

**Identifikation transkriptioneller Alterationen
menschlicher Tumoren und Entwicklung eines
neuen auf RNA-Transfer basierenden Verfahrens
zur Bestimmung der Genfunktion**

**Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“**

**Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz**

**Carolin Bell
geb. am 06.01.1976 in Siegen**

Mainz, 2004

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 01.12.2004

Für einen wunderbaren Großvater

Zusammenfassung

Targetierte und wissensbasierte Therapien werden als vielversprechende Behandlungskonzepte für Krebserkrankungen angesehen. Die Grundlage für diese ist die Verfügbarkeit von Zielstrukturen, die nicht in Normalgeweben aber in neoplastischen Zellen angeschaltet sind und die Kenntnis ihrer funktionellen Rolle im zellulären Geschehen. Vor diesem Hintergrund waren die Zielvorgaben der vorliegenden Arbeit die Identifikation neuer selektiv in Tumoren aktivierter Gene sowie die Entwicklung eines methodischen Prozesses, um die molekularen Effekte der fehlerhaften Aktivierung solcher Gene zu untersuchen.

Für die erste Fragestellung haben wir zwei komplementäre Methoden entwickelt. Zum einen haben wir nach neuen Mitglieder der Cancer/Germline (CG) Familie von Genen gesucht, die bereits attraktive Zielstrukturen laufender Phase I/IIa Studien sind. Zu diesem Zweck wurde ein bioinformatischer Data Mining Ansatz generiert. Dieser führte zur erfolgreichen *in silico* Klonierung neuer CG Gene. Interessanterweise waren unter diesen, im Gegensatz zu den bisher mit anderen Techniken gefundenen, auch Oberflächenmoleküle, die somit nicht nur für antigen-spezifische Vakzinestrategien sondern auch für monoklonale Antikörperansätze genutzt werden können.

Zur Identifikation von in Tumorzellen überexprimierten Genen nutzten wir einen cDNA Mikroarray mit 1152 ausgewählten Genen mit direkter oder indirekter tumorimmunologischer oder tumorbiologischer Relevanz. Die komparative transkriptionelle Untersuchung von humanen Tumor- und Normalgeweben mit diesem Array führte zur Wiederentdeckung bereits bekannter, aber auch zur Aufdeckung bisher nicht beschriebener tumor-assoziiertes Transkriptionsveränderungen. So war das bisher noch wenig charakterisierte Gen HSPC150 eines derjenigen, die die beste Diskriminierung zwischen Tumoren und Normalgeweben ermöglichte.

Der zweite große Schwerpunkt dieser Arbeit war die Technologieentwicklung eines versatilen Prozesses zur Untersuchung von molekularen Effekten eines solchen aberrant in Zellen exprimierten Gens. Zur Simulation dieser Situation stellten wir *in vitro* transkribierte RNA dieses Gens her und elektroporierten diese in Zielzellen. Transkriptionsanalysen solcher Transfektanden mit *Affymetrix Oligonukleotid Mikroarray* deckten auf gesamt-genomischer Ebene ganze Kaskaden konsekutiver, transkriptioneller Alterationen auf. Zum konzeptionellen Beweis untersuchten wir die Effekte der Expression des SYT-SSX2 Fusionskonstruktes, das als kausativ für Synovialsarkome angesehen wird. Die differentiell exprimierten Gene, die wir in den Transfektanden fanden, ließen sich auch als endogen in Synovialsarkomproben dysreguliert verifizieren.

Somit wurden in dieser Arbeit Techniken etabliert, die nicht nur die Neuentdeckung tumorrelevanter Gene ermöglichen. Sie erlauben auch eine erste Kartierung ihrer molekularen Effekte und bieten somit eine erste Grundlage zur hypothetischen Erarbeitung ihrer Funktion und haben somit ein substantielles Potential für funktionelle Genomik bei Tumoren.

Summary

Targeted and knowledge based therapies are considered as promising therapeutic modalities for cancer. The basis for them is the availability of target structures restricted to neoplastic cells and the knowledge of their functional role in cells. The objective of this doctoral thesis was the discovery of such genes selectively activated in cancer cells, and the development of a technological process for the analysis of molecular effects of such an erroneous gene activation.

For the first objective two complementary methods were developed. For the one, we were interested in new members of the Cancer/Germline (CG) familie of genes, which are already attractive target candidates currently tested in Phase I/IIa studies. For this purpose we generated a bioinformatic data mining approach. This resulted in successful *in silico* cloning of novel CG genes. Surprisingly, in contrast to those CG genes found by other discovery strategies, surface antigens were among them, which would also be eligible for antibody therapies in addition to vaccine approaches.

For the identification of genes overexpressed in tumor cells we resorted to a microarray representing 1152 genes, selected due to their direct or indirect tumorbiological or tumorimmunological relevance. The comparative transcriptional profiling of tumor and normal tissues with this array resulted not only in rediscover of known tumor-associated alterations but also in the identification of new ones. Among the latter was HSPC150 which discriminates with high significance between healthy and neoplastic cells.

The second major objective of this project was the technological development of a versatile process for the analysis of molecular effects of such an aberrant expression of a defined gene. For simulation of this situation we generated *in vitro* transcribed RNA of this gene and electroporated it in cells. Transcriptional analysis of such transfectands with *Affymetrix Oligonukleotid Mikroarray* allowed mapping of entire cascades of consecutive transcriptional alterations. For a proof of concept, we assessed in this system the SYT-SSX2 fusion construct, which is perceived as the causative defect in synovial sarcoma. The genes we found as differentially expressed in the transfectands were confirmed as being dysregulated in synovial sarcoma as well.

In summary, we established techniques, which not only allow discover of novel tumor relevant genes. They also allow a preliminary mapping of molecular effects and thus form the basis for a hypothesis-oriented determination of gene function and have a substantial potential for functional genomics of tumors.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Molekulare Identifizierung tumorassoziierter Genprodukte.....	1
1.2	Die Klasse der Cancer/Germline Antigene bzw. Gene.....	2
1.3	<i>In silico</i> Klonierung zur Identifikation neuer selektiv exprimierter Gene.....	4
1.4	Mikroarrayanalyse zur Identifikation neuer selektiv exprimierter Gene.....	5
1.5	Funktionsanalyse tumorassoziierter Transkripte.....	7
1.6	Ziele der vorgelegten Arbeit.....	9
2	MATERIAL UND METHODEN	10
2.1	Material.....	10
2.1.1	Chemikalien und Enzyme.....	10
2.1.2	Geräte.....	12
2.1.3	Kits.....	12
2.1.4	Antikörper.....	13
2.1.5	Puffer und Lösungen.....	13
2.2	Methoden.....	19
2.2.1	Computationale Methoden.....	19
2.2.1	Expressionsanalyse.....	21
2.2.3	Herstellung der Vektoren.....	30
2.2.4	Verifizierung der Daten auf Proteinebene.....	33
2.2.5	Basismethoden.....	35
2.2.6	Zellmaterialien.....	39
3	ERGEBNISSE	42
3.1	Neue tumor-selektiv exprimierte Gene der Cancer/Germline Gen Klasse.....	42
3.1.1	Identifizierung von Kandidatengenen durch Datenbanksuche.....	42
3.1.2	Charakterisierung der neuen CG Gene.....	47
3.1.3	Deteminierung von unterscheidenden Klassen-prädiktoren für strikt keimzellspezifische Gene versus CG Gene.....	49
3.2	Neue in Tumoren überexprimierte Gene.....	58
3.2.1	Technische Etablierung und Durchführung der vergleichenden Transkriptomanalyse von Tumoren und Normalgeweben.....	58
3.2.2	Clusteranalysen zur Überprüfung der Integrität der erhobenen Daten	65
3.3	Etablierung einer Methode zur funktionellen Charakterisierung neuer selektiv in Tumorzellen exprimierter Gene	75
3.3.1	Etablierung der experimentellen Bedingungen und Charakterisierung des experimentellen Systems.....	75
3.3.2	IVT RNA Transfektion von Modellgenen.....	82

3.3.3	Untersuchung der Effekte der ekto- pen Expression von SYT-SSX1 und SYT-SSX2 Fusionsgenen.....	91
3.3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	102
4	DISKUSSION	103
4.1	Identifizierung von keimzellspezifischen Genen mit tumor- biologischer Relevanz	104
4.1.1	Klonierung neuer CG Gene durch <i>Data Mining</i> von Sequenz- Datenbanken.....	104
4.1.2	Prädiktoren für ekto- p in Tumoren exprimierte keimzellspezifische Gene.....	107
4.2	Identifizierung von in Tumoren überexprimierten Genen mit Hilfe von cDNA-Mikroarrays.....	109
4.3	Etablierung eines Gentransfers basierend auf IVT RNA zur funktionellen Charakterisierung von Genen	113
4.3.1	Technische Eigenschaften des IVT RNA Transfers.....	113
4.3.2	IVT RNA Transfektion von Modellgenen.....	114
4.3.2	Untersuchung der molekularen Effekte von SYT-SSX Fusionsproteinen.....	117
5	LITERATUR	122

ANHANG

PUBLIKATIONEN

Abkürzungen:

Acetyl-CoA, acetyl-coenzym A
ATP, adenosin-tri-phosphate
BCA, blue chemiluminescence analysis
BSA, bovine serum albumin
CD, cluster of differentiation
cDNA, copy desoxy ribo nucleic acid
CDS, coding sequence
CG Gen, Cancer/Germline gene
CT Gen, Cancer/Testis gene
CTL, cytotoxic T-Lymphocyte
DAC, 5'Aza-2-Deoxycytidine
DC, dendritic cells
DEPC, Diethylpyrocarbonat
DFO, Desferrioxamine
DKO, double knock out
DMEM, dulbeccos modified eagle medium
DNA, desoxy ribo nucleic acid
DNMT, DNA (cytosine-5-)-methyltransferase
dNTP, di nucleicacid tri phosphate
dsRNA, double-stranded RNA
DTT, Dithiothreitol
EDTA, Ethylendiamintetraacetat
EGFP, enhanced green fluorescence protein
EST, expressed sequence tags
FCS, fetal calf serum
FITC, Fluorescein-iso-thio-cyanat
GITC, Guanidinisothiocyanat
GM-CSF, granulocyte macrophage colony stimulating factor
IL, Interleukin
LB, Luria-Bertani
LDHC, lactat dehydrogenase C
MACS, magnetic cell sorting
MCS, multiple cloning site
MEM, minimal essential medium
MHC, major histocompatibility complex
mRNA, messenger ribo nucleic acid
NAD, Nikotin-amid-adenin-dinukleotid
NADH, Nikotin-amid-adenin-dinukleotid hydrogen
ODF, outer dense fibers
ORF, open reading frame
PBMC, peripheral blood monocytes

PBS, phosphate buffered saline

PE, phycoerythrin

RDA , redundancy analysis

RMA, robust multichip analysis

RNA, ribo nucleic acid

RT-PCR , reverse transcription polymerase chain reaction

SAM, statistical analysis of microarrays

SEREX, serological expression cloning of human tumor antigens

ssRNA, single-stranded RNA

TAE, Tris-Acetate-EDTA

1 Einleitung

1.1 Molekulare Identifizierung tumorassoziierter Genprodukte

Eines der Kardinalziele der Tumorbiologie ist die Identifizierung tumorassoziierter Alterationen. Nach der Zufallsentdeckung zellulärer Onkogene bei der Suche nach Tumoviren (Stehelin et al., 1976), bestand die erste systematische Klonierungsstrategie in der Transfektion von Fibroblastenkulturen mit der DNA karzinogen behandelter Zelllinien. Die Transfektanden mit transformiertem Phänotyp (Shih et al., 1979) wurden analysiert, um Erkenntnisse über die zugrundeliegenden Mechanismen bei der Tumorentstehung zu gewinnen. Mittlerweile stehen eine ganze Reihe neuer Verfahren zur Untersuchung tumor-assoziierter Veränderungen zur Verfügung. Zu ihnen gehören Differential Display, subtraktive Hybridisierung, RDA (redundancy analysis) bis hin zu den Technologien der Genomics-Ära wie Mikroarrays. Mit diesen konnten eine Vielzahl von Genen aufgedeckt werden, deren *loss* oder *gain of function* mit der Entstehung von Tumoren in Zusammenhang gebracht wird.

Die maligne Transformation einer normalen Ursprungszelle in eine Tumorzelle ergibt sich aus dem Zusammenspiel vieler molekularer Veränderungen. Diese möglichst umfangreich und systematisch zu kartieren wird zu einem Erkenntnisgewinn über die Tumorphathogenese beitragen.

Interessanterweise haben methodische Entwicklungen in der Tumorimmunologie zur Klonierung immuntherapeutisch nutzbarer Zielstrukturen (Boon and Old, 1997) nebenbei unerwartete Einblicke in genotypische und phänotypische Alterationen von Tumorzellen gewährt.

Eine zentrale Zielsetzung der Tumorimmunologie ist die Nutzung von spontan in Krebspatienten auftretenden spezifischen Immuneffektoren zur Klonierung der durch sie erkannten Zielantigene. Durch Expressionsklonierung unter Nutzung sowohl des T-Zell- (van der et al., 1991),(De Plaen et al., 1997) als auch des Antikörperrepertoires (Sahin et al., 1995),(Tureci et al., 1997),(Sahin et al., 1997) von Tumorpatienten sind in den letzten Jahren eine Vielzahl von Antigenen in verschiedenen Neoplasien definiert worden.

Die Immunogenität der entsprechenden Genprodukte ist dabei auf strukturelle und regulatorische Alterationen zurückzuführen. Gleichzeitig können solche molekularen Veränderungen aber auch die Funktion des jeweiligen Genproduktes in potentiell tumorpathogenetisch relevanter Weise modifizieren. Entsprechend ist das Immunsystem ein sensibler Biodetektor für potentiell onkogene Veränderungen.

Dies ist evident für Antigene, die durch bekannte Onkogene kodiert werden, wie amplifiziertes und überexprimiertes Her2/neu, c-myc oder mutiertes p53 (Disis and Cheever, 1996). Aber auch für Proteine, die initial aufgrund einer immunogenen Mutation identifiziert wurden, konnte subsequent die biologische Signifikanz derselben gezeigt werden. So wurden mittels Expressionsklonierung mit tumorspezifischen

zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL)-Klonen Mutationen in der cyclinabhängigen Kinase CDK4 (Wolfel et al., 1995), in β -Catenin (Robbins et al., 1996), sowie der Caspase-8 (Mandrizzato et al., 1997) erstbeschrieben. Mittlerweile wurde erarbeitet, dass die beschriebene Mutation der CDK4 die Bindungsdomäne ihres Inhibitors, des Zellzyklusregulators p16, zerstört. Dies führt zu unkontrolliertem Wachstum dieser Zellen (Zuo et al., 1996). Das streng regulierte β -Catenin wird durch die Ser47 Mutation aberrant stabilisiert (Rubinfeld et al., 1997). Durch diese konstitutionelle Aktivierung bindet es an die Transkriptionsfaktoren Lef und TCF und trägt zur Dysregulation der Zellwachstumskontrolle bei. Die mutierte Caspase-8 dagegen hat eine reduzierte proapoptotische Aktivität.

Mit den beschriebenen tumorimmunologischen Klonierungsverfahren wurde aber auch eine ganz neue Genklasse aufgedeckt. Ihre Mitglieder sind dadurch gekennzeichnet, dass das unmodifizierte Wildtyp-Genprodukt in der normalen Ursprungszelle streng silenziert, in Tumorzellen jedoch aberrant aktiviert ist. Anders als mutierte und überexprimierte Genprodukte, deren Wildtypallel auch in gesunden Zellen gefunden wird, sind diese Genprodukte somit hochselektiv für Tumorzellen und lassen sich per sensitiver RT-PCR in keinem Normalgewebe bis auf Testis nachweisen. Aufgrund dieses charakteristischen Expressionsmusters wurde die Bezeichnung Cancer/Testis (CT) Gene geprägt. Durch Verfügbarkeit von monoklonalen Antikörpern konnten mittlerweile die Keimzellen in testikulärem Gewebe als die exprimierende Population für CT Gene identifiziert werden (Chen and Old, 1999),(Old and Chen, 1998),(Old, 2001),(Tureci et al., 2001), sodass sich mittlerweile auch der Begriff der CG (Cancer/Germline) Gene etabliert hat.

1.2 Die Klasse der Cancer/Germline Antigene bzw. Gene

Die ersten CG Antigene und die sie kodierenden CG Gene wurden unter Nutzung spezifischer CTLs kloniert (van der et al., 1991), die aus Tumorpatienten isoliert worden sind und nur Tumorzellen aber nicht Normalzellen lysierten. Weitere wurden durch das SEREX-Verfahren gefunden (Sahin et al., 1995),(Chen, 2000),(Chen et al., 1997),(Scanlan et al., 1998). Dieses beruht auf der Nutzung zirkulierender Autoantikörper aus Seren von Tumorpatienten zum Immunscreening von aus Tumoren hergestellten Expressionsbanken. Zu der Klasse der CG Antigene (Chen et al., 1997),(Tureci et al., 1998) zählen unter anderem die Antigene MAGE (van der et al., 1991), GAGE (Van den et al., 1995), BAGE (Boel et al., 1995), SSX-2/HOM-MEL-40 (Tureci et al., 1996), NY-ESO-1 (Chen et al., 1997), und HOM TES-14/SCP1 (Tureci et al., 1998). Mittlerweile sind 44 Gene oder Genfamilien als CG Gene beschrieben (Scanlan et al., 2004). Alle diese Gene weisen das klassische Expressionsspektrum auf d.h. keine Expression in Normalgeweben außer Testis aber Expression in diversen Tumorentitäten. Die meisten CG Gene sind auf dem X-Chromosom lokalisiert. In

immunhistochemischen Untersuchungen ist in einem Teil der Tumorproben nur ein geringer Anteil von Zellen positiv für das untersuchte CG Antigen (Jungbluth et al., 2000), während andere Tumoren ein sehr homogenes Muster aufweisen. Für einige CG Gene ist gezeigt, dass die Methylierung von *CpG islands* im Promotorbereich für ihre transkriptionelle Repression in allen somatischen Geweben verantwortlich ist. Tumorassoziierte Hypomethylierung scheint bei der ektopen Aktivierung in Tumorzellen eine Rolle zu spielen (De Smet et al., 1999c),(Gartler and Goldman, 1994),(Jones, 1986),(Wachsmann, 1997),(Versteeg, 1997). Die molekularen Mechanismen der aberranten Aktivierung von CG Genen in Tumoren sind allerdings noch nicht im Detail verstanden.

Die zunehmende Anzahl von CG Genen zeigt, dass es sich nicht um singuläre Ereignisse handelt, sondern dass ganze keimzellspezifische Programme in Tumoren aktiviert werden. Entsprechend ist eine biologische Relevanz dieser Veränderungen zu vermuten. Diese, wie auch die funktionelle Rolle einzelner CG Gene, sowie die molekularen Auswirkungen bei ektopter Expression in somatischen Zellen im Rahmen der malignen Transformation sind allerdings bisher noch nicht verstanden.

Erste Hinweise gibt es derzeit lediglich für das CG Gen SYCP1 (synaptonemal complex protein 1). Dieses ist Teil des synaptonemalen Komplexes und während der Prophase der Meiose I beteiligt an der Paarung von homologen Chromosomen in der Äquatorialplatte, ihrer Rekombination, sowie ihrer Migration an die diametralen Pole der sich teilenden Zelle (Meuwissen et al., 1992),(Tureci et al., 1998). Durch heterologe Expression konnten Anhaltspunkte gewonnen werden, dass die ektope Expression von SYCP1 in nicht meiotischen Zellen Aneuploidie induziert (U.Sahin, persönliche Mitteilung).

Für andere CG Gene lassen sich selbst die physiologischen Funktionen lediglich anhand von auffälligen Domänen hypothetisieren. Ein Beispiel ist SSX2 (synovial sarcoma, X breakpoint 2), das eine transkriptionell reprimierende KRAB-Domäne enthält. Die meisten CG Gene allerdings wie z.B. NY-ESO-1/LAGE-1, die Mitglieder der MAGE-, BAGE- und GAGE-Familien, sind funktionell gar nicht charakterisiert.

Das selektive tumor-assoziierte Expressionsprofil macht CG Antigene zu attraktiven Zielstrukturen für therapeutische Ansätze. Mittlerweile sind eine Reihe von immunogenen Peptidpitopen von CG Antigenen bekannt, die von zytotoxischen T-Zellen oder T-Helfer-Zellen erkannt werden (Jager et al., 2000c),(Gnjatic et al., 2002). Ihre Verfügbarkeit war die Grundlage für die Initiierung einer Reihe von immuntherapeutischen Phase I/IIa Studien zur Vakzinierung von Tumorpatienten.

So wurden HLA-A1 positive Patienten mit metastasierenden Melanomen mit MAGE-A3 (melanoma antigen, family A, 3) Peptiden vakziniert. Bei sieben von 25 Patienten wurde eine Tumorregression bis hin zur vollständigen Remission erreicht (Marchand et al., 1999). Auch mit dem CG Antigen NY-ESO-1 werden erste klinische Studien durchgeführt. So wurde durch Immunisierung mit einem NY-ESO-1 derivierten HLA-A2-restringierten Peptid in vier von sieben Patienten eine peptid-spezifische CD8⁺-T-

Zellantwort hervorgerufen. Diese resultierte sowohl in einer Stabilisierung der Erkrankung, als auch in der Regression einzelner Metastasen (Jager et al., 2000b). Entsprechend ist einer der primären Beweggründe für die Suche nach weiteren Mitgliedern der CG Gen Klasse der Wunsch nach Erweiterung des Repertoires potentiell therapeutisch nutzbarer, spezifischer Zielstrukturen.

Die Erkenntnis, dass es sich hier im Grunde genommen um testis- bzw. keimzellspezifische Differenzierungsantigene handelt, hat zur Erarbeitung neuer Strategien geführt. So führte das Screening von cDNA-Expressionsbanken, die anstatt aus Tumoren aus Testisgewebe generiert wurden mit Seren von Tumorpatienten zur Identifizierung z.B. von SYCP1 und CT8 (Tureci et al., 1998),(Tureci et al., 2002). Auch wurden Strategien entwickelt, die den Einsatz von immunologischen Sonden gänzlich aufgeben und auf RDA (Hubank and Schatz, 1994),(Lisitsyn et al., 1993) bzw. einfachen *in silico* Klonierungsverfahren beruhen (Scanlan et al., 2002). Dies führte u.a. zur Identifizierung von LAGE-1 (Lethe et al., 1998), BRDT (Scanlan et al., 2000), MAGE-C1 (Lucas et al., 1998) , CT10 (Gure et al., 2000) .

1.3 *In silico* Klonierung zur Identifikation neuer selektiv exprimierter Gene

Die Fülle der öffentlichen Datenbanken wie z.B. GenBank/NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), Human Gene Index TIGR (www.tigr.org), I.M.A.G.E. (www.image.llnl.gov) mit verfügbaren annotierten Sequenzinformationen zu Volllänge-Genen wie auch EST (expressed sequence tags) bilden eine gute Basis für *in silico* bzw. *virtuelle* Klonierung (Krizman et al., 1999). In Entwicklung befindliche Data Mining Strategien erlauben, aus der Gesamtheit der öffentlich verfügbaren Sequenzen Teilmengen zu extrahieren. Solche Teilmengen können beispielsweise durch definierte *keywords* als Suchkriterien charakterisiert sein. Sie können sich aber auch durch Abfragen mittels Bool'scher Operatoren (UND, ODER, ABER NICHT) aus relationalen Datenbanken ergeben, die Gensequenzsammlungen beinhalten. So lassen sich experimentelle Techniken wie Subtraktive Hybridisierung bzw. Differential Display digital simulieren (Scheurle et al., 2000). Hierbei wird auf Datenbanken der öffentlichen Domäne zugegriffen, in denen die Gesamtheit der Sequenzen aus individuellen Normal- und Tumorgewebebanken, getrennt nach ihrer Gewebeherkunft, verwaltet werden (www.tigr.org) (Cocea, 1997). Diese ESTs sind Sequenzfragmente und keiner spezifischen und funktionell definierten Genidentität zugeordnet (Adams et al., 1991),(Krizman et al., 1999). Subtrahiert man von der Gesamtheit der aus Expressionsbanken einer definierten Tumorentität sequenzierten Klone alle Klone, aus Expressionsbanken des entsprechenden Normalgewebes, so sollte die verbleibende Teilmenge angereichert sein mit tatsächlich tumorspezifischen Kandidatengenen.

Variationen dieses Ansatzes erlauben es, Cancer/Germline Gene aber auch Angehörige beliebiger anderer Genklassen zu entdecken.

Aufgrund einer Reihe technologischer und bioinformatischer Limitationen ist die praktische Umsetzung dieses Konzeptes nicht trivial, wird aber bereits erfolgreich angewendet (Bera et al., 2002),(Vasmatzis et al., 1998).

Im Anschluss an die virtuelle Identifizierung tumor-assoziiertes Gene wird deren spezifische Expression in *wet bench* Experimenten validiert. Des Weiteren lassen Literaturrecherchen und Similaritätsanalysen zu bereits bekannten Genprodukten Rückschlüsse auf die mögliche Funktion zu und geben Anhaltspunkte für eine potentielle therapeutische Nutzbarkeit.

1.4 Mikroarrayanalyse zur Identifikation neuer selektiv exprimierter Gene

Neben dem Einsatz von *in silico* Klonierungsverfahren stellen Mikroarrays eine weitere innovative Möglichkeit dar, selektiv exprimierte Gene zu finden.

Mikroarrays ermöglichen das parallele und schnelle Monitoring der Expression großer Anzahlen von Genen (Schena et al., 1998). Die Mächtigkeit, insbesondere von hochdichten (High-Density, HD) Mikroarrays, beschränkt sich nicht nur auf den summativen Effekt der simultanen Untersuchung multipler Gene im Sinne eines genomspannenden Expressionsprofils. Vielmehr erlaubt die große Informationsdichte die Generierung von Metainformation durch Einsatz von potenten computationalen Methoden zur Extraktion von Mustern und Clustern aus massiven Datensätzen (Zweiger, 1999). Entsprechend werden gesamtgenomische Transkriptionsanalysen mittels HD Mikroarrays für diversifizierte Fragestellungen, so auch für die Identifizierung differentiell in Tumoren exprimierter Gene eingesetzt (Welsh et al., 2001),(Wellmann et al., 2000). Dies erschließt nicht nur einen molekularen Ansatz zur Taxonomie von Tumoren (Golub et al., 1999) über die bisher bestehende histologische Klassifikation hinaus, sondern kann auch konkrete therapeutische Implikationen haben (Alizadeh et al., 1999),(Pomeroy et al., 2002),(t Veer et al., 2003).

Der in dieser Arbeit genutzte Affymetrix *Human Genome U133A* Array hat ein solches hochdichtes Format.

Ist die Untersuchung eines definierten Sets an ausgewählten Genen in einem kleineren Multiplex-Ansatz erwünscht, werden mitteldichte (medium density, MD) Mikroarrays eingesetzt. In diese Kategorie fällt der in dieser Arbeit genutzte *OncImmunoChip* der Firma Memorec Biotec GmbH, Köln.

Eine Limitation des Systems stellt die Bewertung der molekularen Alterationen hinsichtlich ihrer Authentizität wie auch ihrer tatsächlichen Relevanz für die Tumorphagenese dar. Mit Hilfe von Mikroarrays ist es zwar möglich eine Vielzahl von differentiell exprimierten Genen zu identifizieren, aber ein solches System birgt auch

immer die Gefahr, durch die Wahl der Kontrolle sowie durch die Nutzung von Mischgeweben, oder pathologisch schlecht charakterisierten Geweben nicht relevante Gene zu detektieren. Die Assoziation der identifizierten tumor-assoziierten Gene mit der Tumorzelle muss mit unabhängigen Methoden verifiziert werden.

Die Induktion oder Ausschaltung von Genen kann neben den gewünschten, spezifischen Effekten auch zu einer Reihe unspezifischer Veränderungen führen, die ohne Relevanz für den Tumor sind. Letztere treten oft sekundär und später auf und sind instabil. Ein starkes Indiz für eine tumorätiopathogenetisch relevante Veränderung ist das Auftreten dieser bei einem hohen Anteil von Patienten mit dem entsprechenden Tumortyp und das Vorhandensein bereits in frühen Stadien. Ein Beispiel für eine solche molekulare Alteration ist das Fusionsgen SYT-SSX, das in >90% der Synovialsarkome vorkommt (Clark et al., 1994; Crew et al., 1995).

Die chromosomale Translokation t(X;18)(p11.2;q11.2) (Clark et al., 1994; Crew et al., 1995) mit der Fusion zwischen dem SYT-Gen und einem Mitglied der SSX-Familie gilt als prognostischer Marker in diesen Tumoren (Turc-Carel et al., 1986).

SYT ist auf Chromosom 18 lokalisiert und wird abundant in nahezu jedem Gewebe exprimiert (de Bruijn et al., 1996). Es kodiert für ein nukleäres transkriptionsaktivierendes Protein, welches in die aktive Kontrolle der Zelladhäsion involviert ist (Eid et al., 2000). SYT bindet in Zellen, die in der G1-Phase arretieren an p300. Durch die Bindung kommt es zur Aktivierung von β_1 -Integrin und damit zur verbesserten Zelladhäsion (Eid et al., 2000). Die Verbesserung der Zelladhäsion durch SYT ist durch die C-terminalen 8 Aminosäuren bedingt. Dieser Bereich geht bei Fusion verloren. Die Bindung an p300 kann zwar trotzdem erfolgen, aber sie bewirkt dann eine Inhibition der Zelladhäsion (Eid et al., 2000).

Die X-chromosomalen SSX-Gene, werden zu einer Familie mit sechs homologen Mitgliedern zusammengefasst (Crew et al., 1995; Tureci et al., 1996; Gure et al., 1997). Die Familienmitglieder SSX1, SSX2, SSX4 sind normalerweise lediglich in Keimzellen exprimiert und als Fusionspartner beim Synovialsarkom beschrieben (Crew et al., 1995), (Skytting et al., 1999). Auffällig in der Sequenz dieser Gene sind zwei transkriptionsreprimierende Domänen, die N-terminale KRAB-Domäne (Witzgall et al., 1994; Margolin et al., 1994) und die C-terminale SSXRD-Domäne (Lim et al., 1998).

Bei der Fusion von SYT und SSX geht die KRAB-Domäne von SSX verloren und wird durch die transkriptionsaktivierende Domäne QPGY des SYT-Gens ersetzt (Brett et al., 1997) (Abb. 4.2). Dadurch, dass das Fusionsgen den konditional aktiven Promotor des SYT nutzt, sind nun die durch das SSX beigetragenen Domänen aberrant in Zellen aktiviert, in denen sie sonst nicht exprimiert werden. Interessanterweise kann die ektopre Aktivierung von SSX Genen neben der Rekrutierung des konditional aktiven SYT-Promotors auch durch Demethylierung des eigenen Promotors erfolgen. Entsprechend verhalten sich SSX1, SSX2 und SSX4 als CG Gene.

Die entstehenden Fusionsgene besitzen demnach sowohl eine transkriptionsaktivierende, als auch eine transkriptionsreprimierende Domäne, was

eine Vorhersage ihrer Funktion schwierig macht. Eine Dysregulation von Zielgenen könnte jedoch die Folge sein.

In Transaktivierungsassays konnte gezeigt werden, dass die Fusionsgene SYT-SSX im Vergleich zum Wildtyp SYT-Gen eine um den Faktor 7 verringerte Aktivität aufweisen (Brett et al., 1997).

SYT wie auch SYT-SSX interagieren mit BRM, einer Komponente des SWI/SNF Komplexes, der eine Rolle bei der Chromatinorganisation spielt (Thaete et al., 1999). Der SWI/SNF Komplex ist ein negativer Wachstumsregulator und potentieller Tumorsuppressor (Versteeg et al., 1998; Wong et al., 2000; Reyes et al., 1998; Gebuhr et al., 2000). Durch die Interaktion von SYT-SSX mit dem SWI/SNF Komplex wird die Nukleosomenstruktur verändert und damit die Aktivität von SWI/SNF inhibiert. Des Weiteren bewirkt die Histonbindungskapazität von SYT-SSX eine Blockierung der Interaktion des SWI/SNF Komplexes mit den Core-Histonen (Kato et al., 2002).

Obwohl die Translokation seit nunmehr einer Dekade bekannt ist, gibt es bisher nur Anhaltspunkte zur Funktion der entstehenden Fusionsgene und fragmentarische Einblicke in nachgeschaltete molekulare Veränderungen. Eine Bestimmung der molekularen Alterationen durch die heterologe Expression von SYT-SSX fehlt bisher.

1.5 Funktionsanalyse tumorassoziierter Transkripte

Mit der Fertigstellung des ersten Entwurfs der Sequenzierung des humanen Genoms besteht die nächste Herausforderung darin, von der deskriptiven Genomforschung in die funktionelle Genforschung voranzuschreiten (Fields et al., 1999). So gilt es auch die Funktionen der von uns identifizierten, selektiv exprimierten Gene, sowie ihre Bedeutung für diverse Zustände aufzudecken.

Die molekularen und zellulären Veränderungen, die sich nach der Ein- oder Ausschaltung z.B. von SYT-SSX Genen in einer Zelle einstellen, können wichtige Aufschlüsse über seine Funktion geben.

Für das gezielte Ausschalten eines Gens hat sich in den letzten Jahren die Verwendung von Antisense-RNA durchgesetzt. Die Antisense-RNA bindet nach den Regeln der Komplementarität sequenzspezifisch an die natürlich transkribierte mRNA ihrer Zielsequenz. Hierdurch wird die Translation gezielt inhibiert. Diese Methode wurde zunächst in Prokaryoten beschrieben (Green et al., 1986). Mittlerweile erlaubt sie eine schnelle, transiente, posttranskriptionelle Silenzierung jedes beliebigen Gens in einer Vielzahl von eukaryotischen Zelltypen (Izant and Weintraub, 1985) und wird vielseitig verwendet.

So wurde z.B. in einer Studie das Fusionsgen SYT-SSX2 in einer Synovialsarkomzelllinie gezielt durch Antisense-RNA ausgeschaltet und die Veränderungen in der Genexpression anhand eines cDNA-Mikroarrays ermittelt. XRCC4 wurde in diesem Ansatz als SYT-SSX Zielgen identifiziert (Xie et al., 2003).

XRCC4 ist in das NHEJ DNA-Reparatursystem involviert (Roth and Gellert, 2000). XRCC4 defiziente Mäuse weisen eine massive Apoptose von Zellen während der Entwicklung des Nervensystems auf. Die Embryos sind wachstumsgestört und Fibroblasten zeigen eine deutlich verminderte Proliferation und eine premature Alterung (Gao et al., 2000).

Neben dem Einsatz von Antisense-RNA gewinnt die Methode der RNAi (RNA Interferenz) immer mehr an Bedeutung für die gezielte Ausschaltung von Genen. Hierbei wird kurze (~21bp) doppelsträngige RNA in die Zellen eingebracht, die spezifisch mit der Zielsequenz interagiert. Dadurch wird ein Multiprotein-Komplex aktiviert, der zum frühzeitigen Abbau transkribierter mRNA führt, bevor diese translatiert werden kann (Hammond et al., 2000). Allerdings kann siRNA durch Aktivierung des Interferonsystems, durch Induktion der von doppelsträngiger RNA abhängigen Protein Kinase Antwort (PKR) (Elbashir et al., 2001; Caplen et al., 2001) oder durch eine konzentrationsabhängige Stimulierung oder Repression von nicht targetierten Genen (Persengiev et al., 2004) auch unspezifische Effekte hervorrufen. Entscheidende Vorteile der Methode sind allerdings der geringe Zeitaufwand, die Möglichkeit der Analyse von Kinetiken und die Anwendbarkeit der Methode in nahezu allen Zellsystemen. Die oben beschriebenen Ansätze führen zu einem *loss of function* spezifischer Gene und sind insbesondere bei der Charakterisierung von Tumorsuppressoren von Interesse.

Unsere Arbeitsgruppe ist besonders an solchen selektiv in Tumoren exprimierten Genen interessiert, die ektopt aktiviert oder überexprimiert sind. Bei solchen Genprodukten ist es zielführender die Auswirkungen eines *gain of function* zu simulieren. Auch hier stehen eine Reihe alternativer Techniken des Gentransfers zur Verfügung.

So können transiente Transfektanten wie auch stabil transfizierte Zellklone hergestellt werden. Das zu untersuchende Gen kann mittels DNA-Plasmidkonstrukten aber auch mit retro- oder adenoviralen Vektoren in Zellen eingebracht werden. Die Expression des eingebrachten Gens kann konstitutional sein oder über einen regulierbaren Promotor gesteuert werden.

Ein solches induzierbares Promotorsystem wurde beispielsweise angewendet, um die Genexpression in einer Mausfibroblastenzelllinie (3Y1) nach stabiler Transfektion mit einem tetracyclin-induzierbaren SYT-SSX1 Plasmid zu untersuchen. Die Inokulation dieser transgenen Zelllinie in Nacktmäuse führte zum Tumorwachstum und lieferte den ersten Hinweis auf das onkogene Potential des chimären Proteins. Auf molekularer Ebene beschrieben die Autoren eine Reduktion der Tumorsuppressoren WT1 und DCC (Nagai et al., 2001). Systeme mit induzierbaren Promotoren sind allerdings in der Herstellung sehr zeitaufwendig.

Daher wurden auch für den heterologen Gentransfer Ansätze entwickelt, die auf der Nutzung von RNA basieren. Transfer von *in vitro* transkribierter RNA wird derzeit besonders intensiv in der Tumorummunologie erprobt, um Tumorantigene in antigen-

präsentierende dendritische Zellen (DC) einzubringen (Boczkowski et al., 2000; Heiser et al., 2001; Nair et al., 1998).

Das Einbringen des zu untersuchenden Gens in Form von RNA anstelle von DNA weist einige entscheidende Vorteile auf. Während DNA-kodierende Konstrukte zur adäquaten Transkription/Translation bis in den Zellkern eingeschleust werden müssen, muss RNA lediglich in das Zytoplasma der Zellen gelangen. Zum Einen ist somit der RNA Transfer unabhängig von der Teilungsaktivität der zu transfizierenden Zellen. Zum Anderen sind die erreichbaren Transfektionsraten höher (Van Tendeloo et al., 2001; Saeboe-Larssen et al., 2002). Die erzielten Proteinmengen entsprechen denen bei physiologischer Expression. Auch lassen sich kinetische Untersuchungen sehr gut durchführen, weil innerhalb weniger Stunden bereits translatiertes Protein nachweisbar ist und funktionell relevant wird (Van Meirvenne et al., 2002).

Als besonders effizient hat es sich erwiesen, Plasmide zu nutzen, die nicht nur flankierende T7 oder SP6 Promotoren, sondern Polyadenylkassetten enthalten (Boczkowski et al., 1996). In diese wird die cDNA des zu untersuchenden Gens inkloniert, als polyadenyliertes Transkript *in vitro* transkribiert und mit einem Cap versehen. Das Einbringen in Zellen kann durch Elektroporation oder liposomal erfolgen.

1.6 Ziele der vorgelegten Arbeit

Vor diesem Hintergrund war es Ziel dieser Arbeit neue, selektiv in Tumoren exprimierte Gene zu identifizieren. Wir haben uns hier auf CG Gene fokussiert, die eine ektope Expression ausschließlich in Tumoren und Keimzellen aufweisen, sowie auf Gene mit signifikanter Überexpression in Tumoren im Vergleich zu Normalgeweben.

Für die Identifizierung neuer Mitglieder der Klasse der CG Gene sollten *in silico* Ansätze verfolgt und Annotationen in den öffentlich zugänglichen Datenbanken genutzt werden.

Die Identifizierung von Genen, die sich durch eine Überexpression in Tumoren auszeichnen, sollte mittels Mikroarray erfolgen. Hierbei sollten systematische Expressionsvergleiche von Normalgeweben und Tumorgeweben zur Detektion differentiell exprimierter Gene durchgeführt werden.

Neben der Identifizierung neuer potentiell therapeutisch nutzbarer Antigene ist die funktionelle Charakterisierung solcher Gene ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung ihrer Tauglichkeit für Therapieansätze. Diese wird durch technische Limitationen beeinträchtigt. Entsprechend war eine der Hauptaufgaben dieser Arbeit ein System zu etablieren, welches die schnelle funktionelle Charakterisierung tumor-assoziiertes Gene unterstützt. Hierbei sollte die ektope Expression dieser Gene durch RNA Transfer in Zellen simuliert und die konsekutiven molekularen Alterationen subsequent mittels Mikroarrayanalyse kartiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien	Hersteller
Acetyliertes Rinderserumalbumin (BSA)	Invitrogen, San Diego, CA
Agar	Difco, Detroit
Agarose für Elektrophorese	Sigma, St. Louis
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, St. Louis
Ampicillin (Amp)	Sigma, St. Louis
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen
5'-Aza-2'-deoxycytidine (DAC)	Sigma, St. Louis
Benzonase	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolylphosphate Salt (BCIP)	p-Toluidine Biomol, Plymouth, PA
Bromphenolblau	Sigma, St. Louis
Calf intestine alkaline phosphatase (CIAP)	MBI Fermentas, Burlington, ON
Casein-Natrium	Roth, Karlsruhe
DAKO	DAKO Corporation, Carpinteria, CA
Desferrioxamin mesylate (DFO)	Novartis, Basel, Schweiz
Di-nucleicacid tri-phosphate (dNTP)	Invitrogen, San Diego, CA
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, San Diego, CA
Diethylenpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, St. Louis
Distilled water	Invitrogen, San Diego, CA
Dulbeccos modified eagle medium (DMEM)	Invitrogen, San Diego, CA
E coli DNA-Ligase	Invitrogen, San Diego, CA
E.coli DNA-Polymerase I	Invitrogen, San Diego, CA
E.coli RNAse-H	Invitrogen, San Diego, CA
ϵ -Aminocaprinsäure	Sigma, St. Louis
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut 96-100% (v/v) p.A.	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, St. Louis
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Dinatrium	Sigma, St. Louis
Ethylenglycol- bis (β -aminoethylether)-N,N,N',N' tetraacetic acid (EGTA)	Merck, Darmstadt
FACS-Clean	BD, Heidelberg
FACS-Flow	BD, Heidelberg
FACS-Rinse	BD, Heidelberg
Fötales Kälberserum (FCS)	Invitrogen, San Diego, CA
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Glycerin (wasserfrei)	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
GM-CSF	Novartis/Essex Pharma, Base, Schweiz
Herring Sperm DNA	Promega, Mannheim
Hoechst 33342	Molecular Probes, Eugene, OR
Hyperfilm ECL	Amersham bioscience, Uppsala, Schweden
Hot Star Taq-DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden
IgG (Ziege)	Sigam-Aldrich, St. Louis
Interleukin-4	Strathmann Biotech, Hamburg
Isopropanol p.a.	Merck, Darmstadt
Kanamycin (Kana)	Sigma, St. Louis
Kontrolloligo B2	Affymetrix, New York
λ -DNA Eco471 (Avall)	MBI Fermentas, Burlington, ON
Lithiumchlorid	Merck, Darmstadt
Lumi Light	Santa Cruz, Heidelberg
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt

Chemikalien	Hersteller
MES freie Säure Monohydrat	Sigma, St. Louis
MES Natriumchlorid	Sigma, St. Louis
Methanol	Merck, Darmstadt
Minimum essential medium (MEM)	Invitrogen, San Diego, CA
Natriumacetat (3M ; pH 4,5)	Ambion, Austin, Texas
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumacid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid RNase-/DNase free (5M)	Ambion, Austin, Texas
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, St. Louis
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriummolibdat	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	Merck, Darmstadt
Natriumvanadat	Merck, Darmstadt
Nitroblue tetrazolium (NBT)	Biomol, Plymouth, PA
3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid (MOPS)	Sigma, St. Louis
Non-essential amino acids (NEAA)	Invitrogen, San Diego, CA
Orange G	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicillin-streptomycin	Invitrogen, San Diego, CA
PFU Ultra Hot Start	Stratagene, Amsterdam
Phosphate buffered saline (PBS) pH 7,2	Invitrogen, San Diego, CA
Phosphate buffered saline (PBS)	Bio Whittaker Europe, Verviers, Belgien
Poly-L-Lysin	Sigma, St. Louis
Polyethylenglykol (PEG) 6000	AppliChem, Darmstadt
Polyvinylpyrrolidon K15 (PVP)	AppliChem, Darmstadt
Ponceau S	Sigma, St. Louis
Primer	Invitrogen, San Diego, CA
Propidiumiodid	Sigma, St. Louis
Restriktionsendonukleasen	Pharmacia, Freiburg
Rinderserumalbumin (BSA)	Invitrogen, San Diego, CA
RNA Längenstandard (Century Marker)	Ambion, Huntingdon, Cambridgeshire
Roti Load 1	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640	Invitrogen, San Diego, CA
R-Phycoerythrin-Streptavidin	MoBiTec, Göttingen
Saponin	Invitrogen, San Diego, CA
second strand Reaction buffer 5x	Invitrogen, San Diego, CA
20xSSPE	Cambrex, Rutherford, NJ
Sucrose	Merck, Darmstadt
Superfix plus	Tetenal, Norderstedt
Superscript II	Invitrogen, San Diego, CA
T4 DNA-Polymerase	Invitrogen, San Diego, CA
T4 DNA-Polymerase	MBI Fermentas, Burlington, ON
Trichloessigsäure	Merck, Darmstadt
Trishydroxymethylaminomethan (TrisBase)	Sigma, St. Louis
Triton-X 100	Merck, Darmstadt
Trypsin	Invitrogen, San Diego, CA
Trypton	Difco, Detroit
Tween 20	Merck, Darmstadt
Ultrafin SW Negativentwickler	Tetenal, Norderstedt
Water Molecular Biology Grade	Cambrex, Rutherford, NJ
Whatman Papier	Whatman International, Waitstone, England
Yeast-Extract	Difco, Detroit
X-Vivo	Bio Whittaker Europe, Verviers, Belgien
Xylencyanol FF	AppliChem, Darmstadt

2.1.2 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
ABI Prism 7700 Sequence detection system	Applied Biosystems, Foster City, CA
Affymetrix gene chip fluidics station 400	Affymetrix, Santa Clara, CA
Affymetrix gene chip hybridization ofen 640	Affymetrix, Santa Clara, CA
Begasungsbrutschrank	Heraeus instruments, Hanau
BioAnalyzer 2100	Agilent Technologies, Pado Alto, CA
Biofuge pico	Heraeus instruments, Hanau
Capacitance Extender II	BioRad, München
FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop IX 70	Olympus, Hamburg
G2500 Gene Array Scanner	Agilent Technologies, Pado Alto, CA
Gene Pulser II	BioRad, München
Inkubationshaube IST 50	Nectua, Mössingen
Küvetenschleuder	IST, Thorsten Betzel, Hattersheim
MS2 Minishaker	IKA Labortechnik, Staufen
Omnifuge 2:ORS	Heraeus instruments, Hanau
Sicherheitswerkbank herasafe	Heraeus instruments, Hanau
Subcell GT	BioRad, München
Thermocycler T3	Biometra, Göttingen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Mikro 22R	Hettich, Tuttlingen
Ultra Turrax T8	IKA Labortechnik, Staufen
Ultraspec 2100 pro	Amersham Pharmacia, Uppsala Schweden
Vortexer VF2	IKA Labortechnik, Staufen
Zentrifuge 5810	Eppendorf, Hamburg

2.1.3 Kits

Bezeichnung	Hersteller
BCA protein assay kit	Pierce, Rockford, USA
Cytometric Bead Array; human inflammation kit	Becton Dickinson, Heidelberg
mMESSAGE mMACHINE™ T7 Ultra	Ambion, Austin, Texas
Enzo RNA Transcript Labeling Kit	Affymetrix, Santa Clara, CA
Gene Chip Eukaryotic hybridization control kit	Affymetrix, Santa Clara, CA
GeneChip Sample Cleanup Module	Affymetrix, New York
MegaClear	Ambion, Austin, Texas
NucleoSpin Kit	Macherey and Nagel, Düren
Rneasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Ampli Cap SP6 IVT-Kit	EPICENTRE, Madison, WI
SYR Green Kit	Qiagen, Hilden
Superscript II Kit	Invitrogen, San Diego, CA
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, San Diego, CA
TOP10 chemisch-kompetente Zellen Kit	Invitrogen, San Diego, CA
QiaQuick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden

2.1.4 Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
Ziege anti Streptavidin- Bi	Alexis, Grünberg
Ziege IgG, reagent grade	Sigma, St. Louis
Maus anti human VHL IG 32	Clontech, San Jose, CA, USA
Kaninchen anti human cyclin D1	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA
Kaninchen anti GFP	Clontech, San Jose, CA, USA
Maus anti human ERK2 6G11	Nanotools, Teningen
Maus anti human β -actin	Abcam, Cambridge
Maus anti human CD40L	Alexis, Grünberg
Ziege anti Maus HRP	Jackson/ Dianova, Hamburg
Ziege anti Maus HRP	DAKO Corporation, Carpinteria, CA
Ziege anti Kaninchen HRP	DAKO Corporation, Carpinteria, CA
Ziege anti Kaninchen HRP	Jackson/ Dianova, Hamburg
Maus anti CD80 PE	Becton Dickinson, Heidelberg
Maus anti CD83 PE	Becton Dickinson, Heidelberg
Maus anti CD86 FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
Maus anti HLA-DR FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
Ziege anti Maus Cy2	Sigma, St. Louis

2.1.5 Puffer und Lösungen

Blaumarker und Ladepuffer für Agarosegele

0,25%	Bromphenolblau
0,25%	Xylenyanol FF
0,25%	Orange G
1mM	EDTA
40%	Sucrose

- in H_2O_{dest} lösen

DEPC- Wasser

1ml DEPC ad 1l Aqua ad inectibilia

- ü.N. bei Raumtemperatur schütteln
- autoklavieren

MOPS 10x Stammlösung

42,8g	MOPS
6,8g	Na-Acetat
3,7g	EDTA

- einstellen auf pH 7,0

MOPS- Gel (1%)

1,5g	Agarose (für 150ml)
120ml	DEPC- Wasser

- aufkochen bis Agarose sich gelöst hat
- nach Abkühlen auf 55°C Zugabe 15ml 10x MOPS Stammlösung und 15ml 37%iges Formaldehyd

RNA-Probenpuffer:

120µl	10xMOPS
500µl	Formamid
350µl	Formaldehyd 37%ig
150µl	Blaumarker
100µl	Ethidiumbromid

TAE 50x Stammlösung:

242g	TrisBase
57,1ml	Eisessig
100ml	0,5M EDTA pH 8,0

- ad 1000ml H₂O_{dest.}: autoklavieren

TAE-Gel

1,5g	Agarose (für 150ml)
150ml	1xTAE

- aufkochen bis Agarose sich gelöst hat
- nach Abkühlen auf 55°C Zugabe Ethidiumbromid (0,25ppM)

LB-Medium

1%	Trypton
0,5%	Yeast-Extract
1%	Natriumchlorid

- in H₂O_{dest} lösen
- autoklavieren

LB-Agar

1,5%	Agar
------	------

- in LB-Medium lösen
- autoklavieren

Verdünnungs- und Waschpuffer

0,2%	Saponin
2%	FCS
2mM	EDTA

- in PBS lösen

Hybridisierungspuffer

100mM	MES
1M	Natriumchlorid
20mM	EDTA
0,01%	Tween 20

Waschpuffer A

6x	SSPE
0,01%	Tween 20

Waschpuffer B

100mM	MES
0,1M	Natriumchlorid
0,01%	Tween 20

MES-Färbepuffer

100mM	MES
1M	Natriumchlorid
0,05%	Tween 20

SAPE-Färbungslösung

2mg/ml	acetyliertes BSA
10µg/ml	Streptavidin Phycoerythrin (SAPE)
600µl	2x MES Färbepuffer
540µl	Wasser (Gesamtvolumen von 1200µl)

Antikörperlösung für HD Mikroarray

300µl	2x MES- Färbepuffer
2mg/ml	acetyliertes BSA
0,1mg/ml	Normal Goat IgG
3µg/ml	biotinylierter Antikörper
266,4µl	Wasser (Gesamtvolumen 600µl)

Fixationspuffer (ohne Saponin)

2%	PFA
2%	FCS
5mM	EDTA

- in PBS lösen

Fixationspuffer (mit Saponin)

2%	PFA
2%	FCS
5mM	EDTA
0,2%	Saponin

- in PBS lösen

Immunfluoreszenzwaschpuffer und FACS-Puffer

2%	FCS
5mM	EDTA
0,1%	Natriumacid

- in PBS lösen

Immunfluoreszenzwaschpuffer (mit Saponin)

2%	FCS
5mM	EDTA
0,1%	Natriumacid
0,1%	Saponin

- in PBS lösen

FACS-Puffer mit Propidiumiodid

2%	FCS
5mM	EDTA
0,1%	Natriumacid

- in PBS lösen
- Zugabe 10µg / ml Propidiumiodid

Laufpuffer LÄMMLI 10x

144g	Glycin
30,3g	TRIS
10g	SDS

- ad 1l H₂O dest.

Transferpuffer für Western Blot (nach Kyle-Anderson)- Anodenpuffer 1

300mM TRIS pH 9,5

- Anodenpuffer 2

30mM TRIS pH 9,5

- Kathodenpuffer 10x

250mM TRIS

400mM ϵ -Aminocaprinsäure

• vor Gebrauch Mischung:

1 Teil 10x Puffer

7 Teile H₂O dest.

2 Teile Methanol

Lösung für unspezifische Proteinfärbung

2% Ponceau S

• ansetzen in 3 % Trichloressigsäure

Waschpuffer 10x:

0,5M TRIS

3M NaCl

2 % Tween 20

• pH :7,5

1xSDS-Probenpuffer

100mM DTT

50mM TRIS pH:6,8

1% SDS (w/v)

10% Glycerin wasserfrei (v/v)

Blocking-Puffer (CPPT)

0,5% Casein Na (w/v)

1% PEG 6000 (w/v)

1% PVP K15 (w/v)

0,2% Tween 20 (v/v)

50mM TRIS (pH:7,5)

300mM NaCl

Lyse –Puffer für Zellen (ohne Kernlyse)

0,5%	Triton X-100 (v/v)
100mM	LiCl
5mM	MgCl ₂
2mM	EGTA
10mM	NaF
1mM	Na VO ₄
1mM	Na (MoO ₄)

- vor Benutzung je 10ml 1 Tablette Roche complete zugeben

DMEM (Dulbeccos modified eagle medium) komplett

500 ml	DMEM-Medium mit 4500mg Glucose/l
10%	FCS
0,5%	Pen/Strep

MEM (Minimum essential medium) komplett

500 ml	MEM-Medium mit Earls Salzen
10%	FCS
0,5%	Pen/Strep
1%	Non essential Aminoacids
1%	Na-Pyruvat

RPMI komplett

500 ml	RPMI-Medium
10%	FCS
1%	Non essential Aminoacids
1%	Na-Pyruvat
0,5%	Pen/Strep

DC-Medium

1000 U/ml	IL-4
1500 U/ml	GM-CSF

- in X-Vivo

2.2 Methoden

2.2.1 Computationale Methoden

Computational assistierte Methoden wurden auf verschiedenen Ebenen für dieses Projekt genutzt. Zum Einen wurden mit Hilfe eines umfangreichen Data Minings neue Cancer/Germline Gene (CG) durch *in silico* Klonierung identifiziert. Zum Anderen wurden bioinformatische Tools extensiv exploitiert für Sequenz- und Strukturanalysen gefundener Kandidatengene.

2.2.1.1 Identifizierung neuer CG Gene durch genom-umspannende *in silico* Klonierung

Eine Strategie zum Data Mining öffentlicher Datenbanken wurde zur *in silico* Klonierung von neuen CG Genen entwickelt. In der vorliegenden Arbeit wurde das Data Mining beschränkt auf zum Zeitpunkt des Einsatzes (März 2001) in Volllänge bekannte kodierende Sequenzen (geschätzt ~10.000 Genprodukte). Bei Expressed sequence tags (ESTs) handelt es sich um Genfragmente mit unkuratierter Annotation, die sich nicht immer einer spezifischen und funktionell definierten Genidentität zuordnen lassen (Adams et al., 1991; Krizman et al., 1999). Diese wurden in unserem Ansatz nicht berücksichtigt, um die Komplexität zu reduzieren.

Die Rationale des Vorgehens war, elektronisch keimzellspezifische Gene aus den öffentlich zugänglichen Datenbanken zu extrahieren. Diese sollten subsequent auf Expression in Tumoren getestet werden.

Hierzu wurde eine hierarchische *Keyword search* mittels des *ENTREZ Search and Retrieval Systems* des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>) als Portal in *GenBank* genutzt. Mit den Suchworten *testis specific gene*, *sperm specific gene* und *spermatogonia specific gene* in Kombination mit weiteren limitierenden und stringenzerhöhenden Suchspezifikationen wurde auf die *Flat Files* der Geneinträge zugegriffen und die entsprechenden Kandidatengene gelistet. Alle diese wurden anschließend einem elektronischen Northern (eNorthern) unterzogen. Dies bedeutet, dass durch Abgleich von Genen in EST-Datenbanken (dbEST unter www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST) die Gewebedistribution über die Annotation der Gewebeherkunft homolog identifizierter ESTs abgeleitet werden kann. Lediglich Gene ohne Identität zu ESTs aus nicht testikulären Normalgeweben wurden weitergeführt. Redundanzen wurden durch stringenten Homologieabgleich über BLASTN (<http://ncbi.nlm.nih.gov/blast>) gegen alle humanen Nukleotidsequenzen behoben. Auf diese Weise wurde eine Liste potentiell stringent keimzellspezifischer Gene ermittelt.

Ergänzend zu diesem System wurde der *cDNA xProfiler* des *Cancer Genome Anatomy Project* (www.cgap.nci.nih.gov/Tissues/xProfiler) genutzt. Hierbei werden die Genexpressionen zweier Pools von cDNA-Bibliotheken miteinander verglichen. Jeder dieser Pools kann eine singuläre cDNA-Bibliothek darstellen oder aber diverse cDNA-

Bibliotheken. Für jedes Gen, das in einer solchen Bibliothek vorkommt, muss mindestens eine EST-Sequenz in dem UniGene Cluster dieses Gens einen Hit in dem entsprechenden Gewebe aufweisen. In die Suche integriert wurden nur Bibliotheken der Spezies *homo sapiens*. Alle zur Verfügung stehenden EST Bibliotheken, die mehr als 1000 Gene enthalten, wurden für die Suche zugelassen. In den Pool A wurden alle Bibliotheken integriert, die ESTs aus normalem Testis enthalten. Hierbei wurden gemischte Gewebelbibliotheken nicht berücksichtigt. In den Pool B wurden alle Bibliotheken integriert, die aus Normalgeweben mit Ausnahme von Testis und Ovar stammten. Fötale Gewebe wurden ebenfalls nicht zugelassen.

2.2.1.2 Computational assistierte Sequenz- und Strukturanalyse

Für eine umfangreiche Sequenz- und Strukturanalyse stehen eine Reihe öffentlich zugänglicher Tools und Algorithmen zur Verfügung. Der erste Schritt nach einer erfolgreichen Sequenzierung war der Abgleich der erhaltenen Sequenzen gegen die bereits bekannte Sequenz aus der GenBank. Hierzu wird das Modul BLASTN vom NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) genutzt, bei dem entweder die erhaltene Sequenz gegen eine Nukleotidbank abgeglichen wurde, oder der direkte Abgleich zu der bereits bekannten Sequenz möglich ist. Hierdurch ließen sich zum einen Teilsequenzen zu der Vollängesequenz zusammensetzen und zum anderen Basenaustausche bzw. Frameshifts bestimmen. Im Anschluss wurde die zusammengesetzte Vollängesequenz mit Hilfe des *ORF Finders* des NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html) auf einen durchgehenden Leserahmen hin untersucht. Außerdem ließ sich feststellen, ob es sich bei aufgetretenen Basenaustauschen um *silent mutations* handelte, bei denen der Basenaustausch nicht zu einer anderen Aminosäure führt. Ergaben sich nach dieser Analyse verschiedene mögliche Leserahmen, wurden die Sequenzen auf das Vorhandensein einer KOZAK-Sequenz (Kozak, 1996) vor dem potentiellen Startkodon hin untersucht. Nur in dem richtigen Kontext kann das Startkodon als solches effektiv erkannt werden. Die ideale Sequenz für eine mRNA von Vertebraten nach den Kozakkriterien ist: GCC ACC **ATG** G; liegt das potentielle Startkodon in einem von diesem Muster stark abweichenden Kontext vor, dient es vermutlich nicht als Startbeginn der Translation.

Für die Analyse von Spleißvarianten wurde die Vollängesequenz gegen eine genomische Datenbank des NCBI abgeglichen (www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/). Hierdurch lassen sich Exon-Intronübergänge bestimmen.

Die chromosomale Lokalisation wurde über *ENTREZ Genome* (www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez) oder durch *Unigene* des NCBI ermittelt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene>). Die Proteinsequenz wurde abgeleitet mit dem Programm *ORF Finder* des NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html). Zur weiteren Charakterisierung der Proteinsequenz wurde die Aminosäuresequenz nach funktionell definierten Domänen, Motiven und strukturellen Besonderheiten abgesucht. Diese können Hinweise auf spezifische Funktionen geben oder die Zuordnung zu einer Familie funktionell verwandter Moleküle erlauben.

Eine integrierte Beurteilung von Kompartimentalisierungs- und Signalsequenzen erlaubt eine Prädiktion der subzellulären Lokalisation des jeweiligen Proteins (<http://psort.nibb.ac.jp/>). Hydrophobizitäts-Blots (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) oder Chou-Fasman Analysen in Kombination mit Prädiktion von Transmembrandomänen tragen bei zum Verständnis der Membrantopologie von Oberflächenmolekülen.

Auch die Prädiktion der Sekundärstruktur eines neuen Proteins kann durch Similaritätsanalyse mit allen in SWISSPROT (<http://www.expasy.org/sprot/>) verfügbaren Proteinen weiterführende funktionelle Hinweise geben.

Neben solchen allgemeinen bioinformatischen Tools steht eine große Vielzahl von Programmen zur Verfügung, die entsprechend der spezifischen Erfordernisse individueller Genprodukte rekrutiert werden können (siehe auch Pedro's Molecular Tool Books, gea.stanford.edu/luciano/bioservers.html).

2.2.1 Expressionsanalyse

2.2.1.1 RNA-Extraktion

Eine Limitation bei der Arbeit mit RNA ist die hohe Anfälligkeit gegenüber endogenen und exogenen RNAsen. Zur Inaktivierung von RNAsen beziehungsweise Kontaminationsprophylaxe sind deshalb eine Reihe von Maßnahmen notwendig. Hierzu zählt die Verwendung von sterilen Glasgefäßen und Metallgegenständen sowie steriler Plastikware. Alle eingesetzten Lösungen wurden durch die Behandlung mit 0,1%igem Diethylpyrocarbonat (DEPC) von RNAsen befreit (Fedorcsak and Ehrenberg, 1966).

RNA wurde aus Geweben bzw. aus Zellpellets extrahiert, die nach der Gewinnung sofort bei -80°C gelagert wurden. Von dem Gewebestück wurden etwa 50mg zur RNA-Extraktion abgetrennt. Für die RNA-Extraktion aus Zellen wurden 5×10^6 – 1×10^7 Zellen eingesetzt. Die Extraktion der RNA erfolgte mit RneasyMini (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers.

Das Gewebestück bzw. das Zellpellet wurden zunächst in einem stark denaturierenden Puffer der Guanidinisothyocyanat (GITC) enthält aufgenommen und mit Hilfe eines Ultra Turrax homogenisiert. Hierdurch wird eine sofortige Inaktivierung der RNAsen und damit die Isolation von intakter RNA gewährleistet. Um die richtigen Bindungsbedingungen an die Säule herzustellen wurde zusätzlich Ethanol zugegeben. Die Gesamt-RNA kann dann an die Silikamembran binden. Kontaminationen durch z.B. DNA oder Proteine werden in den anschließenden Waschschrritten mit Puffer RW1 bzw. RPE entfernt. Nach Beseitigung von Resten des Puffers RPE, dessen hoher Ethanolgehalt bei nachfolgenden Enzymreaktionen stören würde, wurde die RNA in RNase-freiem Wasser eluiert.

1 μl der extrahierten RNA wurde anschließend in 30 μl RNA-Probenpuffer überführt, für 10min bei 70°C denaturiert und durch Elektrophorese auf einem MOPS-Gel aufgetrennt. Die Banden sollten scharf abgegrenzt sein. Schmierphänomene als

Hinweis auf Degradation sollten nicht vorliegen. Außerdem sollte die 28S-Bande etwa zweifach so stark sein wie die 18S-Bande. Des weiteren erfolgte eine photometrische Vermessung der Proben bei 260 bzw. 280nm. Dadurch wurde zum einen die Konzentration der RNA gemessen und zum anderen die Qualität der RNA durch den Quotienten 260/280 bestimmt. Dieser Quotient sollte zwischen 1,8 und 2,1 liegen. Kleinere Werte deuten auf Proteinkontaminationen hin. Größere Werte deuten auf Degradation hin. Nur RNA-Proben mit entsprechender Qualität und ausreichender Quantität wurden im Folgenden zur reversen Transkription eingesetzt.

2.2.1.2 Reverse Transkription

Die reverse Transkriptase verlängert die als Matrize dienende RNA ausgehend von angelagerten Primern zu einer komplementären, einzelsträngigen DNA. Durch Verwendung eines Poly-dT-Primers wird spezifisch poly-adenylierte mRNA transkribiert. Die so geprimte cDNA (copy DNA) wurde für RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) eingesetzt. Zur Kontrolle der Integrität der synthetisierten cDNA wurde eine PCR für das in den meisten Geweben konstitutiv aber gering abundant exprimierte Gen p53 durchgeführt.

Für Real-Time RT-PCR Analysen wurden Random-Hexamer-Primer verwendet, die, im Gegensatz zum Poly-dT-Primer, an unterschiedlichste Stellen der RNA binden. Dies bietet den Vorteil, dass das cDNA-Produkt besser die gesamte Struktur der RNA widerspiegelt. Zum Anderen wird nicht nur poly-adenylierte mRNA transkribiert, sondern auch 28S RNA und 18S RNA, die zur Normalisierung genutzt werden kann. Neben 18S RNA wurde auch das HPRT Transkript (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase) zur Normalisierung verwendet.

Zur Herstellung der cDNA wurde ein 20µl Reaktionsansatz hergestellt, der sich wie folgt zusammensetzte:

4µl	5x <i>First Strand Synthesis Buffer</i>
2µl	0,1M DTT
3µl	RNAse-freies Wasser
1µl	reverse Transkriptase

1µl	10µM dNTP
1µl	50µM poly-dT(18)Primer
1-8 µl	RNA (bis zu 5µg)
ad H ₂ O	(RNAse-frei) bis zu 10µl

In vorgekühlten Reaktionsgefäßen wurden die entsprechenden Mengen umzuschreibender RNA vorgelegt und mit Wasser, dNTPs und dem Primer gemischt. Dieser Ansatz wurde für 3min bei 70°C denaturiert, um die RNA-Stränge linear und einzelsträngig zu machen. Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt, kurz abzentrifugiert und dann mit 10µl des Gemisches aus Dithiothreitol (DTT), Puffer, Wasser und reverser Transkriptase (Superscript II, Invitrogen, San Diego, CA) versetzt. Die cDNA-Synthese erfolgte bei 42°C für 60min. Daran schloss sich ein weiterer Denaturierungsschritt bei 70°C für 15min an, bei dem die reverse Transkriptase inaktiviert wurde.

2.2.1.3 Polymerase- Kettenreaktion

Die PCR (polymerase chain reaction) erlaubt die selektive Anreicherung definierter Nukleinsäuresequenzen aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen (Mullis et al., 1986). Man nutzt dabei die Eigenschaften von DNA-Polymerasen einen Einzelstrang zum DNA-Doppelstrang zu polymerisieren. Durch Einsatz von zwei komplementären Oligonukleotidprimern (sense und antisense) wurde der gewünschte Bereich amplifiziert. Durch Verwendung thermostabiler DNA-Polymerasen (Saiki et al., 1988) war eine automatisierte Durchführung der PCR in programmierbaren Thermoblöcken möglich. In dreiteiligen Zyklen wiederholten sich die Prozesse der Primeranlagerung, Kettenverlängerung und Denaturierung der DNA-Doppelstränge. Hiermit wurde eine exponentielle Vermehrung der gewünschten Transkripte erreicht.

Die PCR zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität aus, so dass Kontaminationen durch DNA strikt vermieden werden müssen. Geeignete Maßnahmen zur Kontaminationsprophylaxe sind dabei UV-Bestrahlung von PCR-Arbeitsplätzen, Vermeidung der Benutzung jeglicher DNA am PCR-Arbeitsplatz und Verwendung von Pipettenspitzen mit Filtereinsatz zum Schutz vor Aerosol-Kontaminationen (Kwok and Higuchi, 1989).

PCR-Untersuchungen wurden mit HotStar Taq (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Eine Etablierung der spezifischen PCRs erfolgte dabei durch Variieren von Zyklenzahl und Annealingtemperatur. Der Prototyp des Ablaufes der PCR-Reaktion war dabei wie folgt:

- | | |
|-------------------|---|
| 1. 95°C / 15min | Aktivierung des Enzyms |
| 2. 94°C / 1min | Denaturierung |
| 3. 55-70°C / 1min | Annealingtemperatur abh. vom GC-Gehalt der Primer |
| 4. 72°C / 1min | Elongation |
| 5. | zurück zu Schritt 2 und Wiederholung des Ablaufes für 35 Zyklen |
| 6. 72°C / 6min | Endelongation |

Die synthetisierte cDNA wurde mit genspezifischen Primern für p53 auf Quantität und Qualität getestet. Nur solche cDNAs, die eine hohe Expression von p53 nach 30 Zyklen aufwiesen, wurden für die weiteren Untersuchungen eingesetzt. Für alle Genprodukte, die nach der oben beschriebenen computationalen Analyse testis-spezifisch waren, wurde eine spezifische PCR etabliert. Eingesetzte Primer und Amplifikationsbedingungen sind in Tabelle 19 (Anhang) aufgelistet. Um falsch positive Ergebnisse durch genomische Amplifikation zu vermeiden, wurden die Primer so ausgewählt, dass sie Intron/Exon-Grenzen überspannten. Zur Kontrolle wurde bei der Etablierung der Primer genomische DNA eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte mit 1U HotStarTaq (Qiagen, Hilden), wobei 0,5µl first strand cDNA (~0,17µg RNA) eingesetzt wurden. Neben den zu untersuchenden cDNAs wurde in jeder Reaktion zusätzlich eine template-freie Negativkontrolle und Testis-cDNA als Positivkontrolle mitgeführt.

2.2.1.4 Quantifizierung durch Real-Time PCR

Die Quantifizierung der Expression ausgewählter Gene wurde mit Hilfe des *ABI PRISM 7700 Sequence Detection Systems* und Software (Applied Biosystems, Foster City, CA) durchgeführt.

Hierzu wurde SYBR-Green genutzt, ein Fluoreszenzfarbstoff, der in doppelsträngige DNA interkaliert. Die lasergesteuerte Analyse misst nach jedem PCR-Zyklus die Menge an doppelsträngiger DNA mit interkaliertem SYBR-Green. Dabei wird der CT-Wert bestimmt, d.h. der Wert, bei dem die logarhythmische Kurve der Zunahme des Fluoreszenzsignals zum ersten Mal über ein Hintergrundsignal ansteigt. Die Bestimmung der relativen Transkriptmenge im Vergleich zu einem Kontrolltranskript erfolgte über die ermittelten CT-Werte.

Amplifikationsbedingungen und die Primer wurden in der konventionellen RT-PCR etabliert. Die PCR-Ansätze erfolgten jeweils in Triplikaten entsprechend den Vorgaben des Herstellers (SYBR-Green Kit; Qiagen, Hilden). 15µl des SYBR-Green MasterMixes, 5µl 1/10 verdünnte *first strand* cDNA und 300nM genspezifische *forward* und *reverse* Primer wurden in einem Gesamtvolumen von 30µl eingesetzt. 40 PCR-Zyklen mit 30s Denaturierung bei 95°C, 30s Annealing bei der entsprechenden Temperatur (s. Anhang Tab. 19) und 30s Elongation bei 72°C wurden durchgeführt. Des Weiteren wurde eine 18s rRNA spezifische PCR bzw. eine HPRT (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase) spezifische PCR durchgeführt, um Unterschiede in der Qualität der eingesetzten RNA bzw. in der Quantität der eingesetzten cDNA auszugleichen. Zur Darstellung der relativen Expression z.B. der Expression von behandelten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen, wurde eine weitere Normalisierung durchgeführt ($\Delta\Delta\text{CT}$ Calculation; Applied Biosystems, Foster CA).

2.2.1.5 Expressionsanalyse mittels Mikroarray

Mikroarrays ermöglichen das parallele und schnelle Monitoring der Expression einer großen Anzahl von Genen (Schena et al., 1998). Wir haben zum einen mitteldichte gespottete cDNA-Arrays genutzt, die ein von uns ausgewähltes Set an cDNAs repräsentieren. Zum anderen haben wir für die Erstellung eines umfassenden genom-umspannenden Expressionsprofils hochdichte Mikroarrays verwendet.

a. Verwendete Mikroarrayformate

cDNA-Mikroarrayanalysen wurden in Kooperation mit der Firma Memorec Biotec GmbH, Köln durchgeführt. Für die Untersuchungen wurde der *Oncoimmunochip cDNA Mikroarray* ausgewählt. Auf diesen Mikroarray sind die cDNAs für 1152 Gene aufgebracht. Die ausgewählten Gene sind vor allem Onkogene, Tumormarker, Zytokine, Stressgene und SEREX-Gene, so wie solche, denen eine Funktion im Zellzyklus, in der DNA-Reparatur, in der Signaltransduktion oder in der Apoptose zukommt.

Spezifische cDNA-Fragmente von 200-400 Basenpaaren werden mit Hilfe der *Piezo ink-jet* Technik unter Reinstraumbedingungen gespottet. Als Matrix wurde Glas verwendet, welches im Gegensatz zu einer Nylonmembran eine Miniaturisierung und eine hohe Automatisierung erlaubt. Hierdurch wird die Menge benötigten Materials entscheidend reduziert.

Für die *Affymetrix Oligonukleotid Mikroarrays* wurde der Chip *Human Genome U133A* verwendet, der 22.000 Gene beinhaltet, die einen Großteil der in Volllänge bekannten Gene abdecken. Im Gegensatz zu den cDNA-Fragmenten, die für den *Oncoimmunochip cDNA Mikroarray* verwendet wurden, werden für den *Affymetrix Oligonukleotid Mikroarray* Oligos aus 21 Basenpaaren verwendet. Ein Gen wird zum einen durch ein Set von in der Regel 11 Oligos repräsentiert, die aufgrund ihrer 100%igen Homologie zu der Gensequenz als *perfect match* bezeichnet werden. Zum anderen durch 11 *mismatch*-Oligos. Bei letzteren ist eine Base mutiert. Diese Kombination erlaubt es, unspezifische Bindungen zu erkennen und zu exkludieren.

Die kurzen Basenstränge werden durch ein photolithographisches Verfahren mit Hilfe einer Maske auf die Matrix aufgebracht, wodurch eine erhebliche Miniaturisierung im Vergleich zu den cDNA-Mikroarrays möglich ist.

b. Probenvorbereitung

Für den *Oncoimmunochip cDNA Mikroarray* wurde Gesamt-RNA aus den Proben extrahiert, durch *in vitro* Transkriptiton amplifiziert und in einer cDNA-Synthesereaktion mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 oder Cy5 markiert. Probe und eine entsprechende Kontrolle wurden simultan auf einem Array hybridisiert. (Durchführung durch die Firma Memorec Biotec GmbH, Köln). Im Anschluß werden die Arrays getrennt für die einzelnen Farbstoffe gescannt. Die erhaltenen Scans werden übereinander gelegt, so dass sich Felder ergeben, die entweder rot oder grün aufleuchten, wenn das entsprechende Gen nur in einer der hybridisierten Proben vorkommt. Ist die

Expressionshöhe des Gens in beiden Proben gleich, ergibt sich in dem zusammengesetzten Bild ein gelbes Feld. Je nach gemessener Farbintensität werden den einzelnen Genen relative Expressionswerte zugeordnet.

Auch für die *Affymetrix Oligonukleotid Mikroarrays* wurde zunächst Gesamt-RNA extrahiert und revers transkribiert. Für die reverse Transkription wurde ein Primer eingesetzt, der sowohl an den T7-Promotor als auch an die poly-adenylierte RNA bindet (Tab. 1).

Tab.1: Primer für die Herstellung von Einzelstrang-cDNA.

Primer	Sequenz des Primers
T7-Oligo(dT) Promoter Primer Kit	5'- GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG-(dT) ₂₄ - 3'

Anschließend erfolgte die Synthese des zweiten cDNA-Stranges in folgendem Reaktionsansatz:

RNAse-freies Wasser	91 µl
5X <i>Second Strand Reaction Buffer</i>	30 µl
10 mM dNTP mix	3 µl
10 U/µL <i>E. coli</i> DNA Ligase	1 µl
10 U/µL <i>E. coli</i> DNA Polymerase I	4 µl
2 U/µL <i>E. coli</i> RNase H	1 µl

Das Reaktionsgemisch wurde für 2h bei 16°C in einem Biometra Trioblock inkubiert. Die Vervollständigung des Stranges erfolgte durch Ligation durch die Zugabe von 10 U T4 DNA Polymerase und weiterer Inkubation bei 16°C für 5min. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von 10µL 0.5M EDTA abgestoppt. Zur Entfernung von Puffern und Enzymen wurde das Reaktionsgemisch mit Hilfe des *GeneChip Sample Cleanup Module* aufgereinigt. Hierzu wurde der Reaktionsansatz mit 600µl *cDNA Binding Buffer* versetzt und gründlich gemischt. Die doppelsträngige cDNA wurde durch Zentrifugation bei 8.000 x g für 1min auf eine Silikamembran geladen, einmal mit 750µl Waschpuffer gewaschen und nach dem Trocknen der Säule durch erneute Zentrifugation bei 25.000 x g für 5min mit 14µl Elutionspuffer eluiert.

Durch *in vitro* Transkription wurde die doppelsträngige cDNA zu cRNA umgeschrieben und durch den Einbau biotinylierter Nukleotide markiert. Dazu nutzten wir das *Enzo BioArray HighYield RNA Transcript Labeling Kit* nach Vorgaben des Herstellers.

Template cDNA	10 µl
10X HY Reaktionspuffer	4 µl
10X Biotin-markierte Ribonukleotide	4 µl
10X DTT	4 µl
10X RNase Inhibitor Mix	4 µl
20X T7 RNA Polymerase	2 µl
RNase-freies Wasser	12 µl

Die Inkubation erfolgte in einem Biometra Trioblock bei 37°C für 5 Stunden. Der Reaktionsansatz wurde alle 30-45min gemischt. Die markierte cRNA wurde mit Hilfe des *GeneChip Sample Cleanup Module* aufgereinigt. Für die Aufreinigung wurde das Reaktionsvolumen mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 100µl gebracht und mit 350µl IVT *cRNA Binding Buffer* und 250µl Ethanol versetzt. Durch Zentrifugation für 15s bei 8.000 x g erfolgte die Bindung der RNA an die Säule. Puffer, Enzymreste und nicht-inkorporierte dNTPs wurden durch einen Waschschrift mit 500µl Ethanol entfernt. Reste des Ethanols, die bei Folgereaktionen stören würden, wurden durch anschließende Zentrifugation der Säule mit geöffnetem Deckel für 5min bei 25.000 x g beseitigt. Die markierte cRNA wurde in zwei Schritten mit 10 bzw. 11µl RNase-freiem Wasser eluiert.

Nach Qualitäts- und Quantitätsbestimmung der RNA wurde die Konzentration der markierten RNA nach der photometrischen Vermessung nach folgender Formel abgeschätzt:

$$\text{geschätzte Menge } (\mu\text{g}) \text{ markierter cRNA} = \text{RNA}_m - (\text{Gesamt-RNA}_i) \times (y)$$

RNA_m = Menge der gemessenen cRNA nach der IVT (µg)

Gesamt- RNA_i = Ausgangsmenge eingesetzter Gesamt-RNA (µg)

y = Fraktion der cDNA, die für die IVT-Reaktion eingesetzt wurde

20µg cRNA wurden im Anschluss fragmentiert, um eine bessere Bindung an die Sonden zu gewährleisten. Die cRNA wurde mit 8µl 5x Fragmentierungspuffer in einem Gesamtansatz von 40µl für 35min bei 94°C inkubiert. Hierbei entstehen Fragmente von 35-200 Basenpaaren. Die Fragmentierung wurde auf einem 1%igem MOPS-Gel mit Hilfe eines Längenstandards kontrolliert.

15µg der fragmentierten cRNA wurden im Folgenden zur Herstellung der Sonde eingesetzt (Tab. 2).

Tab. 2: Herstellung der Sonde für die Hybridisierung des Arrays.

Komponenten	Standard Array	Endkonzentration
fragmentierte cRNA	15 µg	0.05 µg/µl
Kontrol Oligonukleotid B2(3 nM)	5 µl	50 pM
20X Eukaryotische Hybridisierungskontrollen (bioB, bioC, bioD, cre)	15 µl	1.5, 5, 25, 100 pM
Heringsperm DNA (10 mg/mL)	3 µl	0.1 mg/ml
Acetyliertes BSA (50 mg/ml)	3 µl	0.5 mg/ml
2x Hybridisierungspuffer	150 µl	1X
Wasser	bis zu einem Gesamtvolumen von 300 µl	

Das Hybridisierungsgemisch wurde vor der Hybridisierung für 5min bei 99°C in einem Biometra Trioblock denaturiert. Eventuell enthaltenes unlösliches bzw. ausgefallenes Material wurde durch Zentrifugation für 5min bei 25.000 x g entfernt.

Nach der Äquilibration wurde der Probenarray mit 1x Hybridisierungspuffer befüllt und für 10min bei 45°C inkubiert. Der Array wurde mit 200µl des Sondenansatzes befüllt und für 16h bei 45°C bei einer Rotation von 60rpm hybridisiert.

Nach der Hybridisierung wurde der Array gewaschen und gefärbt. Hierzu wurde das Hybridisierungsgemisch entnommen und der Array mit 250µl Waschpuffer A befüllt, der wenig stringente Waschbedingungen herstellt. Das Waschen erfolgte in der dafür vorgesehenen Waschstation nach Protokoll (Tab.3).

Tab. 3: Wasch – und Färbeprotokoll der Fluidicsstation.

Vorgang	Ablauf
Waschen 1	10Zyklen mit 2 Mixes/Zyklus mit Waschpuffer A bei 25°C
Waschen 2	4Zyklen mit 15 Mixes/Zyklus mit Waschpuffer B bei 50°C
Färben	Färbung mit SAPE-Lösung für 10min bei 25°C
Waschen	10Zyklen mit 4 Mixes/Zyklus mit Waschpuffer A bei 25°C
2. Färbung	Färbung mit Antikörperlösung für 10 min bei 25°C
3. Färbung	Färbung mit SAPE-Lösung für 10min bei 25°C
Waschen	15 Zyklen mit 4Mixes/Zyklus mit Waschpuffer A bei 30°C

Im Anschluss wurde der Array mit einer Pixelgröße von 3µm bei einer Wellenlänge von 570nm gescannt.

c. Datenauswertung

In einem ersten Schritt der Datenauswertung des *Oncoimmunochip cDNA Mikroarray* wurden für das Auge sichtbare Verunreinigungen manuell maskiert und somit von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die Normalisierung der Daten erfolgte über die ebenfalls auf dem Array gespotteten Kontrollgene. Die Auswertung des *Oncoimmunochip cDNA Mikroarray* erfolgte mit Hilfe der Software ImaGene Version 4.1 (BioDiscovery, Los Angeles, CA). Mit Hilfe dieser Software wurde ein Eisen-Clustering durchgeführt (Eisen et al., 1998). Bei dieser Clusteringmethode handelt es sich um eine Form des hierarchischen Clustering, bei der die Expressionsprofile einzelner Gene und/oder Gewebe aufgrund von Similaritäten Gruppen zugeordnet werden. Hierbei werden paarweise Distanzmatrizen für alle Gene berechnet, die auf Ähnlichkeitswerten für jedes Genpaar basieren. Die Matrix wird durchsucht, um den höchsten Ähnlichkeitswert zu ermitteln. Dem Genpaar mit dem höchsten Ähnlichkeitswert wird ein Knotenpunkt zugeordnet. Für diesen Knotenpunkt wird ein Genexpressionsprofil berechnet, in dem ein Mittelwert aus den Werten des Genpaares berechnet wird. Der Knotenpunkt ersetzt im Folgenden die Einzelwerte des Genpaares. Dieser Vorgang wird n-1 mal wiederholt, so dass nur noch eine einzelne Matrix übrig bleibt.

Die Qualitätskontrolle der *Affymetrix Oligonukleotid Mikroarrays* erfolgte anhand von Reporter genen, die in die Sonden integriert waren. Hierdurch lassen sich die Prozesse der Sondenherstellung und der Hybridisierung kontrollieren.

Die Auswertung der Daten wurde mit dem Programm *Mikroarray suite 5.0* (Affymetrix, Santa Clara, CA) bzw. *ArrayAssist* (Iobion, Amsterdam) durchgeführt. Grundlage dieser Auswertung ist eine RMA (robust multichip analysis). Mit den so erhaltenen Daten sind dann elementare Operationen wie paar- oder batchweiser Vergleich möglich. Als weitere Kontrolle der Experimente wurden Duplikate untereinander verglichen. Die Anzahl signifikant regulierter Gene beim Vergleich der Duplikate sollte null betragen.

Für die Identifizierung koregulierter Gene und neuer funktionell relevanter Signalwege wurden hierarchische Clusteranalysen (s. auch Auswertung *Oncoimmunochip cDNA Mikroarray*) genutzt. Bei kinetischen Reihen wurden einzelne Zeitpunkte als getrennte relationale Datenbanken gehandhabt.

2.2.3 Herstellung der Vektoren

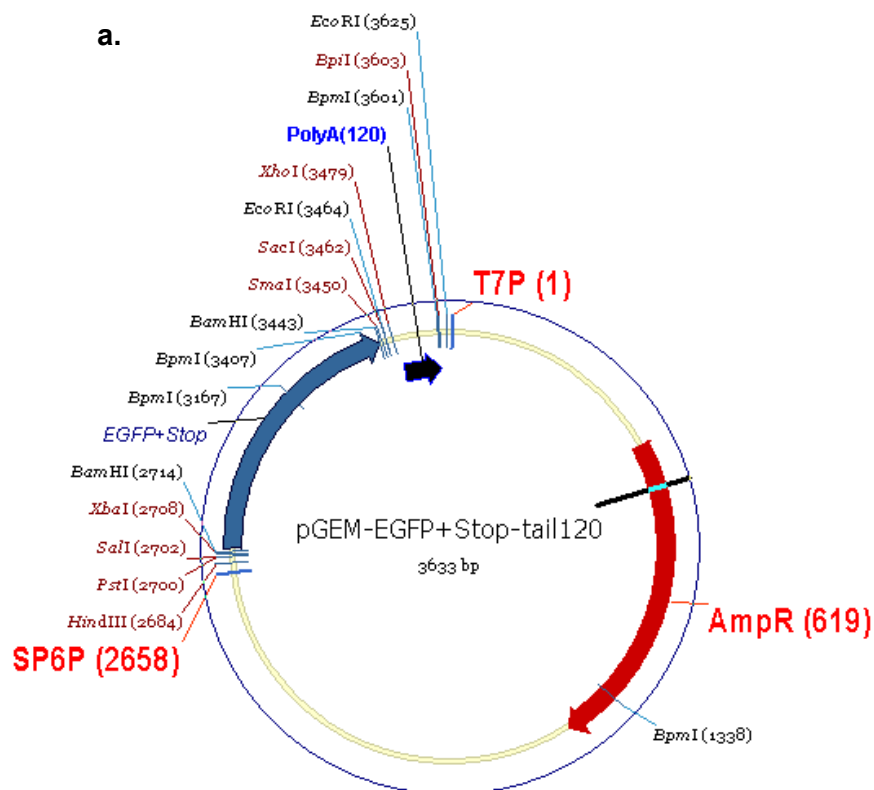
Die Herstellung der Vektoren erfolgte durch Klonierung der jeweiligen kodierenden Sequenz in den Vektor pGEM3Z (Invitrogen, San Diego, CA) bzw. in den Vektor pCMV Script (Stratagene, Amsterdam, NL) als Basisvektoren.

Der Vektor pGEM3Z hat einen SP6-Promotor vor dem Startkodon, von dem aus eine *in vitro* Transkription möglich ist. Der Vektor pCMV Script enthält an gleicher Stelle einen T7 Promotor.

Ausgehend von diesen Basisvektoren wurden umfangreiche Modifizierungen eingeführt, die für die Herstellung von poly-adenylierter IVT RNA nötig sind.

In den Vektor pGEM3Z wurde ein Poly-A-Strang von 120 Basen über die XhoI-Schnittstelle eingeführt. Direkt hinter den Poly-A-Strang wurde eine Restriktionsschnittstelle eingeführt, die die Linearisierung ermöglichte. Dieser Vektor wird im Folgenden als Vektor pGEM3Z Tail bezeichnet (Abb. 2.1.a).

In den Vektor pCMV Script wurde ein Poly-A-Strang von 120 Basenpaaren hinter der Schnittstelle SacI eingeführt. Vor den Poly-A-Strang wurde eine Sequenz aus dem untranslatierten Bereich von β -Globin integriert, die die Stabilität der RNA erhöhen sollte. Dieser Vektor wird im Folgenden als Vektor pSTI Tail bezeichnet (Abb. 2.1.b).



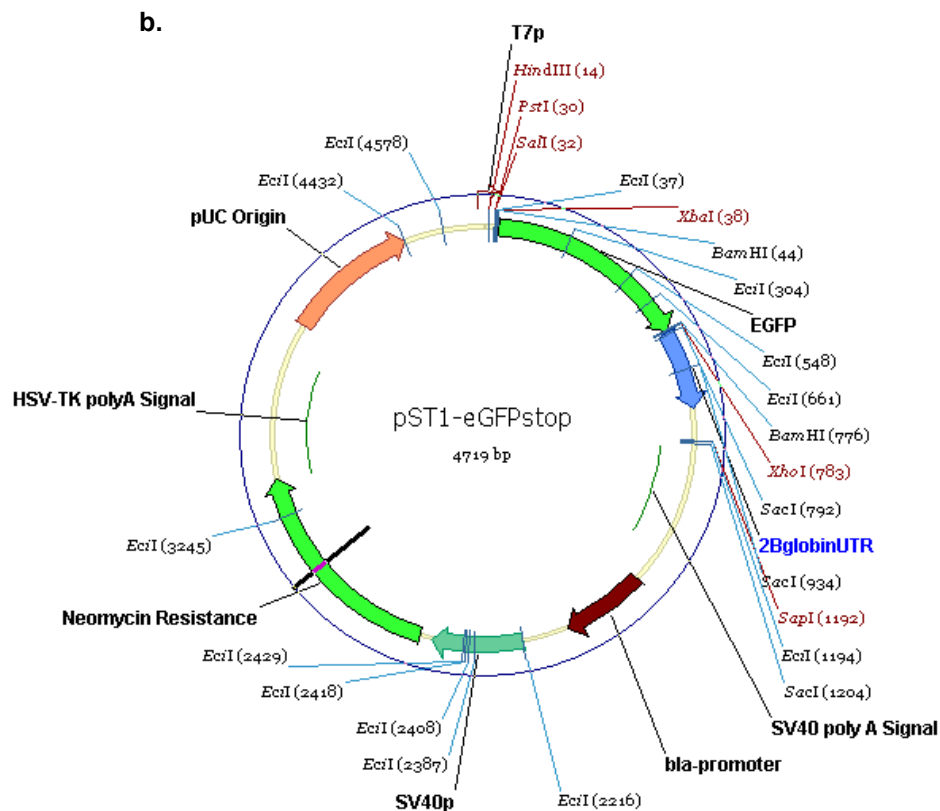


Abb. 2.1: Darstellung der eGFP-Vektoren - a. pGEM3Z eGFP Tail und b. pST1 eGFP Tail. Diese Vektoren wurden als Ausgangsvektoren für die weiteren Klonierungen genutzt.

eGFP wurde aus dem Vektor pEGFP-N3 (BD Bioscience, Heidelberg) erhalten. 2dGFP wurde aus dem Vektor pTRE-d2EGFP (BD Bioscience, Heidelberg) erhalten. Die Gene wurden aus den angegebenen Geweben amplifiziert. Nach Aufreinigung und Restriktion an den angegebenen Schnittstellen mit den jeweiligen Vektoren (Tab. 4) ligiert und in *E. coli* MRF1⁻ transformiert. Die erhaltenen Plasmide wurden sequenziert und die Sequenz analysiert.

Tab. 4: Sequenzen der Primer zur Amplifizierung des gesamten ORFs (open reading frame) der jeweiligen Gene.

Primer	Sequenz der Primer	Schnittstelle	Vektor	Gewebe
EGFP Kozak Start	ATTGGATCCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG CTG	BamH I	pGEM3Z Tail	Vektor EGFP- N3
EGFP Stop	ATTGGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGA GT	BamH I	pGEM3Z Tail	Vektor EGFP- N3
VHL	TATGGATCCACCATGCCCGGAGGGCGGAGAAC	BamH I	pGEM3Z Tail	Testis- Normalgewebe
VHL	TATGGATCCTCAATCTCCCATCCGTTGATG	BamH I	pGEM3Z Tail	Testis- Normalgewebe
Hif1 alpha	TATGGATTCACCATGGAGGGCGCCGGCGGCGGAAC GACAAG	BamH I	pGEM3Z Tail	Brustkarzinom
Hif1 alpha	TATGGATCCTTAGTTAACTTGATCCAAAGCTCTGAGTA ATTC	BamH I	pGEM3Z Tail	Brustkarzinom
SSX2 Kozak Start	GAGCTGCAGACCATGAACGGAGACGACGCCTTTG	Pst I	pGEM3Z Tail	Testis- Normalgewebe
SSX2 Stop	GAGCTGCAGTTACTCGTCATCTTCCTCAGGGTC	Pst I	pGEM3Z Tail	Testis- Normalgewebe
SYT Kozak Start	GAG CTGCAGACCATGGGCGGCAACATGTCTGTGGCTTTC	Pst I	pGEM3Z Tail	Lunge- Normalgewebe
SYT-Stop	GAGCTGCAGTCACTGCTGGTAATTTCCATACTGTCC	Pst I	pGEM3Z Tail	Lunge- Normalgewebe
SYT-SSX1 Kozak Start	GAG CTGCAGACCATGGGCGGCAACATGTCTGTGGCTTTC	Pst I	pGEM3Z Tail	Synovial- sarkom
SYT-SSX1 Stop	GAGCTGCAGTTACTCGTCATCTTCCTCAGGGTCGCT	Pst I	pGEM3Z Tail	Synovial- sarkom
SYT-SSX2 Kozak Start	GAG CTGCAGACCATGGGCGGCAACATGTCTGTGGCTTTC	Pst I	pGEM3Z Tail	Synovial- sarkom
SYT-SSX2 Stop	GAGCTGCAGTTACTCGTCATCTTCCTCAGGGTCGCT	Pst I	pGEM3Z Tail	Synovial- sarkom
2dGFP Start	GAGGGATCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG	BamHI	pGEM3Z Tail	Vektor pTRE- d2EGFP
2dGFP Stop	GAGGAGCTCGAATTCCTACACATTGATCCTAGCAGA	XhoI	pGEM3Z Tail	Vektor pTRE- d2EGFP
CD40L Kozak Start	GAGACCGCGGCCGCACCATGATCGAAACATACAAC	Not I	pSTI Tail	aktivierte PBMCs
CD40L- Stop	GAGGGATCCTCAGAGTTTGAGTAAGCCAAAGGACGT	BamHI	pSTI Tail	aktivierte PBMCs

2.2.4 Verifizierung der Daten auf Proteinebene

Neben der Verifizierung der ermittelten Arraydaten auf Transkriptebene erfolgte zusätzlich eine Untersuchung auf Proteinebene für Genprodukte für die kommerzielle Antikörper verfügbar sind.

2.2.4.1 Immunfluoreszenzfärbung

Die Zellen wurden abgelöst, auf eine Zelldichte von 10^5 Zellen/ml Medium eingestellt und auf mit Poly-L-Lysin und Kollagen beschichteten Objektträgern anwachsen gelassen. Hierzu wurden die Objektträger in eine 145mm Petrischale gelegt, pro Objektträger 2ml Medium mit Zellen ausgebracht und für 3-4h im Inkubationsschrank bei 37°C inkubiert. Danach konnte die Petrischale mit Medium aufgefüllt werden. Nach weiteren 24h Kultivationszeit wurden die Objektträger mit PBS (phosphate buffered saline) gespült, die Zellen mit 2% Paraformaldehyd für 15min fixiert und anschließend mit Waschpuffer gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit 200µl verdünnter Lösung des ersten Antikörpers in Waschpuffer für 1h bei 37°C in einer feuchten Kammer. Nach kurzem Waschen wurden die Zellen mit der verdünnten Lösung des zweiten Antikörpers für 1h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Zellkerne durch Zugabe eines Tropfens Eindeckmediums Dako mit dem Kernfarbstoff Hoechst 33342 in einer Verdünnung von 1000:1 angefärbt und die Objektträger mit einem Deckglas versehen. Die Färbung wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops ausgewertet.

2.2.4.2 FACS-Färbung

Die Zellen wurden abgelöst und mit FACS-Puffer gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit 100µl der verdünnten primären Antikörperlösung in FACS-Puffer für 30min bei 4°C. Nach einem erneuten Waschschrift mit FACS-Puffer wurden die Zellen für 30min bei 4°C in 100µl verdünnter Lösung des sekundären Antikörpers inkubiert. Die Zellen wurden nochmals gewaschen und anschließend in 400µl FACS-Puffer mit 10µg/ml Propidiumiodid aufgenommen und mit Hilfe des FACS-Kalibur analysiert.

Neben der FACS-Färbung wurde für die simultane Bestimmung von Zytokinen der BD™ Cytometric Bead Array verwendet. Hierbei werden Bead-Populationen, die mit unterschiedlichen Fluorochromen versehen sind, mit spezifischen Antikörpern ge-coated. In dem verwendeten *Human inflammation kit* sind die spezifischen Antikörper gegen IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-1β und TNF gerichtet. Für die Nachweisreaktion wurden die gekoppelten Beads, PE-konjugierte Nachweisantikörper und die entsprechende Probe nach Protokoll des Herstellers gemischt und inkubiert. Während der Inkubationszeit bildete sich ein Komplex aus diesen Komponenten aus. In der anschließenden flowzytometrischen Messung wurden die diversen fluoreszenzmarkierten Bead-Populationen aufgetrennt und quantitativ im Vergleich zu einer Standardreihe bestimmt.

2.2.4.3 SDS-PAGE und Western Blot

Die Zellen wurden pelletiert, mit Lysepuffer zur Auflösung der Zellmembran versetzt und für 15min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Reste der Zellmembran wurden durch Zentrifugation für 5min bei 14.000 x g abgetrennt. RNA sowie DNA wurden durch Zugabe von 25U/ml Benzonase und Inkubation für 15min auf Eis denaturiert. Die Lösung wurde mit Probenpuffer versetzt, für 5min bei 95°C inkubiert und bis zum Gebrauch in Aliquots bei -20°C gelagert.

Vor der Behandlung der Lösung mit Benzonase wurde eine Probe zur Bestimmung der Proteinkonzentration entnommen.

Die Proteinlösung wurde auf ein SDS (sodium-dodecyl-sulfate)-Polyacrylamidgel geladen. Die Elektrophorese erfolgte anfangs bei 10mA/Gel, bis die Proteine das Trenngel erreicht hatten, und danach bei 20mA/Gel. Nach ausreichender Auftrennung der Proteine wurde die Elektrophorese gestoppt und die Proteine auf eine PVDF-Membran geblottet. Hierzu wurden die folgenden Komponenten nach Befeuchtung mit dem jeweiligen Puffer luftblasenfrei übereinander gelegt:

2 Whatmanpapiere	Anodenpuffer 1
2 Whatmanpapiere	Anodenpuffer 2
PVDF-Membran	Kathodenpuffer
Gel	Kathodenpuffer
3 Whatmanpapiere	Kathodenpuffer

Das Blotten erfolgte für 10min/Gel bei 250mA. Nach dem Blotten befanden sich die Proteine auf der Membran. Alle zur Verfügung stehenden Bindungsstellen wurden durch Casein, Polyethylenglykol 6000 und Polyvinylpyrrolidon K15 durch Inkubation über Nacht bei 4°C abgesättigt.

Danach erfolgte die Inkubation mit der verdünnten Lösung des primären Antikörpers für 1h bei Raumtemperatur. Durch dreimaliges Waschen wurde der erste Antikörper entfernt. Anschließend wurde die Membran mit der verdünnten Lösung des sekundären Antikörpers für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Nachweisreaktion mit Hilfe von LumiLight, welches nach Angaben des Herstellers nach Mischung der beiden Komponenten im Verhältnis 1:1 für 1min auf die Membran einwirken sollte. Anschließend wurde das LumiLight entfernt und die Membran vorsichtig trocken getupft, bevor ein Film aufgelegt wurde. Die Entwicklung und Fixierung erfolgten mit Ultrafin SW-Negativentwickler und Superfix plus per Hand.

2.2.5 Basismethoden

2.2.5.1 Agarosegel zur Auftrennung von Nukleinsäuren

Für DNA-Gele wurde 1xTAE-Puffer mit 1-2,5% (w/v) Agarose aufgeköcht, nach Abkühlung auf etwa 60°C mit 2,5ppM Ethidiumbromid versetzt und in einen vorbereiteten Gelträger gegossen. Als Elektrophoresepuffer diente 1xTAE-Puffer. Neben den Proben wurde zusätzlich ein Längenstandard (λ -DNA Eco47I, MBI Fermentas, Burlington) auf die Gele aufgetragen, mit Hilfe dessen die ungefähre Größe des PCR-Produktes abgeschätzt werden konnte.

RNA-Gele wurden mit 1xMOPS-Puffer hergestellt. Vor dem Gießen wurde 37%iges Formaldehyd zugesetzt, um die Ausbildung von Sekundärstrukturen der einzelsträngigen RNA zu verhindern. Ethidiumbromid wurde nicht direkt in das Gel gegeben, sondern dem entsprechenden RNA-Probenpuffer zugesetzt. Die RNA-Proben wurden in Probenpuffer aufgenommen und vor dem Auftragen für 10min bei 70°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 120mA.

2.2.5.2 Amplifizierung und Aufreinigung des PCR-Produktes

Verschiedene Transkripte mussten in Volllänge und mit authentischem ORF (open reading frame) kloniert werden. Die Amplifikation erfolgte nach den Angaben des Herstellers mit PFU Ultra Hot Start mit den in Tabelle 4 angegebenen Primern. Das erhaltene PCR-Produkt wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit *QiaQuick Gel Extraction Kit* aufgereinigt. Hierzu wurde das Gelstück mit dreifachen Gelvolumen Puffer QG versetzt, und bei 50°C für 10min erhitzt, um die Agarose zu lösen. Die erhaltene Lösung wurde auf eine unter hochmolaren Salzbedingungen DNA-bindende Säule geladen. Ein Waschschrift mit Puffer QG entfernte Agarosereste. Anschließend folgte ein Waschschrift mit ethanolhaltigem Puffer PE. In diesem Schritt wurden Reste von Primern sowie Kontaminationen wie z.B. Salze, Enzyme, nicht-inkorporierte Nukleotide, Agarose, Ethidiumbromid und Detergentien ausgewaschen. Anschließend wurde die Säule trocken zentrifugiert. Die gebundene DNA wurde mit 30 μ l sterilem, deionisiertem Wasser eluiert.

Qualitätskontrolle und Quantifizierung des aufgereinigten PCR-Produktes erfolgten durch Gelelektrophorese.

2.2.5.3 Ligation und Transformation

Zur Klonierung in die Vektoren pGEM3Z Tail und pSTI Tail wurde die amplifizierte und aufgereinigte DNA einem Restriktionsverdau unterzogen. Nach nochmaliger Aufreinigung wurde das jeweilige Fragment in die Vektoren mit kompatiblen Restriktionsschnittstellen ligiert. Um Selbstligation zu verhindern müssen die Vektoren mit einer Phosphatase (calf intestine alkaline phosphatase, MBI Fermentas, Burlington, ON) dephosphoryliert werden. Bei der Ligation sollte das Verhältnis von Insert zu

Vektor 3:1 sein. Die Verhältnisse wurden anhand eines Agarosegels abgeschätzt. Der Ligationsansatz wurde mit 1µl Puffer und 1µl T4-Ligase zu einem Gesamtansatz von 10µl aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte bei 14°C über Nacht oder bei 22°C für 2h. 6µl des Ligationsansatzes wurden zu den auf Eis aufgetauten TOP10 chemisch-kompetenten Zellen gegeben und durch leichtes Schütteln vorsichtig gemischt. Nach 30min Inkubationszeit auf Eis wurde ein Hitzeschock für 30s bei 42°C gesetzt und bewirkte ein kurzzeitiges Öffnen der Poren in der Zellmembran. Während einer Inkubation für 1h bei 37°C wurde die Antibiotikaresistenz ausgebildet. 100µl des Transformationsansatzes wurden auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (Konz. 100µg/ml) oder Kanamycin (Konz. 25µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.5.4 Plasmid-Präparation

Isoliert stehende Kolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher in 3ml Selektionsmedium übertragen und bei 37°C über Nacht auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Die Plasmid-Präparation erfolgte nach einem Standardprotokoll (NucleoSpin, Macherey and Nagel, Düren). Dieses Verfahren produziert hochreine und gering denaturierte Plasmid-DNA die sich gut zur Sequenzierung eignet (Birnboim and Doly, 1979). Die Bakterien wurden pelletiert und nach Angaben des Herstellers in RNase-haltigem Puffer A1 aufgenommen. Die Lyse der Bakterien erfolgte in einem alkalischen, SDS-haltigen Puffer. SDS solubilisiert Phospholipide und Proteine der Zellmembran und führt dadurch zur Freisetzung der Zellbestandteile. Natriumhydroxid denaturiert sowohl Proteine und hochgenomische DNA als auch die Plasmid-DNA. RNase führt zur Zerstörung der freiwerdenden RNA. Bei genauem Einhalten der kritischen Lysezeit kommt es bei Neutralisierung mit einem Puffer mit hoher Salzkonzentration (Puffer A3) zur Ausbildung von Präzipitaten aus SDS, denaturiertem Protein, hochgenomischer DNA und Zelldebris. Die korrekt renaturierte Plasmid-DNA verbleibt in Lösung und kann nach Zentrifugation als Überstand abgenommen werden. Eine Aufreinigung des Überstandes erfolgte unter Bindung der DNA unter hochmolaren Bedingungen auf eine Säulenmatrix und ihrer nachfolgenden Elution mit Wasser. Vor der Sequenzierung wurde das Plasmid durch Restriktionsverdau auf erfolgreiche Ligation des PCR-Produktes hin überprüft.

2.2.5.5 Restriktionsverdau

Restriktionsenzymverdäue wurden für verschiedene Zwecke genutzt. Zur Vorbereitung eines Vektors bzw. eines Inserts zur Klonierung wurden je 10µg mit 10U des entsprechenden Restriktionsenzym für 3h bei 37°C inkubiert. Nach der Restriktion erfolgten Aufreinigung und Ligation wie beschrieben.

Für die Längenbestimmung eines Inserts zur Analyse hergestellter Plasmidkonstrukte wurden zwei Restriktionsenzyme verwendet, die jeweils nur einmal (*single cutter*) auf verschiedenen Seiten des Inserts in der MCS (multiple cloning site) des Vektors schneiden. Sofern keine interne Schnittstelle im Insert vorliegt, erhält man eine

Vektorbande und eine Insertbande. Ein Längenmarker erlaubt eine Längenbestimmung der Fragmente. Enthält das Insert interne Schnittstellen werden mehrere Insertfragmente erzeugt, deren Summe der Gesamtinsertlänge entspricht. Eine andere Möglichkeit ist der asymmetrische Verdau, bei dem die Restriktionsenzyme so ausgewählt werden, dass das inklonierte PCR-Produkt asymmetrisch geschnitten wird, so dass sich die Orientierung des Produktes im Vektor bestimmen lässt.

Für Restriktionsenzymverdäue wurde die zu verdauende DNA in einem geeigneten Volumen (20-50µl) Wasser verdünnt und mit dem zum Restriktionsenzym passenden 10xPuffersystem angesetzt. Nach Zusatz der/des Restriktionsenzyme(s) (1U Enzym pro µg DNA) erfolgte dann die Restriktion bei 37°C für 1-2 Stunden.

2.2.5.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde von einem kommerziellen Anbieter durchgeführt (GENTERPRISE, Mainz). Die Sequenzierergebnisse wurden wie unter 2.2.1.2 Computational assistierte Sequenz- und Strukturanalyse beschrieben analysiert.

2.2.5.7 Beschichtung von Objektträgern

Die Glasobjektträger wurden für 5h bei 180°C im Heißluftofen gebacken. Nach dem Abkühlen wurden sie in Poly-L-Lysin (0,1mg/ml in PBS) getaucht und gut benetzt. Diese Poly-L-Lysin gecoateten Objektträger wurden anschließend für 2h bei 37°C in einer 1:10 verdünnten wässrigen Kollagenlösung inkubiert und dann mit destilliertem Wasser abgespült und erneut getrocknet.

2.2.5.8 Herstellung von IVT RNA

Der erste Schritt zur Herstellung von IVT RNA ist die Linearisierung des Plasmids. Wir verwendeten die Restriktionsenzyme Bpil für den Vektor pGEM3Z Tail und SapI für den Vektor pSTI Tail. Beide schneiden nur einmal im Vektor und zwar hinter dem eingefügten Tail. Nach der Linearisierung wurde das Enzym durch Phenol-Chloroform-Fällung inaktiviert und entfernt. Hierzu wurde dem Restriktionsansatz ein Isovolumen des Gemisches aus Phenol und Chloroform zugegeben und gründlich gemischt. Durch kurze Zentrifugation bei 10.000 x g erfolgte die Trennung in eine untere organische Phase und in eine obere wässrige Phase, die die DNA enthält. Letztere wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nun wurde die wässrige Phase mit einem Isovolumen reinen Chloroforms gemischt, um eventuelle Rückstände von Phenol abzutrennen. Nach Zentrifugieren wurde die wässrige Phase abgenommen und durch Zugabe von zwei Isovolumen Ethanol und 10% v/v 3M Natriumacetat pH 4,5 bei -20°C für 2h gefällt. Das Salz wird benötigt, um die Faltung der DNA zu vereinfachen, während das Ethanol gleichzeitig Wasser entzieht.

Die DNA wurde durch Zentrifugation für 45min mit 10.000 x g bei 4°C pelletiert, mit 70%igem Ethanol zur Entfernung von Salzen gewaschen und in einem geeigneten

Volumen RNase-freiem Wasser aufgenommen. Die erfolgreiche und vollständige Linearisierung wurde gelelektrophoretisch geprüft. Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bei 260nm bestimmt. Zur Bestimmung der Reinheit der DNA wurde außerdem die optische Dichte bei 280nm zur Bildung des OD260/280 Quotienten gemessen.

10µg linearisierte DNA wurden für die *in vitro* Transkription eingesetzt. Hierzu wurden 40µl dNTPs (di-nucleic-acid tri-phosphat), wobei 4/5 des dGTPs (guanine triphosphate) zusätzlich mit einer Cap-Struktur versehen sind, 10µl 10x-Puffer, 20µl DTT (dithiothreitol) und 10µl der T7 bzw. SP6 abhängigen Polymerase für 2h bei 37°C inkubiert. Die Polymerasen binden dabei an ihre T7- bzw. SP6-Erkennungssequenzen, die 5' von dem zu transkribierenden ORF liegen und synthetisieren den komplementären RNA-Strang.

Die IVT RNA wurde mit dem *MegaClear Kit* aufgereinigt. Hierzu wurde sie in einem Bindungspufferkonzentrat aufgenommen, das die nötigen Salze für eine optimale Bindung der RNA an die Silikamembran enthält. Die Zugabe von Ethanol entzieht der Hydrathülle der RNA Wasser. Das Gemisch wurde auf eine Silikasäule geladen und bei 10.000 x g für 2min zentrifugiert. Hierbei band die RNA an die Säule, während Verunreinigungen wie z.B. Enzymreste ausgewaschen wurden. Nach mehreren Waschschritten wurde die gereinigte RNA eluiert. Der Elutionspuffer wurde, um eine effizientere Elution zu ermöglichen vorher auf 95°C erhitzt.

Die Qualitätskontrolle und die Quantifizierung erfolgten sowohl gelelektrophoretisch als auch photometrisch.

2.2.5.9 Proteinbestimmung nach der BCA-Methode

Zur Proteinbestimmung wurde der BCA-Test von Pierce (Pierce, Rockford, USA) genutzt und nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Referenz wurde eine Standardreihe gemäß Tabelle Tab. 5 in einem Gesamtvolumen von je 150µl angesetzt.

Tab. 5: Ansatz der Standardreihe zur Bestimmung der Proteinkonzentration.

Ansatz	Konz.
a	2000
b	1500
c	1000
d	750
e	500
f	250
g	125
h	25
i	0

Aus den Ansätzen a-i wurden Triplikate von je 40µl entnommen. Das Reaktionsgemisch wurde nach Angaben des Herstellers im Verhältnis 50+1 angesetzt. Die Standardreihe sowie die Proben wurden mit 400µl Reaktionsgemisch versetzt und für 30min bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch bei 595nm.

Anhand der Standardreihe konnten die Proteinkonzentrationen der Proben bestimmt werden.

2.2.6 Zellmaterialien

2.2.6.1 Gewebe

Die Tumorgewebe stammten aus der Gewebebank des SFB 432. Diese wurden im Rahmen des Z3 Projektes von Herrn Prof. Hans-Anton Lehr (Institut für Pathologie der Universitätskliniken Mainz) angelegt. Die Gewebe wurden nach Entnahme sofort auf Trockeneis überführt und bis zum Gebrauch bei –80°C gelagert. Die Studie erfolgte mit Genehmigung der lokalen "Ethikkommission der Ärztekammer des Landes Rheinland-Pfalz".

2.2.6.2 Zellkultur

Für diese Studie wurden MCF7-Zellen (human, Brustkarzinom) 786-0 (human, Nierenzellkarzinom), K562 (human, Leukämie) sowie HCT-116 (human, Kolonkarzinom) verwendet. Neben den Wildtyp HCT116 Zellen wurden außerdem Varianten der Zelllinie genutzt, bei denen eine oder zwei DNA-Methyltransferasen deletiert worden sind. Dies sind HCT116 DNMT1^{-/-}, HCT 116 DNMT3b^{-/-} und HCT116 DNMT1^{-/-}/3b^{-/-} (= HCT116 DKO) verwendet (zur Verfügung gestellt von B. Vogelstein, The Johns Hopkins University Medical Institutions, Baltimore, USA). Diese permanenten Zelllinien wurden bis zur Konfluenz kultiviert und dann gesplittet. Das Nährmedium für die Brustkarzinom- und die Nierenzellkarzinomzelllinie ist DMEM (Dulbeccos modified eagle medium) mit 4500 mg/l Glukose mit den Zusätzen 10% FCS (fötales Kälberserum) und 0,5% Penicillin/Streptomycin. Das Nährmedium für die Kolonkarzinomzelllinie sowie die Leukämiezelllinie ist RPMI. Als Zusätze wurden hier 10% FCS, 1% NEAA (non-essentiell amino acids), 1% Natriumpyruvat und 0,5% Penicillin/ Streptomycin zugesetzt (RPMI komplett).

Außerdem wurden PBMCs (peripheral blood monocytes) wie unter 2.2.6.3 beschrieben gewonnen und in RPMI komplett kultiviert.

Die Demethylierung der Zellen erfolgte mit 2µM 5'-Aza-2'-Deoxycytidin für 72h. Die Zellen wurden bis zur Semikonfluenz kultiviert. In diesem Stadium wurde das Zellkulturmedium abgenommen und durch Medium mit dem Zusatz von 2µM 5'-Aza-2'-Deoxycytidin ersetzt. 5'-Aza-2'-Deoxycytidin wird während der Proliferation der Zellen anstelle von Cytidin in die DNA eingebaut und kann im Gegensatz zu diesem nicht

methyliert werden. Da 5'-Aza-2'-Deoxycytidin lichtempfindlich ist, wurden die Zellen unter Lichtausschluß für 72h bei 37°C weiter kultiviert.

2.2.6.3 Generierung von dendritischen Zellen

PBMCs (peripheral blood monocytes) wurden aus Blutproben gesunder Spender mit der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation (Boyum, 1968) gewonnen. Das Blut wurde hierzu 1:2 mit PBS versetzt, auf vorgelegtes Ficoll geschichtet und für 45min bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand sowie der sich bildende Ring aus mononukleären Zellen wurde abgenommen, mit kaltem 2mM EDTA in PBS gewaschen und nochmals 15min bei 300 x g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß dekantiert, das Pellet mit kaltem 2mM EDTA in PBS resuspendiert und beides erneut für 15min bei 300 x g bei 4°C zentrifugiert.

Aus diesen Zellen wurden Monozyten mit Hilfe von Beads gekoppelter anti-CD 14 Antikörper durch magnet-assistierte Separation (MACS) abgetrennt. Hierzu wurden 10^7 Zellen in 80µl MACS-Puffer aufgenommen, 20µl anti-CD14-Beads zugegeben und der Ansatz für 15min bei 4°C inkubiert. Es folgte ein Waschschriff mit kaltem MACS-Puffer. Das Pellet wurde in kaltem, entgastem MACS-Puffer aufgenommen. Die Zellsuspension wurde dann auf die mit MACS-Puffer äquilibrierte Säule aufgebracht. Nach dem Durchfluss der Zellsuspension wurde mehrmalig mit kaltem, entgastem MACS-Puffer gespült. Dann wurden die CD14 positiven Monozyten mit X-Vivo eluiert.

$1,5-2 \times 10^7$ dieser Monoyten wurden in zytokinsupplementiertem dendritischem Zellmedium aufgenommen und innerhalb von 5 Tagen zu immaturren dendritischen Zellen (DC) differenziert.

2.2.6.4 Elektroporation von Zellen

Das Prinzip der Elektroporation beruht darauf, dass das Transmembranpotential der Zellen durch einen kurzzeitigen Stromstoß gestört wird. Die Veränderung des Transmembranpotentials durch einen externen Stimulus wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$\Delta V_m = f E_{\text{ext}} r \cos \phi$$

V_m ist das Transmembranpotential, f ein Formfaktor, der den Einfluss der Zelle auf die extrazelluläre Feldverteilung beschreibt. $f E_{\text{ext}}$ beschreibt das angelegte elektrische Feld, r den Radius der Zelle und ϕ den Winkel zu dem extern angelegten elektrischen Feld. Der Faktor f wird häufig mit 1,5 angegeben, ist allerdings von vielen anderen Einflüssen abhängig (Kotnik et al. 1997). Die Elektroporation der Zellen ist erfolgreich, wenn das angelegte elektrische Feld die Kapazität der Zellmembran übersteigt, d.h.

ΔV_m ist größer als ein Schwellenwert ΔV_s , der mit 1V angegeben wird (Kinosita, Jr. and Tsong, 1977). Da der Aufbau der Zellmembran als Bilayer ein gemeinsames Merkmal eukaryotischer Zellen ist, variiert dieser Wert wenig für verschiedene Zelllinien.

Durch den bielektrischen Zusammenbruch des Transmembranpotentials werden transient hydrophile Poren gebildet, durch die Wasser in die Zelle eindringt, welches Moleküle wie z.B. Nukleinsäuren in die Zellen transportiert (Weaver, 1995; Neumann et al., 1999).

Vor der Elektroporation wurden die verwendeten adhärennten Zellen bis zur semi-Konfluenz kultiviert, mit PBS gewaschen und mit Trypsin von den Zellkulturflaschen abgelöst. Die Zellen wurden in Medium mit 10% FCS (fetal calf serum) überführt und 8min bei 500 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in dem serumfreien Medium X-Vivo resuspendiert und wiederum 8min bei 500 x g zentrifugiert. Dieser Waschvorgang erfolgte noch zwei weitere Male um Reste von FCS zu entfernen, die die nachfolgende Elektroporation stören würden.

Nach dem Waschen wurden die Zellen in 250 μ l auf die gewünschte Zelldichte eingestellt, in die Elektroporationsküvetten überführt und auf Eis gestellt. Nach Zugabe der entsprechenden Menge *in vitro* transkribierter RNA unter gründlichem Mischen wurde die Elektroporation bei 200V und 250 μ F durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen sofort in das adäquate Nährmedium überführt und bei 37°C bei 5% CO₂ inkubiert.

3 Ergebnisse

3.1 Neue tumor-selektiv exprimierte Gene der Cancer/Germline Gen Klasse

3.1.1 Identifizierung von Kandidatengenem durch Datenbanksuche

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Identifikation neuer Gene der Cancer/Germline (CG) Genklasse. Unsere Arbeitshypothese war, dass wir durch Expressionsstudien möglichst vieler keimzellspezifischer Gene in Tumoren neue Mitglieder der CG Genklasse finden sollten.

Hierbei war es eine besondere Herausforderung eine authentische Liste tatsächlich testisspezifischer Gene zu generieren, die als Ausgangspunkt für eine solche Studie dienen könnte. Zu diesem Zweck führten wir ein *Data Mining* von Sequenzdatenbanken durch. Zur Reduzierung der Komplexität beschränkten wir die Suche auf Volllänge Gene. Zum Zeitpunkt des *Data Mining*, im März 2001, befanden sich etwa 12.000 Volllänge Gene in der öffentlichen Domäne der Sequenzdatenbank.

Die hierarchische Schlagwortsuche nach *testis specific gene*, *sperm specific gene* und *spermatogonia specific gene* innerhalb der *FlatFiles* in *GenBank* resultierte in 150 unabhängigen Volllänge Genen. Ergänzend zu dieser Schlagwortsuche wurde mit Hilfe des *cDNA xProfilers* ein Vergleich von expressed sequence tag (EST) Datenbanken durchgeführt. Hierbei wurden Testis-cDNA-Bibliotheken mit EST- Banken somatischer Gewebe verglichen. Diese Suche resultierte in 154 Genen. Die Kombination dieser beiden Strategien führte zu einer Liste von 268 potentiell testisspezifischer Gene, da 36 Gene mit beiden Strategien gefunden wurden. Durch Literaturrecherchen und *eNorthern*, bei dem ein erneuter Abgleich der Gensequenz mit EST-Datenbanken stattfand, wurden einige weitere Gene als nicht testisspezifisch demaskiert, so dass die Anzahl der Gene auf 143 reduziert werden konnte (Abb. 3.1.1; Tab. 6; Anhang Tab. 20a+b).

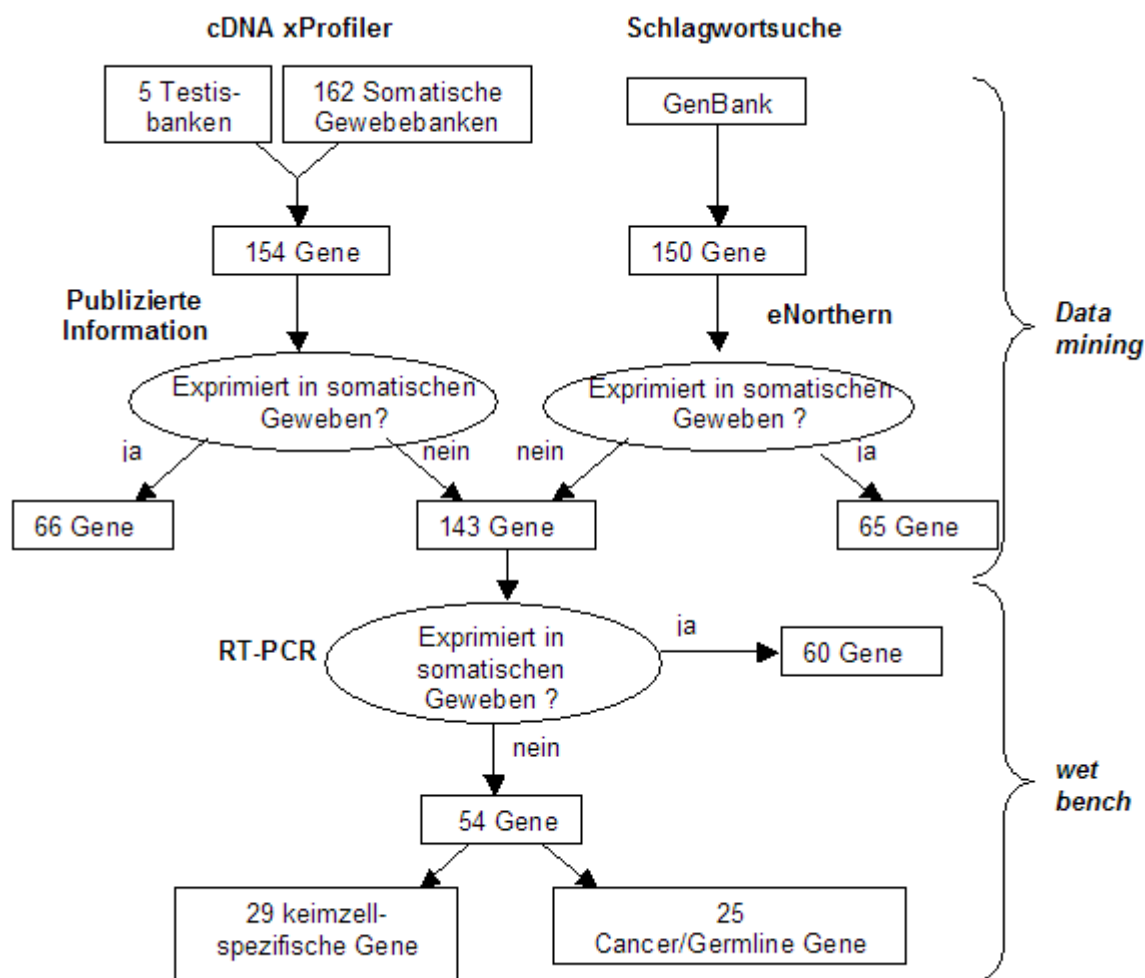


Abb. 3.1.1: Strategie zur Identifizierung keimzellspezifischer Gene. Eine Datenbanksuche wurde anhand des *cDNA xProfilers* und der *ENTREZ* Schlagwortsuche durchgeführt. Die Kombination der beiden Strategien ergab eine Liste von 268 testikulären Genen (36 Gene wurden durch beide Methoden gefunden), die als keimzellspezifisch prädiert wurden. Durch eNorthern und Literatursuche wurde die Anzahl der keimzellspezifischen Gene auf 143 reduziert, von denen 114 in RT-PCR Analysen in Testis und somatischen Geweben untersucht wurden. Durch diese Analysen wurden 54 keimzellspezifische Gene extrahiert, die aufgrund ihrer Expression in Tumoren weiter klassifiziert wurden in solche, die nur in Keimzellen exprimiert werden und solche, die zusätzlich auch in Tumoren exprimiert werden (CG Gene).

Des Weiteren wurden intronlose Gene und Gene von denen hochhomologe Pseudogene existieren, nicht in die nachfolgenden Untersuchungen einbezogen (Anhang Tab. 20b). 114 Gene wurden im Folgenden in *wet bench*-Experimenten untersucht, um die Authentizität der testisspezifischen Expression zu verifizieren. Dies erfolgte durch RT-PCR Analyse in einem umfassenden Panel von Normalgeweben (Milz, Thymus, Mamma, Leber, Ovar, Prostata, Lymphknoten, Uterus, Niere, Thyroid, Dünndarm, Kolon, Ösophagus, Lunge, Haut, aktivierte PBMCs (peripheral blood monocytes), Hirn, Schilddrüse und Testis). Die verwendeten PCR-Primer sowie Annealingtemperaturen sind in Tabelle 19 (Anhang) aufgeführt.

Von den untersuchten 114 Genen wurden 60 Gene auch in anderen Normalgeweben außer Testis gefunden und sind somit nicht testisspezifisch (Anhang Tab. 20a). Das Expressionsmuster dieser Gene war hierbei sehr unterschiedlich. Einige Gene konnten in nahezu jedem Normalgewebe gefunden werden (z.B. STK13), wohingegen die Expression anderer Gene nur in Testis und in wenigen weiteren Normalgeweben detektiert werden konnte (z.B. TBX22 in Thyroid).

Nur die verbleibenden 54 Gene, die in keinem nicht-testikulärem Normalgewebe detektierbar waren, wurden als authentisch testisspezifisch gewertet (Tab. 6). Unter diesen befanden sich 19 Gene die bereits als CG Gene bekannt waren. Diese bestätigten die Richtigkeit unseres Ansatzes.

Die Expression der verbliebenen 35 als testisspezifisch verifizierten Gene wurde anschließend in einem Panel aus mehr als 100 Tumorproben verschiedenster Entitäten getestet (17 Bronchialkarzinome, 20 Brustkarzinome, 20 Kolonkarzinome, 16 Melanome, 8 Prostatakarzinome, 7 Nierenzellkarzinome, 7 Ovarialkarzinome, 6 Zervixkarzinome, 4 Schilddrüsenkarzinome sowie 14 Melanom- und Bronchialkarzinomzelllinien). 28 Gene, die in keinem Normalgewebe außer Testis exprimiert wurden, sowie in keinem der getesteten Tumoren, wurden als rein testis- bzw. keimzellspezifisch eingestuft (Tab. 6). Eine potentielle Expression in hier nicht getesteten Tumoren kann allerdings nicht völlig ausgeschlossen werden. Die übrigen 6 Gene (MORC, TPX-1, LDHC, SGY-1, FTNB, SPO11), wurden in einem Teil der untersuchten Tumorproben nachgewiesen und daher als neue CG Gene deklariert (Tab. 7).

Tab. 6: Auflistung der Gene, die nach *eNorthern* und RT-PCR unter Verwendung von Normalgeweben als keimzellspezifisch eingestuft wurden.

Symbol	Gen	Chromosom	Acc.-Nr.
ADAM2	a disintegrin and metalloproteinase domain 2	8p11	NM_001464
ADAM3A	cyritestin protein	8p21	X89657
ADAM18	a disintegrin and metalloproteinase domain 18	8p22	NM_014237
ADAM30	a disintegrin and metalloproteinase domain 30	1p13	NM_021794
AKAP4	A kinase (PRKA) anchor protein 4	Xp11	NM_003886
BAGE	B melanoma antigen	4p16	NM_001187
BOLL	boule-like (Drosophila)	2q33	NM_033030
BPESC1	blepharophimosis, epicanthus inversus and ptosis, candidate	3q23	NM_021812
BRDT	bromodomain, testis-specific	1p31	NM_001726
CAST	calpastatin	5q14	NM_001750
CST8	cystatin 8	20q11	NM_005492
CTAG2	cancer/testis antigen 2	Xq28	NM_020994
CXORF2	chromosome X open reading frame 2	Xq28	NM_001586
CYLC2	cylicin, basic protein of sperm head cytoskeleton 2	9q31	NM_001340
DAZ	deleted in azoospermia	Yq11	NM_004081
DMRT1	doublesex and mab-3 related transcription factor 1	9p24	NM_021951
GAGE2	G antigen 2	Xp11	NM_001472
GAGE3	G antigen 3	Xp11	NM_001473
GAGE4	G antigen 4	Xp11	NM_001474
LDHC	lactate dehydrogenase C	11p15	NM_002301
LOC51213	HOM-TES-85 tumor antigen	Xq24	NM_016383
MAGEA2	melanoma antigen, family A, 2	Xq28	NM_005361
MAGEA3	melanoma antigen, family A, 3	Xq28	NM_005362
MAGEA4	melanoma antigen, family A, 4	Xq28	NM_002362
MAGEB1	melanoma antigen, family B, 1	Xp21	NM_002363
MAGEB4	melanoma antigen, family B, 4	Xp21	NM_002367
MAGEC1	melanoma antigen, family C, 1	Xq26	NM_005462
MCSP	mitochondrial capsule selenoprotein	1q21	NM_030663
MORC	microrchidia (mouse) homolog	3q13	NM_014429
NYD-SP26	testis development protein	4q13	NM_033122
NYD-SP27	testis development protein	12p12	NM_033123
ODF1	outer dense fibre of sperm tails 1	8q22	NM_024410
PP2Bs1	similar to Protein phosphatase 2B regulatory subunit 1	9q22	BC030595
PRM1	protamine 1	16p13	NM_002761
PRM2	protamine 2	16p13	NM_002762
SAGE	putative tumor antigen	Xq28	NM_018666
SGY-1	soggy-1 gene	19q13	NM_014419
SPACA1	sperm acrosome associated 1	Xq27	NM_030960
SPAM1	sperm adhesion molecule 1	7q31	NM_003117
SPANXC	SPANX family, member C	Xq27	NM_022661
SPO11	meiotic protein covalently bound to DSB	20q13	NM_012444
SYCP1	synaptonemal complex protein 1	1p13	NM_003176
TCP10	t-complex 10 (a murine tcp homolog)	6q27	NM_004610
TETM4	testis-expressed transmembrane-4 protein	11q12	NM_023945
THEG	testicular haploid expressed gene	19p13	NM_016585
TNP2	transition protein 2	16p13	NM_005425
TPTE	transmembrane phosphatase with tensin homology	21p11	NM_013315
TPX1	testis specific protein 1	6p21	NM_003296
TSKS	testis-specific kinase substrate	19q13	NM_021733
TSPY	testis specific protein, Y-linked	Yp11	NM_003308
UBQLN3	ubiquilin 3	11p15	NM_017481
VASA	VASA protein	5q11	NM_019039
VCX	variable charge, X chromosome	Xp22	NM_013452
XAGE-1	XAGE-1 protein	Xp21	NM_020411

Tab. 7: Charakteristika der keimzellspezifischen Gene. Die keimzellspezifischen Gene wurden klassifiziert nach ihrer Geschlechtsspezifität (f=weiblich, m=männlich), ihrem gametogenetischen Status in dem die Expression initiiert wird und ihrer transkriptionellen Aktivierung in somatischen Zellen nach genomischer Hypomethylierung. Mitglieder einer Genfamilie mit hoch homologen Genen wurden in dieser Tabelle zusammengefasst, z.B. MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4.

	Gensymbol	Chromosom	Geschlechts-spezifität	Entwicklungsstadium	Induktion durch DAC	Aktivierung in DNMT1/3b k.o.
	Keimzellspezifische Gene	DA7	Yn11	m	nremeiotic	-
DMRT1		9p24	m/f	premeiotic	-	nd
VASA		5q11	m/f	premeiotic	+	nd
BOLL		2q33	m/f	meiosis I	+	-
BPESC1		3q23	m/f	meiosis I	-	nd
ADAM 30		1p13	m	meiosis II/postmeiotic	-	nd
ADAM18		8p22	m	meiosis II/postmeiotic	-	nd
ADAM3A		8p21	m	meiosis II/postmeiotic	-	nd
AKAP4		Xp11	m	meiosis II/postmeiotic	-	nd
CAST		5q14	m	meiosis II/postmeiotic	-	nd
CST8		20q11	m	meiosis II/postmeiotic	-	-
CXORF2		Xq28	m	meiosis II/postmeiotic	+	nd
CYLC2		9q31	m	meiosis II/postmeiotic	-	-
MCSP		1q21	m	meiosis II/postmeiotic	-	nd
NYD-SP26		4q13	m	meiosis II/postmeiotic	-	nd
NYD-SP27		12p12	m	meiosis II/postmeiotic	-	nd
ODF1		8q22	m	meiosis II/postmeiotic	+	-
PP2Bs1		9q22	m	meiosis II/postmeiotic	-	nd
PRM1,2		16p13	m	meiosis II/postmeiotic	-	-
SPACA1		Xq27	m	meiosis II/postmeiotic	-	nd
SPAM1		7q31	m	meiosis II/postmeiotic	-	nd
TCP10		6q27	m	meiosis II/postmeiotic	-	-
TETM4		11q12	m	meiosis II/postmeiotic	-	nd
TNP2		16p13	m	meiosis II/postmeiotic	-	nd
TSG		19p13	m	meiosis II/postmeiotic	-	nd
TSKS		19q13	m	meiosis II/postmeiotic	-	-
UBQLN3	11p15	m	meiosis II/postmeiotic	-	nd	
VCX	Xp22	m	meiosis II/postmeiotic	-	-	
CG Gene	Gensymbol	Chromosom	Geschlechts-spezifität	Entwicklungsstadium	Induktion durch DAC	Aktivierung in DNMT1/3b k.o.
	BAGE	4p16	m	premeiotic	+	+
	GAGE2,3,4	Xp11	m/f	premeiotic	+	+
	HOM-Tes-85	Xq24	m/f	premeiotic	+	nd
	MAGEA2,3,4	Xq28	m/f	premeiotic	+	+
	MAGEB1,4	Xq21	m/f	premeiotic	+	nd
	MAGEC1	Xq26	m/f	premeiotic	+	nd
	MORC	3q13	m/f	premeiotic	+	+
	SAGE	Xq28	m/f	premeiotic	+	nd
	SPANXC	Xq27	m/f	premeiotic	+	nd
	TSPY	Yp11	m	premeiotic	+	nd
	XAGE1	Xp21	m/f	premeiotic	+	+
	BRDT	1p31	m/f	meiosis I	+	+
	SPO11	20q13	m/f	meiosis I	-	-
	SYCP1	1p13	m/f	meiosis I	+	+
	ADAM2	8p11	m	meiosis II/postmeiotic	-	-
	LDHC	11p15	m	meiosis II/postmeiotic	-	-
	NY-ESO-1	Xq28	m	meiosis II/postmeiotic	+	nd
SGY-1	19q13	m	meiosis II/postmeiotic	-	nd	
TPX1	6p21	m	meiosis II/postmeiotic	-	nd	

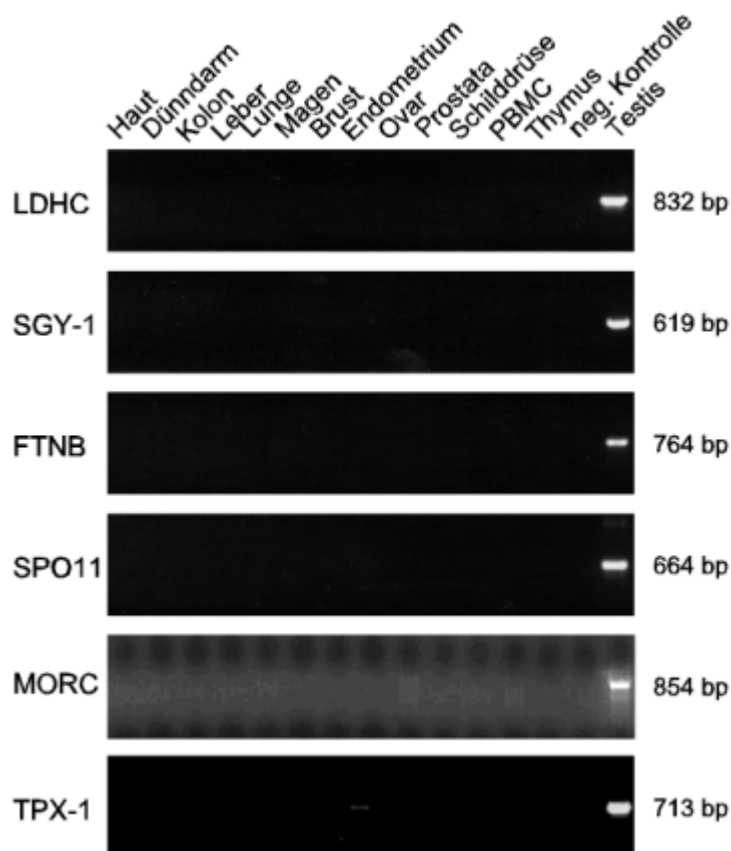
3.1.2 Charakterisierung der neuen CG Gene

Die durch vergleichende RT-PCR Untersuchungen in Normal- und Tumorgeweben identifizierten 6 neuen CG Gene (MORC, TPX-1, LDHC, SGY-1, FTNB, SPO11) sind in unterschiedlichen Frequenzen in diversen Tumorentitäten exprimiert (Abb. 3.1.2 a+b; Tab. 8).

ADAM2, SPO11 und MORC wurden nur in wenigen der getesteten Tumoren nachgewiesen (ADAM2 in 4 von 119, SPO11 in 5 von 119 und MORC in 9 von 119 getesteten Tumor-cDNAs). Dagegen wurde TPX-1 in 3 von 8 Prostata-Karzinomen und in 3 von 20 Brustdrüsenkarzinomen detektiert. SGY-1 wurde in 4 von 16 Melanomen, in 2 von 17 Bronchialkarzinomen, in 4 von 20 Brustdrüsenkarzinomen, wie auch vereinzelt in weiteren Tumoren exprimiert.

Die höchsten Expressionsfrequenzen fanden wir für LDHC, das vor allem in Bronchialkarzinomen (8 von 17), in Melanomen (7 von 16) und in Nierenzellkarzinomen (4 von 7) sehr frequent exprimiert wurde.

a.



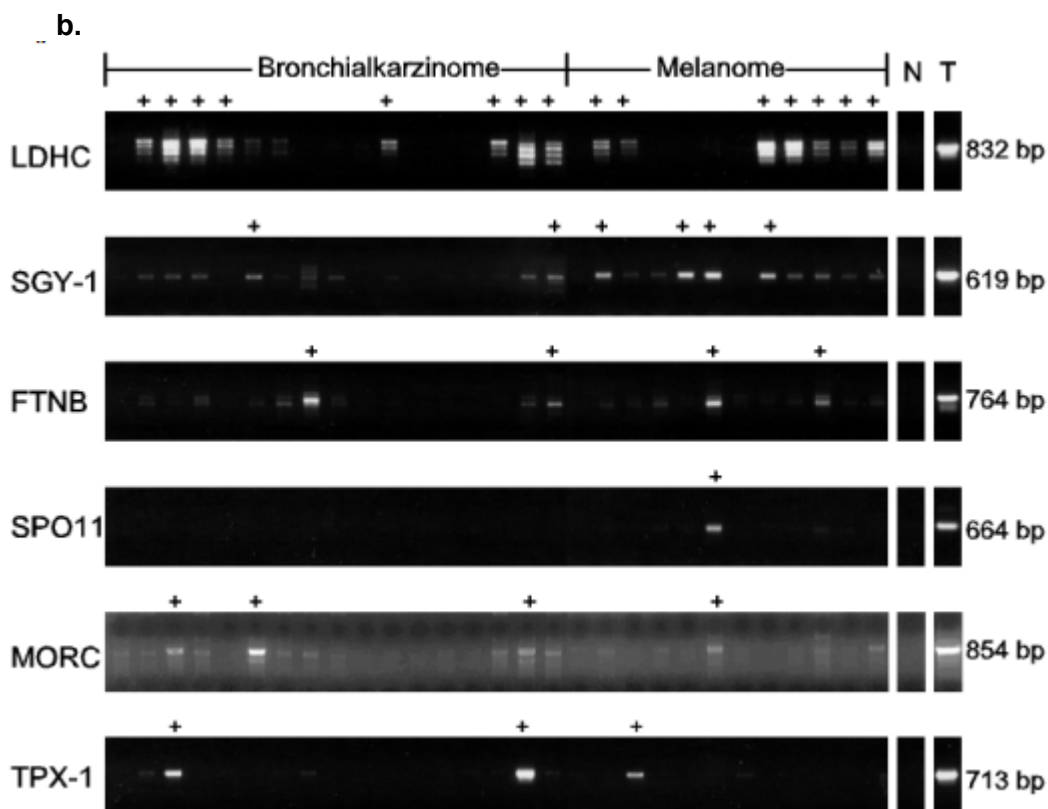


Abb. 3.1.2: RT-PCR Analyse der neuen CG Gene a. in Normalgeweben; b. in Tumorgeweben und Tumorzelllinien. Die Banden, die als positiv gewertet wurden sind mit einem + gekennzeichnet.

Tab. 8: Expressionsfrequenzen der neu identifizierten CG Gene in verschiedenen Tumoren.

Gewebe	getestet	LDHC 11p15	TPX-1 6p21	SGY-1 19q13	ADAM2 8p11	SPO11 20q13	MORC 3q13
Accession-Nummer		NM_002301 NM_017448	NM_003296	NM_014419	NM_001464	NM_012444	NM_014429
Melanome	16	7 (44%)	1 (6%)	4 (25%)	1 (6%)	1 (6%)	3 (18%)
Brustdrüsenkarzinome	20	7 (35%)	3 (15%)	4 (20%)	0	0	0
Kolonkarzinome	20	3 (15%)	0	0	0	0	0
Prostatakarzinome	8	3	3	1	2	0	0
Bronchialkarzinome	17	8 (47%)	2 (12%)	2 (12%)	1 (6%)	0	3 (18%)
Nierenzellkarzinome	7	4	1	0	0	0	0
Ovarialkarzinome	7	3	1	4	0	0	1
Schilddrüsenkarzinome	4	1	0	0	0	0	0
Zervixkarzinome	6	5	1	2	0	2	0
Melanom- Zelllinien	8	5	2	2	0	0	1
Bronchialkarzinom-Zelllinien	6	2	1	2	0	2	1

Bei diesen 6 Genen handelt es sich um bekannte Volllänge Gene, für die wir auf bereits publizierte Charakterisierungen zurückgreifen konnten.

LDHC ist ein Isoenzym der Laktatdehydrogenasen A und B. Seine Expression ist im Gegensatz zu diesen beschränkt auf sich entwickelnde und reife Keimzellen des preleptotenen-zygotenen Stadiums bis hin zu differenzierten Spermatozoen (Jethanandani and Goldberg, 2001).

MORC ist das humane Ortholog des *Microchidia* Genes, dem eine Rolle bei der Rekombination der Chromosomen in der frühen meiotischen Prophase zugesprochen wird (Watson et al., 1998). MORC ist ein nukleäres Protein, welches bereits als spezifisch nur in männlichen Keimzellen exprimiert beschrieben wurde (Inoue et al., 1999).

TPX-1 ist ein integrales Protein der ODFs (outer dense fibers) und des Akrosoms. Es weist eine sehr hohe Homologie zur Familie der Cystein-reichen sekretorischen Proteine (CRISP) auf. Es konnte in Spermatischen, nicht aber in testikulären somatischen Zellen nachgewiesen werden und wird erstmals in späten pachytänen Spermatozyten exprimiert, bevor es nach 4-5 Tagen in das sich entwickelnde Spermiummakrosom inkorporiert wird. Es spielt dort vermutlich eine Rolle bei der Entwicklung des Spermiumkopfes sowie bei der Funktion des Spermiumschwanzes (O'Bryan et al., 2001b).

β-Fertilin (ADAM2) gehört zu einer großen Gruppe von integralen Membranproteinen, der ADAM-Familie und weist eine metalloproteinase-ähnliche sowie eine cystein-reiche Domäne auf. Seine Funktion liegt wahrscheinlich in der Interaktion zwischen Spermium und Oozyte (McLaughlin et al., 2001).

SGY-1 ist ein sekretiertes Protein, welches Homologien zur Dickkopf Protein Familie aufweist, die Wnt vermittelte Effekte während der frühen Embryogenese supprimieren. SGY-1 wird während verschiedenen Stadien in den Spermatogonien exprimiert (Krupnik et al., 1999).

SPO11 ist ein meiosespezifisches Protein, welches in den frühen Stadien der Meiose kovalent an DNA-Doppelstrangbrüche bindet. Es ist auf Chromosom 20q13.2–q13.3 lokalisiert, einem Bereich, der in einigen Brust- und Ovarialkarzinomen amplifiziert ist (Romanienko and Camerini-Otero, 1999).

3.1.3 Determinierung von unterscheidenden Klassenprädiktoren für strikt keimzellspezifische Gene versus CG Gene

Offensichtlich wird ein Teil der hier analysierten keimzellspezifischen Gene in Tumoren aktiviert (19 bereits bekannte und 6 neue Cancer/Germline Gene) ein anderer Teil aber nicht (28 strikt keimzellspezifische Gene)(Tab.7). Um zu verstehen, welche Besonderheiten damit korrelieren, dass ein Gen in eine dieser beiden Gruppen stratifiziert, wollten wir Klassenprädiktoren identifizieren, die mit jeder dieser beiden

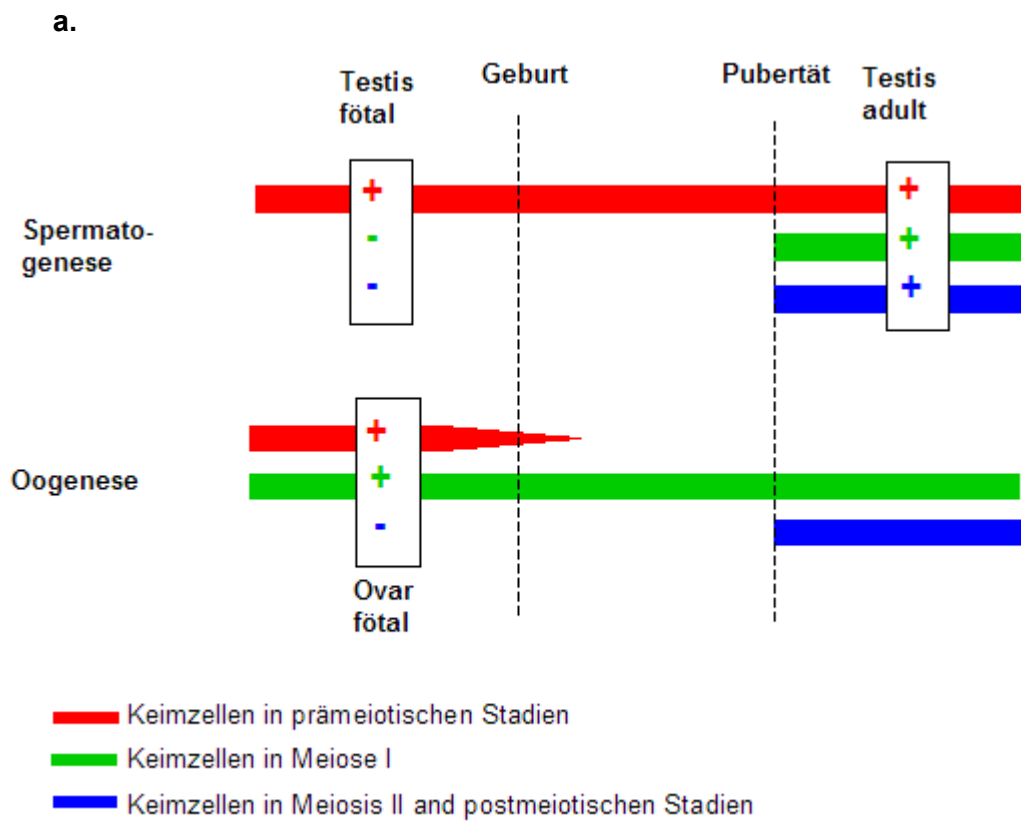
Gruppen korrelieren. Hierzu untersuchten wir alle Gene aus beiden Gruppen auf unten beschriebene Eigenschaften.

3.1.3.1 Geschlechtsspezifität der Keimzellexpression

Ursprünglich sind CG Gene als Cancer/Testis Gene bezeichnet worden, da in RT-PCR Untersuchungen Testis das einzige exprimierende Normalgewebe war. Erst nach der Verfügbarkeit von Immunseren wurden Zellen der Gametogenese als die eigentliche positive Zellpopulation identifiziert.

Als erstes untersuchten wir für alle gefundenen Gene die Expression in Spermatogenese und Oogenese. In der Oogenese wird die Meiose ab der 11. Woche nach Befruchtung initiiert (Gondos et al., 1986). Oozyten können allerdings für mehr als 40 Jahre in der ersten meiotischen Prophase arretieren (Goto et al., 1999; Motta and Makabe, 1986). Zwischen männlicher und weiblicher Gametogenese gibt es erhebliche zeitliche Differenzen im Bezug auf das Erreichen der verschiedenen Entwicklungsstadien. Mit Rücksichtnahme auf diese Unterschiede wurde die Geschlechtsspezifität der keimzellspezifischen Gene durch die Analyse der Expression in adultem Testis (in dem alle Stadien der Spermatogenese auftreten können), fötalem Ovar (in dem die frühen Stadien der Oogenese bis zur Meiose I auftreten können) und adultem Ovar (bei dem die meiotischen Stadien der Oozytenentwicklung auftreten können) untersucht (Abb. 3.1.3 a).

Mehr als 99% der Oogonien und Oozyten gehen zwischen dem fünften Schwangerschaftsmonat und dem Zeitpunkt des Einsetzens der Pubertät in Apoptose. Adultes Ovarialgewebe ist sehr stromahaltig und enthält wenig Keimzellen. Um sicher zu gehen, dass die zur RNA-Extraktion genutzten ovarialen Gewebestücke auch Keimzellen enthalten, wurde die Expression von SYCP1 (Meuwissen et al., 1997), welches bekanntermaßen ausschließlich in den Keimzellen exprimiert wird, als Marker genutzt. Es wurden dann nur solche RNA-Proben weiterverwendet, die positiv für SYCP1 waren.



b.

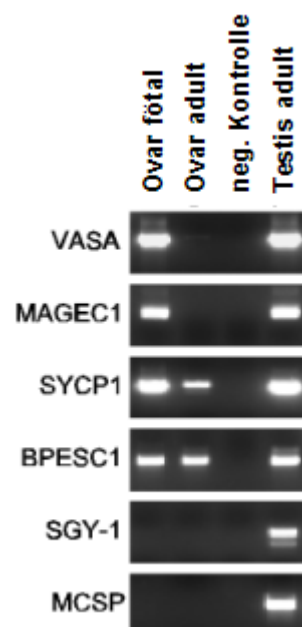


Abb. 3.1.3: Untersuchung der Geschlechtsspezifität. a. Darstellung der zeitliche Differenzen zwischen männlicher und weiblicher Gametogenese. b. Untersuchung von fötalem Ovar, qualitätskontrolliertem adultem Ovar und Testis.

Durch die Untersuchung von fötalem Ovar und durch die Nutzung von qualitätskontrolliertem adultem Ovar konnten einige Gene, die vorher ausschließlich in männlichen Keimzellen gefunden wurden, auch in weiblichen Keimzellen detektiert werden. Hierzu gehören z.B. Mitglieder der MAGE-Familie, aber auch HOM-*TES85*, *MORC* und *BRDT* (Abb. 3.1.3 b; Tab. 7). Dies deutet darauf hin, dass diesen Genen potentiell eine Funktion in der Keimzellentwicklung zukommt. Die Funktion der meisten CG Gene ist aber bislang noch unbekannt.

3.1.3.2 Stadium der transkriptionellen Aktivierung während der Gametogenese

Als nächstes untersuchten wir, in welchem Stadium der Gametogenese diese Gene aktiviert werden. Da keine reinen Populationen gametogenetischer Zellen in verschiedenen Entwicklungsstadien zur Verfügung standen, wurden Mischgewebe für diese Untersuchungen genutzt. Die zeitlichen Differenzen in der männlichen und weiblichen Gametogenese (Abb. 3.1.3 a) wurden dabei berücksichtigt.

Im Gegensatz zu Oogonien treten die Spermatogonien erst in der Pubertät nach einer langen Arrestationsphase in der Mitose in die Meiose ein. Außerdem sind im fötalen Testis lediglich prämeiotische Zellen enthalten (Gondos and Hobel, 1971), während in adultem Testis alle Stadien der Differenzierung von Spermatogonien bis hin zu postmeiotischen Spermatiden enthalten sind.

Hieraus folgerten wir, dass Gene, die unterschiedlichen Stadien der Keimzellentwicklung zuzuordnen sind, auch distinkte aber vorhersagbare Expressionsmuster in fötalem Testis, fötalem Ovar und adultem Testis aufweisen müssten (Abb. 3.1.4).

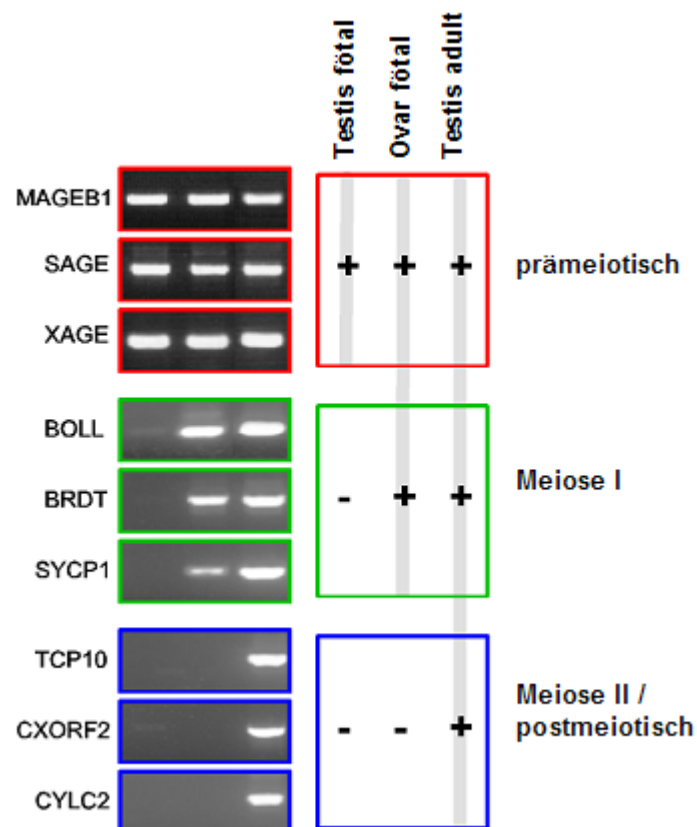


Abb. 3.1.4: Expressionsanalyse der Gene in fötalem Ovar, fötalem Testis und adultem Testis zur Einteilung der Gene in solche, die im prämeiotischem, frühen meiotischem oder meiotischem bzw. postmeiotischem Stadium exprimiert werden.

Durch die Expressionsanalyse in fötalem Ovar, fötalem Testis und adultem Testis lassen sich die Gene in solche einteilen, die im prämeiotischem, frühen meiotischem oder meiotischem bzw. postmeiotischem Stadium exprimiert werden.

Die Untersuchung ergab, dass die Mehrheit der CG Gene in frühen prämeiotischen Stadien der Gametogenese aktiviert werden, während die Expression der keimzellspezifischen Gene häufig erst in späten Stadien der Meiose oder postmeiotisch in der Gametogenese induziert wird (Abb. 3.1.4; Tab. 7).

3.1.3.3 Abhängigkeit der Aktivierung vom DNA-Methylierungsstatus

Ein Mechanismus, der in die Genregulation involviert ist und der eine effiziente Gensilenzierung ermöglicht, ist die DNA-Methylierung (Eden and Cedar, 1994; Meehan et al., 1992; Bird, 1992). Es ist bereits beschrieben, dass genomische Demethylierung zur Expression von diversen keimzellspezifischen Genen in Tumoren führt (De Smet et al., 1996; De Smet et al., 1999b; Honda et al., 2004). Um die Rolle der DNA-Methylierung in der transkriptionellen Kontrolle der beschriebenen Gene zu testen, wurden Zelllinien durch die Behandlung mit der Substanz 5'-Aza-2-Deoxycytidin (DAC)

demethyliert und auf die Expression der keimzellspezifischen Gene und CG Gene getestet.

Die Expression der Mehrzahl der CG Gene (80%) ließ sich durch die beschriebene Behandlung der Zellen induzieren, während nur ein kleiner Teil (18%) der keimzellspezifischen Gene hierdurch induziert wurde (Abb. 3.1.5 a; Tab. 7).

Um dieses Ergebnis noch einmal zu bestätigen, wurde die Expression der Gene zusätzlich in verschiedenen Klonen der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 untersucht, bei denen entweder die Methyltransferase DNMT1 oder DNMT3b oder beide Methyltransferasen durch homologe Rekombination deletiert waren. Es ist beschrieben, dass, während die Deletion jeweils einer der beiden Methyltransferasen lediglich zu moderater Abnahme des genomischen Methylierungsstatus führt (20% bei Deletion von DNMT1 (Rhee et al., 2000); 3% bei Deletion von DNMT3b (Rhee et al., 2002)), ein kombinierter Ausfall beider DNMTs die Methylierung auf 95% reduziert (Rhee et al., 2002).

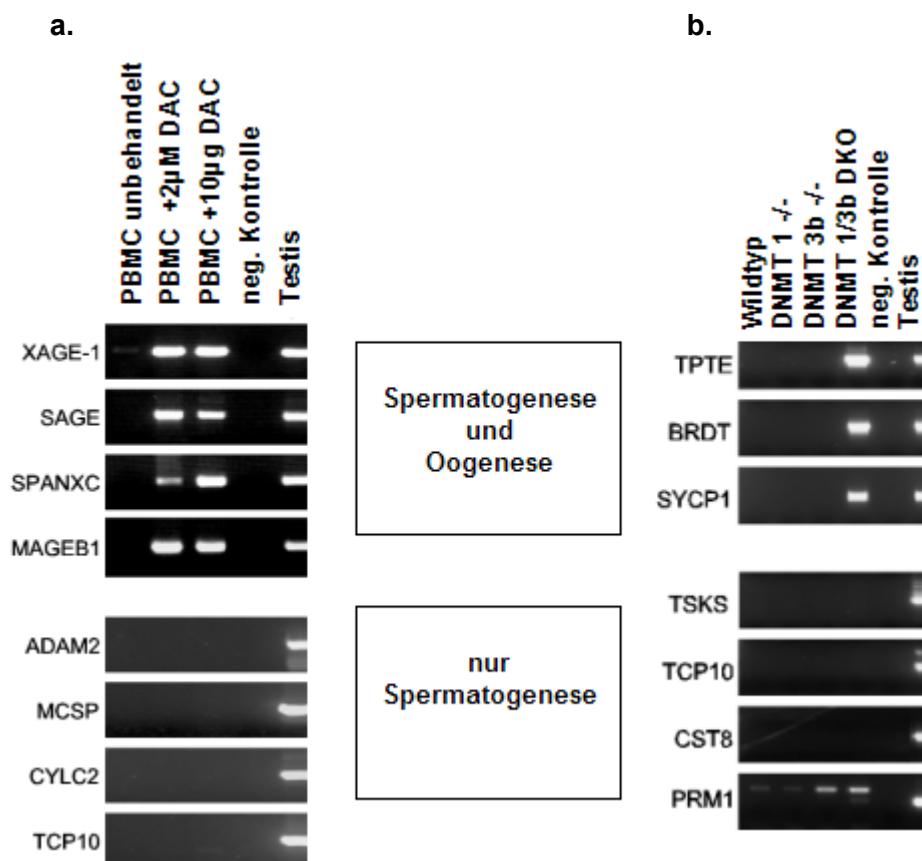


Abb. 3.1.5: Effekt der genomischen Demethylierung auf die transkriptionelle Regulation von Keimzellgenen. **a.** PBMCs wurden für 72 Stunden mit oder ohne 5'-Aza-2-deoxycytidine (DAC) kultiviert und im Anschluss auf die Expression der keimzellspezifischen Gene getestet **b.** Die Expression von Genen in der parentalen HCT116-Zelllinie wurde im Vergleich zur Expression der Gene in den Varianten, die eine Deletion der Methyltransferase DNMT1 oder DNMT3b oder beider Methyltransferasen aufweisen untersucht. Die größere Bande in dem PCR-Bild von PRM1 (Protamin) stellt eine Amplifikation genomischer DNA dar, die ein kleines Intron enthält.

Die Expression der meisten prämeiotisch aktiven keimzellspezifischen Genen war in der doppelt deletierten Zelllinie DNMT1/3b^{-/-} induziert, aber nicht in den Zelllinien, bei denen nur eine der Methyltransferasen deletiert ist (Abb. 3.1.5 b; Tab. 7). Für die Induktion der Expression der Gene, die in Oogenese und Spermatogenese exprimiert sind, ist dem zufolge eine nahezu vollständige Demethylierung nötig. Die strikt keimzellspezifischen Gene, die nur in der Spermatogenese exprimiert werden, lassen sich nicht durch Hypomethylierung induzieren.

3.1.3.4 Chromosomale Lokalisation

Um die Möglichkeit einer Koregulation der untersuchten Gene festzustellen, ermittelten wir die chromosomale Lokalisation der keimzellspezifischen Gene und der CG Gene (Abb. 3.1.6).

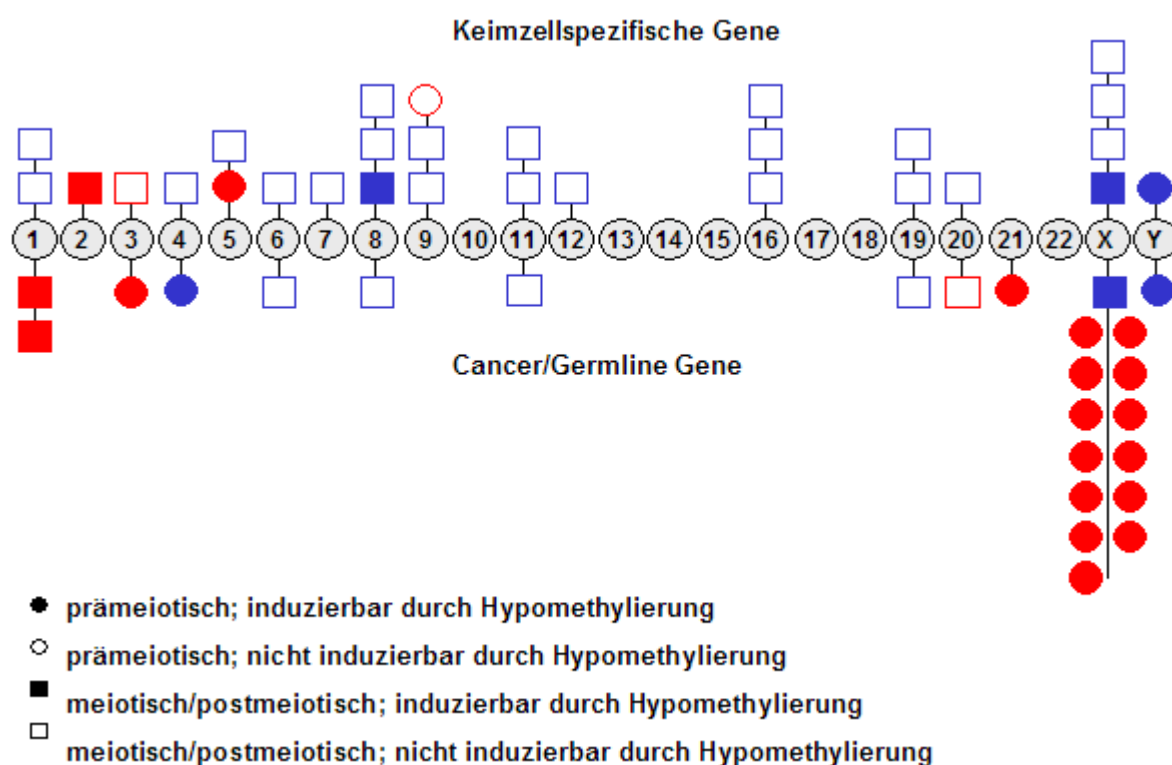


Abb. 3.1.6: Analyse der chromosomalen Lokalisation der untersuchten Gene. Die Gene wurden in keimzellspezifische Gene und CG Gene aufgeteilt und ihre Verteilung über das Genom wird aufgezeigt. Blaue Zeichen repräsentieren die Gene, die nur in der Spermatogenese exprimiert werden, rote Zeichen solche, die sowohl während der Spermatogenese als auch während der Oogenese exprimiert werden.

Wir stellten fest, dass solche keimzellspezifischen Gene auf dem X-Chromosom clustern, die in Tumoren aktiviert werden (Tab.7). Insbesondere waren es auch solche Gene, die prämeiotisch in beiden Geschlechtern exprimiert werden, und die sich durch Demethylierung induzieren lassen (Abb. 3.1.5). Gewebsspezifische oder koregulierte Gene sind häufig auf dem selben Chromosom lokalisiert. So wird zum Beispiel den Geschlechtschromosomen eine besondere Rolle in der Gametogenese zugeordnet (Wang et al., 2001; Hurst and Randerson, 1999; Mintz and Debinski, 2000).

Fasst man die erhobenen Daten zusammen, ergeben sich signifikante Korrelationen der CG Gen Klasse mit definierten Eigenschaften, während strikt keimzellspezifische Gene mit den jeweils diametral entgegengesetzten Eigenschaften korrelieren.

CG Gene sind statistisch häufiger (Abb.3.1.7; Tab. 7):

- prämeiotisch exprimiert
- induzierbar durch Hypomethylierung
- exprimiert in Spermatogenese und Oogenese
- X-chromosomal lokalisiert

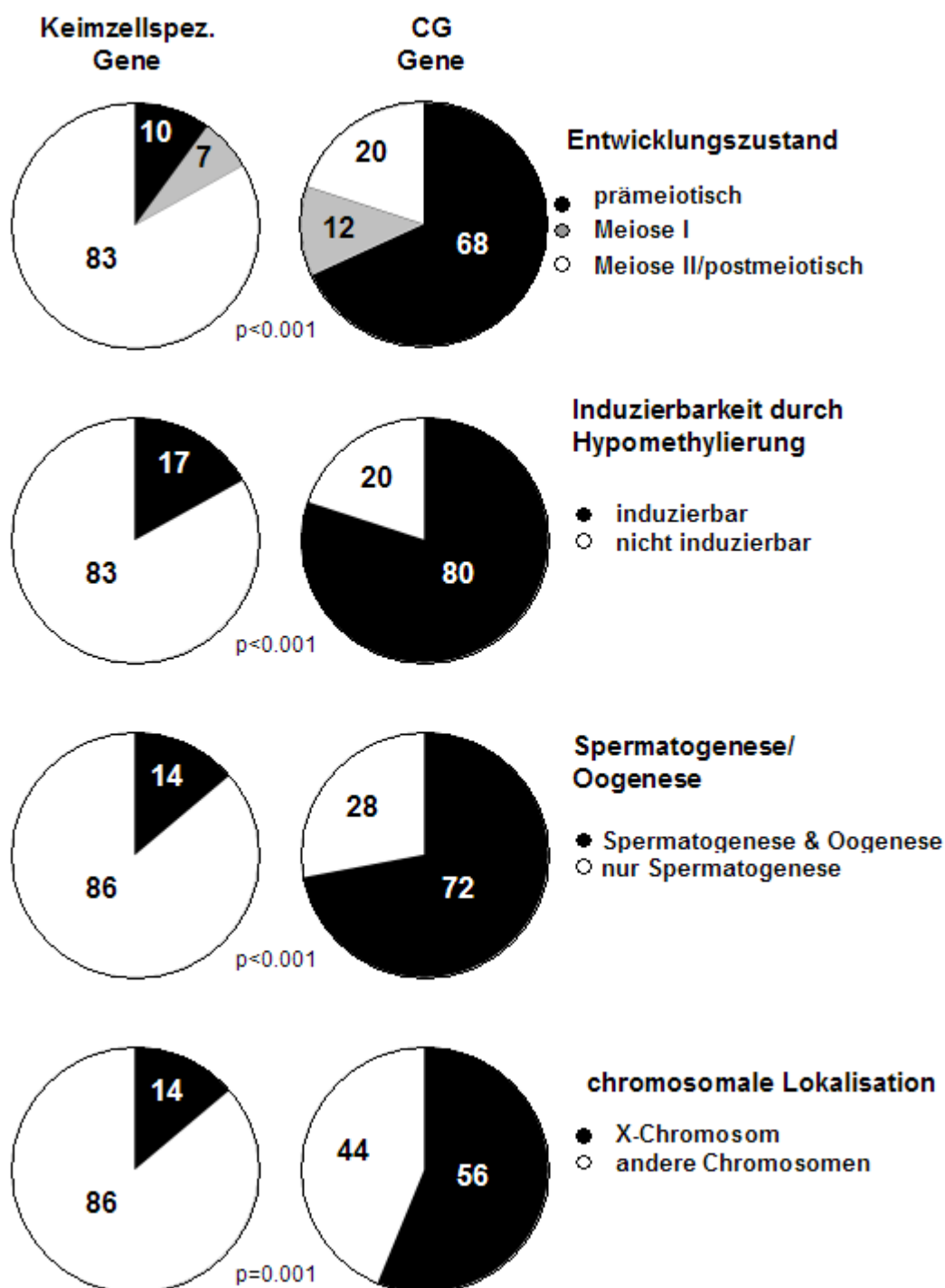


Abb. 3.1.7: Korrelation der untersuchten Eigenschaften mit der Unterteilung in keimzellspezifische Gene und CG Gene. Verteilung von keimzellspezifischen Genen und CG Genen im Bezug auf das Entwicklungsstadium, in dem sie exprimiert werden, die Induzierbarkeit durch Hypomethylierung, Geschlechtsspezifität und chromosomale Lokalisation. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Fisher's Test und des χ^2 - Tests ermittelt.

3.2. Neue in Tumoren überexprimierte Gene

3.2.1 Technische Etablierung und Durchführung der vergleichenden Transkriptomanalyse von Tumoren und Normalgeweben

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Identifikation von Genen, die in Tumoren im Vergleich zu Normalgeweben eine deutliche Überexpression aufweisen. Als methodischen Zugang wählten wir hierzu die vergleichende Transkriptomanalyse von humanen Tumoren und Normalgeweben mittels *medium-density* cDNA Mikroarrays. Unsere Untersuchungen fokussierten wir auf das Mammakarzinom, das Kolonkarzinom und das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom (NSCLC), weil diese drei Tumorentitäten aufgrund ihrer hohen Prävalenz von großer klinischer Bedeutung sind.

Der für die Untersuchungen verwendete *Oncoimmunochip cDNA Mikroarray*, wurde im Rahmen eines Vorgängerprojektes von der Firma Memorec Biotec GmbH, Köln und unserer Arbeitsgruppe entwickelt (www.eurice.de/eucip/). Der *Oncoimmunochip* repräsentiert 1152 bekannte Gene, die aufgrund ihrer molekularen Funktion tumorbiologische und tumorimmunologische Relevanz haben (Tab. 9). Die entsprechenden cDNAs der 1152 Gene und der entsprechenden Kontrollgene wurden in 4-fachen Replikaten gespottet.

Tab. 9: Zusammenstellung der Genklassen, die auf dem *Oncoimmunochip cDNA Mikroarray* repräsentiert sind.

Genfunktion	Bsp. für Gene
Onkogene, Tumorsuppressorgene	p53, BRCA1, VHL
Tumormarker, Tumorantigene	AFP, WT1, MIC1
CD (cluster of differentiation)	CD1, CD154
Cytokine, Chemokine und Rezeptoren	IL-1, IL-18, CCL1
Stressgene	HSPs, FKBP, NFkB
Zellzyklus	CDKs, Cykline
DNA- Reparatur und Metabolismus	RAD, GADD
Transkriptionsfaktoren	E2F, FKH, IKBs
Apoptose	BCL-2, Kaspasen, TNF, TRAF
Signaltransduktion	STATs, SOCS
Komponenten der extrazellulären Matrix	Intrigrine, Kollagene, MMPs
Serexgene	HCAP-G, DSP, SSX2IP
Kontrollgene	B2M, GAPDH

Bevor die Untersuchungsreihe initiiert werden konnte, mussten zunächst zwei technische Herausforderungen gelöst werden. Dies war zum einen die Auswahl einer adäquaten Referenzprobe und zum anderen die limitierte Menge des zur RNA-Extraktion zur Verfügung stehenden klinischen Materials.

3.2.1.1 Auswahl einer Referenzprobe

In dem verwendeten Arraysystem werden komparative Hybridisierungen durchgeführt, d.h. Probe und Kontrolle werden mit unterschiedlichen Chromophoren (CY3, CY5) markiert und auf einem Array hybridisiert. Die Arrays werden im Folgenden gescannt. Hierzu wird ein Scan für den Farbstoff CY3 und ein Scan für den Farbstoff CY5 durchgeführt. Das Gesamtbild ergibt sich aus einer Übereinanderlagerung der beiden Einzelscans. Die Mischfarbe aus beiden Farbstoffen wird als gelbes Feld abgebildet, während nur rote oder grüne Felder die Präsenz des entsprechenden Gens in lediglich einer Probe anzeigen (Abb. 3.2.1).

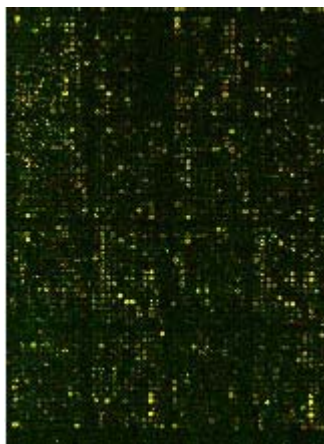


Abb. 3.2.1: Darstellung eines übereinandergelegten Bildes nach Scan der beiden Chromophoren.

Üblicherweise dient bei der paarweisen Hybridisierung von Tumorproben und Normalgewebeproben auf einem Array das Normalgewebe als Referenz für die Bestimmung der relativen Genexpressionslevel im Tumor. Voraussetzung hierfür ist die Verfügbarkeit von Tumorproben und korrespondierendem Normalgewebe eines Patienten. Werden Gewebeproben verschiedener Patienten auf einem Array hybridisiert, gehen interindividuelle Unterschiede des Genexpressionsprofil ein. Stehen Tumor-/Normalgewebepaare (*matched pairs*) eines Patienten wie in unserem Fall nicht zur Verfügung, müssen alle Gewebeproben gegen eine geeignete Referenzsonde hybridisiert werden, um einen Kreuzvergleich aller Proben zu ermöglichen. Entscheidend für die Auswahl der Referenzprobe ist neben der Verfügbarkeit in ausreichender Menge eine hohe Abdeckung der Gene auf dem Array. Folgende Reagenzien wurden daher als Referenzproben primär in Betracht gezogen:

- a. Pool *in vitro* transkribierter RNA hergestellt aus den klonierten Plasmiden aller auf dem Array repräsentierten Gene
- b. *In vitro* transkribierte RNA hergestellt aus einer Testis cDNA-Bibliothek
- c. Pool amplifizierter RNAs aller für die Hybridisierungen verwendeten Gewebe-RNAs (aRNA)

Die Verwendung der Referenz **(a)** sollte theoretisch zu einer nahezu vollständigen Abdeckung der Gene auf dem Array führen, doch war die Durchführung, Etablierung und der Konzentrationsabgleich von >1000 IVT-Ansätzen sowohl finanziell als auch personell nicht realisierbar. Eine cDNA-Bank aus Testisgewebe **(b)** wurde als mögliche Referenz in Erwägung gezogen, da es sich hierbei um ein komplexes Gewebe handelt, in dem bekanntermaßen eine Vielzahl von Genen exprimiert werden. Die Abdeckung sollte demnach für viele der gespotteten Gene erfüllt sein. Der Vorteil bei Verwendung eines Pools aller amplifizierter RNA-Proben die für die Hybridisierung genutzt werden sollten **(c)** war, dass eine Abdeckung nahezu aller Gene zu erwarten war, die auch durch die einzelnen Gewebeproben abgedeckt wurden. Zur Auswahl der geeigneten Referenz wurden deshalb die Testis IVT RNA und der aRNA-Pool komparativ gegen RNA aus Geweben von je einem Mamma-, Kolon- und Bronchialkarzinom hybridisiert. Abb. 3.2.2 zeigt die prozentuale Abdeckung der Referenzproben im Vergleich zu den jeweiligen Tumorproben.

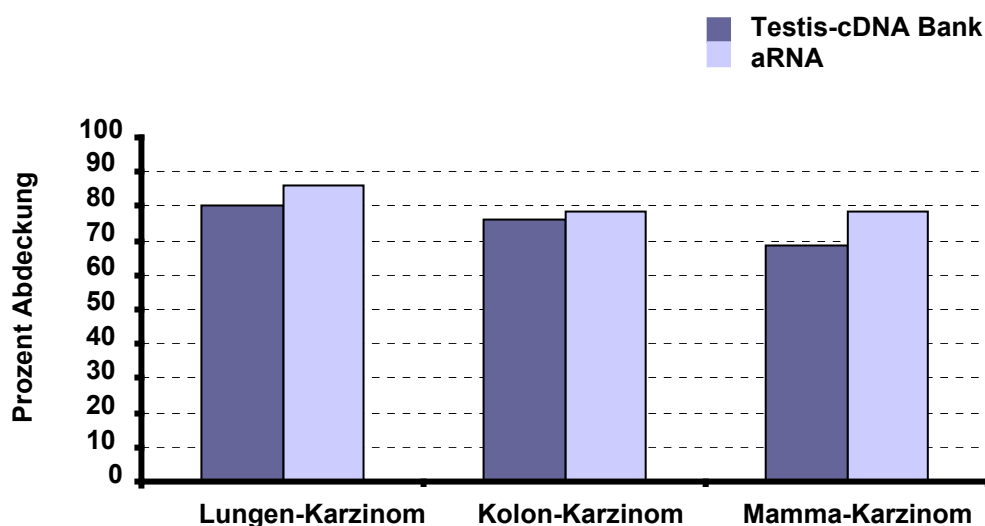


Abb. 3.2.2: Darstellung der prozentualen Abdeckung der Gene nach Hybridisierung der beiden Referenzen gegen Gewebe aus Lungen-, Kolon- und Mammakarzinom. Vergleich zwischen Testis-cDNA-Bank und dem Pool aller amplifizierter RNAs (aRNA) für die einzelnen Gewebe.

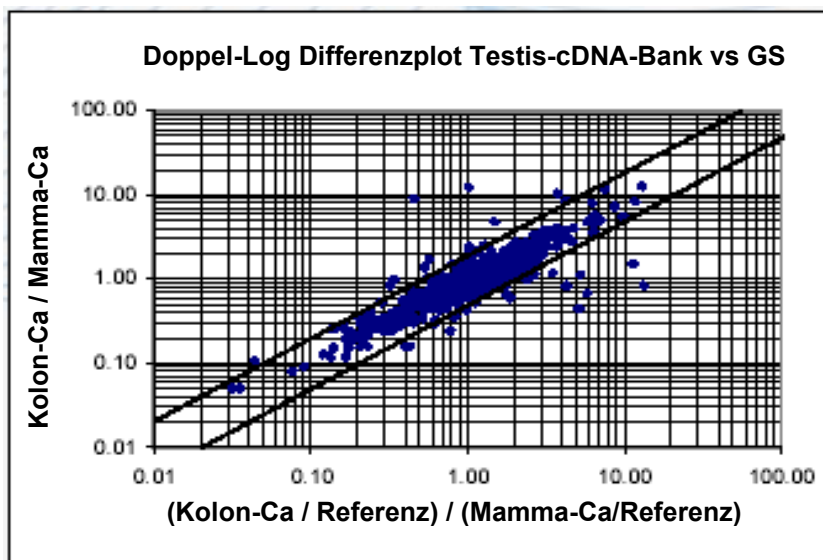
In allen drei Fällen übertrifft die prozentuale Abdeckung des aRNA-Pools die der Testis IVT RNA. Während diese Unterschiede beim Kolonkarzinom nur sehr gering ausgeprägt sind, deckt der aRNA-Pool beim Bronchialkarzinom ca. 5% und beim Mammakarzinom ca. 10% mehr Gene ab, als die Testis IVT RNA Referenz. Dies würde bedeuten, dass bei Verwendung des aRNA-Pools als Referenzprobe ca. 60-120 Gene mehr für die Analyse der Arraydaten zur Verfügung stehen als bei Verwendung der Testis IVT RNA. Die Gesamtabdeckung verteilt über die verschiedenen Tumorgewebe liegt mit ca. 80% -85% in einem geeigneten Bereich.

Neben dem Grad der prozentualen Abdeckung der Gene auf dem Array ist ein weiteres entscheidendes Kriterium für die Auswahl der Referenz, dass der Vergleich zweier Gewebe nach Hybridisierung gegen die Referenz das gleiche Ergebnis liefert, wie die direkte komparative Hybridisierung der zwei Gewebe auf einem Array (Goldstandard GS):

$$\frac{\text{Probe A / Referenz}}{\text{Probe B / Referenz}} = \text{Probe A / Probe B (GS)}$$

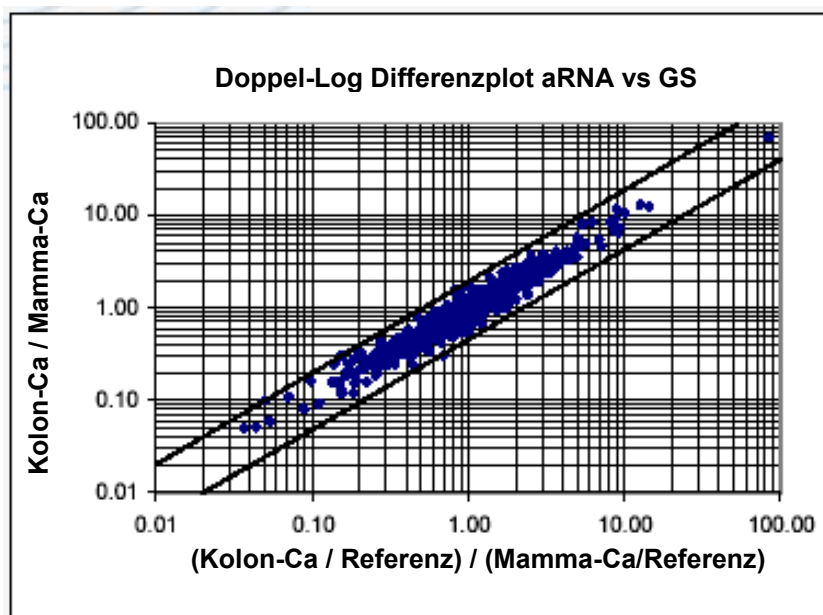
Um zu testen, welche der beiden Referenzproben diese Bedingung optimal erfüllt, wurden jeweils eine Kolonkarzinom- und eine Mammakarzinomprobe zum einen direkt komparativ und zum anderen jeweils gegen die entsprechende Referenz hybridisiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.2.3 dargestellt.

a.



<> 2-fach
reguliert = 4,4%

b.



<> 2-fach
reguliert = 0,1%

Abb. 3.2.3: Vergleich des GS mit der Referenzprobe im doppelt-logarithmischen Differenzplot. a. Direkte komparative Hybridisierung von Mammakarzinom- und Bronchialkarzinomprobe im Vergleich zu der Testis IVT RNA als Referenz b. Direkte komparative Hybridisierung von Mammakarzinom- und Bronchialkarzinomprobe im Vergleich mit dem aRNA-Pool als Referenz.

Markiert ist der Bereich der eine 2-fache differentielle Expression der Gene darstellt. Schwankungen innerhalb dieses Bereichs sind systembedingt und als nicht signifikant zu werten. Die Streuung außerhalb dieser Grenzwerte sollte beim Vergleich des GS gegen die Referenz möglichst gering sein. Bei Verwendung des aRNA-Pools wurden diese Bedingungen nahezu vollständig erfüllt (<2 -fach reguliert = 0,1%), während bei Verwendung der Testis IVT RNA deutliche Differenzen auftraten (<2 -fach reguliert = 4,4%).

Aufgrund der hohen prozentualen Abdeckung der Gene und der Erfüllung der GS-Kriterien wurde für das folgende Gewebeprofilung der aRNA-Pool als Referenzprobe ausgewählt.

3.2.1.2 Etablierung eines cDNA-Amplifikationsverfahrens

Eine weitere Herausforderung war die limitierte Menge an klinischem Material, das vom Pathologen zur Verfügung gestellt werden konnte. Die erforderliche Menge von 100 μ g RNA konnte in der Regel nicht primär durch Extraktion aus den Geweben gewonnen werden. Wir entschlossen uns daher nach der RNA-Extraktion einen Amplifikationsschritt einzuführen, der auf *in vitro* Transkription mit einer T7-abhängigen Polymerase basiert (Eberwine, 1996). Bei Amplifikation besteht die Gefahr, dass unabhängig durchgeführte Reaktionsansätze aus dem selben Ausgangsmaterial nicht reproduzierbar sind, da insbesondere die Repräsentanz seltener oder schwer-amplifizierbarer RNA der Stochastik unterworfen ist. Darum ist es unabdingbar die Reproduzierbarkeit unabhängiger Ansätze zu testen. Um die gleichbleibende Qualität der IVT RNA zu testen, wurden verschiedene Ansätze der gleichen RNA zu verschiedenen Zeitpunkten von verschiedenen Personen hergestellt und komparativ analysiert (Abb. 3.2.4).

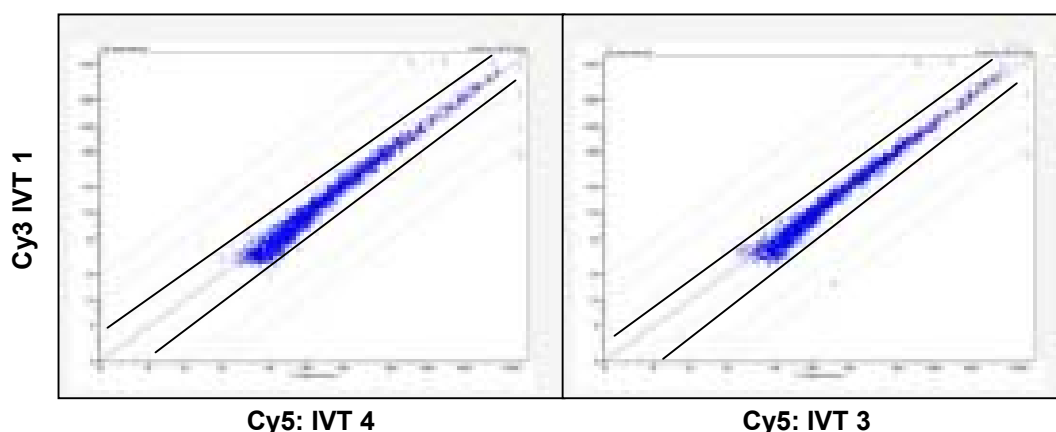


Abb. 3.2.4: Darstellung der Abweichung der verschiedenen Ansätze von *in vitro* transkribierter RNA. Die Anzahl signifikant (außerhalb des markierten Bereichs) regulierter Gene beträgt 0.

Der Vergleich der Hybridisierungen der vier verschiedenen IVT-Ansätze zeigte in allen Fällen ein nahezu identisches Ergebnis. Kein Gen war mehr als 2-fach reguliert, d.h. keines der Gene zeigte eine signifikante Regulation (Abb. 3.2.4).

Aufgrund dieser guten Reproduzierbarkeit wurde im weiteren die extrahierte RNA durch IVT amplifiziert, um die für die Herstellung der Sonden notwendige Menge von 100µg RNA zu erreichen

3.2.1.3 Erstellung des Datensatzes durch Profiling von Tumor- und Normalgeweben

Aus der RNA der unten aufgeführten Tumorgewebe und Normalgewebe von Mamma, Lunge und Kolon (Tab. 10) wurden nach dem zuvor erarbeiteten Protokoll markierte Sonden hergestellt. Diese wurden jeweils mit dem aRNA-IVT-Pool als Referenz auf Arrays hybridisiert. Zur Überprüfung der Integrität der erhobenen Daten wurden neben den genannten Gewebe-RNAs auch RNAs aus ruhenden und aktivierten PBMCs (peripheral blood monocytes) hybridisiert. Diese Proben sollten ein sehr distinktes Cluster bilden, da es sich um eine einheitliche Zellpopulation handelt, die sich deutlich von den anderen verwendeten Geweben abgrenzt.

Tab. 10: Zusammenstellung der hybridisierten Proben. Als Referenz für die Hybridisierungen wurde ein Pool aus diesen Geweben hergestellt.

Gewebetyp	Anzahl hybridisierter Gewebe
Mamma-Normalgewebe	6
Mamma-Karzinom	31
Lunge-Normalgewebe	4
Bronchial-Karzinom	37
Kolon-Normalgewebe	5
Kolon-Karzinom	30
ruhende PBMCs	3
aktivierte PBMCs	3

Nach Durchführung der Hybridisierungen wurden die Arrays gescannt. Anschließend erfolgte die Basisauswertung mit dem Programm ImaGene software Version 4.1 (BioDiscovery, Los Angeles, CA). Vorher wurden für das Auge sichtbare Verunreinigungen auf dem Array manuell maskiert. Nach der Normalisierung über die ebenfalls auf den Array gespotteten Kontrollgene ergaben sich die relativen Expressionswerte im Vergleich zur Referenz, die dann weiteren bioinformatischen Analysen unterzogen wurden.

3.2.2 Clusteranalysen zur Überprüfung der Integrität der erhobenen Daten

Für eine erste beurteilende Analyse wurde ein zwei-dimensionales Eisen-Clustering durchgeführt (Eisen et al., 1998). Dieses Verfahren stellt alle untersuchten Proben auf der Basis der Ähnlichkeit ihrer Transkriptionsprofile in ein Verhältnis und visualisiert ihren Verwandtschaftsgrad. Bei einem zweidimensionalen Clustering wird auf der X-Achse nach den verschiedenen Geweben geclustert und auf der Y-Achse nach den Genen (Abb. 3.2.5).

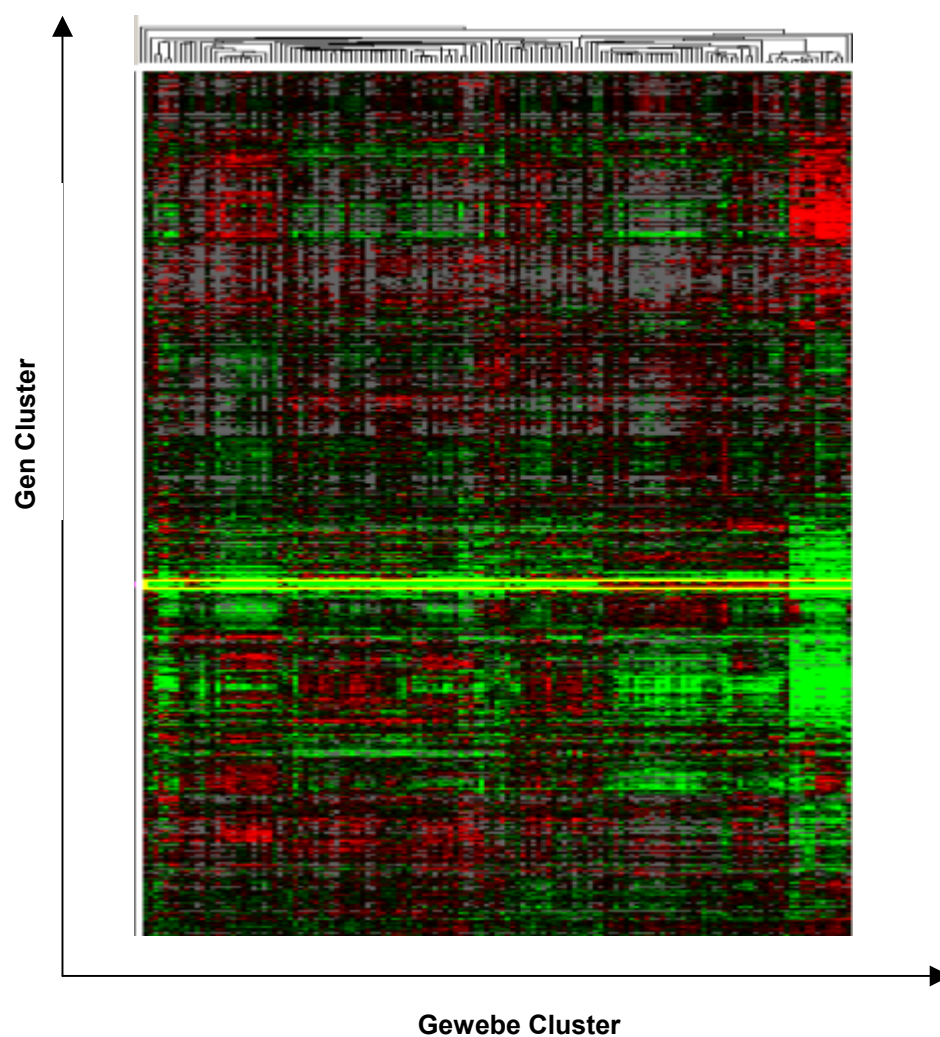


Abb. 3.2.5: Zweidimensionales nicht überwachtes Eisen-Clustering der 119 Gewebearrays.

Obwohl die Clusteranalyse ohne Vorgaben bezüglich der tatsächlichen Identität der Proben durchgeführt wurde, ergaben sich distinkte Cluster der 119 Gewebearrays über alle Gene.

Bei einer genaueren Analyse der auffälligen Cluster, konnten distinkte Cluster für Kolon, PBMCs und Mamma detektiert werden. In diesen Clustern lassen sich auch jeweils bekannte Markergene für die einzelnen Gewebeatitäten finden (Tab. 11; Abb. 3.2.6 a-c).

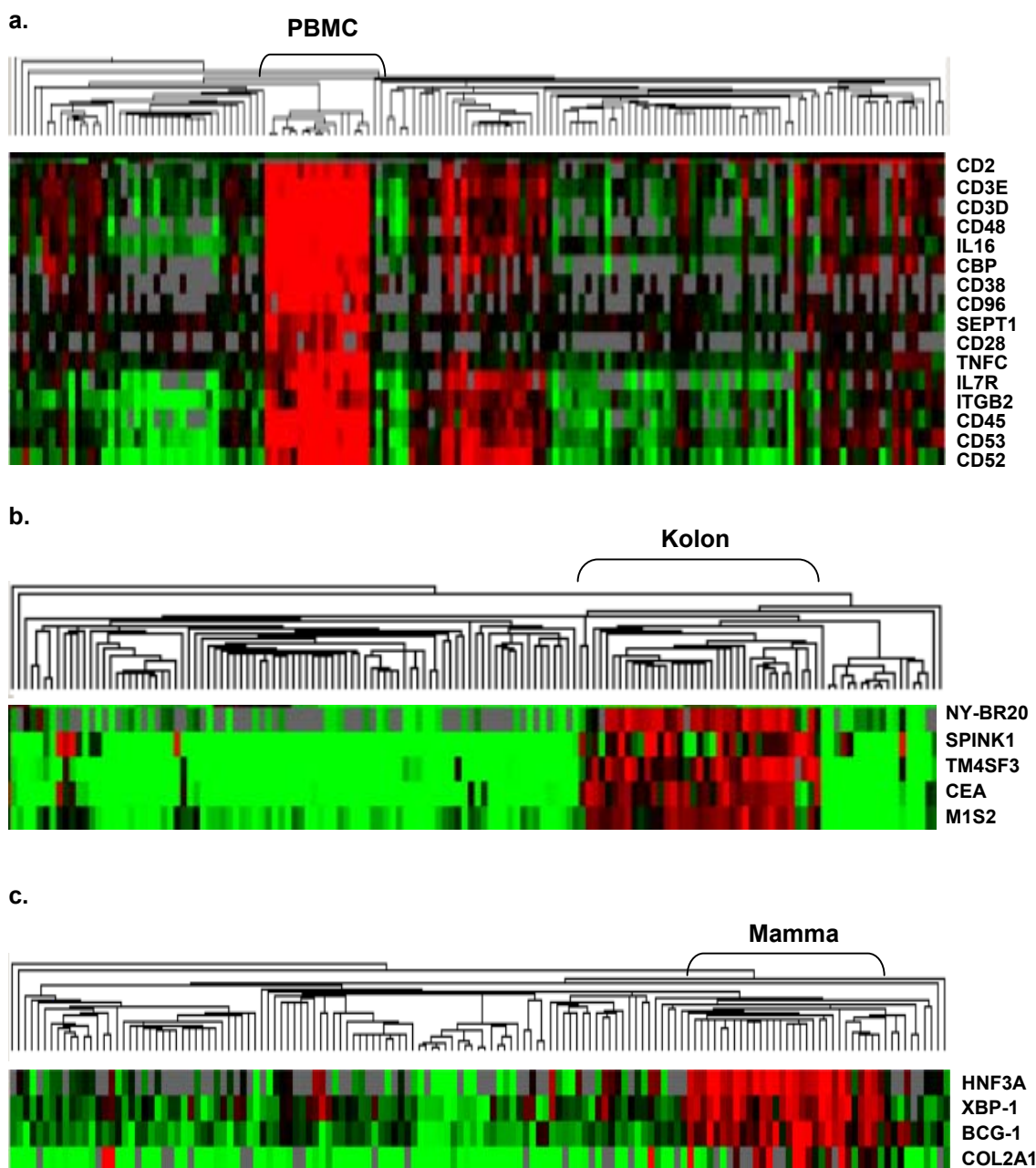


Abb. 3.2.6: Darstellung der gewebspezifischen Cluster. a. Cluster von Lymphozytenmarkern in den PBMC-Proben. b. Cluster von Kolonmarkern in den RNA-Proben aus Kolongewebe. c. Cluster von mammaspezifischen Genen in den RNA-Proben aus Mammagewebe.

Tab. 11: Darstellung der Markergene für die einzelnen Gewebecluster. Alle Gene sind anerkannte Differenzierungsmerkmale für den jeweiligen Gewebetyp.

Cluster	Genname	Acc.Nr.	Literatur
Kolon	CEA (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5)	NM_004363	(Rule and Kirch, 1976)
	TM4SF3 (transmembrane 4 superfamily member 3)	NM_004616	(Szala et al., 1990)
	M1S2 (tumor-associated calcium signal transducer 1)	NM_002354	(Bjork et al., 1993)
PBMC	CD2 (lymphocyte-function antigen-2)	NM_001767	(Enger et al., 1983)
	CD3E (epsilon polypeptide (TIT3 complex))	NM_000733	(Gold et al., 1987)
	CD3D (delta polypeptide (TIT3 complex))	NM_000732	(van den et al., 1984)
	LCP2 lymphocyte cytosolic protein 2	NM_005565	(Jackman et al., 1995)
Mamma	XBP-1 (X-box binding protein 1)	NM_005080	(Fujimoto et al., 2003)

Für die Gewebe Kolon und Mamma sowie für die PBMCs ließen sich eindeutige Cluster detektieren (Abb. 3.2.6), die u.a. die bekannten Markergene beinhalteten. Für Lunge war kein so eindeutiges Subcluster zu erkennen. Eine Differenzierung dieses Gewebes von den anderen war nur bei Betrachtung aller Gene möglich. Bei den hybridisierten nicht-kleinzelligen Lungengeweben handelt es sich um eine histopathologisch sehr inhomogene Gruppe, die aus Plattenepithelkarzinomen, Adenokarzinomen und großzelligen Karzinomen besteht. Neben diesen reinen Subtypen treten aber auch Mischformen auf, so dass ein eindeutiges Clustering dieser Gewebeentität nicht zu erwarten war.

Die Identifizierung von bekannten Markergenen in den entsprechenden Clustern der Gewebe verifizierte die Funktionalität der Methode, so dass durch weitere Clusteranalysen auch neue Differenzierungsgene oder tumor-assoziierte Gene gefunden werden sollten.

3.2.3.1 Darstellung der *most discriminative candidate genes* über die Gesamtheit der Tumorproben in Relation zu allen Normalgeweben

Der Ansatz der *most discriminative candidate genes* sucht nach solchen Genen, deren Expressionen am stärksten zwischen Normalgeweben und Tumorgeweben divergieren. Wir nutzten für diese Analyse den SAM-Algorithmus (statistical analysis of microarrays) und das Programm TM4 TIGR MEV 2.2 (www.tigr.org/software/tm4/mev). Die Ergebnisse wurden in einer *heat map* visualisiert. Als potentielle Tumormarker oder tumor-assoziierte Gene wurden sowohl Gene klassifiziert, die in den Normalgeweben eine deutlich geringere Expression aufwiesen als die Referenz (grüne Felder), als auch solche die in Tumorgeweben eine deutlich erhöhte Expression im Vergleich zu der Referenz zeigten (rote Felder) (Abb. 3.2.7).

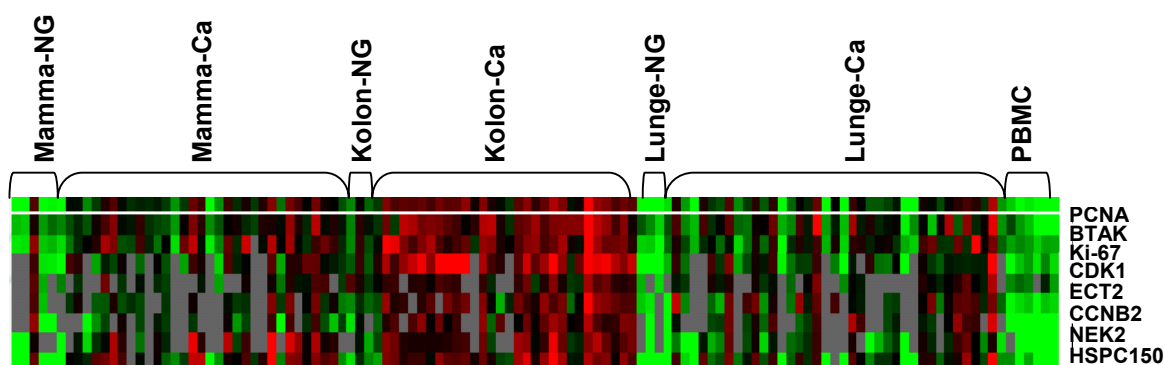


Abb. 3.2.7: Identifizierung von bekannten und neuen Tumormarkern durch Suche nach den *most discriminative candidate genes*. Auswertung anhand einer SAM-Analyse und des TM4 TIGR MEV 2.2 Programms. Grün dargestellt sind die im Vergleich zur Referenz unterexprimierten Gene. Rot dargestellt sind die Gene, die im Vergleich zur Referenz eine erhöhte Expression aufwiesen. Für die grau unterlegten Bereiche standen keine Expressionswerte zur Verfügung.

Tab. 12: Zusammenstellung der *most discriminative candidate genes* und ihrer Funktion.

Acc.-Nr.	Gen-symbol	Genname	Funktion	Literatur
NM_002529	PCNA	proliferating cell nuclear antigen	Kofaktor der DNA-Polymerase delta	(Wu et al., 2002; Dang et al., 2002)
AF011468	BTAK	aurora kinase A	induziert Centrosomenamplifikation und Aneuploidie	(Gritsko et al., 2003),(Li et al., 2003),(Miyoshi et al., 2001)
NM_002417	Ki-67	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	nicht bekannt	(Scopa et al., 2003; Scopa et al., 2003; Villena-Heinsen et al., 2002; Shaaban et al., 2002; Engellau et al., 2001)
NM_001786	CDK1	cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	regulatorische Rolle im Zellzyklus	(Ohta et al., 1998; Barrett et al., 2002)
NM_018098	ECT2	epithelial cell transforming sequence 2 oncogene	regulatorische Rolle in Zytokinese	(Miki et al., 1993; Tatsumoto et al., 1999)
NM_004701	CCNB2	cyclin B2	wichtige Komponente für die Zellzyklusregulation	(Sarafan-Vasseur et al., 2002; Liu et al., 1999)
NM_002497	NEK2	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 2	wichtig für Chromosomen Segregation; nötig für die Bildung bipolarer mitotischer Spindeln	(de Vos et al., 2003; Wai et al., 2002)
NM_014176	HSPC150	HSPC150 protein similar to ubiquitin-conjugating enzyme	nicht bekannt	(Okamoto et al., 2003)

8 Gene wurden auf diese Weise als *most discriminative candidate genes* klassifiziert (Abb. 3.2.7). Die Tatsache, dass 7 dieser Gene bekannte Tumor- bzw. Proliferationsmarker repräsentierten, war Bestätigung für die Plausibilität der Datenanalyse (Tab. 12).

Im Gegensatz zu den bekannten Markergenen war für das Gen HSPC150 eine tumor-assoziierte Expression nicht bekannt. Zur Validierung der Mikroarray-Daten wurde die Expression dieses Gens in einem Set verschiedener Normalgewebe (2x Prostata, 3xMagen, 3xLunge, 2xMamma, 3xKolon) und Tumoren mittels Real-Time RT-PCR quantifiziert (Abb. 3.2.8; Tab. 13). (Primer und Amplifikationsbedingungen s. Anhang Tab. 19).

Tab. 13: Zusammenstellung der differentiellen Expression von HSPC150 in diversen Karzinomen ermittelt mit Hilfe von quantitativer RT-PCR.

Gewebetyp	% überexprimiert
Mamma-Karzinom	9 / 14 (64%)
Bronchial-Karzinom	13 / 14 (93%)
Kolon-Karzinom	7 / 10 (70%)
Magen-Karzinom	3 / 9 (33%)
Prostata -Karzinom	1 / 6 (16%)

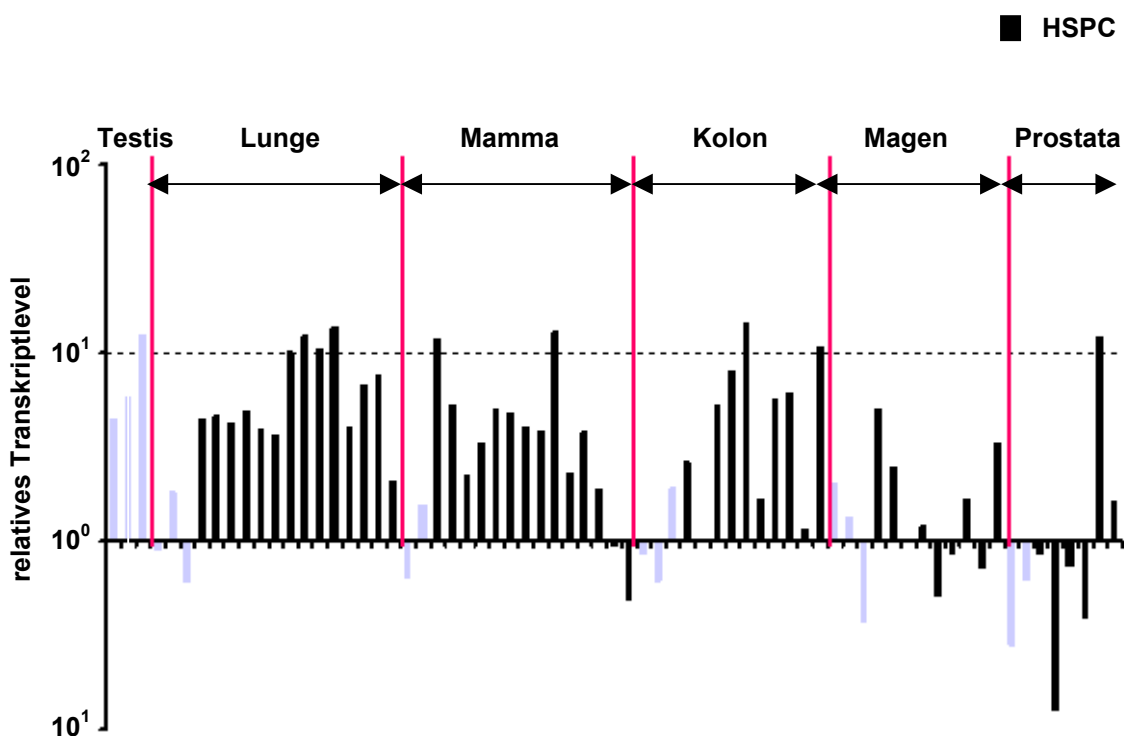


Abb. 3.2.8: Expression von HSPC150 in diversen Tumoren im Vergleich zu der Expression in den korrespondierenden Normalgeweben. Die Expression von Testis wurde im Vergleich zu der Expression der Normalgewebe aus Mamma und Lunge ermittelt, da diese sehr einheitliche Werte aufwiesen. Die Normalisierung erfolgte zur Berücksichtigung unterschiedlicher cDNA-Qualitäten über HPRT. Hellblau dargestellt sind die Normalgewebe, schwarz dargestellt die Karzinome.

Die Real-Time RT-PCR bestätigte die Überexpression von HSPC150 in Tumoren relativ zu den untersuchten Normalgeweben. In Bronchialkarzinomen lag diese 0.5-1 log über der Expression in den korrespondierenden Normalgeweben. In der Regel waren mindestens 50% der Proben, bei Entitäten wie z.B. Bronchialkarzinomen 93% der untersuchten Proben überexprimiert. Eine erhöhte Expression von HSPC150 in Testis im Vergleich zu den anderen Normalgeweben ist bereits beschrieben (Okamoto et al., 2003) und konnte auch in unseren Untersuchungen bestätigt werden.

3.2.3.2 Darstellung der *most discriminative candidate genes* zwischen Bronchialkarzinomen und normalem Lungengewebe mit Fokus auf SEREX-Gene

Als nächstes haben wir differentiell exprimierte Gene geclustert, die am eindeutigsten zwischen Bronchialkarzinomen und normalem Lungengewebe diskriminieren und zu der Gruppe von Genen gehören, gegen die Tumorpatienten bekanntermaßen spontan Autoantikörperantworten ausbilden. Auch hier wurde wieder der SAM-Algorithmus angewendet (Abb. 3.2.9; Tab. 14).

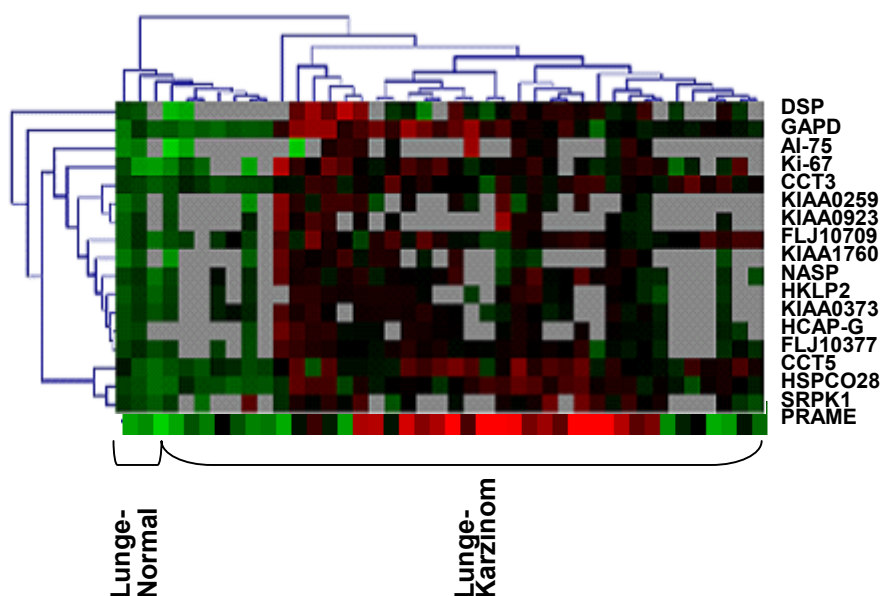


Abb. 3.2.9: Zweidimensionales Clustering nach SEREX-Genen, die in den untersuchten Lungen-Normalgeweben und Bronchialkarzinomen differentiell exprimiert werden.

Tab. 14: Zusammenstellung des Clusters der in Lungenkarzinomen differentiell exprimierten Gene.

Acc.-Nr.	Gen-symbol	Gennamen	Funktion	RT-PCR bestätigt Überexpression ?
NM_004415	DSP	desmoplakin	struktureller Bestandteil des Cytoskeletts	+
NM_002046	GAPDH	glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase	wichtig für Carbohydratmetabolismus	nd
NM_031941	AI-75	auto immune enteropathy related antigen	nicht bekannt	-
NM_002417	Ki-67	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	nicht bekannt	nd
NM_005998	CCT3	T-complex protein 1, gamma subunit	wichtig für Faltung von Aktin und Tubulin	-
NM_007027	KIAA 0259	DNA topoisomerase II binding protein	wichtig für DNA-Replikation und für DNA-Reparatur	-
NM_014021	KIAA 0923	Synovial sarcoma X breakpoint 2 interacting protein	nicht bekannt	-
NM_018188	FLJ 10709	hypothetical protein	nicht bekannt	nd
AJ242724	KIAA 1760	putative mitogen-activated protein kinase kinase kinase	nicht bekannt	
NM_002482	NASP	nuclear autoantigen sperm protein	histon-bindendes Protein; transportiert Histone in den Nukleus sich teilender Zellen	-
NM_020242	HKLP2	kinesin like protein	nicht bekannt	-
AB002371	KIAA 0373	centrosome protein cep290	nicht bekannt	nd
NM_022346	HCAP-G	chromosome associated protein G	wichtig für Kondensation und Segregation der Chromosomen	+
NM_018077	FLJ 10377	weakly similar to nucleolar protein NOP4	nicht bekannt	-
NM_012073	CCT5	T-complex protein 1, epsilon subunit	wichtig für Faltung von Aktin und Tubulin	
NM_014038	HSPC028	basic leucine zipper and W2 domains 2	nicht bekannt	-
NM_003137	SRPK1	serine/arginine rich protein specific kinase1	reguliert intrazelluläre Lokalisation von Spleißfaktoren	-
NM_006115	PRAME	preferentially expressed antigen in melanoma	nicht bekannt	+

Für 18 Gene (Tab. 14) wurde eine deutliche erhöhte Expression in Bronchialkarzinomen verglichen mit den Normalgeweben detektiert (Abb. 3.2.9).

Die Expression von 14 dieser 18 Gene wurde mittels Real-Time RT-PCR in einem Set von Normalgeweben und Tumoren quantifiziert. Die Expression von Ki-67 und GAPDH wurde nicht weiter untersucht, weil es sich hier um bereits gut charakterisierte Gene handelt. Bei den Genen FLJ10709 und KIAA0373 konnte die PCR nicht etabliert werden.

Die tumor-assoziierte Überexpression konnte lediglich für die drei Gene DSP, HCAP-G und PRAME bestätigt werden (Abb. 3.2.10.a+b; Abb. 3.2.11) (Primer und Amplifikationsbedingungen s. Anhang Tab. 19).

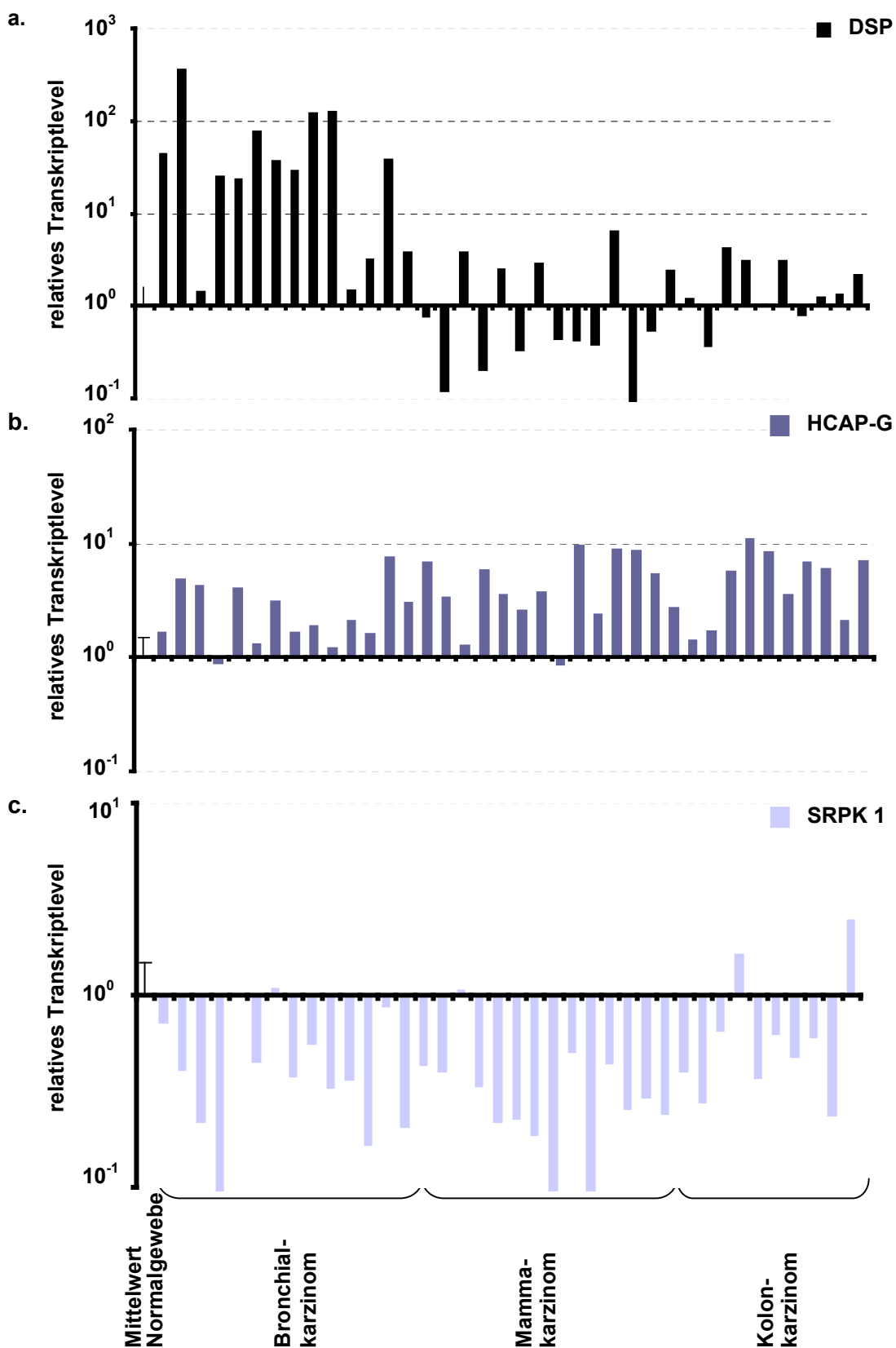


Abb. 3.2.10: Expression von DSP und HCAP-G und SRPK1 in diversen Tumoren im Vergleich zu dem Mittelwert der Expression in Normalgewebe von Brust, Lunge und Kolon. SRPK1 ist ein Beispiel für ein Gen, für das die erhöhte Expression in Tumoren im Vergleich zu Normalgeweben nicht bestätigt werden konnte. Die Normalisierung erfolgte zur Berücksichtigung unterschiedlicher cDNA-Qualitäten über HPRT.

Für Desmoplakin ließ sich in 71% der getesteten Bronchialkarzinome eine erhöhte Expression nachweisen, sowie in 21% der untersuchten Brustkarzinome und in 30% der Kolonkarzinome.

Die Expression von HCAP-G war in 86% der Brustkarzinomen, in 70% der Kolonkarzinomen, aber auch in 43% der Bronchialkarzinome im Vergleich zu den untersuchten Normalgeweben erhöht. SRPK1 ist ein Beispiel für ein Gen, dass keine differentielle Expression zwischen Normalgeweben und Tumoren aufwies.

Ein weiteres auffälliges Gen in der zweidimensionalen Clusteranalyse war PRAME (preferentially expressed antigen in melanoma)(Abb. 3.2.7). Wir verifizierten auch die Überexpression dieses Genes in Tumoren in einer Real-Time RT-PCR. Getestet wurden 31 Normalgeweben (Duodenum, Ileum, Leber, Lymphknoten, Niere, Milz, Ovar, Pankreas, PBMC, aktivierte PBMCs, Thyroid, Nebenniere, 3 Prostata-Proben, Thymus, 3 Lungen-Proben, 3 Brust-Proben, 3 Kolon-Proben, 3 Magen-Proben und 3 Testis-Proben) und diverse Karzinome (Abb. 3.2.11; Tab. 15). (Primer und Amplifikationsbedingungen s. Anhang Tab. 19). Die Normalgewebe gleicher Entität unterschieden sich nur geringfügig voneinander, so dass nur die Expression jeweils eines Normalgewebes (Ausnahme Testis) in Abb. 3.2.11 dargestellt ist.

Tab. 15: Zusammenstellung der differentiellen Expression von PRAME in diversen Karzinomen ermittelt mit Hilfe von Real-Time RT-PCR.

Gewebetyp	% überexprimiert
Mamma-Karzinom	8 / 14 (57%)
Bronchial-Karzinom	12 / 14 (86%)
Kolon-Karzinom	1 / 10 (10%)
Magen-Karzinom	3 / 9 (33%)
Prostata -Karzinom	5 / 6 (83%)
Ovarial-Karzinom	0 / 8 (0%)
Synovialsarkom	6 / 6 (100%)

PRAME zeigt von den untersuchten Genen die deutlichste differentielle Expression mit den höchsten Frequenzen in 93% der Bronchialkarzinome und 100% der Synovialsarkome, aber auch in 57% der Brustkarzinome und in 83% der Prostatakarzinome. Auffällig ist hierbei die Expressionshöhe, die in einigen Bronchialkarzinomen einen Faktor von bis zu 5000 im Vergleich zu den Normalgeweben beträgt.

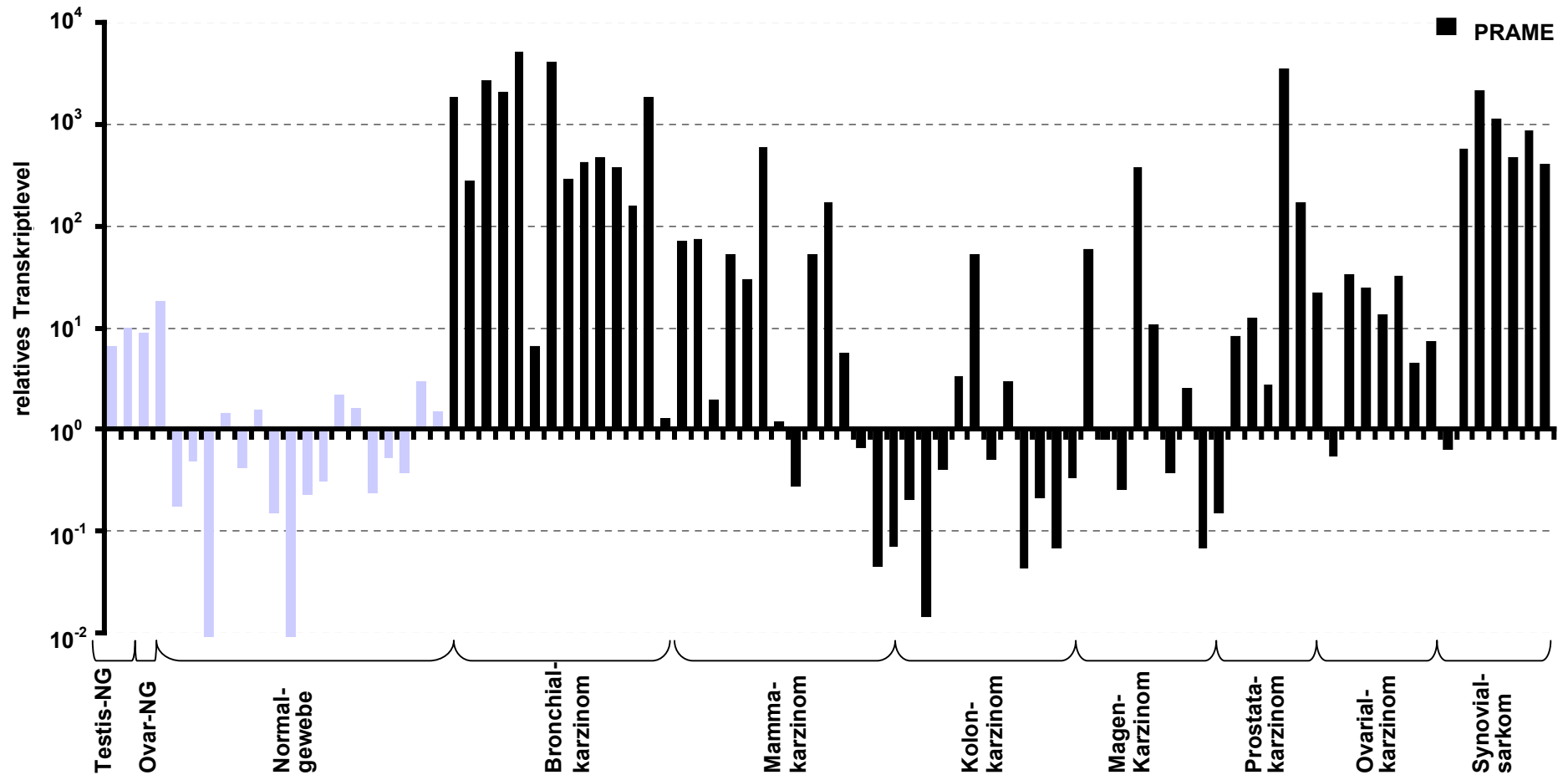


Abb. 3.2.11: Expression von PRAME in diversen Karzinomen und Normalgeweben. Ermittlung der relativen Expression gegen die mittlere Expression von PRAME in allen Normalgeweben. Normalisierung zur Berücksichtigung unterschiedlicher cDNA-Qualitäten über HPRT. Hellblau dargestellt sind die Normalgewebe, schwarz dargestellt sind die Tumoren.

3.3. Etablierung einer Methode zur funktionellen Charakterisierung neuer selektiv in Tumorzellen exprimierter Gene

Die vorangehenden Resultate zeigen, dass mit den genannten Methoden der *in silico* Klonierung sowie der vergleichenden Mikroarrayanalyse von Tumorgeweben und Normalgeweben eine Vielzahl selektiv in Tumoren exprimierter Gene gefunden werden können. Eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit war es, eine adäquate Methode für die rasche Entschlüsselung der tumorbiologischen Relevanz solcher Gene zu entwickeln. Um dieses Ziel zu erreichen, wählten wir das nachfolgend beschriebene experimentelle Design.

Die ektope Expression potentiell onkogener Gene sollte durch den Transfer von *in vitro* transkribierter (IVT) RNA in Zelllinien simuliert werden. Die möglicherweise daraus resultierenden transkriptionellen Alterationen sollten nachfolgend mit *Affymetrix Oligonukleotid Mikroarrays* umfassend kartiert werden.

3.3.1 Etablierung der experimentellen Bedingungen und Charakterisierung des experimentellen Systems

Zur Etablierung der Bedingungen und entsprechender Protokolle für den RNA-Transfer wurde das Konstrukt eGFP-pGEM3Z Tail verwendet. Von diesem Konstrukt lässt sich eGFP kodierende RNA *in vitro* transkribieren (eGFP IVT RNA), die mit Cap und Tail versehen ist. Diese wird anschließend durch Elektroporation in Zielzellen eingebracht. Dieses Reporter-genkonstrukt haben wir für folgende methodische Untersuchungen verwendet:

- Transfektionseffizienz in diversen Zelltypen
- Einfluss der Zellzahl auf die Elektroporationseffizienz
- Ermittlung der optimalen Elektroporationsbedingungen
- Konzentrationsabhängigkeit
- Zeitabhängigkeit
- Untersuchung methodisch bedingter Effekte nach RNA-Elektroporation

3.3.1.1 Transfektionseffizienz in diversen Zelltypen

Zur Ermittlung der Transfektionseffizienzen durch Elektroporation und zur Bestätigung der Funktionalität der eGFP IVT RNA transfizierten wir jeweils 5×10^6 Zellen verschiedenster Herkunft (Tab. 13) mit jeweils 20 μg eGFP IVT RNA. Als Kontrolle wurden Zellen verwendet, die ohne RNA elektroporiert wurden (Leer EP).

Die Zellen wurden nach 24h Kultivierungszeit lysiert bzw. abgelöst und das translatierte eGFP Protein anschließend durch Western Blot-Analyse (lysierte Zellen) oder mittels

Durchflußzytometrie (FACS)(abgelöste Zellen) detektiert. Zum immunologischen Nachweis von eGFP wurde ein anti-eGFP Antikörper in einer Konzentration von 1µg/ml eingesetzt. Als Beladungskontrolle diente ein Antikörper gegen ERK, der in einer Konzentration von 0,2µg/ml eingesetzt wurde. Abbildung 3.3.1 zeigt exemplarisch das Ergebnis der Western Blot-Analyse nach Transfektion von 786-0 Zellen mit eGFP IVT RNA (Abb. 3.3.1).

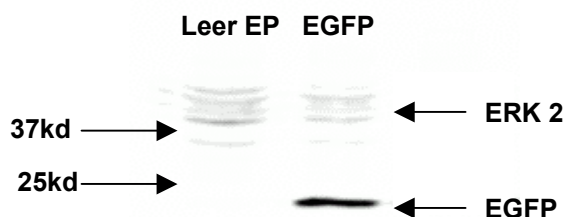


Abb. 3.3.1: Western Blot zum Nachweis der Translation der eGFP IVT RNA 24h nach Transfektion in 786-0 Zellen. Transfiziert wurden 20µg eGFP-pGEM3Z Tail IVT RNA mit 200V und 250µF. Als primärer Antikörper wurde rabbit anti-GFP in einer Konzentration von 1µg/ml verwendet. Als sekundärer Antikörper wurde goat anti-rabbit HRP in einer Konzentration von 0,5µg/ml verwendet. Als Beladungskontrolle wurde ein mouse anti-ERK2 Antikörper in einer Konzentration von 0,2µg/ml verwendet. Als sekundärer Antikörper wurde hier goat anti-mouse HRP 1:5000 verdünnt.

Die Western Blot-Analysen zeigten, dass nach 24h eine eindeutige Proteinexpression von eGFP nachweisbar war. Dies bestätigte, dass die eingebrachte RNA in den Zellen stabil ist und translatiert werden kann.

Die mittels FACS ermittelten Transfektionseffizienzen der unterschiedlichen Zelltypen sind in nachfolgender Tabelle zusammengefasst (Tab. 16). Abbildung 3.3.2 zeigt zusätzlich exemplarisch den FACS Dot Blot von transfizierten 786-0 Zellen.

Tab. 16: Transfektionseffizienzen diverser Zellen ermittelt nach Transfektion von 5×10^6 Zellen mit 20µg eGFP IVT RNA. Messung der Fluoreszenzintensität mit Hilfe des FACS-Kalibur 24h nach Transfektion. Transfektionsbedingungen 200V; 250µF.

Zelllinie	Zelltyp	% transfizierte Zellen
HEK	Humane embryonale Nierenzellen	> 90%
K 562	Leukämiezelllinie	> 90%
MCF 7	Brustkarzinomzelllinie	> 95%
786-0	Nierenzellkarzinomzelllinie	> 95%
MRC-5	Lungenfibroblasten	> 95%
Wi-38	Lungenfibroblasten	> 90%
Monozyten		70-80%
Dendritische Zellen		70-80%
Lymphozyten		35-45%

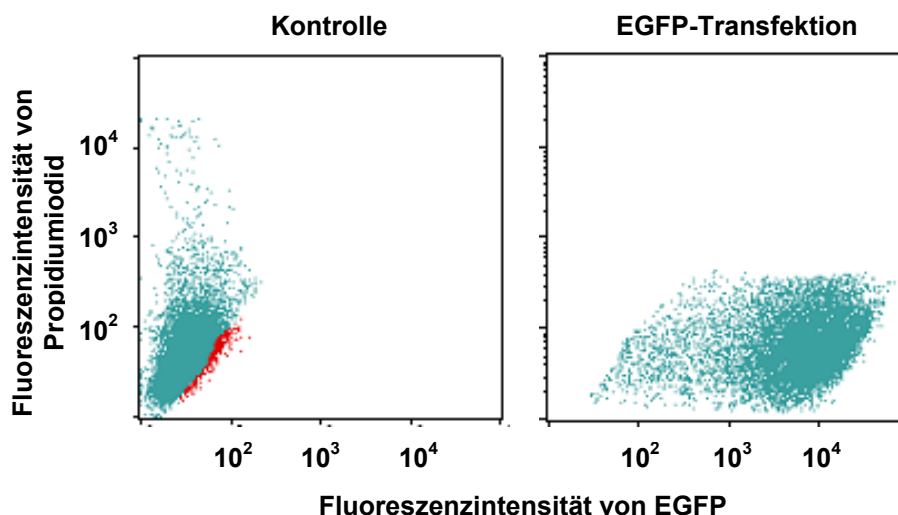


Abb. 3.3.2: Darstellung des FACS Dot Blots 24h nach Transfektion von 1×10^7 786-0 Zellen mit $20 \mu\text{g}$ eGFP IVT RNA, bzw. nach Kontrolltransfektion ohne RNA.

Wir zeigten, dass sich eine Reihe von Zelltypen mit hoher Effizienz elektroporieren lassen. Dies schloss neben Tumorzelllinien auch primäre Zellen wie humane Lymphozyten und dendritische Zellen ein.

3.3.1.2 Einfluss der Zellzahl auf die Transfektionseffizienz

Als nächstes untersuchten wir den Einfluss der Zellzahl auf die Transfektionseffizienz. Dazu wurde $20 \mu\text{g}$ qualitätskontrollierte eGFP IVT RNA in $2,5 \times 10^6$, 5×10^6 und 2×10^7 K562-, MCF7-Zellen oder 786-0 Zellen elektroporiert. Die Zellen wurden nach erfolgter Transfektion für 24h unter Standardbedingungen kultiviert, anschließend abgelöst und die Expression von eGFP durchflußzytometrisch analysiert. Als Beispiel wird das Ergebnis für transfizierte K562-Zellen gezeigt (Abb. 3.3.3).

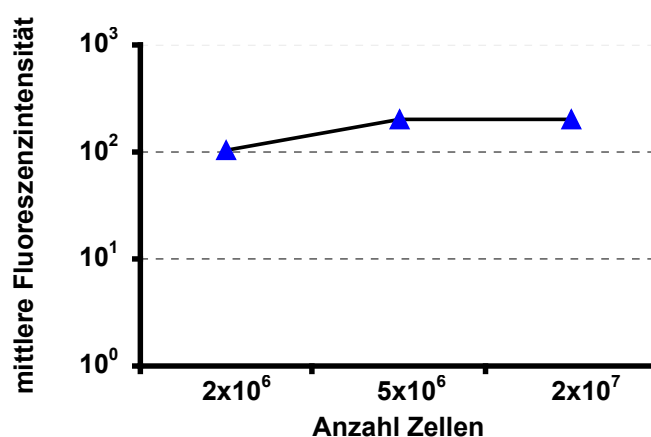


Abb.3.3.3: Ermittlung des Einflusses der Zellzahl auf die Elektroporationseffizienz durch Ermittlung der mittleren Fluoreszenzintensität von eGFP. Transfiziert wurden $20 \mu\text{g}$ eGFP-pGEM3Z Tail IVT RNA in die angegebene Anzahl von K562-Zellen. Kultivierung der Zellen nach Transfektion für 24h. Die Ermittlung der mittleren Fluoreszenzintensitäten erfolgte mit Hilfe des FACS-Kalibur.

Die erzielten Transfektionseffizienzen betragen durchgehend >95%. Ein deutlicher Einfluss der Zellzahl auf die Elektroporationseffizienz oder auf die mittlere Fluoreszenzintensität war nicht nachweisbar (siehe Abb. 3.3.3).

3.3.1.3 Ermittlung der optimalen Elektroporationsbedingungen

Zur Optimierung der Elektroporationsbedingungen haben wir die Voltstärke und die Kapazität variiert. 5×10^6 MCF7-Zellen wurden mit $20 \mu\text{g}$ eGFP IVT RNA unter Verwendung unterschiedlicher Elektroporationsparameter transfiziert und anschließend für 24h unter Standardbedingungen kultiviert. Die Transfektionseffizienz wurde anhand der mittleren Fluoreszenzintensität von eGFP mittels FACS-Analyse bestimmt (Abb. 3.3.4).

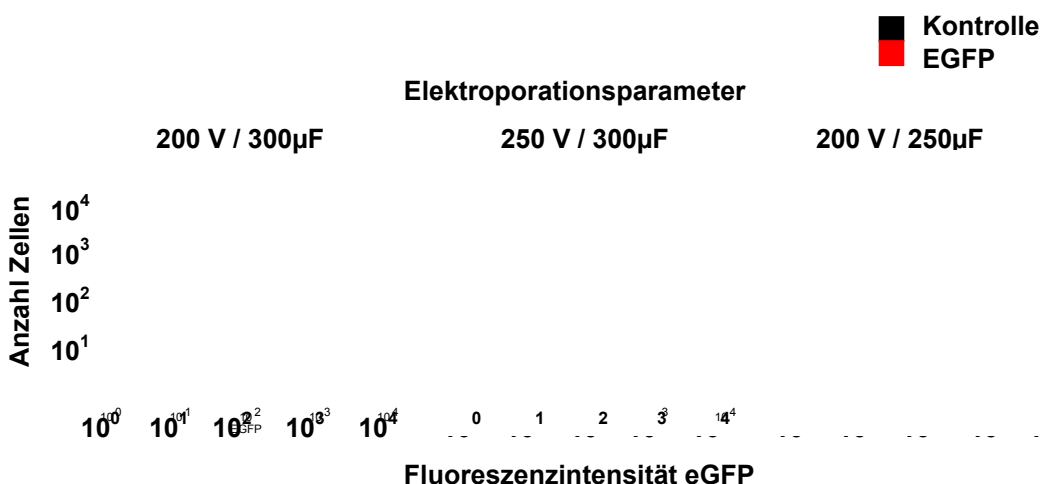


Abb. 3.3.4: Ermittlung des Einflusses der Elektroporationsbedingungen auf die Elektroporationseffizienz und die mittlere Fluoreszenzintensität. Transfektion von $20 \mu\text{g}$ eGFP IVT RNA in MCF7-Zellen. Kultivierung der Zellen nach Transfektion für 24h. Die Ermittlung der mittleren Fluoreszenzintensitäten erfolgte mit Hilfe des FACS-Kalibur.

Die durchflußzytometrische Auswertung ergab für alle getesteten Bedingungen eine Transfektionseffizienz von >95% mit einem Anteil toter Zellen von etwa 5% (Daten nicht gezeigt). Der Anteil toter Zellen wurde durch Färbung der Zellen mit Propidiumiodid bestimmt. Diese Zellen wurden in die Auswertung nicht mit einbezogen.

Für die nachfolgenden Experimente wählten wir 200V und 250 μF als Standardelektroporationsbedingungen.

3.3.1.4 Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit der Proteinmenge

Als nächstes untersuchten wir, ob die Menge transfizierter IVT RNA einen Einfluss auf die Menge des nach Transfektion translatierten Proteins hat. Zur Ermittlung der Konzentrationsabhängigkeit wurden 5×10^6 MCF-7 Zellen mit RNA-Mengen von 0,1 bis $10 \mu\text{g}$ transfiziert, für 24h kultiviert und die Menge an gebildetem eGFP Protein durch durchflußzytometrische Messung der Fluoreszenzintensität analysiert (Abb.3.3.5). Als Kontrolle wurden nicht transfizierte Zellen verwendet.

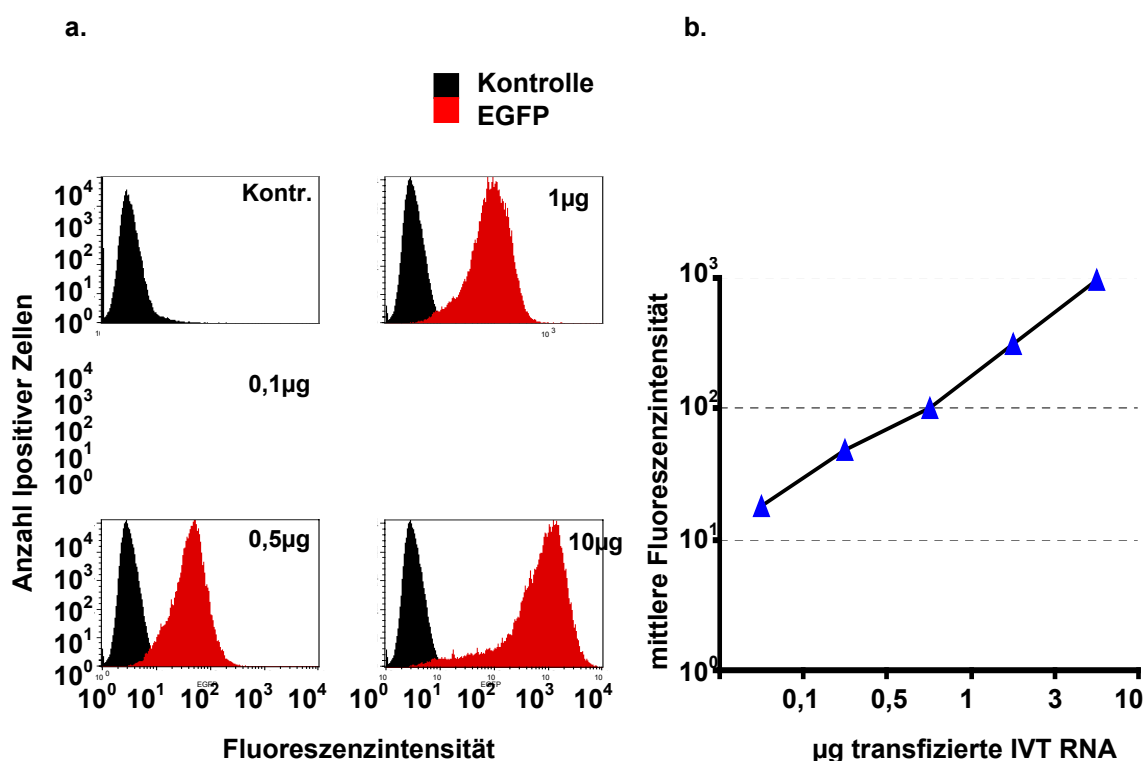


Abb. 3.3.5: Ermittlung des Einflusses der RNA-Menge auf das eGFP-Proteinlevel 24h nach Transfektion von 5×10^6 MCF-7-Zellen mit eGFP IVT RNA. a. Darstellung der Messung der Fluoreszenzintensität im Histogrammplot im Vergleich zu einer nicht transfizierten Kontrolle. b. Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensitäten.

Wir fanden im Messbereich eine lineare Abhängigkeit zwischen transfizierter RNA-Menge und nachweisbarer Proteinmenge, repräsentiert durch die Intensität des Fluoreszenzsignals (Abb. 3.3.5.b). Die Menge an transfizierter RNA wirkt sich nicht auf die Elektroporationseffizienz aus, die in allen Versuchen $\sim 95\%$ betrug. Die Proteinmenge lässt sich demnach durch Transfektion der Zellen mit unterschiedlichen Mengen an IVT RNA titrieren.

3.3.1.5 Pharmakokinetik

Als nächstes untersuchten wir, wie lange die IVT RNA in den Zellen stabil verbleibt und in welchem Zeitfenster Protein nachweisbar ist.

2×10^7 786-0 Zellen wurden mit $20 \mu\text{g}$ eGFP IVT RNA bzw. 2dGFP IVT RNA transfiziert und die Transkriptmenge sowie die Fluoreszenzintensität im zeitlichen Verlauf von 3h bis 120h gemessen (Abb.3.3.6a+b). Das eGFP-Protein besitzt eine Halbwertszeit von 16h, während die Halbwertszeit der destabilisierten Variante 2dGFP durch die Integration einer PEST-Aminosäuresequenz, die eine Proteindegradation bewirkt, auf 2h verkürzt ist (Clontech, 1998).

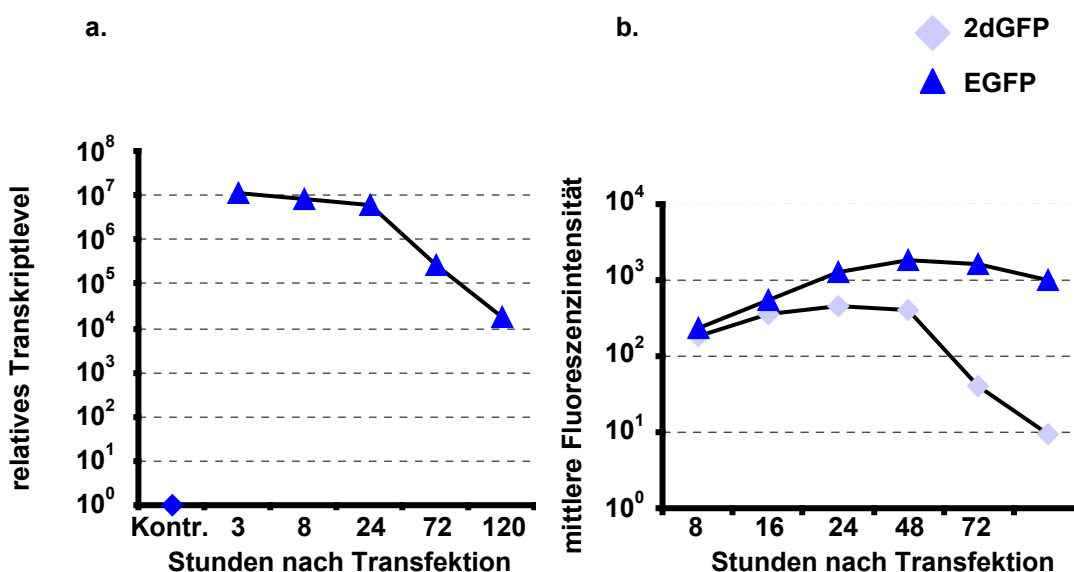


Abb. 3.3.6: Ermittlung des Einflusses der Zeit auf die Transkript- und Proteinmenge nach Transfektion von 2×10^7 786-0-Zellen mit $20 \mu\text{g}$ eGFP IVT RNA bzw. 2dGFP IVT RNA. a. Ermittlung der relativen Transkriptmenge anhand einer quantitativen RT-PCR Analyse. (Primer und Reaktionsbedingungen s. Anhang Tab.19). Die Normalisierung erfolgte gegen nicht transfizierte Zellen. Zur Berücksichtigung unterschiedlicher cDNA-Qualitäten wurde eine 18s-spezifische PCR durchgeführt und die Werte zur Normalisierung verwendet. b. Ermittlung der mittleren Fluoreszenzintensität von eGFP mit Hilfe des FACS-Kalibur.

Die relative Transkriptmenge bei Elektroporation von $20 \mu\text{g}$ IVT RNA ist sehr hoch im Vergleich zu der natürlicherweise gebildeten Transkriptmenge abundant exprimierter Gene und beginnt erst nach 24h linear abzunehmen. Bereits nach 4h ist eine substantielle Menge an translatiertem Protein nachweisbar, die bis 24h nach Transfektion weiter zunimmt. Nach 24h nimmt die Proteinmenge für eGFP sehr langsam ab, während für das destabilisierte 2dGFP eine rapide Abnahme zu beobachten ist. Nach 72h konnte kaum noch destabilisiertes 2dGFP nachgewiesen

werden (Abb. 3.3.6.b). Eine Verfügbarkeit von Protein nach Transfektion der Zellen mit IVT RNA scheint über einen Zeitraum von 1-3 Tagen gegeben zu sein. Demnach ist dies das Zeitfenster, in dem spezifische molekulare Alterationen durch den Transfer von RNA gemessen werden können.

3.3.1.6 Untersuchung methodenbedingter Effekte nach RNA-Elektroporation

Nachfolgend untersuchten wir, welche unspezifischen Effekte durch Elektroporation und durch Einbringen einer einzelsträngigen RNA in Zellen ausgelöst werden. Diese Effekte könnten die, durch ein spezifisches als IVT RNA transferiertes Genprodukt bedingten, molekularen Veränderungen überlagern.

2×10^7 786-0 Zellen wurden mit $20 \mu\text{g}$ eGFP IVT RNA transfiziert und für weitere 8h, 24h und 72h kultiviert. Ein Vergleich mit untransfizierten Zellen zeigte keine Veränderung im Wachstumsverhalten und keine verstärkte Apoptose (Daten hier nicht gezeigt). Der Anteil lebender Zellen nach Transfektion betrug jeweils etwa 95%.

In einem zweiten Schritt wurde nach den oben angegebenen Versuchsbedingungen RNA aus den Zellen extrahiert und zur Herstellung von Sonden verwendet. Die Sonden wurden auf dem *Oncoimmunochip cDNA Mikroarray* hybridisiert. Anschließend erfolgte die Basisauswertung mit dem Programm ImaGene software Version 4.1 (BioDiscovery, Los Angeles, CA). Für das Auge sichtbare Verunreinigungen auf dem Array wurden manuell maskiert. Nach der Normalisierung über die ebenfalls auf den Array gespotteten Kontrollgene ergaben sich die relativen Expressionswerte im Vergleich zur Referenz. Aufgrund der Sensitivität des Systems handelt es sich nur bei Veränderungen von einem Faktor von 2 und höher um signifikante Veränderungen. Die Anzahl signifikant regulierter Gene ist in Tab. 17 dargestellt.

Tab. 17: Anzahl signifikant regulierter Gene in 2×10^7 786-0 Zellen, die mit $20 \mu\text{g}$ eGFP IVT RNA transfiziert wurden, im Vergleich zu nicht transfizierten Kontrollzellen. Nur bei einer Regulation von >2 bzw. $<0,5$ handelt es sich um signifikante Veränderungen.

Faktor der Regulation	Anzahl regulierter Gene nach 8h	Anzahl regulierter Gene nach 24h	Anzahl regulierter Gene nach 72h
>2	10 (0,87%)	0	0
$<0,5$	48 (4,16%)	15 (1,3%)	0

Die Anzahl der signifikant regulierten Gene war moderat und über die Zeit abnehmend (Tab. 17 und Liste der signifikant regulierten Gene s. Anhang Tab. 21).

24h nach Elektroporation und dem Einbringen von einzelsträngiger RNA in die Zellen sind nur noch 15 Gene (1,3%) differentiell exprimiert. Die Regulation dieser Gene spezifisch durch eGFP wurde durch zusätzliche Analyse von Zellen, die mit irrelevanter IVT RNA transfiziert wurden ausgeschlossen. Entsprechend ist die durch die Methode

verursachte Störung des Transkriptoms der Zellen, im Sinne einer unspezifischen Regulation von Genen, nur gering. Die Auswertbarkeit der Ergebnisse nach Transfektion der IVT RNA eines Gens sollte daher nicht oder nur sehr gering beeinträchtigt sein. Bei den nach Elektroporation und/oder Einbringen von einzelsträngiger RNA regulierten Genen handelt es sich im wesentlichen um die folgenden Genklassen:

- *heat-shock* Gene (HSPE1, HSR.1, HSPA4, HSPC177)
- proteasom-assoziierte Gene (PSMA2, PSMB2, PSMA7, PSMD14, PSMB1, PSMD12, PSMA6, PSMC1, PSMA5, PSMA3, PSMD1, PSMD7, PSMB6, PSMB7)
- apoptose-assoziierte Gene (TRAIL, CASP7)

Für die Transfektion von Zellen mit doppelsträngiger (ds) RNA wurde beschrieben, dass Interferon-abhängige Prozesse wie das 2'-5' Oligoadenylat Synthetase (2-5 OAS) System oder die dsRNA abhängige Protein Kinase R (PKR) aktiviert werden (Castelli et al., 1997; Bridge et al., 2003; Sledz et al., 2003). In den von uns durchgeführten Untersuchungen konnten wir nur vereinzelt interferon-induzierte Gene detektieren wie z.B. IFNGR1 (interferon gamma receptor 1). Das Einbringen von einzelsträngiger IVT RNA scheint demnach nur einen geringfügigen Einfluss auf das Expressionsspektrum interferon-assoziiierter Gene zu haben. Die Detektion spezifischer Effekte nach RNA-Transfer sollte demnach möglich sein und nicht durch methodenbedingte Effekte überlagert werden.

3.3.2 IVT RNA Transfektion von Modellgenen

Um die Möglichkeiten und Limitationen der Transfektion von Zellen mit IVT RNA noch eingehender zu untersuchen, haben wir verschiedene Modellgene als heterolog exprimierte IVT RNA in Zellen eingebracht. Bei der Auswahl der Modellgene haben wir diverse Aspekte berücksichtigt, die nachfolgend kurz aufgeführt werden. Aufgrund der Verfügbarkeit des Proteins für 1-3 Tage wählten wir Gene, bei denen nach Einbringen ihrer IVT RNA in Zellen unmittelbare Effekte zu erwarten waren d.h. präferentiell z.B. Transkriptionsfaktoren. Die Gene sollten zudem tumor-assoziiert sein und eine potentielle Funktion in der Karzinogenese haben. Außerdem sollten möglichst Antikörper gegen das Genprodukt zur Verfügung stehen, um es für Untersuchungen auf Proteinebene zugänglich zu machen. Für die Untersuchungen wurden die vorher determinierten Bedingungen genutzt.

3.3.2.1 Transfektion mit Hypoxia inducible factor 1 α (HIF1- α) IVT RNA

HIF1 ist ein Transkriptionsfaktor, der es Zellen ermöglicht, unter hypoxischen Bedingungen, die z.B. in Tumoren herrschen, ihre Stoffwechselprozesse aufrechtzuerhalten. Er spielt damit eine entscheidende Rolle für den Energiemetabolismus der Zelle, aber auch für die Angiogenese und Apoptose. Strukturell ist HIF1 ein Heterodimer. Die Expression der alpha Untereinheit ist induzierbar, während die beta-Untereinheit konstitutiv exprimiert wird (Wang et al., 1995). Die Regulation des Komplexes ist abhängig von der Degradation der Alpha-Untereinheit. Diese wird unter normoxischen Bedingungen unter Beteiligung von VHL (von Hippel Lindau) ubiquitinyliert, was zu einer Degradation durch das Proteasom führt. Unter hypoxischen Bedingungen wird HIF1- α hingegen stabilisiert. Dies führt zu einer erhöhten Expression von zahlreichen Genen, wie z.B. Glukosetransportern, glykolytischen Enzymen und VEGF (vascular endothelial growth factor) (Gleadle and Ratcliffe, 1997; Semenza et al., 1996; Levy et al., 1995).

HIF1- α erschien uns als gutes Modellgen, da die zu erwartenden Effekte seiner heterologen Expression bereits umfangreich charakterisiert waren. Für die Bestimmung der molekularen Veränderungen nach RNA Transfer von HIF1- α IVT RNA wurde die Nierenzellkarzinomzelllinie 786-0 ausgewählt, da durch die VHL-Defizienz dieser Zellen ein sofortiger Abbau von HIF1- α verhindert wird.

2×10^7 786-0 Zellen wurden mit RNA-Konzentrationen von $0,02 \mu\text{g}$ bis $25 \mu\text{g}$ transfiziert. Nach 24h Kultivierungszeit wurde die RNA aus den Zellen extrahiert. In einer Real-Time RT-PCR wurde zum einen die Transkriptmenge von HIF1- α und zum anderen die Expression der von HIF1- α induzierten Gene LDHA (lactate dehydrogenase A), VEGF (vascular endothelial growth factor) und Glut-1 (glucose transporter-1) untersucht (Abb. 3.3.7). (Primer und Reaktionsbedingungen s. Anhang Tab. 19).

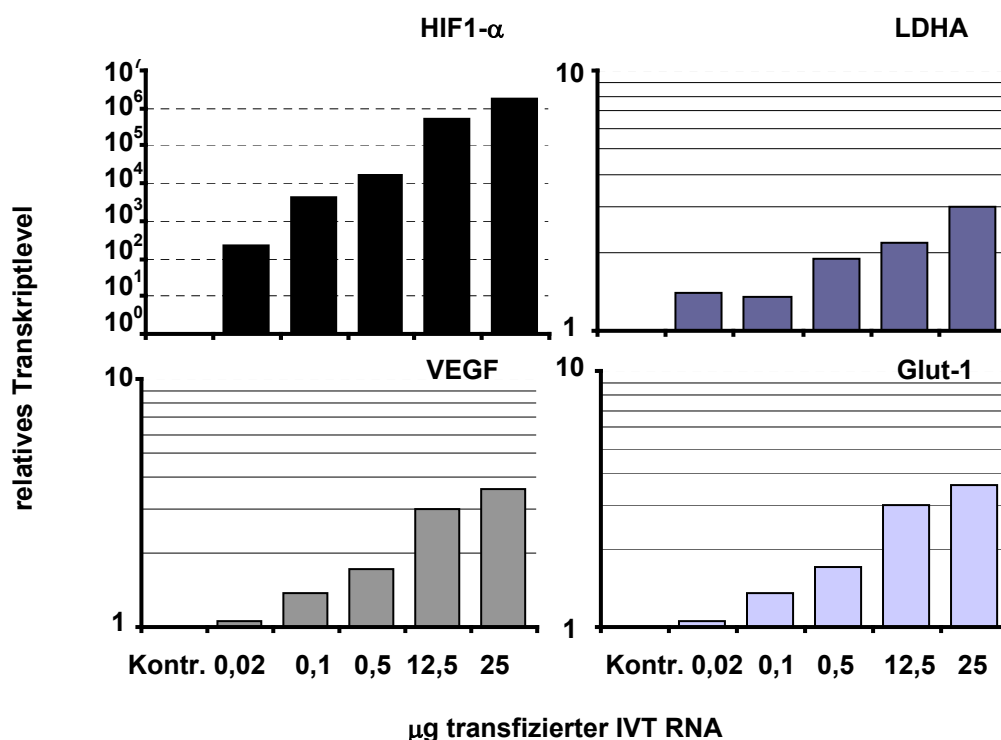


Abb.3.3.7: Quantitative Bestimmung der relativen Transkriptmenge von HIF1- α , LDHA, VEGF, Glut-1 24h nach Transfektion von 2×10^7 786-0 Zellen mittels Real-Time RT-PCR. Darstellung der relativen Expression im Vergleich zu einer eGFP transfizierten Kontrolle.

Mit zunehmender Menge eingesetzter IVT RNA nimmt auch die Menge an nach 24h noch nachweisbarer HIF1- α RNA zu. Der Transfer der RNA von HIF1- α führt zu detektierbaren physiologischen Effekten, wie zur transkriptionellen Induktion von LDHA, VEGF und GLUT-1. Das Ausmaß ihrer Induktion lässt sich durch die Menge von transferierter HIF1- α IVT RNA titrieren. Dabei scheint der Transfer von 12,5 μ g die größten Effekte zu induzieren im Verhältnis zur eingesetzten Menge an RNA.

Durch Transfer des Transkriptionsfaktors HIF1- α ist eine robuste Regulation seiner Zielgene möglich. Durch Titration der Menge eingesetzter IVT RNA lassen sich auch die Transkriptmengen der durch HIF1- α induzierten Gene titrieren.

3.3.2.2 Transfektion mit von-Hippel-Lindau (VHL) IVT RNA

Die molekularen Effekte eines Transkriptionsfaktors sind nahezu direkt und unmittelbar nachweisbar. So bindet HIF1 direkt an seine Consensussequenz im Promotorbereich seiner Zielgene (Semenza, 2000a; Semenza, 2000b) und initiiert unmittelbar deren Transkription. Um zu untersuchen, ob auch indirekte und sekundäre Effekte durch den IVT RNA Transfer manifestiert werden können, haben wir das dem HIF1- α vorgeschaltete pVHL (von-Hippel-Lindau) Protein als Modellgen ausgewählt. pVHL

gehört zu dem Komplex der Ubiquitin Ligase E3 und wirkt als Substrat für die Ligasefunktion. Es ist beteiligt an der Ubiquitylierung der alpha-Untereinheit von HIF1. So führt ein Defekt im VHL-Gen, z.B. in Nierenzellkarzinomen, zu einer konstitutiv erhöhten Expression von HIF1- α , wodurch konsekutiv die von ihm regulierten Gene überexprimiert werden (Levy et al., 1995; Semenza et al., 1996). Für VHL ist ein kommerzieller Antikörper verfügbar, der den Nachweis der Translation nach IVT RNA Transfer erlaubte. Des Weiteren stand uns mit der Nierenzellkarzinomzelllinie 786-0 eine VHL-defiziente Zelllinie zur Verfügung, so dass der direkte Vergleich einer exprimierenden zu einer defizienten Zelllinie möglich war. 2×10^7 786-0 Zellen wurden mit $20 \mu\text{g}$ VHL IVT RNA transfiziert. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet. Nach Extraktion der RNA wurde eine Real-Time RT-PCR zur Transkriptmengenbestimmung von VHL durchgeführt (Abb. 3.3.8)(Primer und Amplifikationsbedingungen s. Anhang Tab. 19). Die relative Expression wurde im Vergleich zu eGFP-transfizierten Kontrollzellen ermittelt.

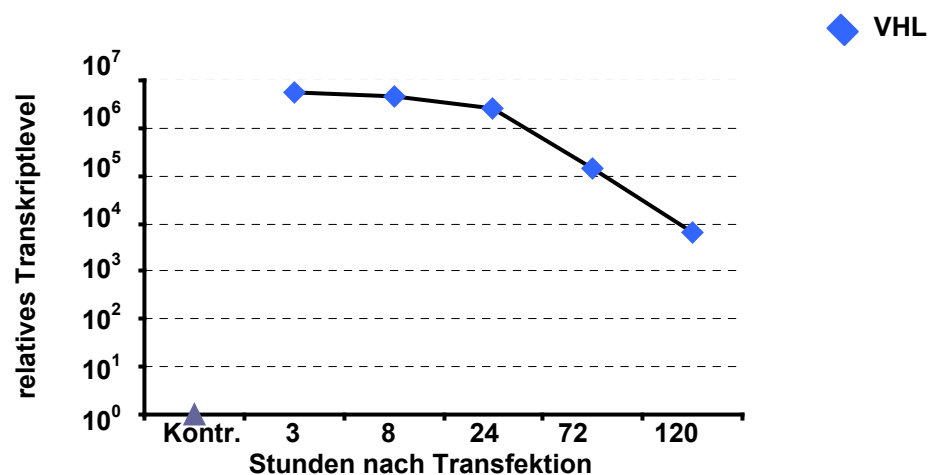


Abb. 3.3.8: Darstellung der relativen Transkriptmenge von VHL nach Transfektion von 2×10^7 786-0-Zellen mit $20 \mu\text{g}$ VHL IVT RNA im zeitlichen Verlauf. Normalisierung zur Berücksichtigung unterschiedlicher cDNA-Qualitäten über 18s. Die Ermittlung der relativen Expression erfolgte im Vergleich zu eGFP transfizierten Zellen.

Sowohl hinsichtlich der Höhe als auch der Kinetik der relativen Transkriptmenge bestätigten wir die bereits für eGFP IVT RNA gemachten Beobachtungen. Bereits nach 3h ist eine substantielle Transkriptmenge nachweisbar, die über einen Zeitraum von 24h nahezu stabil bleibt. Danach ist eine lineare Abnahme der Transkriptmenge zu beobachten.

24h nach Elektroporation wurde zusätzlich eine Western Blot Analyse zum Nachweis der Translation durchgeführt. Hierzu wurden 2×10^7 786-0 Zellen mit $20 \mu\text{g}$ VHL IVT RNA transfiziert. Die Zellen wurden nach 24h lysiert und auf ein 12%iges Polyacrylamidgel aufgebracht. Zum Nachweis des Proteins wurde ein Maus anti-human VHL Antikörper in einer Konzentration von $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ eingesetzt (Abb. 3.3.9). Das VHL Protein konnte als Translationsprodukt bei 23 kDa spezifisch nachgewiesen werden

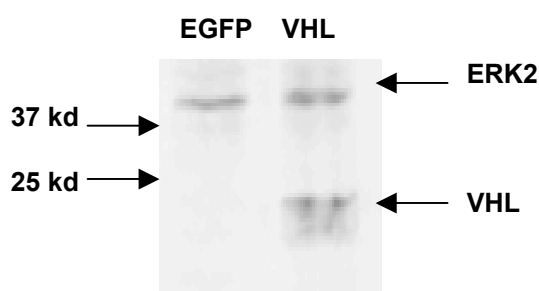


Abb.3.3.9: Nachweis der Translation von VHL IVT RNA durch Western Blot Analyse mit einem primärem mouse anti-VHL Antikörper in einer Konzentration von $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ und $0,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ sekundärem anti-mouse HRP 24h nach Transfektion von 2×10^7 786-0-Zellen mit $20 \mu\text{g}$ VHL IVT RNA. Als Beladungskontrolle wurde ein mouse anti-ERK2 Antikörper in einer Konzentration von $0,2 \mu\text{g}/\text{ml}$ verwendet. Als sekundärer Antikörper wurde hier goat anti- mouse HRP 1: 5000 verdünnt.

Das VHL Protein konnte als Translationsprodukt bei 23 kDa spezifisch nachgewiesen werden. Die IVT RNA wurde also zu Protein translatiert und konnte in den Zellen nach 24h nachgewiesen werden.

Anschließend überprüften wir, ob bekannte Zielgene von VHL durch den Transfer von VHL IVT RNA in den Zellen reguliert werden. Wie zuvor beschrieben führt die Expression von VHL zu einem verstärkten proteasomalen Abbau von HIF1- α und konsekutiv zu einer Suppression der Expression von LDHA und VEGF (Levy et al., 1995; Semenza et al., 1996).

Die Expression von LDHA und VEGF wurde 3h, 8h, 24h und 120h nach VHL IVT RNA Transfer in einer Real-Time RT-PCR getestet (Abb. 3.3.10) (Primer und Reaktionsbedingungen s. Anhang Tab. 19).

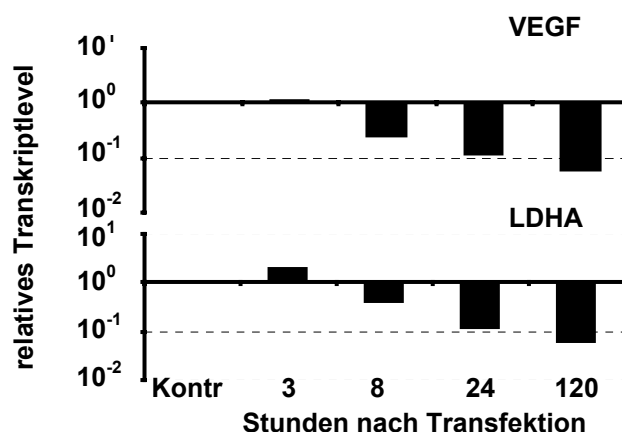


Abb. 3.3.10: Relative Transkriptmenge von VEGF und LDHA nach Transfektion von 2×10^7 786-0-Zellen mit $20 \mu\text{g}$ VHL IVT RNA im zeitlichen Verlauf. Die Ermittlung der relativen Transkriptmengen erfolgte im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen. Die Normalisierung erfolgte über 18s rRNA.

Nach 8h konnten wir eine beginnende Abnahme der Transkriptmenge sowohl von VEGF als auch von LDHA feststellen, die sich über den Zeitverlauf immer deutlicher ausprägte.

Diese Daten zeigen, dass durch IVT RNA Transfer eines Gens das nicht als primärer Transkriptionsfaktor fungiert, sekundäre Effekte ausgelöst werden können. Damit konnte gezeigt werden, dass die Methode nicht nur für Transkriptionsfaktoren anwendbar ist.

3.3.2.3 Transfektion mit CD40 Ligand IVT RNA

Nach den vorgenannten Untersuchungen in Zelllinien testeten wir als nächstes den RNA-Transfer in primäre Zellen. Wir wählten dazu humane dendritische Zellen (DC), die die wichtigsten Modulatoren des Immunsystems darstellen. DCs lokalisieren in der Haut und in peripheren Organen. Sie liegen hier in einem immaturren Zustand vor, der durch gut untersuchte Oberflächenmarker charakterisiert ist und sich funktionell durch eine starke Endozytoseaktivität auszeichnet. Bei einem immunogenen Reiz, wie z.B. einer Infektionen mit Pathogenen, wird ein Maturierungsprozess der DCs ausgelöst. Gleichzeitig wird ihre Wanderung in die regionalen Lymphknoten initiiert, wo sie die effektivsten Induktoren von T-Zell- und B-Zell-Immunantworten sind. Auch der mature Zustand der DCs ist durch die Expression von detailliert untersuchten Oberflächenmarkern und Zytokinen sowie durch eine distinkte Morphologie der DCs gekennzeichnet. Es gibt etablierte Zellkultursysteme zur Differenzierung von immaturren humanen DCs aus Blutmonozyten. Diese können durch verschiedene Stimuli, u.a. besonders effizient durch Zugabe von rekombinantem CD40 Ligand, (CD40L) maturiert werden.

Durch Transfektion von primären humanen DCs mit CD40L IVT RNA sollte einerseits die Funktionalität des RNA-Transfers in primäre Zellen getestet werden und andererseits die Nutzbarkeit des Systems für eine funktionelle Reprogrammierung von Zellen analysiert werden.

Humane DCs wurden in zytokinsupplementierter Kultur aus MACS-sortierten Monozyten eines gesunden Spenders differenziert. Am Tag fünf wurden 5×10^6 DCs mit CD40L IVT RNA transfiziert und für weitere 72h mit IL-4 und GM-CSF kultiviert. Als Positivkontrolle wurden untransfizierte DCs mit rekombinantem CD40L inkubiert. Als Negativkontrolle dienten DCs die ohne IVT RNA elektroporiert worden waren (Leer EP). Die DCs wurden mit anti-CD80, anti-CD83, anti-CD86 und anti-HLA-DR Antikörpern, die spezifische DC Maturierungsmarker erkennen, gefärbt und durchflußzytometrisch analysiert (Abb. 3.3.11).

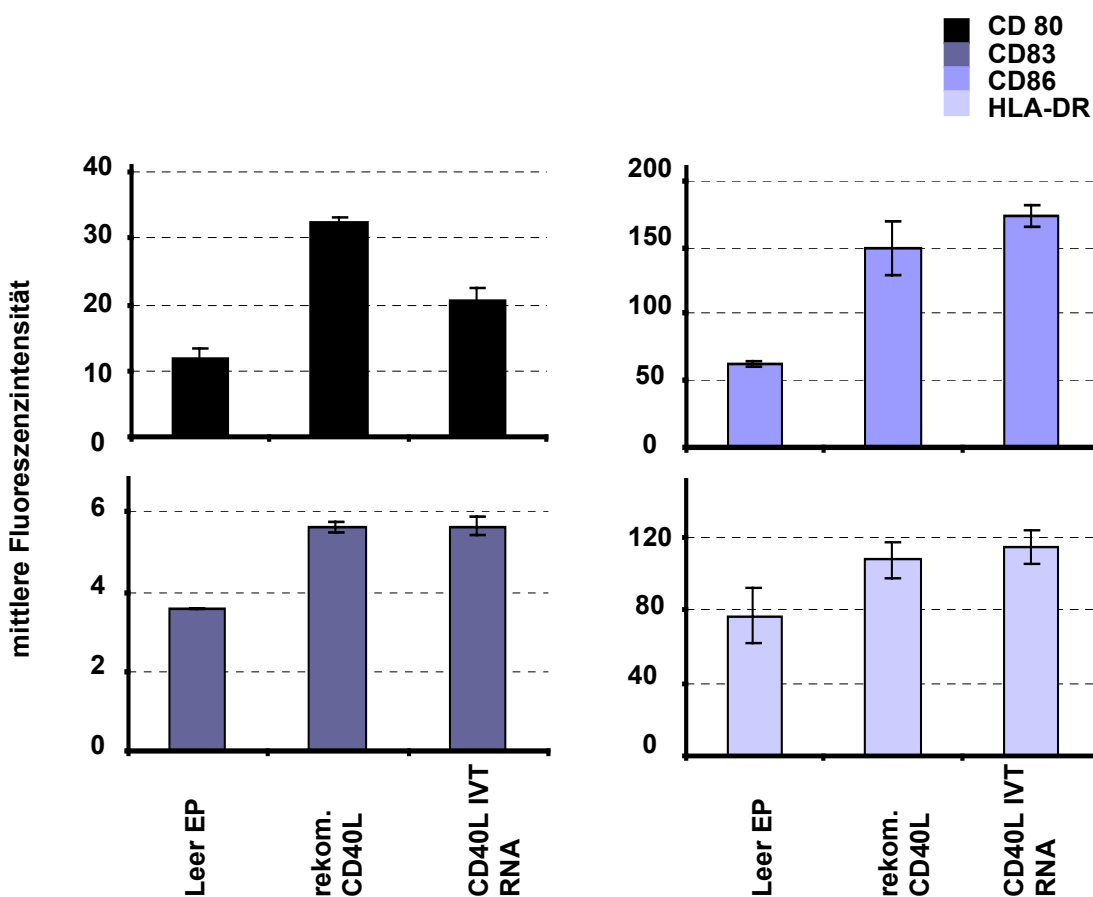


Abb. 3.3.11: Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensitäten nach Färbung der DCs mit je 3µl der Antikörper anti-CD80-PE, anti-HLA-DR-FITC, anti-CD83-PE, bzw. anti-CD86-FITC in 50µl FACS-Puffer. Die Inkubation erfolgte für 30min bei 4°C. Die Auswertung der Fluoreszenzintensitäten erfolgte mit Hilfe des FACS-Kalibur.

Die Transfektion von Zellen mit CD40L IVT RNA führte zur Zunahme der Expression aller vier gemessenen Maturationsmarker. Für die Marker CD83, CD86 und HLA-DR, aber nicht für CD80 war der gemessene Effekt dabei mindestens so groß wie der Effekt, der durch die Zugabe von rekombinanten CD40L in die Kultur erreicht werden konnte.

Wir beobachteten ferner, dass die immaturren DCs den gleichen typischen maturationsassoziierten morphologischen Veränderungen nach CD40L IVT RNA-Transfer unterliegen, wie die mit rekombinantem CD40L Protein behandelten (Abb. 3.3.12).

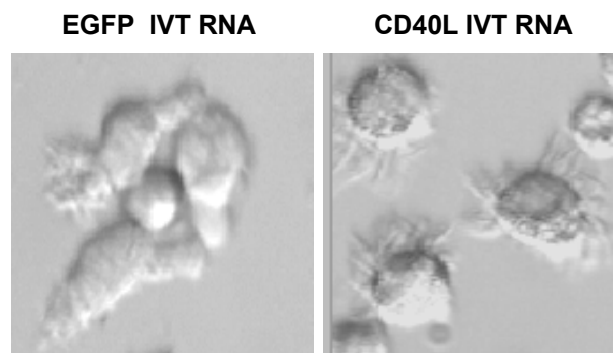


Abb. 3.3.12: Phasenkontrastmikroskopische Darstellung von DCs 72h nach der Transfektion mit eGFP bzw. CD40L bei 400-facher Vergrößerung.

Die immaturren DCs adhären am Boden der Zellkulturflasche, während die maturateden DCs in Suspension vorliegen. Die maturateden DCs sind kugelförmig und bilden zahlreiche Ausläufer, die zu einem *wollknäuelartigen* Erscheinungsbild führen.

Zur Überprüfung des Maturationsstatus der CD40L IVT RNA transfizierten DCs bestimmten wir zusätzlich die von den DCs gebildete Menge an proinflammatorischen Zytokinen IL1- β , IL-6 und TNF- α , sowie von IL12p70, IL-8 und IL-10. Hierzu nutzten wir einen durchflußzytometrischen Bead-Array (Abb. 3.3.13).

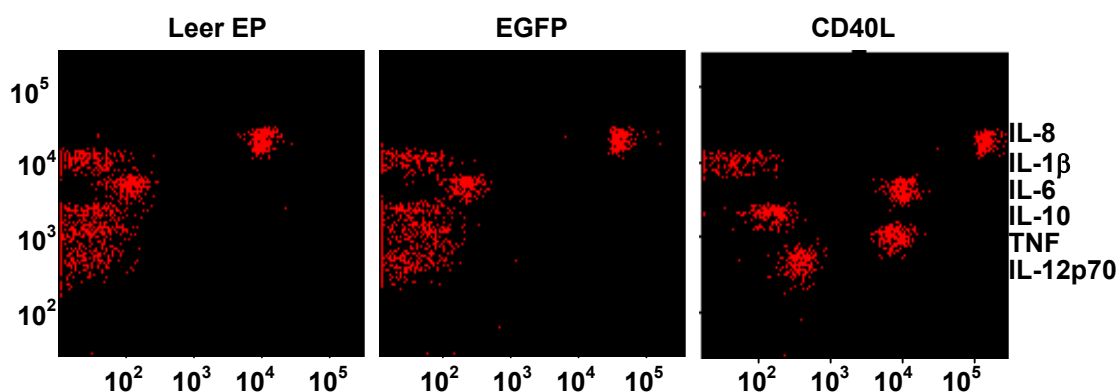


Abb. 3.3.13: Darstellung der Zytokinsekretion 72h nach Transfektion von 5×10^6 immaturren DCs mit CD40L und eGFP IVT RNA. Messung der Zytokinsekretion im Überstand mit Hilfe des cytomertischen Bead-Arrays *human inflammation kit*.

Nach 72h war eine deutliche Sekretion von TNF- α , IL-6, IL-10 und IL-12p70 messbar. Veränderungen in der Sekretion von IL-8 und IL-1- β spezifisch durch CD40L dagegen konnten wir nicht nachweisen.

Die erhobenen Daten belegen, dass auch primäre Zellen effektiv dem RNA-Transfer unterzogen werden können. Dies gilt auch für ansonsten schwer transfizierbare Zellen wie DCs.

Sowohl die Morphologie, wie auch die Oberflächenmarker weisen eine mindestens genauso effektive Maturierung auf, wie durch die Zugabe des rekombinanten CD40 Liganden. Diejenigen Zytokine, die eine wichtige Rolle spielen bei der primären lokalen proinflammatorischen Reaktion und B-Zellproliferation, dem Isotypwechsel sowie der Induktion von zytotoxischen T-Zellen, konnten nachgewiesen werden.

Diese Resultate unterstreichen auch, dass durch den RNA-Transfer eine funktionelle zelluläre Reprogrammierung möglich ist.

3.3.3 Untersuchung der Effekte der ekto-Expression von SYT-SSX1 und SYT-SSX2 Fusionsgenen

Die Methode des RNA-Transfers sollte eine rasche Entschlüsselung der tumorbiologischen Relevanz von Genen ermöglichen. Zur Verifizierung wurden die Fusionsprodukte der Gene SYT, einem ubiquitär exprimierten Gen, und SSX1 oder SSX2, CG Genen, die nur in Testis und in Tumoren exprimiert werden, ausgewählt. Der Grund für die Wahl dieser Gene war auf der einen Seite die Häufigkeit der Translokation t(X;18)(p11.2;q11.2)(Clark et al., 1994; Crew et al., 1995) in über 90% der Synovialsarkome (Sreekantaiah et al., 1994), was auf eine Relevanz bei der Biologie des Tumors und somit auf ein onkogenes Potential schließen lässt. Auf der anderen Seite enthalten die Fusionsprodukte eine transkriptionsaktivierende QPGY-Domäne, so dass unmittelbare molekulare Alterationen als Folge der Translokation zu erwarten sind. Da weder SYT noch SSX eine DNA-Bindungsdomäne aufweisen, spielen sie voraussichtlich eine Rolle als Kofaktor bei der Transkriptionsregulation. Molekulare Effekte der Translokation und ihre Bedeutung in der Entstehung und Etablierung des Tumors sind bisher weitestgehend unbekannt.

3.3.3.1 Durchführung des Mikroarrayexperimentes und Basisauswertung

Die durch die Transfektion von SYT-SSX1 und SYT-SSX2 IVT RNA ausgelösten molekularen Alterationen sollten durch *Affymetrix Oligonucleotid Mikroarrays* analysiert werden. In einem ersten Schritt sollte die Transfektionseffizienz nach Transfektion von 1×10^7 MCF-7 Zellen mit 15 μ g SYT-SSX1, SYT-SSX2, SSX2 oder eGFP überprüft werden. Die verschiedenen Konstrukte wurden jeweils in Triplikaten transfiziert. Die Transfektion mit eGFP wurde durchgeführt, um die Transfektionseffizienz im Fluoreszenzmikroskop überprüfen zu können. Nach 8h wurde eine Transfektionseffizienz von über 95% ermittelt (Daten nicht gezeigt). Die Zellen wurden nach 8h, 24h bzw. 72h geerntet, die RNA extrahiert und eine Real-Time RT-PCR (Primer und Reaktionsbedingungen s. Anhang Tab. 19) (Abb.3.3.14) zur Bestimmung der Transkriptmengen von SYT-SSX1 und SYT-SSX2 durchgeführt.

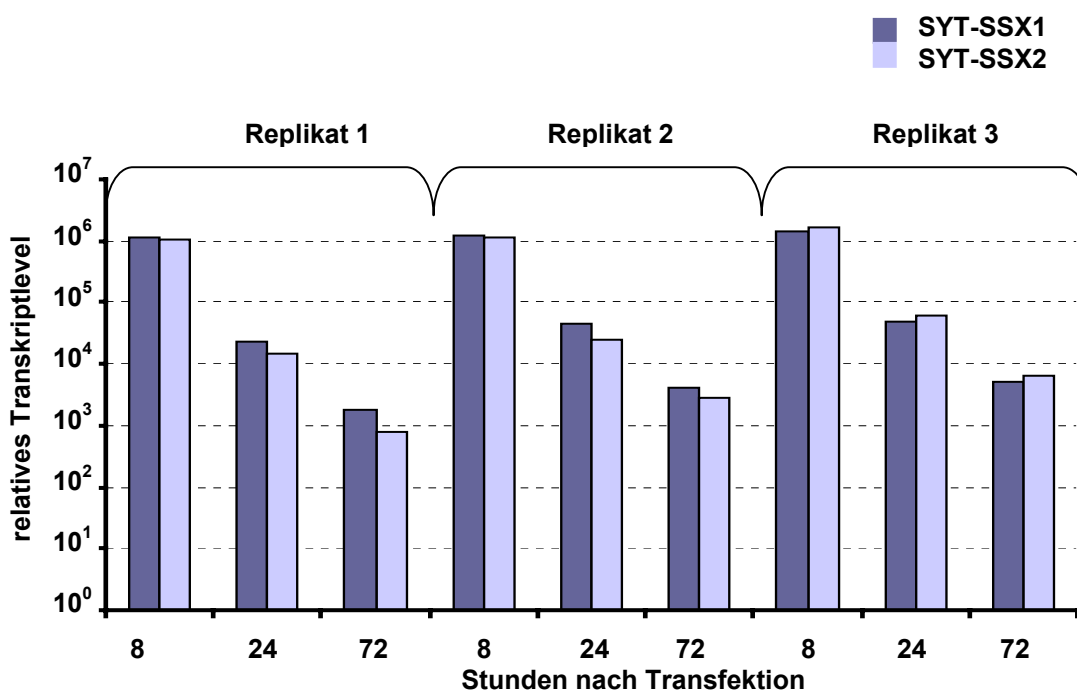


Abb.3.3.14: Bestimmung der relativen Transkriptmenge von SYT-SSX1 und SYT-SSX2. 1×10^7 MCF-7 Zellen wurden mit $20 \mu\text{g}$ SYT-SSX1, SYT-SSX2 und eGFP IVT RNA transfiziert. Kultivierung der Zellen für 8h, 24h und 72h. Normalisierung über HPRT, Ermittlung der relativen Transkriptlevel gegen den Mittelwert der Triplikate der eGFP transfizierten Zellen (hier nicht dargestellt). Darstellung von drei unabhängigen Transfektionen.

Wir fanden eine lineare Abnahme der Transkriptmenge von SYT-SSX1 und SYT-SSX2 über die Zeit. Bei der Bestimmung der relativen Transkriptmenge fiel auf, dass die Übereinstimmung der Triplikate nach 8h sehr hoch war, während die Varianz nach 24h und 72h zunimmt. Dies ist wahrscheinlich dadurch zu erklären, dass die Zellen getrennt kultiviert wurden und sich über die Zeit eine biologische Divergenz der unterschiedlichen Ansätze einstellte.

Zur Analyse der molekularen Veränderungen in den Zellen nach RNA-Transfer der aufgeführten Gene nutzten wir *Affymetrix Oligonucleotid Mikroarrays*, mit denen Expressionsveränderungen von 22.000 Genen simultan untersucht werden können. Für die Analyse der SYT-SSX2 und der eGFP transfizierten Zellen wurden jeweils zwei *Human Genome U133A Arrays* zu den Zeitpunkten 8h und 24h hybridisiert. SSX2 und SYT-SSX1 wurden in Einzelbestimmungen zu den Zeitpunkten 8h und 24h untersucht. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software *Microarray suite 5.0* sowie mit *ArrayAssist* (Abb. 3.3.15). Die Auswertung bestätigte anhand der in die Sonden integrierten Reportergene die Qualität der Sondenherstellung und Hybridisierung.

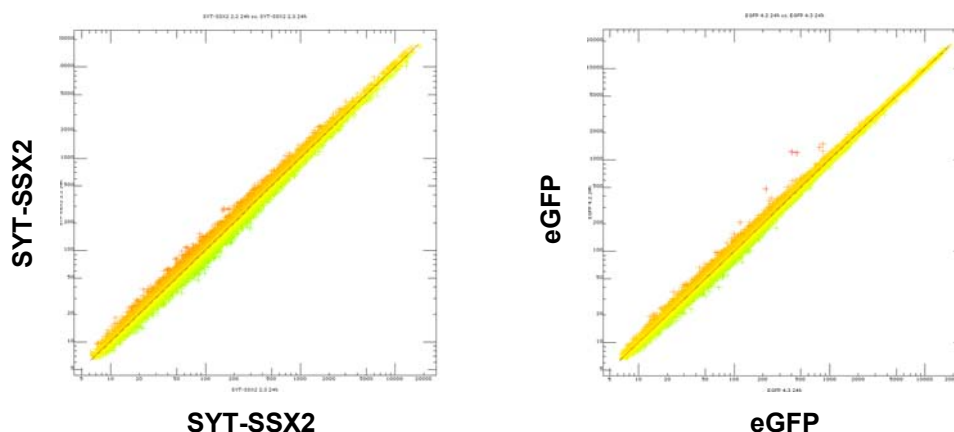


Abb.3.3.15: Scatterplot aller Gene zum Nachweis der Similarität der Duplikate. Vergleich der Duplikate der mit SYT-SSX2 oder eGFP transfizierten Zellen. Darstellung der Replikate nach 24h. Gelb-orange zeigt eine differentielle Expression im nicht signifikanten Bereich, d.h. unter Faktor zwei an, rot und grün zeigt eine Hoch-, bzw. Runterregulation um mehr als den Faktor zwei.

Der Vergleich von Duplikatpaaren untereinander zeigte eine geringe Varianz. Die Anzahl der signifikant regulierten Gene beim Vergleich der Duplikate untereinander beträgt null.

Dies gab uns hinreichend Konfidenz im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, so dass auch die Mikroarrayergebnisse der nur als Einzelbestimmung repräsentierten Transfektanden (SYT-SSX1 und SSX2) in die Analyse einbezogen werden konnten.

3.3.3.2 Bestimmung der signifikant differentiell exprimierten Gene nach IVT RNA Transfer von SSX2, SYT-SSX1 und SYT-SSX2

Für die Bestimmung der signifikant durch SYT-SSX2 regulierten Gene wurden die Expressionswerte der eGFP-transfizierten Zellen als Basis genommen und das Expressionsmuster der SSX2, SYT-SSX1 und SYT-SSX2 IVT RNA transfizierten Zellen dagegen verglichen (Abb. 3.3.16.a). Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Programme *Microarray suite* 5.0 sowie mit *ArrayAssist*. Abb. 3.3.16.a zeigt exemplarisch die differentielle Expression von Genen durch SYT-SSX2.

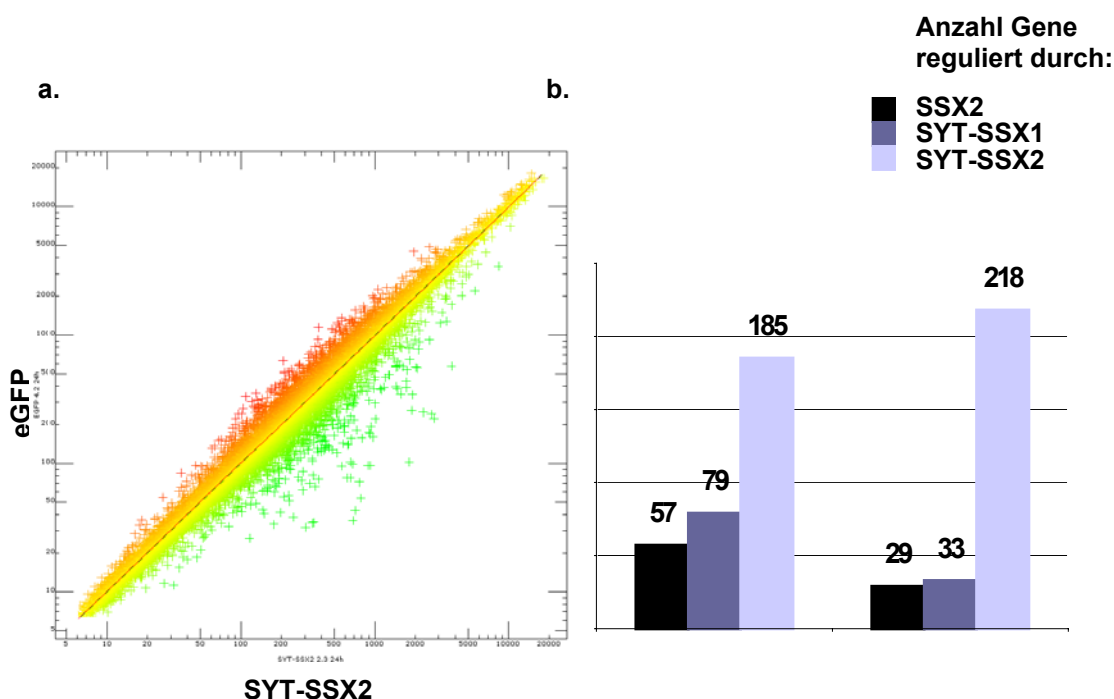


Abb. 3.3.16: Darstellung der durch SYT-SSX2 regulierten Gene. a. Scatterplot aller untersuchten Gene. Vergleich der SYT-SSX2 mit den eGFP transfizierten Zellen nach Transfektion von jeweils 15µg IVT RNA. Darstellung der Replikate nach 24h. Gelb-orange zeigt eine differentielle Expression im nicht signifikanten Bereich d.h. unter Faktor zwei an, rot und grün zeigen eine Hoch- bzw. Runterregulation um mehr als den Faktor zwei. b. Darstellung der Anzahl der Gene, die nach 8h bzw. 24h durch die Transfektion von 15µg IVT RNA des jeweiligen Gens signifikant reguliert werden. Die Basisauswertung erfolgte mittels RMA-Analyse, die Ermittlung des Signifikanzkriteriums erfolgte mit Hilfe der Software ArrayAssist (lobion, Amsterdam).

Für die Auswertung wurde eine Regulation von mindestens Faktor 2 zugrunde gelegt, die dem Sensitivitätsbereich des Systems entspricht. Als Signifikanzkriterium wurde ein Wert von $p=5\%$ angesetzt. Für diese Bedingungen konnten 185 Gene in den SYT-SSX2 transfizierten Zellen nach 8h, und 218 Gene nach 24h detektiert werden. Der Anteil an Genen, die sowohl nach 8h als auch nach 24h reguliert werden beträgt dabei 41,3% (Abb. 3.3.16.b).

Als interne Plausibilitätskontrolle für die erfolgreiche Sondenherstellung und Hybridisierung betrachteten wir, dass wir das jeweilig transfizierte Gen in den Genlisten der signifikant überexprimierten Gene wiederfanden. Die regulierten Gene lassen sich anhand ihrer Funktion verschiedenen Gruppen zuordnen (s. Anhang Tab. 22). So sind dies z.B. Wachstumsfaktoren, neuronale Gene, tumor-assoziierte Gene, Kollagene, sowie solche, die in die Prozesse der Signaltransduktion, Zelladhäsion, Zellentwicklung und -differenzierung sowie in die Zellzyklusregulation involviert sind.

Hierbei fällt auf, dass der Anteil überexprimierter Gene deutlich über dem der supprimierten Gene liegt. Die Gene, die durch SYT-SSX1 reguliert werden, sind zu >95% identisch zu denen, die auch durch SYT-SSX2 reguliert werden.

3.3.3.3 Verifizierung der differentiell exprimierten Gene durch Real-Time RT-PCR

Zur Verifizierung der Mikroarray Daten sollte die differentielle Expression nach RNA Transfer von exemplarisch ausgewählten Genen mittels quantitativer RT-PCR untersucht werden. Insgesamt haben wir 26 Gene der diversen funktionellen Klassen in einer Real-Time RT-PCR untersucht (Tab. 18). (Primer und Amplifikationsbedingungen s. Anhang Tab. 19).

Funkt. Klasse	Gen-Id.	Genname	Differentielle Expression nach Transfektion							
			nach 8h				nach 24h			
			SYT	SSX2	SYT-SSX1	SYT-SSX2	SYT	SSX2	SYT-SSX1	SYT-SSX2
Neuronale Gene	NM_004438.1	Ephrin A.4	1,65 +/- 0,1	4,46 +/- 0,8	9,15 +/- 4,9	6,69 +/- 0,7	0,90 +/- 0,1	2,98 +/- 0,6	6,39 +/- 0,9	7,87 +/- 1,0
	AW189015	Ephrin A-3	5,22 +/- 1,6	14,19 +/- 4,9	5,4 +/- 4,3	2,85 +/- 0,9	0,78 +/- 0,4	3,25 +/- 2,3	5,11 +/- 3,1	5,95 +/- 2,7
	NM_003043.1	Solute carrier transporter 6A8	1,04 +/- 0,1	7,31 +/- 1,0	8,84 +/- 3,6	7,09 +/- 0,5	1,11 +/- 0,1	3,05 +/- 0,5	2,45 +/- 0,3	3,92 +/- 0,4
	AJ_224869	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	1,41 +/- 0,1	0,49 +/- 0,2	1,49 +/- 0,9	7,10 +/- 0,8	1,24 +/- 0,2	0,43 +/- 0,1	0,40 +/- 0,1	2,40 +/- 0,5
Kollagene	NM_000088	Collagen 1A1	2,6 +/- 0,3	2,40 +/- 0,9	7,75 +/- 3,0	4,42 +/- 0,6	0,7 +/- 0,1	4,30 +/- 1,5	6,74 +/- 1,6	20,27 +/- 3,6
	NM_000093	Collagen 5A1	0,62 +/- 0,2	3,92 +/- 2,1	53,8 +/- 30,9	31,74 +/- 15,5	0,95 +/- 0,1	0,97 +/- 0,4	5,30 +/- 2,25	14,89 +/- 4,5
	NM_001853	Collagen 9A3	1,04 +/- 0,1	7,50 +/- 1,1	9,14 +/- 3,7	8,24 +/- 0,6	1,22 +/- 0,1	2,80 +/- 0,5	2,56 +/- 0,3	4,19 +/- 0,4
Histone	NM_021063	Histon 2BFB	1,24 +/- 0,1	0,88 +/- 0,2	0,95 +/- 0,4	2,27 +/- 0,3	0,95 +/- 0,1	1,01 +/- 0,2	0,32 +/- 0,1	2,48 +/- 0,4
	NM_003530	Histon 3BF	1,02 +/- 0,1	0,28 +/- 0,3	0,6 +/- 0,3	2,36 +/- 0,2	1,37 +/- 0,2	1,55 +/- 0,4	0,29 +/- 0,1	4,6 +/- 0,6
Zellzyklus-regulation	NM_000389	Cyclin dependent kinase inhibitor 1A	0,90 +/- 0,1	2,31 +/- 0,4	2,78 +/- 1,6	2,36 +/- 0,2	1,19 +/- 0,1	1,22 +/- 0,2	1,10 +/- 0,1	1,86 +/- 0,2
	NM_004064	Cyclin dependent kinase inhibitor 1B	1,79 +/- 0,3	0,81 +/- 0,2	0,52 +/- 0,5	1,16 +/- 0,2	1,24 +/- 0,5	0,30 +/- 0,2	0,11 +/- 0,1	1,33 +/- 0,4
	D64137	Cyclin dependent kinase inhibitor 1C	1,57 +/- 0,1	10,20 +/- 2,4	374,29 +/- 195,0	647,57 +/- 42,0	0,72 +/- 0,1	18,20 +/- 3,5	53,32 +/- 10,0	1282,23 +/- 180,0
Wachstumsfaktoren	AL133386	Bone morphogenetic protein-5	1,19 +/- 0,1	0,80 +/- 0,2	0,55 +/- 0,3	0,34 +/- 0,02	1,39 +/- 0,2	0,75 +/- 0,2	2,26 +/- 0,2	1,68 +/- 0,2
	NM_001718	Bone morphogenetic protein-6	1,13 +/- 0,1	1,29 +/- 0,2	2,59 +/- 1,3	2,84 +/- 0,3	1,39 +/- 0,1	1,20 +/- 0,1	4,76 +/- 0,4	4,28 +/- 0,5
	AL157414	Bone morphogenetic protein-7	1,00 +/- 0,1	0,96 +/- 0,2	3,26 +/- 1,2	16,87 +/- 1,0	1,24 +/- 0,1	1,50 +/- 0,2	2,76 +/- 0,1	30,96 +/- 0,9
	AF022375.1	Vascular endothelial growth factor	5,32 +/- 2,4	0,77 +/- 0,3	9,24 +/- 3,7	5,70 +/- 2,6	3,06 +/- 1,4	6,34 +/- 0,2	1,03 +/- 0,4	6,92 +/- 4,0
	NM_002607.1	Platelet derived growth factor alpha	1,00 +/- 0,2	1,33 +/- 0,2	6,94 +/- 4,0	11,4 +/- 1,4	1,19 +/- 0,1	1,17 +/- 0,2	2,12 +/- 0,5	2,93 +/- 0,7
	BC001422.1	Placental growth factor	2,00 +/- 0,2	0,79 +/- 0,1	78,01 +/- 29,9	47,80 +/- 3,5	0,79 +/- 0,1	1,06 +/- 0,2	6,18 +/- 1,0	19,62 +/- 2,6
	D86962.1	Growth receptor bound protein 10	1,50 +/- 0,1	1,04 +/- 0,2	6,20 +/- 2,8	22,30 +/- 1,3	0,93 +/- 0,1	3,19 +/- 0,5	2,37 +/- 0,4	7,41 +/- 0,9
	M87771.1	fibroblast growth factor receptor-2	1,04 +/- 0,1	1,38 +/- 0,2	4,06 +/- 1,7	1,73 +/- 0,1	0,95 +/- 0,1	1,31 +/- 0,2	2,88 +/- 0,4	1,63 +/- 0,2
	M87771.1	fibroblast growth factor receptor-3	0,93 +/- 0,1	4,66 +/- 0,6	17,03 +/- 7,8	29,40 +/- 1,5	1,26 +/- 0,2	1,15 +/- 0,2	7,45 +/- 0,1	17,97 +/- 0,6
	NM_000424	Keratin 5	0,79 +/- 0,1	9,71 +/- 2,2	22,99 +/- 10,2	5,29 +/- 0,4	1,85 +/- 0,2	15,00 +/- 3,0	18,98 +/- 1,5	42,85 +/- 3,6
Keratine	NM_005556	Keratin 7	1,58 +/- 0,1	5,85 +/- 1,3	1,99 +/- 1,0	1,01 +/- 0,1	1,22 +/- 0,2	7,91 +/- 2,0	1,24 +/- 0,2	2,09 +/- 0,3
	NM_002275.1	Keratin 15	1,11 +/- 0,1	1,72 +/- 0,3	1,92 +/- 0,9	0,84 +/- 0,1	1,29 +/- 0,2	1,40 +/- 0,2	6,19 +/- 0,8	3,40 +/- 0,5
Zell-differenzierung	NM_005978.2	S100 calcium binding protein A2	1,36 +/- 0,1	6,52 +/- 1,0	0,28 +/- 0,1	1,4 +/- 0,1	1,61 +/- 0,2	6,85 +/- 1,3	0,06 +/- 0,01	2,11 +/- 0,2
	NM_020672.1	S100 calcium binding protein A6	1,42 +/- 0,1	1,30 +/- 1,1	1,60 +/- 0,9	1,42 +/- 0,1	1,45 +/- 0,1	6,15 +/- 1,0	2,30 +/- 0,2	1,89 +/- 0,2

Tab. 18: Darstellung der relativen Transkriptmengen im Vergleich zu eGFP-transfizierten Zellen ermittelt mittels Real-Time RT-PCR. Die Normalisierung erfolgte über HPRT. Die Standardabweichung zwischen den biologischen Triplikaten ist angegeben.

Für alle 26 untersuchten Gene konnte die differentielle Expression in den SYT-SSX2 transfizierten Zellen bestätigt werden. Nachfolgend sind die relativen Transkriptmengen einiger signifikant regulierter Gene beispielhaft dargestellt (Abb. 3.3.17).

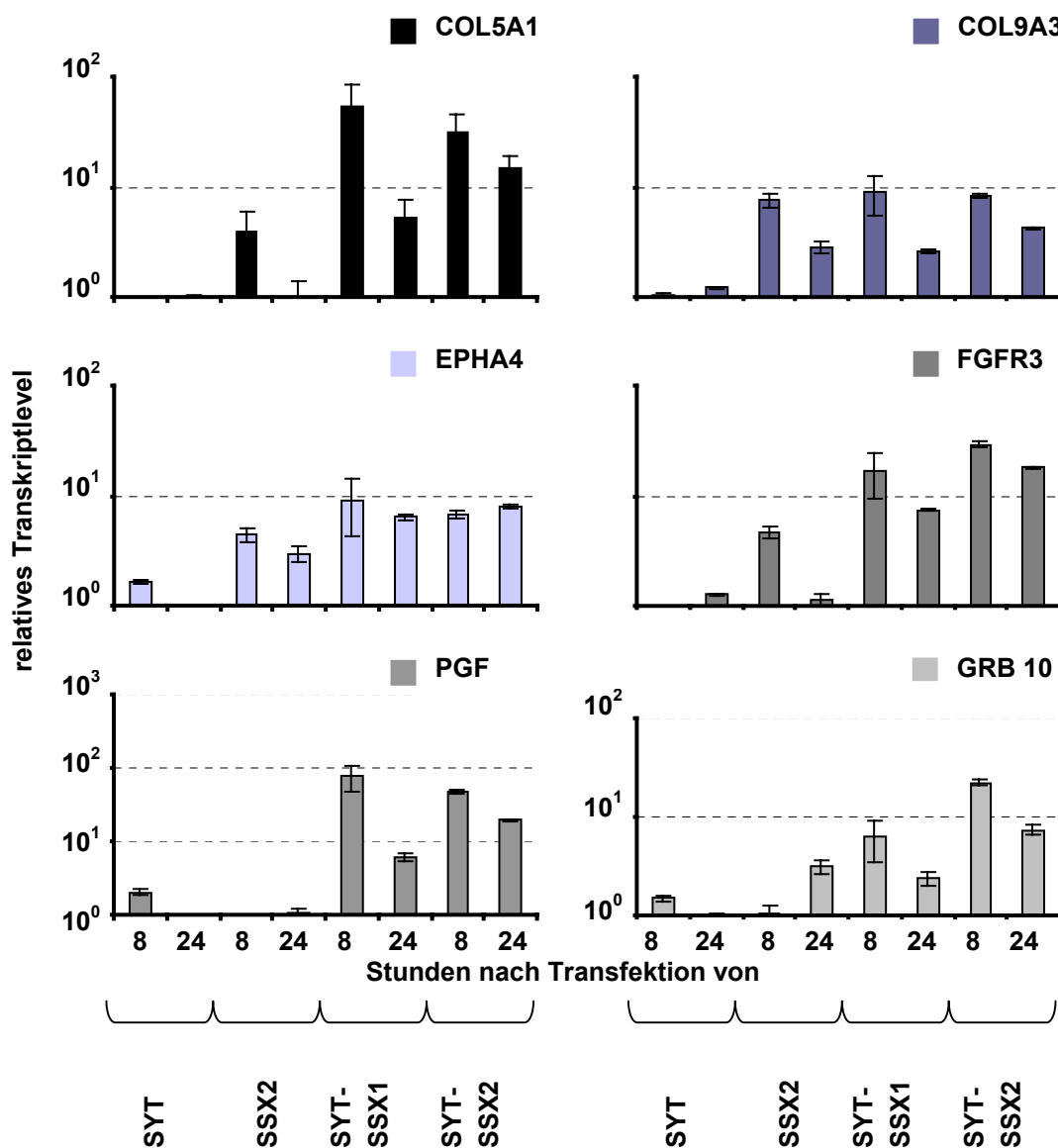


Abb. 3.3.17: Darstellung der relativen Transkriptmengen nach Transfektion von 1×10^7 MCF-7 Zellen mit SYT, SSX2, SYT-SSX1, SYT-SSX2 oder eGFP IVT RNA als Kontrolle. Die Normalisierung erfolgte über HPRT. Die relativen Transkriptmengen wurden im Vergleich zu den mit eGFP IVT RNA transfizierten Zellen ermittelt.

Insbesondere bei der Betrachtung des Zeitpunktes 8h nach RNA Transfer sahen wir für alle Gene eine deutliche Induktion durch die Fusionskonstrukte SYT-SSX1 und SYT-SSX2. SSX2 alleine induzierte ebenfalls vier der fünf hier gezeigten Gene, wenn auch in geringerem Ausmaß. Der Transfer von SYT alleine führte zu keinem signifikanten Effekt.

3.3.3.4 Verifizierung der funktionellen Relevanz der Gene durch Bestimmung der relativen Expression in Synovialsarkomen

Zur Verifizierung der funktionellen Relevanz *in vivo* einiger besonders interessant erscheinender Gene haben wir ihre relative Expression mittels Real-Time RT-PCR in Synovialsarkomen im Vergleich zu Normalgeweben getestet. Hierbei wurden 3 SYT-SSX1 positive Synovialsarkome sowie 2 SYT-SSX2 positive Synovialsarkome getestet. Die relative Expression wurde im Vergleich zur Expression der Gene in 10 Normalgeweben ermittelt (Abb. 3.3.18).

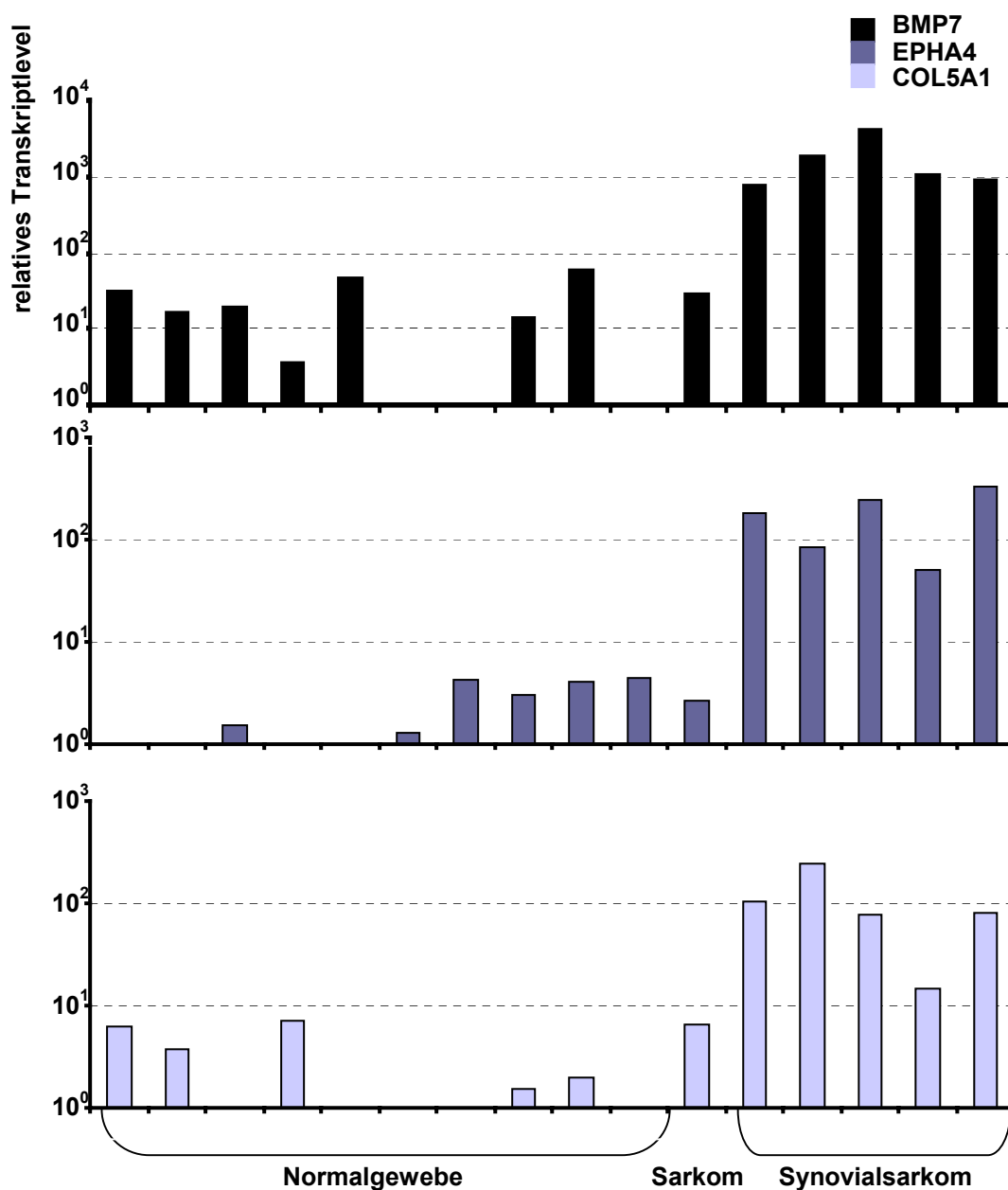


Abb. 3.3.18: Darstellung der relativen Transkriptmengen von BMP7, EPHA4 und COL5A1 in Synovialsarkomen im Vergleich zu Normalgeweben aus Mamma, Lunge, Niere, Ovar, Testis, Leber, Lymphknoten, Thymus, Milz und Nebenniere. Die Normalisierung erfolgte über HPRT. Bei dem getesteten Sarkom handelt es sich bei Bestimmung der Expression von BMP-7 und COL5A1 um ein Osteosarkom, während für die Untersuchung von EPHA4 ein Synovialsarkom getestet wurde, welches nicht positiv für SYT-SSX1 oder SYT-SSX2 war. Die pathologische Diagnose ist aufgrund der fehlenden Translokation fraglich.

Die differentielle Expression *in vivo* der gezeigten Gene konnte in Synovialsarkomen eindeutig bestätigt werden. Die erhöhte Expression von BMP7 und EPHA4 wurde bereits in anderen Studien beschrieben (Nagayama et al., 2002). Auch für FGFR3, p57, BMP5 und PGF ließ sich eine Überexpression in Synovialsarkomen nachweisen

(Daten hier nicht gezeigt). Die Gewebe wurden außerdem auf ihre Expression von SYT und SSX2 hin untersucht, um eine Induktion durch die differentielle Expression dieser Gene auszuschließen. Für SYT konnte eine ubiquitäre Expression in allen Geweben bestätigt werden (Daten hier nicht gezeigt). Die getesteten Synovialsarkome zeigten keine erhöhte Expression im Vergleich zu den Normalgeweben. Für SSX2 konnten wir erwartungsgemäß keine Expression in den getesteten Normalgeweben außer in Testis nachweisen. In den Synovialsarkomen konnte eine schwache Expression (3 log geringer als in Testis) nachgewiesen werden. Ein Effekt auf die Regulation der differentiell exprimierten Gene durch SYT oder SSX2 konnte daher ausgeschlossen werden.

3.3.3.5 Induktion von p57 durch Wachstumsfaktoren

Die deutlichste differentielle Expression in den SYT-SSX2 transfizierten Zellen im Mikroarrayexperiment wies p57 auf (cyclin- dependent kinase inhibitor 1C), das in die aktive Proliferationskontrolle involviert ist (MacLean et al., 2004)(Abb. 3.3.19; Tab. 14). Die Induktion von p57 durch diverse Wachstumsfaktoren (Johnson et al., 1998; Fan et al., 1997; Kivinen and Laiho, 1999; Reynisdottir et al., 1995) sowie die differentielle Expression in Tumoren (Johnson et al., 1998; Fan et al., 1997; Kivinen and Laiho, 1999; Reynisdottir et al., 1995) wurde bereits beschrieben.

Um den Zusammenhang der Expression von Wachstumsfaktoren und p57 in den mit SYT-SSX2 transfizierten Zellen genauer zu untersuchen, wurde 4h, 8h, 16h und 24h nach der Transfektion RNA asserviert und die Transkriptmengen von p57, PGF und FGFR3 in einer quantitativen RT-PCR untersucht (Abb. 3.3.19) (Primer und Amplifikationsbedingungen s. Anhang Tab. 19).

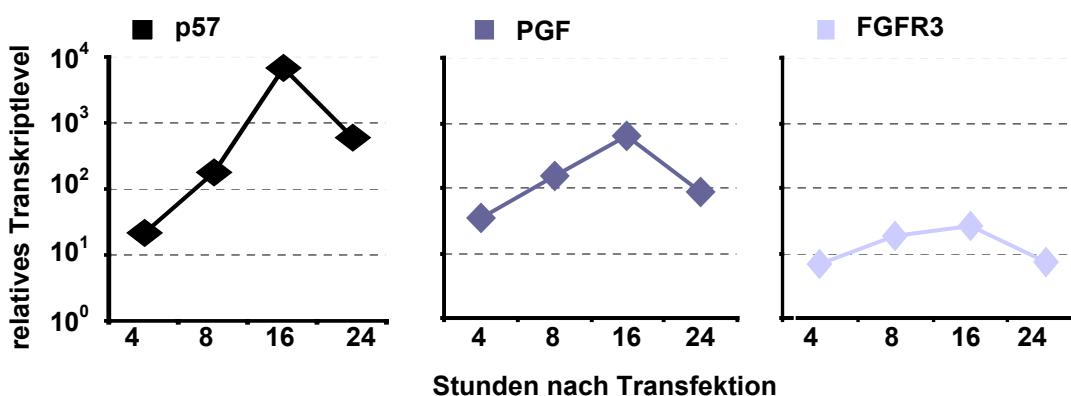


Abb. 3.3.19: Darstellung der relativen Transkriptmengen von FGFR3, PGF und p57 im zeitlichen Verlauf nach Transfektion von 1×10^7 MCF-7 Zellen mit $15 \mu\text{g}$ SYT-SSX2 und eGFP IVT RNA. Normalisierung über HPRT. Die Ermittlung der relativen Transkriptmengen erfolgte gegen die Transkriptmengen in eGFP transfizierten Zellen.

Die relative Transkriptmenge von p57 in den SYT-SSX2 transfizierten Zellen steigt auch nach 8h noch deutlich an, während die relativen Expressionslevel der Wachstumsfaktoren PGF (placental growth factor) und FGFR3 (fibroblast growth factor receptor 3) nach 8h nur noch geringfügig ansteigen. PGF und FGFR3 könnten daher möglicherweise koreguliert werden. p57 wird hingegen möglicherweise von diesen Faktoren reguliert.

Die Funktion von p57 besteht in der Bindung und der dadurch bedingten Inhibition des Komplexes aus Cyclin D1 und der cyclin-abhängigen Kinase 4 (Zhang et al., 2000). Cyclin D1 ist ein wichtiger Faktor in der Wachstumskontrolle. Eine Dysregulation des zellulären Wachstums stellt einen wichtigen Grund für die Entstehung von Tumoren dar. So spielt auch Cyclin D1 eine Rolle in der Karzinogenese diverser Tumoren durch Kooperation mit Onkogenen wie z.B. Myc (Bodrug et al., 1994; Lovec et al., 1994a) oder Ras (Zwicker et al., 1999; Hinds et al., 1994; Robles et al., 1998; Lovec et al., 1994b). Auch in Synovialsarkomen ist eine erhöhte Proteinexpression von Cyclin D1 durch Stabilisierung des Proteins beschrieben (Antonescu et al., 2000; Xie et al., 2002b).

Um zu testen, ob eine Erhöhung des Proteinlevels von Cyclin D1 auch nach Transfektion der Zellen mit SYT-SSX IVT RNA erreicht wird, wurden 1×10^7 MCF-7 Zellen 24h nach Transfektion mit SSX2, SYT-SSX1, SYT-SSX2 und eGFP IVT RNA lysiert und der Gesamtproteinanteil extrahiert. Der Nachweis von Cyclin D1 erfolgte durch eine Western Blot Analyse unter Verwendung eines polyklonalen rabbit anti-human cyclin D1 Antikörpers in einer Konzentration von $1 \mu\text{g/ml}$ (Abb. 3.3.20).

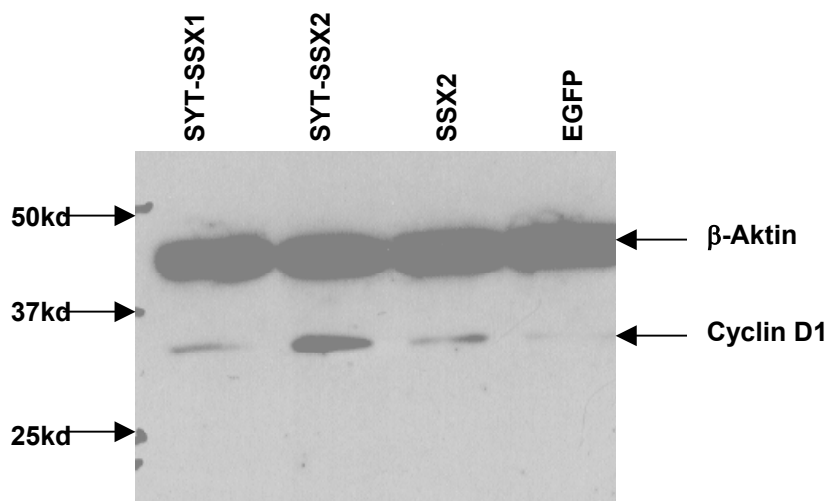


Abb. 3.3.20: Western Blot Analyse der Proteinmenge von cyclin D1 in 1×10^7 MCF-7 Zellen 24h nach Transfektion der Zellen mit SSX2, SYT-SSX1, SYT-SSX2 und eGFP IVT RNA. Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper rabbit anti-cyclin D1 in einer Konzentration von $1 \mu\text{g/ml}$, bzw. mouse anti- β -actin, als interne Ladungskontrolle, in einer Verdünnung von 1:5000. Als sekundärer Antikörper wurden goat anti-mouse IgG HRP in einer Verdünnung von 1: 2000 bzw. goat anti-rabbit IgG HRP in einer Verdünnung von 1: 2500 verwendet.

Nach Transfektion von Zellen mit SYT-SSX2 lässt sich eine erhöhte Proteinmenge von Cyclin D1 nachweisen. Durch Transfektion von SSX2 alleine bzw. SYT-SSX1 ist die Proteinmenge von Cyclin D1 nur gering erhöht.

3.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Es konnte gezeigt werden, dass die Methode des Transfers von *in vitro* transkribierter RNA in Zellen genutzt werden kann, um Zielgene solcher Gene zu identifizieren, die bisher funktionell wenig charakterisiert sind. Diverse Zelltypen, von Tumorzelllinie bis hin zu primären Zellen, lassen sich mit hoher Effizienz transfizieren. Die RNA ist für einen Zeitraum von 24h nahezu stabil in den Zellen vorhanden. Danach konnte eine lineare Abnahme der RNA Konzentration nachgewiesen werden. Protein konnte in Abhängigkeit von der Halbwertszeit über einen Zeitraum von 1-3 Tagen in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine Titrierung der Proteinmenge über die Konzentration der eingesetzten RNA möglich ist. Die Funktionalität der transfizierten RNA konnte am Beispiel von HIF1- α , als Transkriptionsfaktor, und VHL eindeutig gezeigt werden. Außerdem konnte eine Umprogrammierung von dendritischen Zellen erreicht werden. Nach Transfektion dieser Zellen mit IVT RNA des CD40L konnte eine Maturation der Zellen eingeleitet und die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine nachgewiesen werden. Zum Nachweis der Nutzbarkeit der Methode für die Bestimmung der funktionellen Relevanz von tumor-assoziierten Genen, wurden Zellen mit den Fusionsgenen SYT-SSX1 und SYT-SSX2 transfiziert. Vor allem nach 8h ließ sich eine deutlich erhöhte Expression von Wachstumsfaktoren nachweisen, die einen ersten Hinweis auf das onkogene Potential der Fusionsgene lieferten. Des Weiteren wurden neuronale Gene, tumor-assoziierte Gene und Gene, denen eine Rolle z.B. in der Zellzyklusregulation zukommt, durch die Transfektion mit SYT-SSX1 und SYT-SSX2 induziert. Die Methode des RNA Transfers sollte es also erlauben schnell und effizient die potentielle Bedeutsamkeit von Genen in der Karzinogenese sicherzustellen.

4 Diskussion

Tumorerkrankungen gehören trotz intensiver Studien unter Ausreizung der klassischen Therapieformen auch heute noch zu den führenden Todesursachen. Daher werden enorme Anstrengungen unternommen, neue Therapiemodalitäten zu etablieren.

Besondere Attraktivität haben sogenannte targetierte Therapien gewonnen, die genprodukt-spezifisch ausgerichtet sind und an definierten molekulare Alterationen ansetzen.

Ein Beispiel sind Small Compound Moleküle. Das Wirkprinzip beruht darauf, dass solche Moleküle selektiv in Tumoren exprimierte und für die Tumorzelle essentielle Moleküle binden, diese funktionell inhibieren und somit zur Proliferationshemmung oder zum Tod von Tumorzellen führen. Ein Beispiel, das große Erfolge in der Klinik gebracht hat, ist Imatinib (Gleevec). Dieses bindet an die BCR-ABL Kinase, das Produkt der Translokation der Chromosomen 9 und 22, bei der chronisch-myeloischen Leukämie (CML) (Hagemeijer, 1987). Dieses Fusionsprotein hat eine aberrant konstitutive Kinaseaktivität und induziert ganze Kaskaden nachgeschalteter Effekte, die zu einer ungehemmten Proliferation und zum Überlebensvorteil der leukämischen Zellen führen. Seine Inhibition durch die orale Gabe von Imatinib führt signifikant häufig zur Heilung solcher Patienten, bei denen die klassischen Chemotherapieprotokolle versagt haben (Druker et al., 2001; Crossman and O'Brien, 2004; Borthakur and Cortes, 2004).

Auch immuntherapeutische Ansätze sind targetierte Therapien, da sie auf die Erkennung eines definierten Antigens ausgerichtet sind. Das Wirkprinzip von Vakzineansätzen ist, dass die antigenspezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten die antigenträgenden Krebszellen effizient erkennen und lysieren (Rosenberg, 1997; Rosenberg, 1999; Melief et al., 1996; Zhang et al., 2003). Das Prinzip von monoklonalen Antikörpern (wie z.B. Rituxan in der Standardtherapie von B-Zelllymphomen) ist, dass der antigenspezifische Immunglobulinkomplex Tumorzellen erkennt und lysiert.

Ein anderer Aktivitätsmodus von therapeutischen Antikörpern kann ihre antagonistische Wirkung sein. So bindet das Herceptin in der Standardtherapie von Brusttumoren an sein Antigen, den Wachstumsfaktorrezeptor HER2/NEU und verhindert das Signaling über diesen (Suter et al., 2004; Hirsch and Langer, 2004; Miles, 2001).

Für alle diese targetierten Ansätze gilt, dass die Auswahl der Zielstruktur eine entscheidende Rolle für den Erfolg der Therapie spielt. Dies ist zum einen seine selektive Expression wie auch seine tumorbiologische Relevanz. Ersteres gewährleistet eine geringe Toxizität der entwickelten Therapeutika, zweiteres eine optimale Effizienz. Zum anderen sind alle targetierten Therapien bisher auf einer wissensbasierten Grundlage entwickelt worden. Teil eines Medikamentenzulassungsverfahrens ist auch der Nachweis des sogenannten *mode of action*. Entsprechend ist die umfassende Analyse solcher Gene auf molekularer wie auch zellulärer Ebene sehr wichtig.

In der vorgelegten Arbeit werden neue Techniken entwickelt und eingesetzt sowohl für die Identifikation neuer tumor-selektiv exprimierter Gene wie auch für die molekulare Kartierung der von ihnen induzierten Alterationen.

4.1 Identifizierung von keimzellspezifischen Genen mit tumor-biologischer Relevanz

4.1.1 Klonierung neuer CG Gene durch *Data Mining* von Sequenz- Datenbanken

Cancer Germline (CG) Gene haben aufgrund ihrer charakteristischen Gewebeverteilung und Tumorselektivität besondere Bedeutung als potentielle immuntherapeutische Zielstrukturen gewonnen (Boon and Old, 1997; Old, 2001). Durch den in dieser Arbeit entwickelten auf *Data Mining* von Sequenzdatenbanken beruhenden Ansatz konnten wir neue Mitglieder dieser Genklasse identifizieren. Unsere Abfragestrategie war darauf ausgerichtet, zunächst eine Liste testis- bzw. keimzellspezifischer Gene zu generieren.

Datenbanken in der öffentlichen Domäne haben Limitationen. So sind die meisten *expressed sequence tag* (EST) Sammlungen auf eingeschränkt repräsentative Stichproben aus nicht normalisierten cDNA Expressionsbanken zurückzuführen. Genverzeichnisse haben oft nicht kuratierte Spezifikationen. So werden z.B. Gene als testis-spezifisch eingegeben, obwohl möglicherweise nur eine beschränkte Anzahl von Normalgeweben vom Autor des jeweiligen Geneintrages untersucht wurde und erscheinen falsch positiv in unseren Schlagwortsuchen.

Entsprechend musste für die primär *in silico* determinierten Gene experimentell geprüft werden, ob es sich um authentisch testis-spezifische Gene handelt oder ob sie etwa doch in nicht gonadalen Normalgeweben exprimiert werden.

Dabei erwiesen sich lediglich 20% (54 von 268) der ursprünglich prädizierten Gene als auf Keimzellen beschränkt und für eine weitergehende Untersuchung in Tumoren von Interesse.

Mit dem gewählten Ansatz konnten wir in der Tat neben 19 bereits bekannten auch 6 neue CG Gene finden und unsere Ausgangshypothese bestätigen. Für diese 6 Gene (MORC, SGY-1, SPO-11, FTNB, LDHC, TPX-1) konnten wir auf bereits publizierte Literatur zurückgreifen. Diese bestätigt für alle die keimzellspezifische Expression. Allerdings war für keines dieser Gene bisher eine Aktivierung in Krebszellen bekannt, die von uns im Rahmen der vorliegenden Arbeiten neu entdeckt wurden.

Die in der Literatur beschriebenen physiologischen Funktionen der Proteine in Keimzellen erlaubten uns Hypothesenbildung bezüglich der potentiellen Effekte ihrer unerlaubten Expression in Tumorzellen.

Das nukleäre Protein MORC ist das humane Ortholog des *Microchidia* Genes. Es wird spezifisch in männlichen Keimzellen exprimiert. *In situ* Hybridisierung an Maustestis zeigt die Lokalisation von MORC in germinalen Epithelschichten, die Spermatogonien und Spermatozyten enthalten (Inoue et al., 1999). Gene mit hoher Homologie zu MORC wurden allerdings auch in somatischen Geweben nachgewiesen (Inoue et al., 1999). Es spielt vermutlich eine Rolle bei der Rekombination der Chromosomen in der frühen meiotischen Prophase (Watson et al., 1998). So beobachtet man bei Mäusen mit mutiertem MORC eine Arretierung der Keimzellen vor dem pachytänen Stadium die zur Sterilität führt.

Auch SPO 11 ist ein meiose-spezifisches Protein. Es bindet in den frühen Stadien der Meiose kovalent an DNA-Doppelstrangbrüche. Seine Lokalisation konnte auf Chromosom 20q13.2–q13.3 nachgewiesen werden, einem Bereich, der in einigen Brust- und Ovarialkarzinomen amplifiziert ist (Romanienko and Camerini-Otero, 1999) und mit chromosomaler Instabilität assoziiert wurde (Collins et al., 1998). Die Expression von SPO11 führt vermutlich zur Generierung von spezifischen DNA-Doppelstrangbrüchen während der Meiose.

Chromosomale Instabilität wird als ein wichtiger tumorpromotierender Faktor angesehen (Roig et al., 2004). Es ist vorstellbar, dass MORC als Gen, das rekombinogen ist und SPO11, das DNA-Doppelstrangbrüche verursacht, über diesen Mechanismus zur Tumorphathogenese beitragen. In der Tat wurde beschrieben, dass die Expression von SPO11 in nicht meiotischen Zellen durch DNA-Doppelstrangbrüche zur Instabilitäten führt (Baudat and de Massy, 2004).

SGY-1 ist ein sekretiertes Protein und wird in den Tubuli seminiferi während des pachytänen Stadiums der meiotischen Prophase exprimiert und ist spezifisch assoziiert mit in der Entwicklung befindlichen Spermatozyten (Kaneko and DePamphilis, 2000). Es hat Homologien zu der Dickkopf Protein Familie. Seine Funktion liegt vermutlich in der Regulation der Wnt-Proteine vor allem von Wnt1 während der Spermatogenese (Kaneko and DePamphilis, 2000). Wnt Proteine sind bei der Zellproliferation und -differenzierung von embryonalen und adulten Zellen beteiligt. Eine Dysregulation des Wnt-Signalweges in adulten Zellen kann zur Karzinogenese beitragen (Cadigan and Nusse, 1997).

β -Fertilin (ADAM2) gehört zu einer großen Gruppe von integralen Membranglykoproteinen, der ADAM-Familie. Als Heterodimer mit α -Fertilin spielt es eine Rolle bei der Interaktion zwischen Spermium und Oozyte (McLaughlin et al., 2001). Seine Disintegrin ähnliche Domäne bindet an Integrinrezeptoren auf der Membran der Oozyte (Cho et al., 1998). Dies führt zur Aktivierung diverser Kaskaden wie z.B. des RAS-RAF-Signalweges. Es ist vorstellbar, dass eine Parakrinie dieses Genprodukts zu unkontrolliertem Zellwachstum bei Tumorzellen beitragen kann.

TPX-1 wird in späten pachytänen Spermatozyten aktiviert und ist ein integrales Protein der outer dense fibers (ODFs) des Schwanzes von haploiden Keimzellen und des sich entwickelnden Akrosoms (O'Bryan et al., 2001a). Es ist ein Mitglied der Familie der cysteine-rich secretory proteins (CRISP). TPX-1 ist involviert in die Interaktion von Sertoli-Zellen und spermatogenetischen Zellen insbesondere hinsichtlich der Differenzierung und Maturation der letzteren. Funktionsverlust von TPX-1 verhindert diese spezifische Zell-Zell-Interaktion und führt damit zu Fertilitätsabnahme (Olesen et al., 2001).

Unter den gefundenen CG Genen war die LDHC dasjenige mit der höchsten Prävalenz in Tumoren. Dieses Protein ist das testis-spezifische Isoenzym der Laktatdehydrogenase-Familie (Markert et al., 1998) und exprimiert in reifen Keimzellen des preleptotenen-zygotenen Stadiums bis hin zu differenzierten Spermatozoen (Jethanandani and Goldberg, 2001).

Laktatdehydrogenasen katalysieren die Interkonversion von Laktat und Pyruvat in der Glykolyse. Es sind drei verschiedene Laktatdehydrogenase Isoenzyme bekannt (Masters, 1982; O'Carra and Mulcahy, 1990; Li et al., 1998). Durch Tetramerisierung der zwei Isoformen LDHA (m-Kette) und LDHB (h-Kette) entstehen fünf verschiedene somatische Isoenzyme (LDH1-LDH5) die durch unterschiedliche physikochemische und enzymatische Eigenschaften sowie durch ein gewebespezifisches Expressionsmuster charakterisiert sind (O'Carra and Mulcahy, 1990). Die Serum-Laktatdehydrogenaseaktivität wird häufig als prognostischer Tumormarker verwendet (Vigano et al. 2000), ohne allerdings das hierfür verantwortliche Isoenzym zu kennen. Die LDHC bildet ein homotetrameres Isoenzym, welches bisher nie in Betracht gezogen wurde als Tumormarker zu dienen, da es bisher als keimzell-spezifisch beschrieben wurde (Edwards et al. 1989) und die von uns gefundene Expression in Tumoren unbekannt war.

Die LDHC hat im Vergleich zu den anderen Isoenzymen Besonderheiten, die den spezifischen Anforderungen von Keimzellen entsprechen. Dies ist z.B. erhöhte Sensitivität gegenüber Pyruvat Inhibition und geringere Sensitivität gegenüber Laktat Inhibition (Goldberg et al., 1985). Die Laktatkonzentrationen sowohl in männlichen als auch in weiblichen Genitalflüssigkeiten sind sehr hoch und können somit als Energiequelle genutzt werden. Der bevorzugte Metabolismus von Laktat durch die LDHC stellt Pyruvat als Ausgangsmolekül für den Citratzyklus zur Verfügung (Bajpai et al., 1998).

In Tumorzellen ist die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien häufig gestört, was vermutlich zum einen an Defekten der Mitochondrien und zum anderen an Überexpression der glykolytischen Enzyme in Tumoren liegt. Der Energiehaushalt muss dann durch aerobe Glykolyse aufrechterhalten werden. Durch die erhöhte Glykolyserate wird Glukose zu einem hohen Maße in Laktat umgewandelt, welches aber offensichtlich effektiv als Energiequelle genutzt werden kann. Dieser Mechanismus wird als Warbureffekt bezeichnet. Die zugrundeliegende molekulare

Basis ist noch nicht verstanden (Warburg, 1956; zusammengefasst in Semenza, 2000c). Die LDHC könnte ein Schlüsselenzym sein, das zu diesem Effekt beiträgt. Sie kann große Mengen an Laktat in Pyruvat umwandeln. Pyruvat kann dann zum einen in die Glukoneogenese eingeführt werden, und zum anderen in den Citratzyklus. Hierzu muss es in Acetyl-CoA (Acetyl-Koenzym A) umgewandelt werden, welches dann zur ATP-Generierung genutzt werden kann.

4.1.2 Prädiktoren für ektop in Tumoren exprimierte keimzellspezifische Gene

In das beschriebene *Data Mining* sind etwa 12.000 Gene eingegangen. Entsprechend kann behauptet werden, dass wir vermutlich durch unsere Abfrage den Anteil an keimzellspezifischen Genen gelistet haben, die in 1/4 bis 1/3 des gesamten Genoms vertreten sind. Etwa die Hälfte dieser Gene wird in Tumoren aktiviert, so dass die Tumorphathogenese offensichtlich mit der Einschaltung ganzer keimzellspezifischer Programme verbunden ist.

Wir haben uns die Frage gestellt, wie sich solche CG Gene von strikt keimzellspezifischen Genen unterscheiden. Um dies zu beantworten, haben wir beispielhaft alle 54 keimzellspezifischen Gene auf potentielle Prädiktoren für eine der beiden Klassen untersucht. Da diese Genliste aus einem großen genomischen Ansatz entstanden ist, sollten Resultate einer solchen Meta-Analyse allgemein gültige Folgerungen erlauben.

Um das Stadium der Gametogenese zu bestimmen, zu dem jedes dieser Gene transkriptionell aktiviert wird, nutzten wir den Umstand, dass die männliche und weibliche Gametogenese sich im zeitlichen Ablauf der verschiedenen Entwicklungsstadien unterscheiden. In der Oogenese wird die Meiose I bereits in der 11. Woche nach Fertilisation initiiert (Gondos et al., 1986). Oozyten können allerdings über 40 Jahre in der ersten meiotischen Prophase arretieren. Dagegen enthält fötaler Testis prämeiotische Zellen (Gondos and Hobel, 1971), da die Spermatogonien im Gegensatz zu den Oogonien zunächst in der Mitose verweilen und erst in der Pubertät in die Meiose eintreten. In adultem Testis sind alle Stadien der Differenzierung von Spermatogonien bis hin zu postmeiotischen Spermatiden enthalten.

Wir folgerten, dass Gene, die unterschiedlichen Stadien der Keimzellentwicklung zuzuordnen sind, auch distinkte aber vorhersagbare Expressionsmuster in fötalem Testis, fötalem Ovar und adultem Testis aufweisen müssten. Die Nutzbarkeit dieser Rationale konnten wir tatsächlich verifizieren durch die richtige Zuordnung von Genen, deren Aktivierung in definierten Gametogenesestadien von anderen Arbeitsgruppen bereits gut untersucht war (DMRT1 und DAZ für prämeiotische Stadien, SYCP1 und SPO11 für Meiose und die Spermatidprotein, TNP2, ODF1 und SPACA1 für postmeiotische Stadien).

Durch Nutzung dieses indirekten Ansatzes, konnten wir die Notwendigkeit zur Asservierung von aufgereinigten Keimzellen zu verschiedenen Stadien umgehen, der sowohl aus logistischen Gründen, wie auch aus technischen Limitationen schwierig umzusetzen ist.

Nach unseren Daten sind entsprechend Gene wie z.B. MAGEB1, SAGE und XAGE als prämeiotisch einzuordnen. BOLL, SYCP1 und BRDT werden in fötalem Testis nicht exprimiert aber in fötalem Ovar und adultem Testis, so dass sie eindeutig der Meiose I zugeordnet werden können. TCP10, CXORF2 und CYCL2 sind dagegen ausschließlich in Meiose II oder postmeiotisch exprimiert, da sie lediglich in adultem Testis nachgewiesen werden konnten.

Interessanterweise werden CG Gene überwiegend in frühen prämeiotischen Stadien exprimiert, während die keimzellspezifischen Gene häufig erst in späten Stadien der Meiose oder postmeiotisch in der Gametogenese induziert werden. Hierzu könnte beitragen, dass die transkriptionelle Regulation von Genen sich zu verschiedenen Zeitpunkten der Gametogenese grundsätzlich unterscheidet.

In der Tat weisen unsere Untersuchungen zur Korrelation der transkriptionellen Aktivierung mit genomischer Hypomethylierung in diese Richtung. Auffälligerweise sind es gerade die prämeiotischen Gene, die wir durch genomische Hypomethylierung aktivieren konnten.

Epigenetische Modifikationen wie Hypomethylierung oder Acetylierung (Eden and Cedar, 1994; Meehan et al., 1992; Bird, 1992) bewirken, dass die kompakte Struktur der Nukleosomen aufgelockert wird. Hierdurch wird es der Polymerase II ermöglicht, spezifisch an den Promotor anzubinden und die Transkription des Gens zu beginnen.

Für ausgewählte keimzellspezifische Gene war bereits gezeigt worden, dass die stringente transkriptionelle Repression in adulten somatischen Geweben im Verlauf einer malignen Transformation durch Promotordemethylierung aufgehoben wird (De Smet et al., 1996; De Smet et al., 1999a; Honda et al., 2004).

Unsere Untersuchungen sowohl mit 5'-Aza-2-Deoxycytidin (DAC) als demethylierendem Agens als auch mit Zelllinien, in denen die beiden kritischen DNA Methyltransferasen DNMT1 und DNMT3b ausgeknockt sind, bestätigen erstmalig durch einen systematischen Ansatz, dass genomische Hypomethylierung sowohl notwendig als auch hinreichend für die Induktion der Expression der CG Gene ist.

Die Regulation der Expression der rein keimzellspezifischen Gene unterliegt vermutlich einem weitaus komplexeren Mechanismus u.U. unter Beteiligung spezifischer Transkriptionsfaktoren und/oder Mechanismen, welche die Chromatinstruktur verändern wie z.B. Phosphorylierungen (Sassone-Corsi, 2002).

Wiewohl Cancer/Germline Gene oft als testis-spezifisch beschrieben werden, deckten wir auf, dass sie charakteristischerweise statistisch häufiger als strikt keimzellspezifische Gene nicht nur in der Spermatogenese sondern auch in der Oogenese exprimiert werden. Dies war aufgrund eines Probenartefakts offensichtlich von anderen bisher übersehen worden. Gewebestücke aus adultem Ovar sind oft sehr stromareich und enthalten nur noch wenige Keimzellen. Naturgemäß lassen sich selbst

oozytenspezifische Gene dann nicht aus einem beliebigen Ovarialgewebestück amplifizieren. Wir haben die uns zur Verfügung stehenden Ovarialproben auf ihre Expression von SYCP1 untersucht. SYCP1 wird ausschließlich in den Keimzellen exprimiert und kann daher als Surrogatmarker für die Präsenz von Keimzellen verwendet werden.

Eine weitere auffällige Korrelation ist, dass mehr als die Hälfte der durch den Ansatz gefundenen CG Gene auf dem X-Chromosom lokalisiert sind.

Diese Resultate zeigen nicht nur, dass die Aktivierung von Keimzellgenen in Tumoren nicht zufällig ist. Auch haben wir dadurch weitere Klassenprädiktoren identifiziert, die in bioinformatische Abfragestrategien kompiliert werden können, um diese noch spezifischer auf CG Gene auszurichten. Die Anzahl der falsch positiven rein testis-exprimierten Gene kann dadurch reduziert werden.

4.2 Identifizierung von in Tumoren überexprimierten Genen mit Hilfe von cDNA-Mikroarrays

Überexprimierte Gene unterscheiden sich zwar nicht in ihrer qualitativen, aber in ihrer quantitativen Expression in Tumorzellen und dem jeweiligen Herkunftsgewebe. Ihre Überexpression kann zu einem tumorbiologisch relevanten *gain of function* beitragen. So wurde die Überexpression von Wachstumsfaktorrezeptoren, wie z.B. EGF-Rezeptor (epidermal growth factor receptor) (Robertson et al., 1996; Ishikawa et al., 1990; Itakura et al., 1994) und PDGF (platelet derived growth factor) (Kumabe et al., 1992; Van der et al., 1993; Coltrera et al., 1995) in Tumoren beschrieben. Die überexprimierten Rezeptoren resultieren in einer autonomen und konstitutionell aktiven Signaltransduktion des entsprechenden Signalweges der zu einer vermehrten Proliferation der Zellen führt. Die Kenntnis der Überexpression von Genen in Tumoren und den daraus resultierenden zellulären Mechanismen kann, wie im Falle der Überexpression der Rezeptortyrosinkinase ERBB2 bzw. HER2/NEU bei der Therapie mit Herceptin, die Grundlage für erfolgreiche Therapieformen bilden. Im Fall der Therapie mit Herceptin z.B. war das Verständnis der daraus resultierenden zellulären Mechanismen die Grundlage für eine erfolgreiche und mittlerweile routinemäßig angewandte Therapieform (Finn and Slamon, 2003; Ziada et al., 2004).

Für die Identifizierung solcher in Tumoren überexprimierter Gene eignen sich cDNA-Mikroarrays. Da wir in einem ersten Ansatz an einer Identifizierung von tumor-relevanten Genen, und weniger von komplexen molekularen Netzwerken und Signaltransduktionskaskaden interessiert waren, wählten wir für unsere Experimente einen mitteldichten cDNA-Array, der 1152 Gene abdeckte. Die Gene, die auf diesem

Oncoimmunochip cDNA Mikroarray repräsentiert sind, wurden im Rahmen eines Vorgängerprojektes von der Firma Memorec Biotec GmbH, Köln und unserer Arbeitsgruppe ausgewählt (www.eurice.de/eucip/). Kriterien für die Auswahl dieser Gene war, dass sie bereits als tumor-assoziiert vorbeschrieben waren, oder zu tumorbiologisch relevanten funktionellen Gruppen gehörten.

Ein erstes entscheidendes Kriterium für die Analyse von tumor-assoziierten Genen mit Hilfe von Mikroarrays ist die Auswahl einer geeigneten Kontrolle. Entscheidende Voraussetzungen, die die Kontrolle erfüllen muss, ist eine hohe Abdeckung von möglichst vielen Genen auf dem Array sowie die direkte Vergleichbarkeit zu dem *gold standard* (Abb. 3.2.2 + 3.2.3). In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass ein amplifizierter Pool aller RNAs diese Voraussetzungen erfüllt, so dass dieser im Folgenden als Referenz verwendet wurde.

Ähnlichkeiten im Transkriptionsprofil von Gewebe lassen sich quantifizieren. Das Clustering erlaubt die Gruppierung mehrerer Proben auf der Basis dieser Ähnlichkeitsmaße. Proben, die aus dem selben Herkunftsgewebe entstammen, sollten in einer derartigen Clusteranalyse einen hohen Grad der Verwandtschaft aufweisen. Dies ließ sich in den durchgeführten Untersuchungen bestätigen (Abb. 3.2.5 + 3.2.6; Tab. 11).

Es fiel allerdings auf, dass Kolongewebe ein sehr viel einheitlicheres Expressionsspektrum aufwies als z.B. Lungengewebe. Dies führten wir darauf zurück, dass nicht-kleinzellige Lungenkarzinome zu unterschiedlichen Subtypen differenzieren können, nämlich Adenokarzinome, Plattenepithelkarzinome oder Großzeller. Sehr oft ist ein individueller Tumor nicht distinkt einem dieser Subtypen zuzuordnen, sondern enthält auch Anteile eines anderen Subtyps und unter Umständen auch kleinzellig wirkende Bereiche. Diese schon auf histologischer Ebene nachweisbaren, und für den diagnostizierenden Pathologen herausfordernde histologische Heterogenität von nicht-kleinzelligen Lungentumoren, spiegelt sich natürlich im Expressionsspektrum wieder. Kolonkarzinome sind in der Regel reine Adenokarzinome und unterscheiden sich höchstens im Grad ihrer Dedifferenzierung.

Interessanterweise sind diejenigen Gene, die bei der dargestellten Clusteranalyse zur Gewebebezuordnung beitragen, bereits als Differenzierungsgene für das jeweilige Organ beschrieben. So fanden wir bereits bekannte Markergene für Kolon, wie z.B. TM4SF3 (Szala et al., 1990), CEA (Rule and Kirch, 1976) und M1S2 (Bjork et al., 1993) in dem entsprechenden Cluster wieder. Entsprechend sind bisher unbekannte Gene, die in solchen Clustern zu finden sind, höchstwahrscheinlich neue Differenzierungsgene für das jeweilige Organ.

Die Abfrage nach generellen Tumormarkern, die über alle Karzinomarten hinweg, unabhängig von ihrer Gewebeherkunft, differentiell im Vergleich zu den Normalgeweben reguliert waren, resultierte unter anderem in der Identifizierung bereits bekannter Tumormarkern wie Ki67 (Scopa et al., 2003; Scopa et al., 2003; Villena-Heinsen et al., 2002; Shaaban et al., 2002; Engellau et al., 2001), ECT2 (Miki et al.,

1993; Tatsumoto et al., 1999), Cyclin B2 (Sarafan-Vasseur et al., 2002; Liu et al., 1999) und CDK1 (Ohta et al., 1998; Barrett et al., 2002) (Tab. 12) und bestätigte so die Anwendbarkeit dieser Suche nach den *most discriminative genes* für die Identifizierung tumor-assoziiertes Gene (Abb. 3.2.7).

Darüber hinaus allerdings fanden wir auch Gene, die bisher noch nicht als tumor-assoziiert beschrieben waren. Eines der von uns erstmalig in Tumoren als überexprimiert beschriebenes Gen ist HSPC150, welches Ähnlichkeiten zu Ubiquitin konjugierenden Enzymen E2 aufweist. Wir haben die Überexpression von HSPC150 über eine breite Palette verschiedenster Tumorentitäten aufgezeigt so z.B. in 93% der getesteten Bronchialkarzinome, 64% der Mammakarzinome und 70% der Kolonkarzinome, aber auch in 33% der Magenkarzinome und in 16% der Prostatakarzinome (Abb. 3.2.8; Tab. 13). Für HSPC150 ist beschrieben, dass es im Vergleich zu anderen E2 Genen eine sehr geringe Expression in Normalgeweben aufweist. Eine Überexpression von HSPC150 in Testis sowie in einer Neuroblastomzelllinie wurde bereits beschrieben (Okamoto et al., 2003). Auch für andere E2 Proteine ist eine Überexpression in Tumoren beschrieben. So ist z.B. UBC9 in Adenokarzinomen der Lunge überexprimiert (McDoniels-Silvers et al., 2002) und auch für UBCH10 ist eine Überexpression in diversen primären Tumoren beschrieben (Okamoto et al., 2003). E2 Proteine katalysieren die E3 abhängige Ubiquitylierung, die zu einer Degradation der Substratproteine führt (Ciechanover, 1994). Für einige E2 Proteine ist bereits gezeigt, dass sie eine Rolle in der Zellzyklusregulation spielen. So konnte gezeigt werden, dass z.B. UBCH10 nötig ist, für die Ubiquitylierung von mitotischen Cyklinen (Aristarkhov et al., 1996; Yu et al., 1996). HSPC150 könnte ein weiteres Protein der Klasse der Ubiquitin konjugierenden Enzyme E2 sein dem eine Rolle in Tumoren zukommt.

In einem weiteren Ansatz suchten wir zielgerichtet nach Genen, die eine signifikant veränderte Expression in Bronchialkarzinomen im Vergleich zum normalen Lungengewebe aufweisen (Abb. 3.2.9; Tab. 14). Die Expression von 14 der 18 derart identifizierten Gene wurde in einer Real-Time RT-PCR in einer Reihe von Normalgeweben und Tumoren von Lunge und Brust getestet. Bei zwei der vier nicht getesteten Genen konnte die PCR nicht etabliert werden. Die anderen beiden Gene (Ki-67 und GAPDH) sind bereits gut charakterisiert hinsichtlich ihrer Überexpression in Bronchialkarzinomen und wurden nicht näher untersucht.

Für die Gene DSP, HCAP-G, PRAME bestätigte sich die deutliche Überexpression in den Tumorgeweben im Vergleich zu den Normalgeweben gleicher Entität. Für die anderen Gene fällt schon bei Betrachtung des Clusters (Abb. 3.2.9) auf, dass die Expressionswerte dieser Gene für viele Gewebe fehlen (grau gekennzeichnete Bereiche). Dadurch ist eine Vorhersage über die tumor-spezifische Expression dieser Gewebe anhand der Arraydaten schwierig. Durch eine quantitativen RT-PCR ist eine genauere Aussage möglich.

Desmoplakin (DSP) fanden wir überexprimiert in 71% der Bronchialkarzinome, in 21% der Brustkarzinome und in 30% der Kolonkarzinome. Desmoplakin verbindet die Desmosomen mit intermediären Filamenten und ist damit ein struktureller Bestandteil des Cytoskelettes (Green et al., 1990). Desmoplakin ist notwendig für die Organisation der Komplexbildung des Cadherin/Plakoglobin-Komplexes (Kowalczyk et al., 1997). Generell sind die Prozesse der Zell-Zell-Adhäsion wichtig für viele Prozesse wie z.B. Entwicklung und Morphogenese, sowie in der Regulation von Zellmigration und Proliferation (Kowalczyk et al., 1999). Die differentielle Expression von Desmoplakin in Bronchialkarzinomen ist bereits beschrieben (Young et al., 2002),(Kettunen et al., 2004).

HCAP-G, ist ein Teil des 13S Kondensinkomplexes, der in den frühen Stadien der Mitose gebildet wird und für eine richtige Kondensation und Segregation der Chromosomen sorgt (Strunnikov et al., 1993). HCAP-G wurde durch serologische Klonierung einer Melanom-DNA-Bank identifiziert (Jager et al., 2000a). HCAP-G fanden wir überexprimiert in 86% der getesteten Brustkarzinome, aber auch in 43% der Bronchialkarzinome und in 70% der Kolonkarzinome.

PRAME zeigte die deutlichste differentielle Expression mit den höchsten Frequenzen in 86% der Bronchialkarzinome und 100% der Synovialsarkome, aber auch in 50% der Brustkarzinome, 33% der Prostatakarzinome, 22% der Magenkarzinome und in 10% der Kolonkarzinome. Auffällig ist hierbei die Expressionshöhe, die in einigen Bronchialkarzinomen einen Faktor von bis zu 5000 im Vergleich zu den Normalgeweben beträgt. PRAME (preferentially expressed antigen in melanoma) ist ein Antigen, welches durch Expressionsklonierung unter Nutzung des T-Zellrepertoires eines Melanompatienten identifiziert wurde (Ikeda et al., 1997). Sein Expressionspektrum weist Ähnlichkeiten mit dem der Mitgliedern der MAGE, BAGE und Gage-Familie auf, die durch hohe Expressionshöhen in Testis und Tumoren gekennzeichnet sind. PRAME wird allerdings auch in Normalgeweben exprimiert (Ikeda et al., 1997; Pellat-Deceunynck et al., 2000; Sarcevic et al., 2003; Neumann et al., 1998). Die Kontrolle der Regulation von PRAME erfolgt ebenso wie die von MAGE (De Smet et al., 1996) über Promotormethylierung bzw. -demethylierung (Ikeda et al., 1997). Die Funktion von PRAME ist weitestgehend ungeklärt.

Die Detektion dieser Gene zeigt eindeutig, dass es mit Hilfe von cDNA-Mikroarrays möglich ist, tumor-assoziierte Gene zu identifizieren. Diese identifizierten Gene stellen potentielle Targetstrukturen für spezifische therapeutische Ansätze dar. Neben der Untersuchung von bekannten, gut charakterisierten Tumoren wie Mamma-, Kolon- und Bronchialkarzinom bietet sich auch die Möglichkeit schlechter charakterisiert Tumoren mit Hilfe von cDNA-Mikroarrays zu kartieren und damit mögliche Zielstrukturen für eine Therapie zu identifizieren.

4.3 Etablierung eines Gentransfers basierend auf IVT RNA zur funktionellen Charakterisierung von Genen

4.3.1 Technische Eigenschaften des IVT RNA Transfers

In der post-genomischen Ära, in der zwar 30.000-40.000 proteinkodierende Sequenzen bekannt sind, in der aber nur für etwa die Hälfte dieser Gene eine Funktion identifiziert wurde, ist es von erheblicher Bedeutung effiziente Methoden zur funktionellen Charakterisierung neuer Genprodukte zu etablieren. Eine Kartierung der molekularen Effekte eines definierten Gens bildet die Grundlage zur Hypothesenbildung über seine Funktion.

Es gibt verschiedene Strategien Genfunktionen zu studieren. Unserer Erfahrung nach ist es wichtig, initial möglichst viele Informationen und Daten zu sammeln, die die Grundlage für eine Hypothesenbildung bieten. Wenn über Sequenz- und Struktureigenschaften des jeweiligen Genproduktes in Kombination mit einer Kartierung seiner molekularen Effekte hinreichend Hinweise auf eine mögliche Funktion oder die Positionierung im Zellstoffwechsel bestehen, können dann zielgerichtet experimentelle Ansätze zur Evaluierung einer solchen Hypothese durchgeführt werden.

Zur Silenzierung von Genen wurden erfolgreich auf RNA-basierende Verfahren genutzt. Nach der Antisense-RNA (Green et al., 1986) hat die RNA-Interferenz (RNAi) Technologie immer mehr an Bedeutung gewonnen (Fire et al., 1998).

Hier interagieren kurze (~21bp) doppelsträngige RNAs spezifisch mit ihrer Zielsequenz. Dadurch wird ein Multiprotein-Komplex aktiviert, der zum frühzeitigen Abbau transkribierter mRNA führt, bevor diese translatiert werden kann (Hammond et al., 2000).

Wir stellen in dieser Arbeit die Nutzung von RNA für die Simulierung eines *gain of function* vor. Diese Konstellation ist besonders interessant für die Kategorie von selektiv in Tumoren aktivierten oder überexprimierten Genen, an denen unsere Arbeitsgruppe schwerpunktmäßig arbeitet.

Wir konnten eine Reihe von Vorteilen des RNA-Transfers im Vergleich zu anderen Verfahren der heterologen Expression aufzeigen.

So erlaubt der RNA-Transfer insbesondere durch Elektroporation eine hocheffiziente bis zu über 90%ige Transfektion von unterschiedlichsten Zelltypen und Zelllinien (Tab. 12). In unseren Händen galt dies sogar für humane dendritische Zellen, bei denen es sich um primäre, wenig teilungsaktive Zellen handelt. RNA-basierte Konstrukte müssen weder in den Zellkern gelangen, noch in die genomische DNA integrieren, so dass die Zellteilung nicht die Grundvoraussetzung für den Erfolg der Transfektion ist.

Dies umgeht u.a. die Notwendigkeit der Sortierung oder Klonierung von Transfektanten aus einem heterogenen Ansatz die zeitaufwendig sind. Außerdem ist die Selektion von stabil transfizierten Klonen oft mit der Erhöhung der biologischen Varianz und somit mit der Gefahr der Identifizierung falsch positiver *response* Gene verbunden.

Doppelsträngige RNA, die länger als 38bp ist, führt zur Induktion des Interferonsystems (Montgomery et al., 1998; Sen, 2001). Wir erfassten die Genexpression mit eGFP IVT RNA transfizierten und nicht-transfizierten Zellen mit dem *Oncoimmunochip cDNA Mikroarray*. Die eingesetzte einzelsträngige RNA induzierte nur vereinzelt Interferon-induzierte Gene wie z.B. IFNGR1. Bei den differentiell exprimierten Genen handelte es sich im wesentlichen um *heat-shock* Gene sowie proteasom- und apoptose-assoziierte Gene. Diese unspezifischen Expressionsveränderungen waren kurz und transient.

Ein weiterer Vorteil ist, dass durch Titrierung der elektroportierten RNA-Menge auch die Menge gebildeten Proteins in der Zelle verändert wird und somit eine Anpassung an physiologische Mengen möglich ist. Mit Plasmidkonstrukten oder z.B. auch mit adenoviralem Transfer liegen in den Transfektanden oft unnatürlich hohe Proteinmengen vor, die Artefakte hervorrufen oder in der Zelle aggregieren. Somit eignet sich dieses System insbesondere für Gene, die in einem sehr engen quantitativen Fenster reguliert werden. In diesem Zusammenhang ist auch interessant, dass die Menge translatierten Proteins durch die Menge elektroportierter RNA linear titrierbar ist.

4.3.2 IVT RNA Transfektion von Modellgenen

Attraktiv ist die Pharmakokinetik des RNA-Transfers, die wir mit eGFP als Reportergen auf Transkript und Proteinebene, aber auch für Genprodukte wie VHL, HIF1- α und CD40L, modellhaft belegt haben. Die eingebrachte IVT RNA wird schnell und effizient translatiert. Bereits nach 4 Stunden ist Protein nachweisbar. Stabile Proteinlevel finden wir für die meisten von uns untersuchten Genprodukte für mindestens drei Tage. Grundsätzlich wird die Dauer der Verfügbarkeit eines Proteins abhängig von seiner natürlichen Halbwertszeit sein. Während eGFP eine Halbwertszeit von 16h hat, wird seine Variante 2dGFP aufgrund einer eingebrachten PEST-Domäne schneller degradiert und hat eine Halbwertszeit von 2h. Nach IVT RNA-Transfer sind allerdings die Proteinkurven für beide Reportergenprodukte identisch und scheren erst nach 24h deutlich auseinander, also einem Zeitpunkt, zu dem eine rapide Degradation der eingebrachten IVT RNA einsetzte.

Das breite Einsatzspektrum von IVT RNA belegten wir durch Modellgene. So haben wir den Signalweg der *Hypoxie-reponse* untersucht, in dem VHL (Von-Hippel-Lindau) und HIF1- α (hypoxia inducible factor) eine Rolle spielen.

Der Tumorsuppressor pVHL hat eine wichtige Funktion für die Zusammenlagerung von extrazellulärem Fibronectin (Ohh et al., 1998), in der Kontrolle der Matrixdegradation durch Matrix-Metalloproteinasen (Koochekpour et al., 1999) sowie vermutlich in der Synthese und Degradation von Komponenten der extrazellulären Matrix (Davidowitz et al., 2001). Er ist Bestandteil des Ubiquitin Ligase E3 Komplexes und wirkt als Substrat für deren Ligasefunktion. Damit wirkt VHL mit an der Ubiquitynylierung der alpha-

Untereinheit von HIF1 und seiner Degradation durch das Proteasom (Ivan et al., 2001; Cockman et al., 2000; Jaakkola et al., 2001). HIF1- α wird unter hypoxischen Bedingungen stabilisiert. Als Transkriptionsfaktor bindet er an eine definierte Konsensussequenz im Promotorbereich responsiver Gene. Zu diesen gehören Glukosetransporter, glykolytische Enzyme, Gene der Glukoneogenese, Erythropoese, Stickstoffoxid-Synthese und des Phosphatmetabolismus, Wachstumsfaktoren und Eisentransporter (Semenza, 1999; Ratcliffe et al., 1998; Levy et al., 1995; Maxwell et al., 2001; Semenza, 2000b; Semenza et al., 1996; Gleadle and Ratcliffe, 1997).

Drei von diesen Genen (LDHA, VEGF und Glut-1) untersuchten wir per Real-Time RT-PCR. Wir konnten zeigen, dass alle drei Gene hochreguliert werden durch IVT RNA-Transfer des Transkriptionsfaktors HIF1- α , der diese Gene direkt durch Bindung an ihre Promotoren induziert. Aber auch durch IVT RNA-Transfer von VHL lösten wir schnell (innerhalb von 8h) und effizient eine Regulation aller drei Gene aus, in diesem Fall eine Suppression. Dies erfolgte indirekt nach Translation des VHL, seine Integration in einen Multienzymkomplex und Ubiquitylierung von HIF1- α .

Diese Daten zeigen, dass durch Transfer von IVT RNA nicht nur primäre Effekte des transfizierten Gens, sondern auch *downstream* Kaskaden effizient induziert werden. In Kombination mit den pharmakokinetischen Charakteristiken von IVT RNA bedeutet dies eine hervorragende Grundlage zur Entschlüsselung von Signaltransduktionskaskaden. Die Erstellung der Expressionsprofile zu verschiedenen Zeitpunkten und ihre Querschnittsanalyse mit adäquaten Analyseprogrammen sollte erlauben, durch Verlaufsdarstellung definierter Gencluster, sequentiell aktivierte Kaskaden von regulierten Genen aufzudecken.

Um zu evaluieren, ob neben molekular messbaren Effekten nachgeschalteter Gene auch eine Reprogrammierung von Zellen zu erreichen ist, wählten wir humane dendritische Zellen als Modellsystem. Diese sind in ihren unterschiedlichen Differenzierungsformen gut charakterisiert. Insbesondere ist bekannt, dass immature und mature dendritische Zellen (DC) sich in ihrer Funktion distinkt unterscheiden. Während immature DCs sich vor allem durch starke Endozytose und Prozessierung der aufgenommenen Antigene auszeichnen, haben mature DCs eine wichtige Rolle in der Koordination von Immunantworten. Die Transformation vom maturaen in den immaturren Zustand reprogrammiert eine ganze Reihe von funktionellen Signalwegen. Beide Differenzierungsformen sind durch definierte Oberflächenmarker und Zytokinmuster gekennzeichnet, die als Surrogatmarker für diese distinkten Zustände gelten können.

Wir zeigten, dass der Transfer von CD40L IVT RNA die Maturation von immaturren DCs bewirkte. Die Zellen machten die gleichen morphologischen Veränderungen durch und aktivierten die gleichen Maturationsmarker (CD80, CD83, CD86 HLA-DR)(Abb. 3.3.11) wie Kontroll DCs, die herkömmlich mit rekombinantem CD40L behandelt wurden. Des Weiteren exprimierten und sezernierten die transfizierten Zellen TNF- α , IL-6, IL-10 und IL12p70 (Abb. 3.3.13), also Zytokine, die relevant sind für den *cross-talk* im

Lymphknoten. Die Maturation der Zellen durch CD40L IVT RNA war genauso effizient, wie die Behandlung der Zellen mit rekombinantem Protein, obwohl die Verfügbarkeit der RNA nur für ca. 24h gegeben ist.

CD40L ist ein kostimulatorisches, zur TNF-Superfamilie gehörendes Membranprotein, das aktivierungsinduziert auf T-Zellen exprimiert wird. Die Interaktion CD40L, der auf T-Zellen exprimiert ist und CD40, der von antigen-präsentierenden Zellen (APCs), wie z.B. Makrophagen, B-Zellen oder DCs exprimiert wird, spielt eine essentielle Rolle bei der Induktion der humoralen und zellulären Immunantwort. Die Interaktion von CD40 und CD40L führt zu diversen zelltypspezifischen Aktivierungsprozessen (Abb. 4.1).

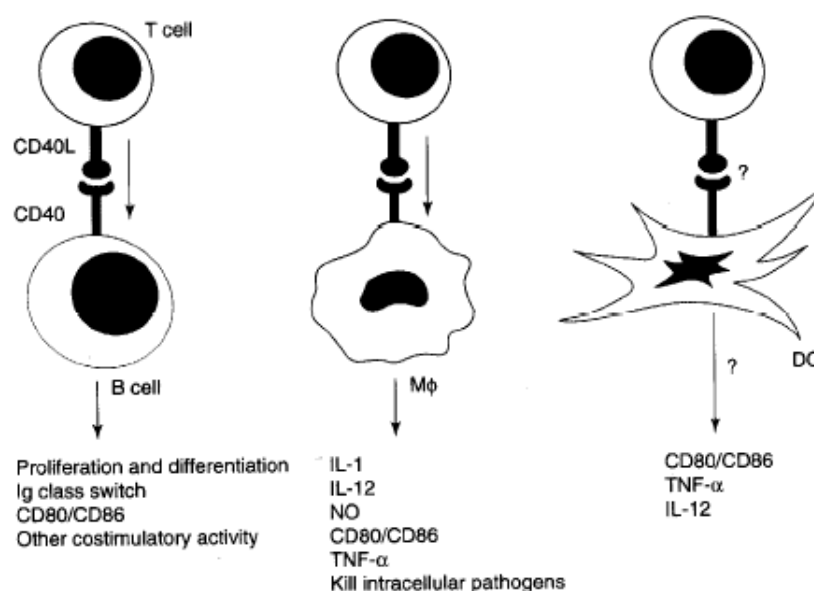


Abb. 4.2: Darstellung des Einflusses der Interaktion von CD40 und CD40L auf B-Zellen, Makrophagen sowie DCs (aus (Grewal and Flavell, 1996)).

Zur vollständigen Aktivierung von T-Zellen sowie APCs ist die Interaktion von CD40L und CD40 wesentlich (Noelle et al., 1992a; Noelle et al., 1992b). Insbesondere spielt hier die Interaktion zwischen T-Helfer-Zelle und DC über CD40-Signaltransduktion eine wichtige Rolle in der Immunabwehr. Dieser Vorgang, der auch als *crosslicensing* bezeichnet wird, wird als einer der wichtigsten immunologischen Initialzündungen angesehen. Durch die genetische Modifikation von DCs zur Expression des CD40L wäre ihre parakrine Stimulation und zudem eine Aktivierung von CD8⁺-T-Zellen und B-Zellen auch ohne CD4⁺-T-Zellhilfe denkbar. DCs, die mit CD40L transfiziert wurden, könnten daher einen potenten Ansatz für Vakzinierungen darstellen, um die oft ungenügende CD4⁺-T-Zellhilfe auszugleichen und das Immunsystem optimal zu stimulieren. Für den vollständigen Nachweis der Funktionalität des als IVT RNA trans-

fizierten CD40L müsste *in vivo* gezeigt werden, dass das migratorische Potential der Zellen und ihre T- und B-zellstimulatorische Kapazität sich erhöht. Diese Untersuchungen stehen noch aus.

In Kombination mit den pharmakokinetischen Charakteristiken von IVT RNA bedeutet dies eine hervorragende Grundlage zur Entschlüsselung von Signaltransduktionskaskaden. Die Erstellung von Genexpressionsprofilen zu verschiedenen Zeitpunkten und ihre Analyse mit adäquaten Programmen sollte erlauben, durch Verlaufsdarstellung definierter Gencluster, sequentiell aktivierte Kaskaden von regulierten Genen aufzudecken. Somit ließe sich mit der Methode des RNA-Transfers die funktionelle Bedeutsamkeit bislang wenig charakterisierter Gene in der Karzinogenese aufklären. Außerdem lassen sich durch den anschließenden Transfer neu identifizierter Zielgene direkte und indirekte Effekte des transfizierten Gens aufdecken.

4.3.2 Untersuchung der molekularen Effekte von SYT-SSX Fusionsproteinen

Zur Verifizierung der von uns etablierten IVT RNA Strategie untersuchten wir die Effekte einer eindeutig tumor-assoziierten molekularen Alteration. In mehr als 90% der Synovialsarkome ist die chromosomale Translokation t(X;18)(p11.2;q11.2) (Clark et al., 1994; Crew et al., 1995) mit der Fusion zwischen dem SYT-Gen und einem Mitglied der SSX-Familie nachweisbar (Abb. 4.2). Aufgrund dieser hohen Prävalenz ist dieser molekularen Alteration eine entscheidende Rolle bei der Karzinogenese des Synovialsarkoms zugesprochen worden. Die Präsenz des chimären Genproduktes wird sogar als diagnostisches Kriterium für diesen Tumor genutzt. (Turc-Carel et al., 1986). Dies machte die Transkripte zu interessanten Kandidaten für den Einsatz der von uns etablierten Technologie des IVT RNA-Transfers in Kombination mit der Erfassung der Expressionsveränderungen auf gesamt-genomischer Ebene mit *Affymetrix Oligonukleotid Mikroarrays*.

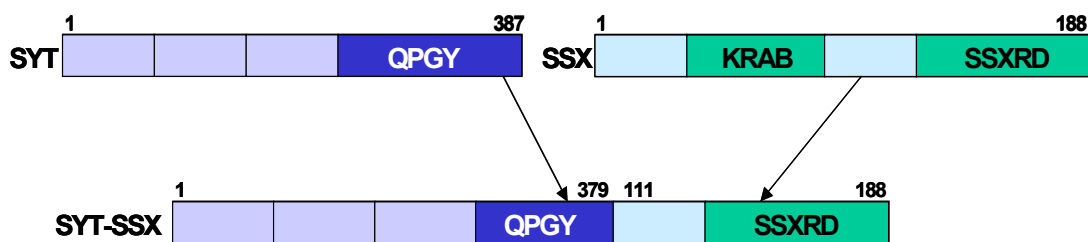


Abb. 4.2: Translokation von SYT (Chromosom 18 p11.2) und SSX (Chromosom X q11.2). Darstellung der wichtigsten Domänen und Veränderungen durch die Translokation.

Konsekutiv zur SYT-SSX Fusion auftretende molekulare Alterationen sind nur bruchstückhaft erfasst und in Systemen untersucht, die nicht direkt mit unserem vergleichbar sind. Eine Studie nutzt Antisense-RNA zur transienten Inhibition von SYT-SSX2 in einer Synovialsarkomzelllinie und ermittelt die molekularen Alterationen anhand eines cDNA-Mikroarrays. Da es sich bei SYT-SSX2 vermutlich um einen Kofaktor für die Transkription handelt, ist zu erwarten, dass die Inhibition dieses Gens zu einer verminderten Expression von Zielgenen führt. Die Sensitivität von cDNA-Mikroarrays könnte hier ein begrenzender Faktor für die Identifizierung von SYT-SSX2 Zielgenen sein. Des Weiteren werden auf einem cDNA-Mikroarray nur eine begrenzte Anzahl von Genen untersucht. Ein direkter Vergleich zu einem *Affymetrix Oligonukleotid Mikroarray* ist daher nur bedingt möglich.

Eine weitere Studie arbeitet mit einem tetracyclin-induzierbaren SYT-SSX1 Plasmid in einer Mausfibroblastenzelllinie. Da wir in unserer Studie einen Fokus auf die SYT-SSX2 transfizierten Zellen gelegt haben, sind diese Ergebnisse auch nur bedingt vergleichbar. In der Tat unterscheiden sich die Resultate beider Studien von denen unserer Untersuchungen.

Allerdings konnten wir unsere Daten mit Expressionsstudien von Synovialsarkomen vergleichen, d.h. den Zellen, die wir durch die ektope Expression des Fusionsgenes simulieren wollten. Die Übereinstimmungen die wir sahen unterstützen die Authentizität und Relevanz unserer Ergebnisse überzeugend.

In unserer Studie identifizierten wir als Zielgene von SYT-SSX vor allem Wachstumsfaktoren, aber auch neuronale Gene, tumor-assoziierte Gene sowie solche, denen eine Funktion in der Zellzyklusregulation zukommt (Tab. 18).

Die erhöhte Expression von neuronalen Genen in Synovialsarkomen wird bereits durch Nielsen et al. (Nielsen et al., 2002) beschrieben. Die Identifikation dieser Gene nach Transfektion der Zellen mit SYT-SSX bringt sie nun eindeutig mit diesem chimären Protein in Verbindung.

Des Weiteren finden wir in unseren Untersuchungen mit RAI2 (retinoic acid induced 2) und TNFAIP2 (tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2) zwei Gene, die durch Retinolsäure induziert werden. Auch Nielsen et al. (Nielsen et al., 2002) beschreiben die Korrelation von weiteren Genen des Retinolsäuresignalweges mit Synovialsarkomen. Auch die Gene EPH-B3 (Ephrin-B3) und EPH-A4 (Ephrin A4) sowie COL9A3 (Collagen 9A3), die als signifikant in Synovialsarkomen hochreguliert beschrieben (Nagayama et al., 2002) werden, werden durch unsere Daten mit dem Fusionskonstrukt SYT-SSX in Verbindung gebracht. Sowohl die Proteine des Retinolsäuresignalweges wie auch die nachgenannten Proteine sind als promigratorisch wirkende Marker für neuronale Leistenzellen beschrieben (Wendling et al., 2000). (Helbling et al., 1998).

Unsere Daten implizieren, dass SYT-SSX Fusionskonstrukte zu einer Aktivierung von Programmen führen, die eine neuronale Differenzierung kennzeichnen. Zusätzlich werden Proteine induziert, die promigratorisch in neuronalen Zellen wirken.

Neben einer Reihe von Wachstumsfaktoren ist es vor allem BMP7 (bone morphogenetic protein), welches aufgrund seiner osteogenen Eigenschaften eine entscheidende Rolle in der Entstehung der Synovialsarkome haben könnte. Die BMPs stellen eine Untergruppe der TGF-Familie dar, die aus etwa 20 homologen Mitgliedern besteht. Neben ihrer osteogenen Funktion spielen die BMPs aber auch eine Rolle in der Proliferation und Differenzierung von Zellen, in chemotaktischen Prozessen, in der Apoptose und der Neurogenese. Einige Mitglieder der BMP-Familie sind bereits im Zusammenhang mit diversen Tumorentitäten beschrieben, so z.B. BMP4, BMP6 und BMP7 in der Entwicklung von Prostatametastasen (Autzen et al., 1998; Thomas et al., 1998; Masuda et al., 2003).

Nielsen et al. (Nielsen et al., 2002) beschreiben die erhöhte Expression von BMP7 in Synovialsarkomen. Wir wiesen die Induktion von BMP7, wie auch BMP5 und BMP6, konsekutiv zu dem SYT-SSX2 Transfer nach und bestätigten auch die Überexpression von BMP5 und BMP7 in Synovialsarkomen (Abb. 3.3.18).

Eine andere Studie beschreibt die Assoziation der Überexpression von Genen wie IGF2 (insulin-like growth factor 2), IGF-bindenden Proteinen und ERBB2 (v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2), aber auch Kollagenen und Keratinen, mit Synovialsarkomen (Allander et al., 2002). Unsere Untersuchungen wiederum weisen diverse Kollagene (COL1A1, COL5A1, COL9A3), aber auch ein IGF2 bindendes Protein sowie Keratin 5, Keratin 7 und Keratin 15 in den transfizierten Zellen nach (Tab. 18). Die Identifizierung von Genen, die auch in Synovialsarkomen differentiell exprimiert sind, stellt einen direkten Bezug zwischen den Fusionsgenen und der Regulation dieser Gene her.

Allerdings sehen wir eine Induktion von Keratinen auch durch SSX2 alleine, was darauf hin deutet, dass der SSX-Anteil des Fusionsgenes entscheidend für die Regulation dieser Gene ist (Tab. 18).

Die Expression der Keratine ist in SYT-SSX1 transfizierten Zellen stärker, als in SYT-SSX2 transfizierten. In Synovialsarkomen können die Keratine überwiegend in epithelialen Zellen detektiert werden (Allander et al., 2002). Das biphasische Synovialsarkom, das durch die SYT-SSX1 Translokation gekennzeichnet ist, hat zusätzlich zu den charakteristischen Spindelzellen eine solche epitheliale Schicht. Das monophasische Synovialsarkom dagegen, das in der Regel eine SYT-SSX2 Translokation aufweist, besteht lediglich aus Spindelzellen (Kawai et al., 1998; Nilsson et al., 1999; dos Santos et al., 2001).

Für die Spindel- und Epithelzellen des biphasischen Synovialsarkoms wird ein monoklonaler Ursprung hypothetisiert (Birdsall et al., 1999; Nishio et al., 2001). Die epitheliale Differenzierung wird mit der Abwesenheit oder unzureichenden Aktivität von mesenchymalen und hematopoetischen Transkriptionsfaktoren in Zusammenhang gebracht (Frisch, 1997). Die differentielle Expression von Keratinen nach Transfektion von Zellen mit SYT-SSX1 deutet darauf hin, dass spezifisch die Translokation von SYT mit SSX1 diese Marker der epithelialen Differenzierung induziert. Die Induktion dieser Gene könnte ein erster Anhaltspunkt für die Entstehung der epithelialen Komponente sein.

Das Gen mit der höchsten differentiellen Expressionsrate beim Vergleich von eGFP und SYT-SSX2 transfizierten Zellen ist CDKN1C (cyclin dependent kinase inhibitor 1C, p57). Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) sind an der aktiven Kontrolle der Zellproliferation beteiligt, wobei sie durch Cycline aktiviert und durch cyclin-abhängige Kinase Inhibitoren (CIK) inhibiert werden (Morgan, 1995). Eine erhöhte Expression von CDKN1A und CDKN1B in Tumorzellen ist als Folge einer Zunahme der Wachstumsfaktoren, FGF und PDGF (platelet-derived growth factor) beschrieben worden (Johnson et al., 1998; Fan et al., 1997; Kivinen and Laiho, 1999; Reynisdottir et al., 1995). Für CDKN1C wird eine Induktion durch Wachstumsfaktoren nur vermutet (Dobashi et al., 2001).

Wir fanden in den SYT-SSX2 transfizierten Zellen sowohl CDKN1C, als auch diverse Wachstumsfaktoren wie z.B. VEGF (vascular endothelial growth factor), PDGFA (platelet derived growth factor alpha), aber auch Nervenwachstumsfaktoren und -rezeptoren wie NGFR (nerve growth factor receptor) und VGF (VGF nerve growth factor inducible) sowie Fibroblastenwachstumsfaktorrezeptoren (FGFR-2, FGFR-3) überexprimiert (Tab. 18; Anhang Tab. 22; Abb. 3.3.19).

Überexprimiertes Cyclin D1 ist bereits für seine Rolle in der Transformation und Entwicklung diverser Tumortypen beschrieben (Sherr, 1996; Rosenwald et al., 1999; Yu et al., 2001)

In Synovialsarkomen ist eine Stabilisierung des Cyclin D1 und dadurch höhere *steady state* Level des Proteins beschrieben (Nilsson et al., 1999; Xie et al., 2002b; Inagaki et al., 2000). Unsere Daten lassen einen direkten Zusammenhang zwischen der heterologen Expression von SYT-SSX2 und erhöhten Cyclin D1 Proteinmengen

vermuten. Während wir keine Veränderung der Transkriptmenge von Cyclin D1 nach Transfektion der Zellen detektierten, ist die Proteinmenge in den transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen deutlich erhöht. Dies lässt eine Stabilisierung von Cyclin D1 auf Proteinebene durch SYT-SSX2 vermuten.

Es ist vorstellbar, dass die Transfektion der Zellen mit SYT-SSX2 zu einer erhöhten Expression von Wachstumsfaktoren führt (Abb. 3.3.19). Diese induzieren die Expression von p57, welches zu einer Stabilisierung des Komplexes zwischen Cyclin D1 und cyclin-abhängiger Kinase führt. Die Stabilisierung dieses Komplexes wiederum könnte zu einer Wachstumsdysregulation führen, die für das onkogene Potential von SYT-SSX2 verantwortlich ist.

Die Detektion von diversen Genen, die nachweislich in Synovialsarkomen von Bedeutung sind, ist ein eindeutiges Indiz dafür, dass mit der hier verwendeten Methode des IVT RNA-Transfers tatsächlich funktionell relevante Effekte induziert werden.

Auch wenn der genaue Ablauf der molekularen Veränderungen bei der Entstehung des Synovialsarkoms weiterhin unklar ist, konnten wir Hinweise finden, die darauf hindeuten, dass die Fusionsgene auch im humanen System onkogenes Potential besitzen. Außerdem konnten wir zeigen, dass die Identifikation neuer Zielgene mit der Methode des RNA-Transfers und anschließender Analyse durch *Affymetrix Oligonukleotid Mikroarrays* möglich ist. Diese Methode hat im Vergleich zu der direkten Analyse von Synovialsarkomen den Vorteil, dass ein Zusammenhang zwischen Translokation und Induktion der molekularen Alterationen hergestellt werden kann. Bei der direkten Analyse von Synovialsarkomen lassen sich nur Momentaufnahmen des aktuellen Expressionsstatus erheben, die keinerlei Hinweise auf die Mechanismen während der Entstehung des Sarkoms geben. Genau diese Mechanismen sind aber die potentiellen Angriffspunkte für eine Therapie. Des weiteren wird hier mit Mischgeweben gearbeitet, so dass eine große Anzahl von Synovialsarkomen untersucht werden muss, um eindeutige Informationen zu generieren. Da die Ausgangszellen des Synovialsarkoms noch nicht bekannt sind, ist außerdem die Auswahl einer geeigneten Kontrolle schwierig.

Auch für den RNA-Transfer würde die Kenntnis der Ausgangszellen des Synovialsarkoms die Simulierung der *in vivo* Situation verbessern. Bei Verwendung einer Zelllinie für die Simulierung der heterologen Expression der Fusionsgene ist die Frage, ob die beobachteten Effekte den natürlicherweise ablaufenden Prozessen entsprechen. Diese Frage lässt sich nur durch ein *in vivo* Modell klären, bei dem z.B. im Maussystem transfizierte Zellen appliziert werden und die molekularen Alterationen bestimmt werden.

Für die genaue Analyse von Regulationskaskaden sind ausgedehnte Zeitkinetiken nach der Transfektion der Zellen sowie die gezielte Inhibition oder Expression der identifizierten Zielgene denkbar.

5 Literatur

't Veer, L.J., Dai, H., van de Vijver, M.J., He, Y.D., Hart, A.A., Bernards, R., and Friend, S.H. (2003). Expression profiling predicts outcome in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 5, 57-58.

Adams, M.D., Kelley, J.M., Gocayne, J.D., Dubnick, M., Polymeropoulos, M.H., Xiao, H., Merril, C.R., Wu, A., Olde, B., Moreno, R.F., and . (1991). Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science* 252, 1651-1656.

Alizadeh, A., Eisen, M., Davis, R.E., Ma, C., Sabet, H., Tran, T., Powell, J.I., Yang, L., Marti, G.E., Moore, D.T., Hudson, J.R., Jr., Chan, W.C., Greiner, T., Weisenburger, D., Armitage, J.O., Lossos, I., Levy, R., Botstein, D., Brown, P.O., and Staudt, L.M. (1999). The lymphochip: a specialized cDNA microarray for the genomic-scale analysis of gene expression in normal and malignant lymphocytes. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 64, 71-78.

Allander, S.V., Illei, P.B., Chen, Y., Antonescu, C.R., Bittner, M., Ladanyi, M., and Meltzer, P.S. (2002). Expression profiling of synovial sarcoma by cDNA microarrays: association of ERBB2, IGFBP2, and ELF3 with epithelial differentiation. *Am. J. Pathol.* 161, 1587-1595.

Antonescu, C.R., Leung, D.H., Dudas, M., Ladanyi, M., Brennan, M., Woodruff, J.M., and Cordon-Cardo, C. (2000). Alterations of cell cycle regulators in localized synovial sarcoma: A multifactorial study with prognostic implications. *Am. J. Pathol.* 156, 977-983.

Aristarkhov, A., Eytan, E., Moghe, A., Admon, A., Hershko, A., and Ruderman, J.V. (1996). E2-C, a cyclin-selective ubiquitin carrier protein required for the destruction of mitotic cyclins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 4294-4299.

Autzen, P., Robson, C.N., Bjartell, A., Malcolm, A.J., Johnson, M.I., Neal, D.E., and Hamdy, F.C. (1998). Bone morphogenetic protein 6 in skeletal metastases from prostate cancer and other common human malignancies. *Br. J. Cancer* 78, 1219-1223.

Barrett, K.L., Demiranda, D., and Katula, K.S. (2002). Cyclin b1 promoter activity and functional cdk1 complex formation in G1 phase of human breast cancer cells. *Cell Biol. Int.* 26, 19-28.

Baudat, F. and de Massy, B. (2004). [SPO11: an activity that promotes DNA breaks required for meiosis]. *Med. Sci. (Paris)* 20, 213-218.

Bera, T.K., Maitra, R., Iavarone, C., Salvatore, G., Kumar, V., Vincent, J.J., Sathyanarayana, B.K., Duray, P., Lee, B.K., and Pastan, I. (2002). PATE, a gene expressed in prostate cancer, normal prostate, and testis, identified by a functional genomic approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 3058-3063.

Bird, A. (1992). The essentials of DNA methylation. *Cell* 70, 5-8.

- Birdsall,S., Osin,P., Lu,Y.J., Fisher,C., and Shipley,J. (1999). Synovial sarcoma specific translocation associated with both epithelial and spindle cell components. *Int. J. Cancer* 82, 605-608.
- Birnboim,H.C. and Doly,J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523.
- Bjork,P., Jonsson,U., Svedberg,H., Larsson,K., Lind,P., Dillner,J., Hedlund,G., Dohlsten,M., and Kalland,T. (1993). Isolation, partial characterization, and molecular cloning of a human colon adenocarcinoma cell-surface glycoprotein recognized by the C215 mouse monoclonal antibody. *J. Biol. Chem.* 268, 24232-24241.
- Boczkowski,D., Nair,S.K., Nam,J.H., Lyerly,H.K., and Gilboa,E. (2000). Induction of tumor immunity and cytotoxic T lymphocyte responses using dendritic cells transfected with messenger RNA amplified from tumor cells. *Cancer Res.* 60, 1028-1034.
- Boczkowski,D., Nair,S.K., Snyder,D., and Gilboa,E. (1996). Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* 184, 465-472.
- Bodrug,S.E., Warner,B.J., Bath,M.L., Lindeman,G.J., Harris,A.W., and Adams,J.M. (1994). Cyclin D1 transgene impedes lymphocyte maturation and collaborates in lymphomagenesis with the myc gene. *EMBO J.* 13, 2124-2130.
- Boel,P., Wildmann,C., Sensi,M.L., Brasseur,R., Renaud,J.C., Coulie,P., Boon,T., and van der,B.P. (1995). BAGE: a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes. *Immunity.* 2, 167-175.
- Boon,T. and Old,L.J. (1997). Cancer Tumor antigens. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 681-683.
- Borthakur,G. and Cortes,J.E. (2004). Imatinib mesylate in the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Int. J. Hematol.* 79, 411-419.
- Boyum,A. (1968). Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran, and ficoll as erythrocyteaggregating agents. *Scand. J. Clin. Lab Invest Suppl* 97, 31-50.
- Brett,D., Whitehouse,S., Antonson,P., Shipley,J., Cooper,C., and Goodwin,G. (1997). The SYT protein involved in the t(X;18) synovial sarcoma translocation is a transcriptional activator localised in nuclear bodies. *Hum. Mol. Genet.* 6, 1559-1564.
- Bridge,A.J., Pebernard,S., Ducraux,A., Nicoulaz,A.L., and Iggo,R. (2003). Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat. Genet.* 34, 263-264.
- Cadigan,K.M. and Nusse,R. (1997). Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev.* 11, 3286-3305.
- Caplen,N.J., Parrish,S., Imani,F., Fire,A., and Morgan,R.A. (2001). Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 9742-9747.
- Castelli,J.C., Hassel,B.A., Wood,K.A., Li,X.L., Amemiya,K., Dalakas,M.C., Torrence,P.F., and Youle,R.J. (1997). A study of the interferon antiviral mechanism: apoptosis activation by the 2-5A system. *J. Exp. Med.* 186, 967-972.

Chen, Y.T. (2000). Cancer vaccine: identification of human tumor antigens by SEREX. *Cancer J. 6 Suppl 3*, S208-S217.

Chen, Y.T. and Old, L.J. (1999). Cancer-testis antigens: targets for cancer immunotherapy. *Cancer J. Sci. Am. 5*, 16-17.

Chen, Y.T., Scanlan, M.J., Sahin, U., Tureci, O., Gure, A.O., Tsang, S., Williamson, B., Stockert, E., Pfreundschuh, M., and Old, L.J. (1997). A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 94*, 1914-1918.

Cho, C., Bunch, D.O., Faure, J.E., Goulding, E.H., Eddy, E.M., Primakoff, P., and Myles, D.G. (1998). Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta. *Science 281*, 1857-1859.

Ciechanover, A. (1994). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell 79*, 13-21.

Clark, J., Rocques, P.J., Crew, A.J., Gill, S., Shipley, J., Chan, A.M., Gusterson, B.A., and Cooper, C.S. (1994). Identification of novel genes, SYT and SSX, involved in the t(X;18)(p11.2;q11.2) translocation found in human synovial sarcoma. *Nat. Genet. 7*, 502-508.

Clontech (1998). Living colors destabilized EGFP vectors. *CLONTECHniques XIII 2*, 16-17.

Cocea, L. (1997). Search the Human cDNA Database at TIGR. *Comput. Appl. Biosci. 13*, 201-204.

Cockman, M.E., Masson, N., Mole, D.R., Jaakkola, P., Chang, G.W., Clifford, S.C., Maher, E.R., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., and Maxwell, P.H. (2000). Hypoxia inducible factor- α binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J. Biol. Chem. 275*, 25733-25741.

Collins, C., Rommens, J.M., Kowbel, D., Godfrey, T., Tanner, M., Hwang, S.I., Polikoff, D., Nonet, G., Cochran, J., Myambo, K., Jay, K.E., Froula, J., Cloutier, T., Kuo, W.L., Yaswen, P., Dairkee, S., Giovanola, J., Hutchinson, G.B., Isola, J., Kallioniemi, O.P., Palazzolo, M., Martin, C., Ericsson, C., Pinkel, D., Gray, J.W., and . (1998). Positional cloning of ZNF217 and NABC1: genes amplified at 20q13.2 and overexpressed in breast carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 95*, 8703-8708.

Coltrera, M.D., Wang, J., Porter, P.L., and Gown, A.M. (1995). Expression of platelet-derived growth factor B-chain and the platelet-derived growth factor receptor beta subunit in human breast tissue and breast carcinoma. *Cancer Res. 55*, 2703-2708.

Crew, A.J., Clark, J., Fisher, C., Gill, S., Grimer, R., Chand, A., Shipley, J., Gusterson, B.A., and Cooper, C.S. (1995). Fusion of SYT to two genes, SSX1 and SSX2, encoding proteins with homology to the Kruppel-associated box in human synovial sarcoma. *EMBO J. 14*, 2333-2340.

Crossman, L.C. and O'Brien, S. (2004). Clinical results with imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Leuk. Res. 28 Suppl 1*, S3-S9.

Dang,C.X., Han,Y., Qin,Z.Y., and Wang,Y.J. (2002). Clinical significance of expression of p21 and p53 proteins and proliferating cell nuclear antigen in pancreatic cancer. *Hepatobiliary. Pancreat. Dis. Int.* 1, 302-305.

de Bruijn,D.R., Baats,E., Zechner,U., de Leeuw,B., Balemans,M., Olde,W.D., Hirning-Folz,U., and Geurts van Kessel,A.G. (1996). Isolation and characterization of the mouse homolog of SYT, a gene implicated in the development of human synovial sarcomas. *Oncogene* 13, 643-648.

De Plaen,E., Lurquin,C., Lethe,B., van der,B.P., Brichard,V., Renauld,J.C., Coulie,P., Van Pel,A., and Boon,T. (1997). Identification of genes coding for tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes. *Methods* 12, 125-142.

De Smet,C., De Backer,O., Faraoni,I., Lurquin,C., Brasseur,F., and Boon,T. (1996). The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 7149-7153.

De Smet,C., Lurquin,C., Lethe,B., Martelange,V., and Boon,T. (1999a). DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter. *Mol. Cell Biol.* 19, 7327-7335.

De Smet,C., Lurquin,C., Lethe,B., Martelange,V., and Boon,T. (1999b). DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter. *Mol. Cell Biol.* 19, 7327-7335.

De Smet,C., Lurquin,C., Lethe,B., Martelange,V., and Boon,T. (1999c). DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter. *Mol. Cell Biol.* 19, 7327-7335.

de Vos,S., Hofmann,W.K., Grogan,T.M., Krug,U., Schrage,M., Miller,T.P., Braun,J.G., Wachsman,W., Koeffler,H.P., and Said,J.W. (2003). Gene expression profile of serial samples of transformed B-cell lymphomas. *Lab Invest* 83, 271-285.

Disis,M.L. and Cheever,M.A. (1996). Oncogenic proteins as tumor antigens. *Curr. Opin. Immunol.* 8, 637-642.

Dobashi,Y., Noguchi,T., Nasuno,S., Katayama,K., and Kameya,T. (2001). CDK-inhibitors-associated kinase activity: a possible determinant of malignant potential in smooth muscle tumors of the external soft tissue. *Int. J. Cancer* 94, 353-362.

dos Santos,N.R., de Bruijn,D.R., and van Kessel,A.G. (2001). Molecular mechanisms underlying human synovial sarcoma development. *Genes Chromosomes. Cancer* 30, 1-14.

Druker,B.J., Talpaz,M., Resta,D.J., Peng,B., Buchdunger,E., Ford,J.M., Lydon,N.B., Kantarjian,H., Capdeville,R., Ohno-Jones,S., and Sawyers,C.L. (2001). Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 344, 1031-1037.

Eberwine,J. (1996). Amplification of mRNA populations using aRNA generated from immobilized oligo(dT)-T7 primed cDNA. *Biotechniques* 20, 584-591.

Eden,S. and Cedar,H. (1994). Role of DNA methylation in the regulation of transcription. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4, 255-259.

- Eid, J.E., Kung, A.L., Scully, R., and Livingston, D.M. (2000). p300 interacts with the nuclear proto-oncoprotein SYT as part of the active control of cell adhesion. *Cell* 102, 839-848.
- Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O., and Botstein, D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 14863-14868.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.
- Engellau, J., Akerman, M., Anderson, H., Domanski, H.A., Rambech, E., Alvegard, T.A., and Nilbert, M. (2001). Tissue microarray technique in soft tissue sarcoma: immunohistochemical Ki-67 expression in malignant fibrous histiocytoma. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 9, 358-363.
- Enger, M.D., Hildebrand, C.E., and Stewart, C.C. (1983). Cd2+ responses of cultured human blood cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 69, 214-224.
- Fan, Z., Shang, B.Y., Lu, Y., Chou, J.L., and Mendelsohn, J. (1997). Reciprocal changes in p27(Kip1) and p21(Cip1) in growth inhibition mediated by blockade or overstimulation of epidermal growth factor receptors. *Clin. Cancer Res.* 3, 1943-1948.
- Fedorcsak, I. and Ehrenberg, L. (1966). Effects of diethyl pyrocarbonate and methyl methanesulfonate on nucleic acids and nucleases. *Acta Chem. Scand.* 20, 107-112.
- Fields, S., Kohara, Y., and Lockhart, D.J. (1999). Functional genomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 8825-8826.
- Finn, R.S. and Slamon, D.J. (2003). Monoclonal antibody therapy for breast cancer: herceptin. *Cancer Chemother. Biol. Response Modif.* 21, 223-233.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- Frisch, S.M. (1997). The epithelial cell default-phenotype hypothesis and its implications for cancer. *Bioessays* 19, 705-709.
- Fujimoto, T., Onda, M., Nagai, H., Nagahata, T., Ogawa, K., and Emi, M. (2003). Upregulation and overexpression of human X-box binding protein 1 (hXBP-1) gene in primary breast cancers. *Breast Cancer* 10, 301-306.
- Gao, Y., Ferguson, D.O., Xie, W., Manis, J.P., Sekiguchi, J., Frank, K.M., Chaudhuri, J., Horner, J., DePinho, R.A., and Alt, F.W. (2000). Interplay of p53 and DNA-repair protein XRCC4 in tumorigenesis, genomic stability and development. *Nature* 404, 897-900.
- Gartler, S.M. and Goldman, M.A. (1994). Reactivation of inactive X-linked genes. *Dev. Genet.* 15, 504-514.
- Gebuhr, T.C., Bultman, S.J., and Magnuson, T. (2000). Pc-G/trx-G and the SWI/SNF connection: developmental gene regulation through chromatin remodeling. *Genesis* 26, 189-197.

Gleadle, J.M. and Ratcliffe, P.J. (1997). Induction of hypoxia-inducible factor-1, erythropoietin, vascular endothelial growth factor, and glucose transporter-1 by hypoxia: evidence against a regulatory role for Src kinase. *Blood* 89, 503-509.

Gnjatic, S., Jager, E., Chen, W., Altorki, N.K., Matsuo, M., Lee, S.Y., Chen, Q., Nagata, Y., Atanackovic, D., Chen, Y.T., Ritter, G., Cebon, J., Knuth, A., and Old, L.J. (2002). CD8(+) T cell responses against a dominant cryptic HLA-A2 epitope after NY-ESO-1 peptide immunization of cancer patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 11813-11818.

Gold, D.P., Clevers, H., Alarcon, B., Dunlap, S., Novotny, J., Williams, A.F., and Terhorst, C. (1987). Evolutionary relationship between the T3 chains of the T-cell receptor complex and the immunoglobulin supergene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84, 7649-7653.

Golub, T.R., Slonim, D.K., Tamayo, P., Huard, C., Gaasenbeek, M., Mesirov, J.P., Coller, H., Loh, M.L., Downing, J.R., Caligiuri, M.A., Bloomfield, C.D., and Lander, E.S. (1999). Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 286, 531-537.

Gondos, B. and Hobel, C.J. (1971). Ultrastructure of germ cell development in the human fetal testis. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 119, 1-20.

Gondos, B., Westergaard, L., and Byskov, A.G. (1986). Initiation of oogenesis in the human fetal ovary: ultrastructural and squash preparation study. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 155, 189-195.

Goto, T., Adjaye, J., Rodeck, C.H., and Monk, M. (1999). Identification of genes expressed in human primordial germ cells at the time of entry of the female germ line into meiosis. *Mol. Hum. Reprod.* 5, 851-860.

Green, K.J., Parry, D.A., Steinert, P.M., Virata, M.L., Wagner, R.M., Angst, B.D., and Nilles, L.A. (1990). Structure of the human desmoplakins. Implications for function in the desmosomal plaque. *J. Biol. Chem.* 265, 11406-11407.

Green, P.J., Pines, O., and Inouye, M. (1986). The role of antisense RNA in gene regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 569-597.

Grewal, I.S. and Flavell, R.A. (1996). A central role of CD40 ligand in the regulation of CD4+ T-cell responses. *Immunol. Today* 17, 410-414.

Gritsko, T.M., Coppola, D., Paciga, J.E., Yang, L., Sun, M., Shelley, S.A., Fiorica, J.V., Nicosia, S.V., and Cheng, J.Q. (2003). Activation and overexpression of centrosome kinase BTAk/Aurora-A in human ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* 9, 1420-1426.

Gure, A.O., Stockert, E., Arden, K.C., Boyer, A.D., Viars, C.S., Scanlan, M.J., Old, L.J., and Chen, Y.T. (2000). CT10: a new cancer-testis (CT) antigen homologous to CT7 and the MAGE family, identified by representational-difference analysis. *Int. J. Cancer* 85, 726-732.

Gure, A.O., Tureci, O., Sahin, U., Tsang, S., Scanlan, M.J., Jager, E., Knuth, A., Pfreundschuh, M., Old, L.J., and Chen, Y.T. (1997). SSX: a multigene family with several members transcribed in normal testis and human cancer. *Int. J. Cancer* 72, 965-971.

- Hagemeyer, A. (1987). Chromosome abnormalities in CML. *Baillieres Clin. Haematol.* 1, 963-981.
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G.J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293-296.
- Heiser, A., Maurice, M.A., Yancey, D.R., Wu, N.Z., Dahm, P., Pruitt, S.K., Boczkowski, D., Nair, S.K., Ballo, M.S., Gilboa, E., and Vieweg, J. (2001). Induction of polyclonal prostate cancer-specific CTL using dendritic cells transfected with amplified tumor RNA. *J. Immunol.* 166, 2953-2960.
- Helbling, P.M., Tran, C.T., and Brandli, A.W. (1998). Requirement for EphA receptor signaling in the segregation of *Xenopus* third and fourth arch neural crest cells. *Mech. Dev.* 78, 63-79.
- Hinds, P.W., Dowdy, S.F., Eaton, E.N., Arnold, A., and Weinberg, R.A. (1994). Function of a human cyclin gene as an oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 709-713.
- Hirsch, F.R. and Langer, C.J. (2004). The role of HER2/neu expression and trastuzumab in non-small cell lung cancer. *Semin. Oncol.* 31, 75-82.
- Honda, T., Tamura, G., Waki, T., Kawata, S., Nishizuka, S., and Motoyama, T. (2004). Promoter hypermethylation of the *Chfr* gene in neoplastic and non-neoplastic gastric epithelia. *Br. J. Cancer* 90, 2013-2016.
- Hubank, M. and Schatz, D.G. (1994). Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res.* 22, 5640-5648.
- Hurst, L.D. and Randerson, J.P. (1999). An eXceptional chromosome. *Trends Genet.* 15, 383-385.
- Ikeda, H., Lethe, B., Lehmann, F., van Baren, N., Baurain, J.F., De Smet, C., Chambost, H., Vitale, M., Moretta, A., Boon, T., and Coulie, P.G. (1997). Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity.* 6, 199-208.
- Inagaki, H., Nagasaka, T., Otsuka, T., Sugiura, E., Nakashima, N., and Eimoto, T. (2000). Association of SYT-SSX fusion types with proliferative activity and prognosis in synovial sarcoma. *Mod. Pathol.* 13, 482-488.
- Inoue, N., Hess, K.D., Moreadith, R.W., Richardson, L.L., Handel, M.A., Watson, M.L., and Zinn, A.R. (1999). New gene family defined by MORC, a nuclear protein required for mouse spermatogenesis. *Hum. Mol. Genet.* 8, 1201-1207.
- Ishikawa, J., Maeda, S., Umezaki, K., Sugiyama, T., and Kamidono, S. (1990). Amplification and overexpression of the epidermal growth factor receptor gene in human renal-cell carcinoma. *Int. J. Cancer* 45, 1018-1021.
- Itakura, Y., Sasano, H., Shiga, C., Furukawa, Y., Shiga, K., Mori, S., and Nagura, H. (1994). Epidermal growth factor receptor overexpression in esophageal carcinoma. An immunohistochemical study correlated with clinicopathologic findings and DNA amplification. *Cancer* 74, 795-804.

Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M., Lane, W.S., and Kaelin, W.G., Jr. (2001). HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 292, 464-468.

Izant, J.G. and Weintraub, H. (1985). Constitutive and conditional suppression of exogenous and endogenous genes by anti-sense RNA. *Science* 229, 345-352.

Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., Kriegsheim, A., Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., and Ratcliffe, P.J. (2001). Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292, 468-472.

Jackman, J.K., Motto, D.G., Sun, Q., Tanemoto, M., Turck, C.W., Peltz, G.A., Koretzky, G.A., and Findell, P.R. (1995). Molecular cloning of SLP-76, a 76-kDa tyrosine phosphoprotein associated with Grb2 in T cells. *J. Biol. Chem.* 270, 7029-7032.

Jager, D., Stockert, E., Jager, E., Gure, A.O., Scanlan, M.J., Knuth, A., Old, L.J., and Chen, Y.T. (2000a). Serological cloning of a melanocyte rab guanosine 5'-triphosphate-binding protein and a chromosome condensation protein from a melanoma complementary DNA library. *Cancer Res.* 60, 3584-3591.

Jager, E., Jager, D., Karbach, J., Chen, Y.T., Ritter, G., Nagata, Y., Gnjatich, S., Stockert, E., Arand, M., Old, L.J., and Knuth, A. (2000b). Identification of NY-ESO-1 epitopes presented by human histocompatibility antigen (HLA)-DRB4*0101-0103 and recognized by CD4(+) T lymphocytes of patients with NY-ESO-1-expressing melanoma. *J. Exp. Med.* 191, 625-630.

Jager, E., Nagata, Y., Gnjatich, S., Wada, H., Stockert, E., Karbach, J., Dunbar, P.R., Lee, S.Y., Jungbluth, A., Jager, D., Arand, M., Ritter, G., Cerundolo, V., Dupont, B., Chen, Y.T., Old, L.J., and Knuth, A. (2000c). Monitoring CD8 T cell responses to NY-ESO-1: correlation of humoral and cellular immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 4760-4765.

Jethanandani, P. and Goldberg, E. (2001). Idhc expression in non-germ cell nuclei is repressed by NF- κ B binding. *J. Biol. Chem.* 276, 35414-35421.

Johnson, M.R., Valentine, C., Basilico, C., and Mansukhani, A. (1998). FGF signaling activates STAT1 and p21 and inhibits the estrogen response and proliferation of MCF-7 cells. *Oncogene* 16, 2647-2656.

Jones, P.A. (1986). DNA methylation and cancer. *Cancer Res.* 46, 461-466.

Jungbluth, A.A., Busam, K.J., Kolb, D., Iversen, K., Coplan, K., Chen, Y.T., Spagnoli, G.C., and Old, L.J. (2000). Expression of MAGE-antigens in normal tissues and cancer. *Int. J. Cancer* 85, 460-465.

Kaneko, K.J. and DePamphilis, M.L. (2000). Soggy, a spermatocyte-specific gene, lies 3.8 kb upstream of and antipodal to TEAD-2, a transcription factor expressed at the beginning of mouse development. *Nucleic Acids Res.* 28, 3982-3990.

Kato, H., Tjernberg, A., Zhang, W., Krutchinsky, A.N., An, W., Takeuchi, T., Ohtsuki, Y., Sugano, S., de Bruijn, D.R., Chait, B.T., and Roeder, R.G. (2002). SYT associates with

human SNF/SWI complexes and the C-terminal region of its fusion partner SSX1 targets histones. *J. Biol. Chem.* 277, 5498-5505.

Kawai,A., Woodruff,J., Healey,J.H., Brennan,M.F., Antonescu,C.R., and Ladanyi,M. (1998). SYT-SSX gene fusion as a determinant of morphology and prognosis in synovial sarcoma. *N. Engl. J. Med.* 338, 153-160.

Kettunen,E., Anttila,S., Seppanen,J.K., Karjalainen,A., Edgren,H., Lindstrom,I., Salovaara,R., Nissen,A.M., Salo,J., Mattson,K., Hollmen,J., Knuutila,S., and Wikman,H. (2004). Differentially expressed genes in nonsmall cell lung cancer: expression profiling of cancer-related genes in squamous cell lung cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.* 149, 98-106.

Kinosita,K., Jr. and Tsong,T.Y. (1977). Formation and resealing of pores of controlled sizes in human erythrocyte membrane. *Nature* 268, 438-441.

Kivinen,L. and Laiho,M. (1999). Ras- and mitogen-activated protein kinase kinase-dependent and -independent pathways in p21Cip1/Waf1 induction by fibroblast growth factor-2, platelet-derived growth factor, and transforming growth factor-beta1. *Cell Growth Differ.* 10, 621-628.

Kozak,M. (1996). Interpreting cDNA sequences: some insights from studies on translation. *Mamm. Genome* 7, 563-574.

Krizman,D.B., Wagner,L., Lash,A., Strausberg,R.L., and Emmert-Buck,M.R. (1999). The Cancer Genome Anatomy Project: EST sequencing and the genetics of cancer progression. *Neoplasia.* 1, 101-106.

Krupnik,V.E., Sharp,J.D., Jiang,C., Robison,K., Chickering,T.W., Amaravadi,L., Brown,D.E., Guyot,D., Mays,G., Leiby,K., Chang,B., Duong,T., Goodearl,A.D., Gearing,D.P., Sokol,S.Y., and McCarthy,S.A. (1999). Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family. *Gene* 238, 301-313.

Kumabe,T., Sohma,Y., Kayama,T., Yoshimoto,T., and Yamamoto,T. (1992). Amplification of alpha-platelet-derived growth factor receptor gene lacking an exon coding for a portion of the extracellular region in a primary brain tumor of glial origin. *Oncogene* 7, 627-633.

Kwok,S. and Higuchi,R. (1989). Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339, 237-238.

Lethe,B., Lucas,S., Michaux,L., De Smet,C., Godelaine,D., Serrano,A., De Plaen,E., and Boon,T. (1998). LAGE-1, a new gene with tumor specificity. *Int. J. Cancer* 76, 903-908.

Levy,A.P., Levy,N.S., Wegner,S., and Goldberg,M.A. (1995). Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J. Biol. Chem.* 270, 13333-13340.

Li,D., Zhu,J., Firozi,P.F., Abbruzzese,J.L., Evans,D.B., Cleary,K., Friess,H., and Sen,S. (2003). Overexpression of oncogenic STK15/BTAK/Aurora A kinase in human pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* 9, 991-997.

Lim,F.L., Soulez,M., Koczan,D., Thiesen,H.J., and Knight,J.C. (1998). A KRAB-related domain and a novel transcription repression domain in proteins encoded by SSX genes that are disrupted in human sarcomas. *Oncogene* 17, 2013-2018.

Lisitsyn,N., Lisitsyn,N., and Wigler,M. (1993). Cloning the differences between two complex genomes. *Science* 259, 946-951.

Liu,J.H., Wei,S., Burnette,P.K., Gamero,A.M., Hutton,M., and Djeu,J.Y. (1999). Functional association of TGF-beta receptor II with cyclin B. *Oncogene* 18, 269-275.

Lovec,H., Grzeschiczek,A., Kowalski,M.B., and Moroy,T. (1994a). Cyclin D1/bcl-1 cooperates with myc genes in the generation of B-cell lymphoma in transgenic mice. *EMBO J.* 13, 3487-3495.

Lovec,H., Sewing,A., Lucibello,F.C., Muller,R., and Moroy,T. (1994b). Oncogenic activity of cyclin D1 revealed through cooperation with Ha-ras: link between cell cycle control and malignant transformation. *Oncogene* 9, 323-326.

Lucas,S., De Smet,C., Arden,K.C., Viars,C.S., Lethe,B., Lurquin,C., and Boon,T. (1998). Identification of a new MAGE gene with tumor-specific expression by representational difference analysis. *Cancer Res.* 58, 743-752.

MacLean,H.E., Guo,J., Knight,M.C., Zhang,P., Cobrinik,D., and Kronenberg,H.M. (2004). The cyclin-dependent kinase inhibitor p57(Kip2) mediates proliferative actions of PTHrP in chondrocytes. *J. Clin. Invest* 113, 1334-1343.

Mandruzzato,S., Brasseur,F., Andry,G., Boon,T., and van der,B.P. (1997). A CASP-8 mutation recognized by cytolytic T lymphocytes on a human head and neck carcinoma. *J. Exp. Med.* 186, 785-793.

Marchand,M., van Baren,N., Weynants,P., Brichard,V., Dreno,B., Tessier,M.H., Rankin,E., Parmiani,G., Arienti,F., Humblet,Y., Bourlond,A., Vanwijck,R., Lienard,D., Beauclin,M., Dietrich,P.Y., Russo,V., Kerger,J., Masucci,G., Jager,E., De Greve,J., Atzpodien,J., Brasseur,F., Coulie,P.G., van der,B.P., and Boon,T. (1999). Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int. J. Cancer* 80, 219-230.

Margolin,J.F., Friedman,J.R., Meyer,W.K., Vissing,H., Thiesen,H.J., and Rauscher,F.J., III (1994). Kruppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 4509-4513.

Markert,C.L., Amet,T.M., and Goldberg,E. (1998). Human testis-specific lactate dehydrogenase-C promoter drives overexpression of mouse lactate dehydrogenase-1 cDNA in testes of transgenic mice. *J. Exp. Zool.* 282, 171-178.

Masuda,H., Fukabori,Y., Nakano,K., Takezawa,Y., CSuzuki,T., and Yamanaka,H. (2003). Increased expression of bone morphogenetic protein-7 in bone metastatic prostate cancer. *Prostate* 54, 268-274.

Maxwell,P.H., Pugh,C.W., and Ratcliffe,P.J. (2001). Activation of the HIF pathway in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11, 293-299.

McDoniels-Silvers,A.L., Nimri,C.F., Stoner,G.D., Lubet,R.A., and You,M. (2002). Differential gene expression in human lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 8, 1127-1138.

McLaughlin,E.A., Frayne,J., Bloomerg,G., and Hall,L. (2001). Do fertilin beta and cyritestin play a major role in mammalian sperm--oolemma interactions? A critical re-evaluation of the use of peptide mimics in identifying specific oocyte recognition proteins. *Mol. Hum. Reprod.* 7, 313-317.

Meehan,R., Lewis,J., Cross,S., Nan,X., Jeppesen,P., and Bird,A. (1992). Transcriptional repression by methylation of CpG. *J. Cell Sci. Suppl* 16, 9-14.

Melief,C.J., Offringa,R., Toes,R.E., and Kast,W.M. (1996). Peptide-based cancer vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* 8, 651-657.

Meuwissen,R.L., Meerts,I., Hoovers,J.M., Leschot,N.J., and Heyting,C. (1997). Human synaptonemal complex protein 1 (SCP1): isolation and characterization of the cDNA and chromosomal localization of the gene. *Genomics* 39, 377-384.

Meuwissen,R.L., Offenbergh,H.H., Dietrich,A.J., Riesewijk,A., van Iersel,M., and Heyting,C. (1992). A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *EMBO J.* 11, 5091-5100.

Miki,T., Smith,C.L., Long,J.E., Eva,A., and Fleming,T.P. (1993). Oncogene ect2 is related to regulators of small GTP-binding proteins. *Nature* 362, 462-465.

Miles,D.W. (2001). Update on HER-2 as a target for cancer therapy: herceptin in the clinical setting. *Breast Cancer Res.* 3, 380-384.

Mintz,A. and Debinski,W. (2000). Cancer genetics/epigenetics and the X chromosome: possible new links for malignant glioma pathogenesis and immune-based therapies. *Crit Rev. Oncog.* 11, 77-95.

Miyoshi,Y., Iwao,K., Egawa,C., and Noguchi,S. (2001). Association of centrosomal kinase STK15/BTAK mRNA expression with chromosomal instability in human breast cancers. *Int. J. Cancer* 92, 370-373.

Montgomery,M.K., Xu,S., and Fire,A. (1998). RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 15502-15507.

Morgan,D.O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature* 374, 131-134.

Motta,P.M. and Makabe,S. (1986). Elimination of germ cells during differentiation of the human ovary: an electron microscopic study. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 22, 271-286.

Mullis,K., Faloona,F., Scharf,S., Saiki,R., Horn,G., and Erlich,H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt 1, 263-273.

Nagai,M., Tanaka,S., Tsuda,M., Endo,S., Kato,H., Sonobe,H., Minami,A., Hiraga,H., Nishihara,H., Sawa,H., and Nagashima,K. (2001). Analysis of transforming activity of

human synovial sarcoma-associated chimeric protein SYT-SSX1 bound to chromatin remodeling factor hBRM/hSNF2 alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 3843-3848.

Nagayama,S., Katagiri,T., Tsunoda,T., Hosaka,T., Nakashima,Y., Araki,N., Kusuzaki,K., Nakayama,T., Tsuboyama,T., Nakamura,T., Imamura,M., Nakamura,Y., and Toguchida,J. (2002). Genome-wide analysis of gene expression in synovial sarcomas using a cDNA microarray. *Cancer Res.* **62**, 5859-5866.

Nair,S.K., Boczkowski,D., Morse,M., Cumming,R.I., Lyerly,H.K., and Gilboa,E. (1998). Induction of primary carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T lymphocytes in vitro using human dendritic cells transfected with RNA. *Nat. Biotechnol.* **16**, 364-369.

Neumann,E., Engelsberg,A., Decker,J., Storkel,S., Jaeger,E., Huber,C., and Seliger,B. (1998). 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.* **58**, 4090-4095.

Neumann,E., Kakorin,S., and Toensing,K. (1999). Fundamentals of electroporative delivery of drugs and genes. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **48**, 3-16.

Nielsen,T.O., West,R.B., Linn,S.C., Alter,O., Knowling,M.A., O'Connell,J.X., Zhu,S., Fero,M., Sherlock,G., Pollack,J.R., Brown,P.O., Botstein,D., and van de,R.M. (2002). Molecular characterisation of soft tissue tumours: a gene expression study. *Lancet* **359**, 1301-1307.

Nilsson,G., Skytting,B., Xie,Y., Brodin,B., Perfekt,R., Mandahl,N., Lundeberg,J., Uhlen,M., and Larsson,O. (1999). The SYT-SSX1 variant of synovial sarcoma is associated with a high rate of tumor cell proliferation and poor clinical outcome. *Cancer Res.* **59**, 3180-3184.

Nishio,J., Iwasaki,H., Ishiguro,M., Ohjimi,Y., Isayama,T., Naito,M., and Kikuchi,M. (2001). Identification of syt-ssx fusion transcripts in both epithelial and spindle cell components of biphasic synovial sarcoma in small tissue samples isolated by membrane-based laser microdissection. *Virchows Arch.* **439**, 152-157.

Noelle,R.J., Ledbetter,J.A., and Aruffo,A. (1992a). CD40 and its ligand, an essential ligand-receptor pair for thymus-dependent B-cell activation. *Immunol. Today* **13**, 431-433.

Noelle,R.J., Roy,M., Shepherd,D.M., Stamenkovic,I., Ledbetter,J.A., and Aruffo,A. (1992b). A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 6550-6554.

O'Bryan,M.K., Sebire,K., Meinhardt,A., Edgar,K., Keah,H.H., Hearn,M.T., and De Kretser,D.M. (2001a). Tpx-1 is a component of the outer dense fibers and acrosome of rat spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* **58**, 116-125.

O'Bryan,M.K., Sebire,K., Meinhardt,A., Edgar,K., Keah,H.H., Hearn,M.T., and De Kretser,D.M. (2001b). Tpx-1 is a component of the outer dense fibers and acrosome of rat spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* **58**, 116-125.

Ohta,T., Okamoto,K., Isohashi,F., Shibata,K., Fukuda,M., Yamaguchi,S., and Xiong,Y. (1998). T-loop deletion of CDC2 from breast cancer tissues eliminates binding to cyclin B1 and cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Cancer Res.* **58**, 1095-1098.

Okamoto,Y., Ozaki,T., Miyazaki,K., Aoyama,M., Miyazaki,M., and Nakagawara,A. (2003). UbcH10 is the cancer-related E2 ubiquitin-conjugating enzyme. *Cancer Res.* 63, 4167-4173.

Old,L.J. (2001). Cancer/testis (CT) antigens - a new link between gametogenesis and cancer. *Cancer Immun.* 1, 1.

Old,L.J. and Chen,Y.T. (1998). New paths in human cancer serology. *J. Exp. Med.* 187, 1163-1167.

Olesen,C., Hansen,C., Bendtsen,E., Byskov,A.G., Schwinger,E., Lopez-Pajares,I., Jensen,P.K., Kristoffersson,U., Schubert,R., Van Assche,E., Wahlstroem,J., Lespinasse,J., and Tommerup,N. (2001). Identification of human candidate genes for male infertility by digital differential display. *Mol. Hum. Reprod.* 7, 11-20.

Pellat-Deceunynck,C., Mellerin,M.P., Labarriere,N., Jegou,G., Moreau-Aubry,A., Harousseau,J.L., Jotereau,F., and Bataille,R. (2000). The cancer germ-line genes *MAGE-1*, *MAGE-3* and *PRAME* are commonly expressed by human myeloma cells. *Eur. J. Immunol.* 30, 803-809.

Persengiev,S.P., Zhu,X., and Green,M.R. (2004). Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *RNA.* 10, 12-18.

Pomeroy,S.L., Tamayo,P., Gaasenbeek,M., Sturla,L.M., Angelo,M., McLaughlin,M.E., Kim,J.Y., Goumnerova,L.C., Black,P.M., Lau,C., Allen,J.C., Zagzag,D., Olson,J.M., Curran,T., Wetmore,C., Biegel,J.A., Poggio,T., Mukherjee,S., Rifkin,R., Califano,A., Stolovitzky,G., Louis,D.N., Mesirov,J.P., Lander,E.S., and Golub,T.R. (2002). Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression. *Nature* 415, 436-442.

Ratcliffe,P.J., O'Rourke,J.F., Maxwell,P.H., and Pugh,C.W. (1998). Oxygen sensing, hypoxia-inducible factor-1 and the regulation of mammalian gene expression. *J. Exp. Biol.* 201 (Pt 8), 1153-1162.

Reyes,J.C., Barra,J., Muchardt,C., Camus,A., Babinet,C., and Yaniv,M. (1998). Altered control of cellular proliferation in the absence of mammalian brahma (*SNF2alpha*). *EMBO J.* 17, 6979-6991.

Reynisdottir,I., Polyak,K., Iavarone,A., and Massague,J. (1995). Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev.* 9, 1831-1845.

Rhee,I., Bachman,K.E., Park,B.H., Jair,K.W., Yen,R.W., Schuebel,K.E., Cui,H., Feinberg,A.P., Lengauer,C., Kinzler,K.W., Baylin,S.B., and Vogelstein,B. (2002). DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* 416, 552-556.

Rhee,I., Jair,K.W., Yen,R.W., Lengauer,C., Herman,J.G., Kinzler,K.W., Vogelstein,B., Baylin,S.B., and Schuebel,K.E. (2000). CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1. *Nature* 404, 1003-1007.

- Robbins,P.F., El Gamil,M., Li,Y.F., Kawakami,Y., Loftus,D., Appella,E., and Rosenberg,S.A. (1996). A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.* *183*, 1185-1192.
- Robertson,K.W., Reeves,J.R., Smith,G., Keith,W.N., Ozanne,B.W., Cooke,T.G., and Stanton,P.D. (1996). Quantitative estimation of epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 in human breast cancer. *Cancer Res.* *56*, 3823-3830.
- Robles,A.I., Rodriguez-Puebla,M.L., Glick,A.B., Trempus,C., Hansen,L., Sicinski,P., Tennant,R.W., Weinberg,R.A., Yuspa,S.H., and Conti,C.J. (1998). Reduced skin tumor development in cyclin D1-deficient mice highlights the oncogenic ras pathway in vivo. *Genes Dev.* *12*, 2469-2474.
- Roig,I., Liebe,B., Egozcue,J., Cabero,L., Garcia,M., and Scherthan,H. (2004). Female-specific features of recombinational double-stranded DNA repair in relation to synapsis and telomere dynamics in human oocytes. *Chromosoma* *113*, 22-33.
- Romanienko,P.J. and Camerini-Otero,R.D. (1999). Cloning, characterization, and localization of mouse and human SPO11. *Genomics* *61*, 156-169.
- Rosenberg,S.A. (1997). Cancer vaccines based on the identification of genes encoding cancer regression antigens. *Immunol. Today* *18*, 175-182.
- Rosenberg,S.A. (1999). A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity* *10*, 281-287.
- Rosenwald,I.B., Chen,J.J., Wang,S., Savas,L., London,I.M., and Pullman,J. (1999). Upregulation of protein synthesis initiation factor eIF-4E is an early event during colon carcinogenesis. *Oncogene* *18*, 2507-2517.
- Roth,D.B. and Gellert,M. (2000). New guardians of the genome. *Nature* *404*, 823-825.
- Rubinfeld,B., Robbins,P., El Gamil,M., Albert,I., Porfiri,E., and Polakis,P. (1997). Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* *275*, 1790-1792.
- Rule,A.H. and Kirch,M.E. (1976). Gene activation of molecules with carcinoembryonic antigen determinants in fetal development and in adenocarcinoma of the colon. *Cancer Res.* *36*, 3503-3509.
- Saeboe-Larssen,S., Fossberg,E., and Gaudernack,G. (2002). mRNA-based electrotransfection of human dendritic cells and induction of cytotoxic T lymphocyte responses against the telomerase catalytic subunit (hTERT). *J. Immunol. Methods* *259*, 191-203.
- Sahin,U., Tureci,O., and Pfreundschuh,M. (1997). Serological identification of human tumor antigens. *Curr. Opin. Immunol.* *9*, 709-716.
- Sahin,U., Tureci,O., Schmitt,H., Cochlovius,B., Johannes,T., Schmits,R., Stenner,F., Luo,G., Schobert,I., and Pfreundschuh,M. (1995). Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *92*, 11810-11813.

Saiki,R.K., Gelfand,D.H., Stoffel,S., Scharf,S.J., Higuchi,R., Horn,G.T., Mullis,K.B., and Erlich,H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.

Sarafan-Vasseur,N., Lamy,A., Bourguignon,J., Pessot,F.L., Hieter,P., Sesboue,R., Bastard,C., Frebourg,T., and Flaman,J.M. (2002). Overexpression of B-type cyclins alters chromosomal segregation. *Oncogene* 21, 2051-2057.

Sarcevic,B., Spagnoli,G.C., Terracciano,L., Schultz-Thater,E., Heberer,M., Gamulin,M., Krajina,Z., Oresic,T., Separovic,R., and Juretic,A. (2003). Expression of cancer/testis tumor associated antigens in cervical squamous cell carcinoma. *Oncology* 64, 443-449.

Sassone-Corsi,P. (2002). Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. *Science* 296, 2176-2178.

Scanlan,M.J., Altorki,N.K., Gure,A.O., Williamson,B., Jungbluth,A., Chen,Y.T., and Old,L.J. (2000). Expression of cancer-testis antigens in lung cancer: definition of bromodomain testis-specific gene (BRDT) as a new CT gene, CT9. *Cancer Lett.* 150, 155-164.

Scanlan,M.J., Chen,Y.T., Williamson,B., Gure,A.O., Stockert,E., Gordan,J.D., Tureci,O., Sahin,U., Pfreundschuh,M., and Old,L.J. (1998). Characterization of human colon cancer antigens recognized by autologous antibodies. *Int. J. Cancer* 76, 652-658.

Scanlan,M.J., Gure,A.O., Jungbluth,A.A., Old,L.J., and Chen,Y.T. (2002). Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol. Rev.* 188, 22-32.

Scanlan,M.J., Simpson,A.J., and Old,L.J. (2004). The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immun.* 4, 1.

Schena,M., Heller,R.A., Thieriault,T.P., Konrad,K., Lachenmeier,E., and Davis,R.W. (1998). Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. *Trends Biotechnol.* 16, 301-306.

Scheurle,D., DeYoung,M.P., Binniger,D.M., Page,H., Jahanzeb,M., and Narayanan,R. (2000). Cancer gene discovery using digital differential display. *Cancer Res.* 60, 4037-4043.

Scopa,C.D., Tsamandas,A.C., Zolota,V., Kalofonos,H.P., Batistatou,A., and Vagianos,C. (2003). Potential role of bcl-2 and ki-67 expression and apoptosis in colorectal carcinoma: a clinicopathologic study. *Dig. Dis. Sci.* 48, 1990-1997.

Semenza,G.L. (1999). Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 551-578.

Semenza,G.L. (2000a). HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev.* 14, 1983-1991.

Semenza,G.L. (2000b). HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J. Appl. Physiol* 88, 1474-1480.

Semenza,G.L., Jiang,B.H., Leung,S.W., Passantino,R., Concordet,J.P., Maire,P., and Giallongo,A. (1996). Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and

lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* *271*, 32529-32537.

Sen,G.C. (2001). Viruses and interferons. *Annu. Rev. Microbiol.* *55*, 255-281.

Shaaban,A.M., Sloane,J.P., West,C.R., and Foster,C.S. (2002). Breast cancer risk in usual ductal hyperplasia is defined by estrogen receptor-alpha and Ki-67 expression. *Am. J. Pathol.* *160*, 597-604.

Sherr,C.J. (1996). Cancer cell cycles. *Science* *274*, 1672-1677.

Shih,C., Shilo,B.Z., Goldfarb,M.P., Dannenberg,A., and Weinberg,R.A. (1979). Passage of phenotypes of chemically transformed cells via transfection of DNA and chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *76*, 5714-5718.

Skytting,B., Nilsson,G., Brodin,B., Xie,Y., Lundeberg,J., Uhlen,M., and Larsson,O. (1999). A novel fusion gene, SYT-SSX4, in synovial sarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.* *91*, 974-975.

Sledz,C.A., Holko,M., de Veer,M.J., Silverman,R.H., and Williams,B.R. (2003). Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat. Cell Biol.* *5*, 834-839.

Sreekantaiah,C., Ladanyi,M., Rodriguez,E., and Chaganti,R.S. (1994). Chromosomal aberrations in soft tissue tumors. Relevance to diagnosis, classification, and molecular mechanisms. *Am. J. Pathol.* *144*, 1121-1134.

Stehelin,D., Varmus,H.E., Bishop,J.M., and Vogt,P.K. (1976). DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* *260*, 170-173.

Suter,T.M., Cook-Bruns,N., and Barton,C. (2004). Cardiotoxicity associated with trastuzumab (Herceptin) therapy in the treatment of metastatic breast cancer. *Breast* *13*, 173-183.

Szala,S., Kasai,Y., Steplewski,Z., Rodeck,U., Koprowski,H., and Linnenbach,A.J. (1990). Molecular cloning of cDNA for the human tumor-associated antigen CO-029 and identification of related transmembrane antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *87*, 6833-6837.

Tatsumoto,T., Xie,X., Blumenthal,R., Okamoto,I., and Miki,T. (1999). Human ECT2 is an exchange factor for Rho GTPases, phosphorylated in G2/M phases, and involved in cytokinesis. *J. Cell Biol.* *147*, 921-928.

Thaete,C., Brett,D., Monaghan,P., Whitehouse,S., Rennie,G., Rayner,E., Cooper,C.S., and Goodwin,G. (1999). Functional domains of the SYT and SYT-SSX synovial sarcoma translocation proteins and co-localization with the SNF protein BRM in the nucleus. *Hum. Mol. Genet.* *8*, 585-591.

Thomas,R., Anderson,W.A., Raman,V., and Reddi,A.H. (1998). Androgen-dependent gene expression of bone morphogenetic protein 7 in mouse prostate. *Prostate* *37*, 236-245.

Turc-Carel,C., Dal Cin,P., Limon,J., Li,F., and Sandberg,A.A. (1986). Translocation X;18 in synovial sarcoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* *23*, 93.

- Tureci,O., Sahin,U., Koslowski,M., Buss,B., Bell,C., Ballweber,P., Zwick,C., Eberle,T., Zuber,M., Villena-Heinsen,C., Seitz,G., and Pfreundschuh,M. (2002). A novel tumour associated leucine zipper protein targeting to sites of gene transcription and splicing. *Oncogene* 21, 3879-3888.
- Tureci,O., Sahin,U., Li,G., and Pfreundschuh,M. (2001). Recognition of human tumors: SEREX expression cloning to identify tumor antigens. In *Cancer immunology (Immunology in medicine Series)*, R.C.Rees and A.Robins, eds.
- Tureci,O., Sahin,U., and Pfreundschuh,M. (1997). Serological analysis of human tumor antigens: molecular definition and implications. *Mol. Med. Today* 3, 342-349.
- Tureci,O., Sahin,U., Schobert,I., Koslowski,M., Scmitt,H., Schild,H.J., Stenner,F., Seitz,G., Rammensee,H.G., and Pfreundschuh,M. (1996). The SSX-2 gene, which is involved in the t(X;18) translocation of synovial sarcomas, codes for the human tumor antigen HOM-MEL-40. *Cancer Res.* 56, 4766-4772.
- Tureci,O., Sahin,U., Zwick,C., Koslowski,M., Seitz,G., and Pfreundschuh,M. (1998). Identification of a meiosis-specific protein as a member of the class of cancer/testis antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 5211-5216.
- van den,E.P., Shepley,B.A., Borst,J., Coligan,J.E., Markham,A.F., Orkin,S., and Terhorst,C. (1984). Isolation of cDNA clones encoding the 20K T3 glycoprotein of human T-cell receptor complex. *Nature* 312, 413-418.
- Van den,E.B., Peeters,O., De Backer,O., Gaugler,B., Lucas,S., and Boon,T. (1995). A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *J. Exp. Med.* 182, 689-698.
- van der,B.P., Traversari,C., Chomez,P., Lurquin,C., De Plaen,E., Van den,E.B., Knuth,A., and Boon,T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254, 1643-1647.
- Van der,M.A., Seddon,M.B., Betsholtz,C.A., Lechner,J.F., and Gerwin,B.I. (1993). Tumorigenic conversion of human mesothelial cells as a consequence of platelet-derived growth factor-A chain overexpression. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 8, 214-221.
- Van Meirvenne,S., Straetman,L., Heirman,C., Dullaers,M., De Greef,C., Van,T., V, and Thielemans,K. (2002). Efficient genetic modification of murine dendritic cells by electroporation with mRNA. *Cancer Gene Ther.* 9, 787-797.
- Van Tendeloo,V.F., Ponsaerts,P., Lardon,F., Nijs,G., Lenjou,M., Van Broeckhoven,C., Van Bockstaele,D.R., and Berneman,Z.N. (2001). Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells. *Blood* 98, 49-56.
- Vasmatazis,G., Essand,M., Brinkmann,U., Lee,B., and Pastan,I. (1998). Discovery of three genes specifically expressed in human prostate by expressed sequence tag database analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 300-304.
- Versteeg,R. (1997). Aberrant methylation in cancer. *Am. J. Hum. Genet.* 60, 751-754.

- Versteeg, I., Sevenet, N., Lange, J., Rousseau-Merck, M.F., Ambros, P., Handgretinger, R., Aurias, A., and Delattre, O. (1998). Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer. *Nature* 394, 203-206.
- Villena-Heinsen, C., Meyberg, R., Axt-Fliedner, R., Reitnauer, K., Reichrath, J., and Friedrich, M. (2002). Immunohistochemical analysis of 1,25-dihydroxyvitamin-D3-receptors, estrogen and progesterone receptors and Ki-67 in ovarian carcinoma. *Anticancer Res.* 22, 2261-2267.
- Wachsman, J.T. (1997). DNA methylation and the association between genetic and epigenetic changes: relation to carcinogenesis. *Mutat. Res.* 375, 1-8.
- Wai, D.H., Schaefer, K.L., Schramm, A., Korsching, E., Van Valen, F., Ozaki, T., Boecker, W., Schweigerer, L., Dockhorn-Dworniczak, B., and Poremba, C. (2002). Expression analysis of pediatric solid tumor cell lines using oligonucleotide microarrays. *Int. J. Oncol.* 20, 441-451.
- Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., and Semenza, G.L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 5510-5514.
- Wang, P.J., McCarrey, J.R., Yang, F., and Page, D.C. (2001). An abundance of X-linked genes expressed in spermatogonia. *Nat. Genet.* 27, 422-426.
- Watson, M.L., Zinn, A.R., Inoue, N., Hess, K.D., Cobb, J., Handel, M.A., Halaban, R., Duchene, C.C., Albright, G.M., and Moreadith, R.W. (1998). Identification of *morc* (microrchidia), a mutation that results in arrest of spermatogenesis at an early meiotic stage in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 14361-14366.
- Weaver, J.C. (1995). Electroporation theory. Concepts and mechanisms. *Methods Mol. Biol.* 55, 3-28.
- Wellmann, A., Thieblemont, C., Pittaluga, S., Sakai, A., Jaffe, E.S., Siebert, P., and Raffeld, M. (2000). Detection of differentially expressed genes in lymphomas using cDNA arrays: identification of clusterin as a new diagnostic marker for anaplastic large-cell lymphomas. *Blood* 96, 398-404.
- Welsh, J.B., Zarrinkar, P.P., Sapinoso, L.M., Kern, S.G., Behling, C.A., Monk, B.J., Lockhart, D.J., Burger, R.A., and Hampton, G.M. (2001). Analysis of gene expression profiles in normal and neoplastic ovarian tissue samples identifies candidate molecular markers of epithelial ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 1176-1181.
- Wendling, O., Dennefeld, C., Chambon, P., and Mark, M. (2000). Retinoid signaling is essential for patterning the endoderm of the third and fourth pharyngeal arches. *Development* 127, 1553-1562.
- Witzgall, R., O'Leary, E., Leaf, A., Onaldi, D., and Bonventre, J.V. (1994). The Kruppel-associated box-A (KRAB-A) domain of zinc finger proteins mediates transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 4514-4518.
- Wolfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M., Wolfel, C., Klehmann-Hieb, E., De Plaen, E., Hankeln, T., Meyer zum Buschenfelde, K.H., and Beach, D. (1995). A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 269, 1281-1284.

Wong,A.K., Shanahan,F., Chen,Y., Lian,L., Ha,P., Hendricks,K., Ghaffari,S., Iliev,D., Penn,B., Woodland,A.M., Smith,R., Salada,G., Carillo,A., Laity,K., Gupte,J., Swedlund,B., Tavtigian,S.V., Teng,D.H., and Lees,E. (2000). BRG1, a component of the SWI-SNF complex, is mutated in multiple human tumor cell lines. *Cancer Res.* 60, 6171-6177.

Wu,W., Zhang,X., Yan,X., Wang,J., Zhang,J., and Li,Y. (2002). [Expressions of beta-catenin, p53 and proliferating cell nuclear antigen in the carcinogenesis of colorectal adenoma]. *Zhonghua Zhong. Liu Za Zhi.* 24, 264-267.

Xie,Y., Skytting,B., Nilsson,G., Gasbarri,A., Haslam,K., Bartolazzi,A., Brodin,B., Mandahl,N., and Larsson,O. (2002b). SYT-SSX is critical for cyclin D1 expression in synovial sarcoma cells: a gain of function of the t(X;18)(p11.2;q11.2) translocation. *Cancer Res.* 62, 3861-3867.

Xie,Y., Skytting,B., Nilsson,G., Gasbarri,A., Haslam,K., Bartolazzi,A., Brodin,B., Mandahl,N., and Larsson,O. (2002a). SYT-SSX is critical for cyclin D1 expression in synovial sarcoma cells: a gain of function of the t(X;18)(p11.2;q11.2) translocation. *Cancer Res.* 62, 3861-3867.

Xie,Y., Tornkvist,M., Aalto,Y., Nilsson,G., Girnita,L., Nagy,B., Knuutila,S., and Larsson,O. (2003). Gene expression profile by blocking the SYT-SSX fusion gene in synovial sarcoma cells. Identification of XRCC4 as a putative SYT-SSX target gene. *Oncogene* 22, 7628-7631.

Young,G.D., Winokur,T.S., Cerfolio,R.J., Van Tine,B.A., Chow,L.T., Okoh,V., and Garver,R.I., Jr. (2002). Differential expression and biodistribution of cytokeratin 18 and desmoplakins in non-small cell lung carcinoma subtypes. *Lung Cancer* 36, 133-141.

Yu,H., King,R.W., Peters,J.M., and Kirschner,M.W. (1996). Identification of a novel ubiquitin-conjugating enzyme involved in mitotic cyclin degradation. *Curr. Biol.* 6, 455-466.

Yu,Q., Geng,Y., and Sicinski,P. (2001). Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation. *Nature* 411, 1017-1021.

Zhang,H.S., Gavin,M., Dahiya,A., Postigo,A.A., Ma,D., Luo,R.X., Harbour,J.W., and Dean,D.C. (2000). Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell* 101, 79-89.

Zhang,Y., Chaux,P., Stroobant,V., Eggermont,A.M., Corthals,J., Maillere,B., Thielemans,K., Marchand,M., Boon,T., and van der,B.P. (2003). A MAGE-3 peptide presented by HLA-DR1 to CD4+ T cells that were isolated from a melanoma patient vaccinated with a MAGE-3 protein. *J. Immunol.* 171, 219-225.

Ziada,A., Barqawi,A., Glode,L.M., Varella-Garcia,M., Crighton,F., Majeski,S., Rosenblum,M., Kane,M., Chen,L., and Crawford,E.D. (2004). The use of trastuzumab in the treatment of hormone refractory prostate cancer; phase II trial. *Prostate* 60, 332-337.

Zuo,L., Weger,J., Yang,Q., Goldstein,A.M., Tucker,M.A., Walker,G.J., Hayward,N., and Dracopoli,N.C. (1996). Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat. Genet.* 12, 97-99.

Zweiger,G. (1999). Knowledge discovery in gene-expression-microarray data: mining the information output of the genome. *Trends Biotechnol.* 17, 429-436.

Zwicker,J., Brusselbach,S., Jooss,K.U., Sewing,A., Behn,M., Lucibello,F.C., and Muller,R. (1999). Functional domains in cyclin D1: pRb-kinase activity is not essential for transformation. *Oncogene* 18, 19-25.

Anhang

Tab. 19: Liste der Gene, die durch RT-PCR untersucht wurden. Primer und Annealingtemperaturen sind angegeben.

Symbol	Gene	5'-Primer	3'-Primer	Annealing
ACRV1	acrosomal vesicle protein 1 transcript variant 1	CATCAAGTCAGCCTAATGAGC	TAGATGGGCACATGTTCTCAC	67°
ACT	activator of CREM in testis	TTTGATCTCAAAGAGAGTGG	TGTCTCTAGATGTCAGTGTC	62°
ADAM2	disintegrin and metalloproteinase domain 2 (fertilin beta)	AATTTGCCAGTGATCATGCAG	CAGAATTAGTGTCTACTAACC	62°
ADAM3A	disintegrin and metalloproteinase domain 3A (cyritestin)	CCATTGTGCTGATGATCCTGG	TCTGTGACTGGCTGCTGTTAC	67°
ADAM18	disintegrin and metalloproteinase domain 18	CCTCTAGTAATTGTGTTCTG	CACGTCATCGCTTTCTGATAC	56°
ADAM30	a disintegrin and metalloproteinase domain 30	GCTACTATAAGCACATGCATG	CCACAATCACATTCCTCATTG	64°
AKAP3	A kinase (PRKA) anchor protein 3	CCATTGTAGGTGACCAAGAAC	AGCTGGCGCTCCTTCTCATAG	62°
AKAP4	A kinase (PRKA) anchor protein 4	TCATGGCTAAGTATAGCAACG	TCACAGGCAACTGCTCAAGTG	65°
AF6	AF6 protein	GCAAATCAGCCTCCTAGTCCT	TTGGGAACGTGTAACACGCTG	64°
AldoA	Aldolase A	AAGAAGGACGGAGCTGACTTC	GGAGTGTACTTTCTTGACAG	67°
ALK-2	Activin A receptor type I	GTTGCATAGCAGATTTGGGCC	GGCCAGAGAGGTTAATGTCGG	68°
ASP	AKAP-associated sperm protein	GAATTAACAGATCTTGAGCAG	TAATGGCCTACATCTTCAGAG	63°
BAGE	B melanoma antigen	TGGCTCGTCTCACTCTGG	CCTCCTATTGCTCCTGTTG	54°
BIK	BCL-2 interacting killer	CAGTGACGCATTGGCCCTGCG	ACCTGTTGCGCAGGACACCCAG	64°
BMP2	Bone morphogenetic protein 2	GACTGCGGTCTCCTAAAGGTC	GATTCCTCATGGTGAAGCTGCG	56°
BMP4	Bone morphogenetic protein 4	GTCAAGACACCATGATTCCTG	GATGTTCTTCGTGGTGAAGCTC	65°
BMP5	Bone morphogenetic protein 5	CAGCTCTCATCAGGACTCCTCC	GGTACGTGGTCAGGAAACATC	64°
BMP6	Bone morphogenetic protein 6	CTTCAGATTACAACAGCAGTG	GGGGTTCATAAGGTGAACCAAG	60°
BMP7	Bone morphogenetic protein 7	GGCAGAGAACAGCAGCAGCGAC	GGGTTGATGAAGTGGACCAGC	64°
BOLL	boule-like (Drosophila)	CCTTCACGTTCTGTATGTAGC	CAGCTTCTAGCTGGTTCGTTG	62°

Symbol	Gene	5'-Primer	3'-Primer	Annealing
BPGF1-Q6	bone derived growth factor sulfhydryl oxidase	GATCGCTCCAAGATCTACATG	GACCTCCTTGGACTIONGGATGC	64°
BPESC1	blepharophimosis, epicanthus inversus and ptosis, candidate	TCCTGATGCCACTTAGCATGT	GCTGGCACTGAACTCAAGCAG	61°
BRDT	bromodomain, testis-specific	CTTCAGACAGCAGTGATTCTG	GGCTAAATCACGGTCTTTGAG	63°
C4ORF6	chromosome 4 open reading frame 6	AACCAGATCAGTGAGGTCATG	TCTAAGCAACCTCAGGCAAC	64°
CAST	calpastatin	GAAGCAGTTCGTATCTTCCAG	AGACTGTCAGAGAGTTTATCC	64°
CCT6B	chaperonin containing TCP1, subunit 6B (zeta 2)	TGGAATAGTAGCTCTTCGCAG	TCAGAAATGGCTCAGGCTACAC	66°
CEA	carcinoembryonic antigen	GTCACCCTGGATGTCCTCTATG	GGAGAAGTTCCAGATGCAGAG	64°
CLG01	clg01 protein	AGCATGAGTCCATCAGCAAAG	CACATCAACCTTGTATGGATG	64°
CLGN	calmegin	AACAGTTAATGGCAGCTGCTG	AGAAACAGGATGTGCAGACTG	70°
COL1A1	Collagen 1A1	TGGTGATGCTGGTCCTGTTGG	GGGGTCAATCCAGTACTCTCC	66°
COL5A1	Collagen 5A1	GAAACTGCTCTCCTATGTGGA	CTGGTAGCCTTTCTTGGTAGC	64°
COL9A3	Collagen 9A3	GTGGGGGGATGATCAGCGAAC	TCCTCTGTCACCCTGGTTTCC	54°
COL16A1	Collagen 16A1	GATGAGAGAATGGCTTACTAC	TGGAGGACCTTGGAGACCTGG	60°
CST8	cystatin 8 (cystatin-related epididymal specific)	TAAGAGTGCTGAAGACCTAGG	CTCCATCACAGTGAATTCACC	65°
CTAG2	cancer/testis antigen 2	CACACAGGATCCATGGATGCTGCAGATGCGG	CACACAAAGCTTGGCTTAGCGCCTCTGCCCTG	64°
CTGF	Connective tissue growth factor	CACCGCCAAAGATGGTGCTCC	TGTCTTCCAGTCGGTAAGCCG	68°
CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	GAACCAGCGGTTACCATGGAG	GACAGGTGCAGCCTGTACTTG	67°
CXORF2	chromosome X open reading frame 2	CGCTTCCAGAGCTTACAGCAG	TTGGAGTACAGTCTACACCTG	65°
CYLC2	cylicin, basic protein of sperm head cytoskeleton 2	AATCCAAGGAGACAGATGTTG	TCAAGCAACTTTCATGACAGG	65°
CYRN	cyritestin protein	CCATTGTCAGTGTGATCCTGG	TCTGTGACTGGCTGCTGTTAC	67°
DAZ	deleted in azoospermia	CCTATAACTCAGTATGTTTCCAG	TATATTTCAACACAGAACCAG	56°
DMC1	DMC1 meiosis-specific homologous recombination	TGACTGCATTTGAGTATAGTG	ATTCCTCCAGCAGTTATTGCG	56°
DMRT1	doublesex and mab-3 related transcription factor 1	TGCCAGTGCAAGAAGTGCAAC	AAGCCAGAATCTTGACTGCTG	67°
DSP	Desmoplakin	CTCACAGAGAACCCTGACCAAG	CCTGAATCCTATTAGATGCCTC	60°

Symbol	Gene	5'-Primer	3'-Primer	Annealing
EGFP	Enhanced green fluorescent protein	CACATGAAGCAGCAGCTTC	CACCTTGATGCGTTCTTCTG	67°
ENO1	Enolase 1	GTCATGGTGTCTCATCGTTCCG	TCACATGACTCTAGACACTTG	63°
ENTPD2	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2	CCAGCACTACCGAGTCTACAC	AGGTTGGTCAGGTTCCAGCATG	62°
EPHA4	Ephrin A4	CAGGGACGGAGAGCTCCAGAC	CCAATTCTTGCCAGGTCCTCC	66°
EPHA3	Ephrin A3	GGGAGATGTCCAATCAGGATG	CCAGAAGAAGGTTTGTATGGCC	64°
FGFR2	fibroblast growth factor receptor 2	CACTCATCAGAGTGTGTCTGG	GCTGAGGTCCAAGTATTCCTC	62°
FGFR3	fibroblast growth factor receptor 3	CACTCACCAGAGTGACGTTGG	CGACAGGTCCCAGGTACTIONGTC	58°
FLJ13031	hypothetical protein FLJ13031	GTCACCAGGAGACTGATGTAG	AGACACATTCACTGCCTGGTC	58°
FLJ22944	hypothetical protein FLJ22944	TCAAGTCCAAGTACAGTGAGC	ACCACTGTGCAGCATACTCTG	58°
FLJ23305	hypothetical protein	GAGAGCAATGCAGTCATTGAG	GTCACGTTCAAGCCTAGCATC	58°
FSCN3	fascin homolog 3	GTGGTTCATCCTACAGCACTG	CTGGTTGCACTGTATGAGGTC	64°
GAGE2	G antigen 2	GACCAAGACGCTACGTAG	CCATCAGGACCATCTTCA	61°
GAPDS	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	ACCATGAGATCTCTGTCTACC	CCTTAGCATCGAAGATGGACG	59°
GLP	golgin-like protein	GAGATGGAGGATGTCATCAGG	GAGCTAATGAAGAGCTCACTG	67°
GRB 10	growth receptor bound 10	CGTTCAGACTCCTCAAGTATG	CACTGTACTIONTAGGGTAGAAGG	58°
H2AFJ	hemoglobin 2 AFJ	CCAACATCCAGGCCGTGCTGC	CACAGCAGCTACTIONAGGCTAGG	-
H2BFB	hemoglobin 2 BFB	GTTCCAAGTAACTTTGCCAAG	AGTGCAAACACCTTTAGTTCC	60°
H3FB	hemoglobin 3 FB	GAGTCACCACAAGGCCAAGGC	GATCTCACGGACTIONAGCGCTG	62°
HCAP-G	chromosome associated protein-G	CTATTGAATGAGATTCTGGAGC	CTGTCACTIONTTCTCTGTCTCTC	60°
HDAC5	Histone deacetylase 5	CAGGACAGTGGTGTGCCCCAT	ACAGCTCCAGTGTGCTCTG	68°
Hif1a	Hypoxia inducible factor	TACTIONCTTTGCAGAATGCTC	GCCTTGATAGGAGCATIONAAC	60°
HPRT1	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	TGACTIONGGCAAAACAATGCA	GGTCTTTTCCACTIONCAAGCT	62°
HSPC150	HSPC150 protein similar to ubiquitin-conjugating enzyme	GTTATCACTIONCTGAGAGGTACC	AGCATCTCTTCTCATCAGCC	62°
HSF2BP	heat shock transcription factor 2 binding protein	TCGTTAGACGGTGTGTCCAG	ACAAGCACTIONCTCACTIONCAAG	62°
IGFBP-3	insulin like growth factor binding protein 3	CCAAGCGGGAGACAGAATATG	CTGCCTTTGGAAGGGCGACAC	66°

Symbol	Gene	5'-Primer	3'-Primer	Annealing
IL13RA2	interleukin 13 receptor, alpha 2	TGGTAGTCAAACATGGAAGAC	AGCAGTCACCAAGGTAGTATC	66°
IMP-2	Insulin-like 2 binding protein	CACCGGAAGCCCAGTTCAAGG	CTGATCTTGCCTGTGCAGTC	-
KAI	metastasis suppressor kangai 1 (CD82 antigen)	CAAGCTGAAGCAGGAGATGGG	CACCTTCTCCATGCAGCCCTC	64°
KRT5	Keratin 5	CCTGGTATCAGACCAAGTATG	ACACTGCTTGTGACAACAGAG	60°
KRT7	Keratin 7	CGACAACATCAAGAACCAGCG	CCAGTGGAAATTCATCACAGAG	62°
KRT 15	Keratin 15	GGCCTGGTTCTTCAGCAAGAC	CTGATGCCAATGCCAGCCATC	66°
KNSL7	kinesin-like 7	CTACGCCTGAAAAGTCAGCAG	TAGCAGACTGCTGACTGTCAC	64°
LDHA	Lactat dehydrogenase A	CTATTGGACTCTCTGTAGCAG	TAGGCATGTTCAAGTGAAGGAG	67°
LDHC	lactate dehydrogenase C, transcript variant 1	TGCCGTAGGCATGGCTTGTGC	CAACATCTGAGACACCATTCC	68°
LHX2	LIM homeobox 2	GCAAGGAAGACTACTACAGGC	GTTTTCGTTGCAGCTTAGCGC	-
LIG3	ligase III, DNA, ATP-dependent, transcript variant beta	CAGAAGTGGTGCACAGTCACC	TGCCTGCTGGCAGATTCTTC	67°
LOC51213	HOM-TES-85 tumor antigen	GGAGAGGCTACTCAACATGCAGAAGC	CTGAGTGACTATGAGATCTCTCTG	64°
LOC51281	testis specific ankyrin-like protein 1	ATTGCCAGTGGGAATGAGCTG	GCTGCTGCTTCACTGGAATTC	70°
LOC51314	NM23-H8	TAGCTCAGCTCTGTGACATTG	TGACCATAGATGGACCCACAG	61°
LOC64180	putative metallopeptidase, family M19	CTCAGCTGCCAGAGCTGTGTG	CTTTGCCACAGTGACCTCTGC	67°
LOC65122	preferentially expressed antigen of melanoma	GGTGCCATCATTACAGTCAG	CCTCAGTGTACACATCAGCTC	66°
LTBP4	latent transforming growth factor binding protein 4	CGACATGCCAGACTTTGAGGA	TCACACTCGTTGATGTCAACG	54°
LW-1	LW-1	CGCCAGCTAAACTTGTATGGC	TAGCTGGCATGTAAGTGTGACG	65°
MAGEA3	melanoma antigen, family A, 3	TGGAGGACCAGAGGCCCC	GGACGATTATCAGGAGGCCTGC	62°
MAGEB1	melanoma antigen, family B, 1	CCCGAGCGAGCTTAAGGAGT	GTCAGATTCGGTACATGACACAG	60°
MAGEC1	melanoma antigen, family C, 1	CGGAGGGAGGAGACTTA	TTAAGGTGGTGTCTTAGG	58°
MBD2	methyl-CpG binding domain protein 2	GTGAACTCCTACTCATCCAAG	CTCTTCTGTATCAGCAGCTCG	63°
MCSP	mitochondrial capsule selenoprotein	CCTACTGGAATCAGTCATGAG	AACACAGGTCTAGCCTGACTC	64°
MFAP2	microfibril associated glycoprotein	CTTGACTGCCGTGAGGAACAG	TGTCCCGACAGAGGTCAGCTC	60°
MGC4766	similar to testis specific protein TES101RP	TGACTGTGGAAGCAGATCCAG	AGCAGCAATGGCAGCAGTAGC	71°
MMP15	matrix metalloproteinase 15	CAAAGGTGACCGCTACTGGCT	GTAGAAGTAGGTGTAGGCTGC	64°

Symbol	Gene	5'-Primer	3'-Primer	Annealing
MOV10L1	MOV10-like 1	GGAACGGCTGATGTCTCGACC	TGTCAGCCACTGCAGATCAGC	69°
MORC	microrchidia (mouse) homolog	CTGAGTATCAGCTACCATCAG	TCTGTAGTCCTTCACATATCG	58°
MRF1	modulator recognition factor 1	GAGGCTGGTCCTGCCATACGT	GGTCTTTCCTGGCATCATCTG	58°
MSH4	mutS (E. coli) homolog 4	TGTCAGCCACTGCAGATCAGC	TAGATGGTACACAGCTCTCTG	65°
MTL5	metallothionein-like 5, testis specific (tesmin)	GCTCAGGAATCCTGTTGCAAG	GCCTATCGTGACTGAATCTTG	68°
Notch1	Notch1	CTGATGGCTTCACCCCGCTCA	TCGGTCCGGATCAGGATCTG	64°
Notch2	Notch2	CAGATTCTGATTGCAACCGA	AACAGAGGTGTCTCTTCCTTG	64°
NR6A1	nuclear receptor subfamily 6, group A, member 1	TACAGTCTGATTACACAGCTG	CTGGTCTTGCAGGAATGCAGC	67°
NXF2	nuclear export factor 2	CTCGGTGCTTACCACGATGAG	TGGTTATGTCACGTGGCCTGC	69°
NYD-SP26	testis development protein	CTGATTCCACTATTCTGAGG	CTTGAATCGTAACAAGAGTC	56°
NYD-SP27	testis development protein	CTCTGGCCTTATCTGATCTTG	CAAGGCTCTACCCATTCTGG	64°
OAZ3	ornithine decarboxylase antizyme 3	AACTACCTCTACCCGATCTGG	CATGTTCAAGGAGGCTCACTG	67°
ODF1	outer dense fibre of sperm tails 1	AGGCAACTGAGATGCATCGAC	GCAAGGAGACTCGATCTTGAC	68°
p21	cyclin-dependent-kinase inhibitor (CIP1)	CACCGAGGCACTCAGAGGAGG	GCGTTTGGAGTGGTAGAAATC	62°
p 27	cyclin-dependent-kinase inhibitor (KIP1)	GGAAGCGACCTGCAACCGACG	GTCCATTCCATGAAGTCAGCG	66°
p 57	cyclin-dependent-kinase inhibitor (KIP2)	GGGCCTCTGATCTCCGATTTTC	GGCTCTTTGGGCTCTAAATTG	58°
PDGFA	platelet derived growth factor alpha chain	CGGGAAGGCCTAGGGAGTCAG	CCCAGAGTGTCTCGGACACAG	60°
PLCG2	phosphatidylinositol 4,5 bisphosphat phosphodiesterase gamma 2	GTGAATGATAATGGCCTCAGC	AAGTTCCTCTTCGCTCTCCAG	64°
(PP2Bs1)	similar to Protein phosphatase 2B regulatory subunit 1	TGTCCTAACAGGAGCTTCATC	AAACAGATCTTCATGTCCTG	63°
PRAME	preferentially expressed antigen in melanoma	CTGAAAATGGTGCAGCTGGAC	AAGGGGTTATCACGTGCCTG	64°
PRM1	protamine 1	CTCTGAGCATTACGGCCAAGC	ATTGACAGGCGGCATTGTTCC	66°
PRTD-NY3	hypothetical protein PRTD-NY3	TGTGATGAGACTGTCATCCAG	TGGAGCTTCTCATGTCAGCAG	65°
PSKH1	putative serine / threonine protein kinase H1	CGCAAGAAGGGTGATGACTGC	GGACACACTAGGCCAGGGCTC	68°
PTK7	tyrosine protein kinase like 7	CTGGGAGACCTCAAGCAGTTC	CGGAAGTGGTAGTACTCACTG	64°
PVS	poliovirus receptor	CAAAGAGGGACCTCCCAGTGA	CGCTGGCATGCTCTGTACTCG	64°

Symbol	Gene	5'-Primer	3'-Primer	Annealing
RFPL3S	ret finger protein-like 3 antisense	GTTTCATAGCAGGTTGAACATG	AGTGGATATGACCTTGGATGC	61°
RNF16	ring finger protein 16	GAACAACGTGAGTGTGCAGTG	CACTGTGGAGATGACCATCTG	64°
RNF17	ring finger protein 17	AGCTATGAACATAGCAAGAGC	GGCAGGGATCTATTACATGGC	64°
S2P	S2P protein	CACCCATCTACAGGATTGTCC	GGGATTCTGTCAGATGAGTGC	68°
S100A2	S100A2 protein	GTCTGCCACAGATCCATGATG	CCCTCCTCATCCACTTTCTCC	64°
S100A6	S100A6 protein	CATTTGGCCGCCTCCCTACCG	TTTCAGCATCCTGCAGCTTCG	64°
S100A14	S100A14 protein	GTCTGGTCTGAGCAACGCAGAGG	CTCTCCAGGCCACAGTTGCTC	-
SAGE	putative tumor antigen	ATAACAGCCAACCAGCACCTG	TTCTCGAGTTGCTGAATTAAG	58°
SDC4	Syndecan 4	CTGGATGACTTGAAGACTCC	TGCCACCCACAATCAGAGCTG	64°
SGY-1	soggy-1 gene	CTCCTATCCATGATGCTGACG	CCTGAGGATGTACAGTAAGTG	64°
SLC3A1	Solute carrier transporter 3A1	CTTCATCATGGGTGTCTACTG	TCGTCGAGTACTACAAGACAG	62°
SLC6A8	solute carrier transporter 6A8	TCACCCCGCTGGTCTGCATGG	GGTCAGGTGCTGCCAGCGCTC	68°
SOX30	SRY (sex determining region Y)-box 30	TACTCCCTTACAGTAAGGACAG	TGCATTCACTTGAGTAGTCTC	65°
SPACA1	sperm acrosome associated 1	GAATGTGCACCGTTACATGTG	GTATCTCACAGAACTCTGCTC	66°
SPAG4	sperm associated antigen 4	TCTCCAGTAGTCTCTGAGGAG	CTGCAGAGTGATGTCGCTCAG	66°
SPAG8	sperm associated antigen 8	GCTGACTATGCAACTAAAGTC	AGCCTCTTCAAGTACAGTGAG	64°
SPAM1	sperm adhesion molecule 1 (PH-20)	GTACAACTTAGTCTCACAGAG	TCAAGGTGCTATAACAGCTGC	63°
SPANXC	SPANX family, member C	CTGCCGCAGACATTGAAGAA	TCCATGAATTCCTCCTCCTC	54°
SPATA1	spermatogenesis associated protein 1	CCACAGACCAATTAGTGTAAC	GCATGCTGTACCTCAGTGATC	63°
SPO11	SPO11, meiotic protein covalently bound to DSB	AAGATACATCGAGGAAGATGG	CTCTGGCAATCAGAGTTCTTC	60°
SSX2	synovial sarcoma, X breakpoint 2	GTGCTCAAATACCAGAGAAGATC	TTTTGGGTCCAGATCTCTCGTG	67°
STK13	serine/threonine kinase 13 (aurora/IPL1-like)	CTCTTCAAGTCGCAGATAGAG	GCTGGTATCTGAGAAGCCTGG	54°
STK31	serine/threonine kinase 31	AGAGTCAGATGATCCTGATGG	AGCCTTATGCAATGTATGCAG	66°
SYCP1	synaptonemal complex protein 1	GAAGGAACTGCTTTAGAATCCAATTC C	GTACAGCAGAAAGCAAGCAACTGAATG	67°
SYT-SSX1	Synovial sarcoma fusion protein 1	GTATGGCCAACAGCAAGATGC	TCGTATCTTCTCAGGGTCA	64°
SYT-SSX2	Synovial sarcoma fusion protein 2	GTATGGCCAACAGCAAGATGC	TCTCGTGAATCTTCTCAGAGG	66°

Symbol	Gene	5'-Primer	3'-Primer	Annealing
TAF7L	RNA polymerase II	AGAGACTGCTGCGTTCCGGATG	TCTGCTGGTACCATAGCACAG	68°
TAX2	GAIP c-terminus interacting protein GIPC	CGAGGTGATGTTTTGCACCCTG	CTCTCAAAGGCAGAGGGCAG	62°
TBX4	T-box 4	GCAGTGATGACAGTGACCTGC	CCATCGTCTGCACGCTATAGC	64°
TBX22	TBXX T-box containing protein	AGTGCACGTGATAGAGCAAGG	TAGATACTGATCACTGGAGTC	64°
TCP10	t-complex 10 (a murine tcp homolog)	GAGCTGACAGAAGCTCATCAG	TCCGACGTGTGCTGCTCTAAC	58°
TCP11	t-complex 11 (a murine tcp homolog)	AGTTAACCGTCATGGCCTCAG	GGATAGAAGCTCACTGTCTGC	67°
TDRD1	tudor domain containing 1	AGCTGTGCATGTTGACAGCTG	GCCAATATGCCTGAAGATGTC	66°
TETM4	testis-expressed transmembrane-4 protein	GACACCATCATGGATTCAAGC	ACAATCACAATCCTCTGAGTG	67°
TEX11	testis expressed sequence 11	TGTTCTGAGTCGTGCACTTG	AGCTTGCCTAATCTGACTTGC	67°
TEX12	testis expressed sequence 12	CGCGAACTTTGTAGCTGGTGC	GTAACCTCTGTGCGAGGAAC	67°
TEX14	testis expressed sequence 14	TGTTAAGGCATGTGACTCATC	GACTTACAGAAGTGAAGTGC	66°
TEX15	testis expressed sequence 15	AAACGACCGAGCACTGTAGAC	TTCTAGATCAGGATGGACATC	64°
TGFB-1	transforming growth factor beta 1	CTGCAAGTGGACATCAACGGG	AGCAGTTCTTCTCCGTGGAGC	66°
THEG	testicular haploid expressed gene	GAGTCTGGACAAGGACTTGG	CTTGGTGACATCCAGCACCTC	69°
TIAM1	T-lymphoma invasion and metastasis associated protein 1	GCAGATGCAGAGGCAAATGCC	ACTTGCTTGGGGCAGACACTG	64°
TKTL1	transketolase-like 1	ATGTGCTTCATTCGGACCACC	TACTTGATATGCAGTGACAG	66°
TNP2	transition protein 2	CAGCTCCATAGCAACTCTCAG	ACCATAGTAACATGTTCTCTGC	62°
TPTE	transmembrane phosphatase with tensin homology	TGGATGTCCTCTCATCCTTG	CCATAGTTCCTGTTCTATCTG	63°
TPX1	testis specific protein 1 (probe H4-1 p3-1)	TTTTGTCTATGGTGTAGGACC	GGAATGGCAATGATGTTACAG	65°
TSBP	testis specific basic protein	TCTAGCACTGTCTCGATCAAG	TGTCCTCTTGGTACATCTGAC	63°
TSGA10	testis specific, 10	AGGAGTCAGATGGCAAATGAG	GTCATCTCAGATCACTGCAAC	66°
TSKS	testis-specific kinase substrate	CAGGAATTGCAGAAGCTGTTC	CCTCTGGCTTCATCTTGTCTG	63°
TSP50	testes-specific protease 50	ACCACCATGGAGACCCAATTC	CCAGTTAGCTCATAGCAGAAC	66°
TSP-NY	testis-specific protein TSP-NY	GAAGCAGTGGCATGATGTCAG	TCTAGTTCTGCTCCCAGCTGG	67°
TSPY	testis specific protein, Y-linked	ATCACTGACGAAGATGAAGAC	TTCTGTGCATAAGACCATGC	66°

Symbol	Gene	5'-Primer	3'-Primer	Annealing
TPX1	testis specific protein 1 (probe H4-1 p3-1)	TTTTGTCTATGGTGTAGGACC	GGAATGGCAATGATGTTACAG	65°
UBQLN3	ubiquilin 3	AAGGACGGGACCACAGCTGAC	TTGTGCTGGATCAGCTGCTGC	64°
VASA	VASA protein	AGACTGATGGATATCATAGGC	CTCTTGACTACCACTGAAGC	64°
VCX	variable charge, X chromosome	TGAGCTGCGGAAGATGAGTCC	TGGTGAGATCTCTGAGGTCTG	66°
VEGF	Vascular endothelial growth factor	GAGATCGAGTACATCTTCAAG	CTTGTCACATCTGCAAGTACG	63°
VHL	Von-Hippel-Lindau	ATCCACAGCTACCGAGGTCAC	CCGTTGATGTGCAATGCGCTC	56°
VR22	alpha-catenin-like protein	CACAAGTGAATGTTGCCTTGG	ACTGTTTGCACTACAGCATTC	61°
XAGE-1	XAGE-1 protein	ACCACACAGCCAGTCCCAGGAGCC	AACCAGCTTGCGTTGTTTCAGCTTG	65°
ZAN	zonadhesin variant 1	GGCTATGTGCTGAGTGAAGAC	CTGGGCAGCATCATGTCATTC	54°

Tab. 20a: Zusammenstellung der Gene, die entweder im elektronischen Northern Hits in somatischen Normalgeweben aufwiesen (Spalte A) oder die in den RT-PCR Analysen in Normalgeweben detektiert wurden (Spalte B) und damit keine Keimzellspezifischen Gene darstellen wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen.

Symbol	Gene	Chromosome	Acc.-Nr.	A	B
ACRV1	acrosomal vesicle protein 1 transcript variant 1	11p12	NM_001612		X
ACT	activator of CREM in testis	6q16	NM_020482		X
ACTL7A	actin-like 7A	9q31	NM_006687	X	
ACTL7B	actin-like 7B	9q31	NM_006686	X	
ADRA1A	adrenergic, alpha-1A-, receptor	8p21	NM_000680	X	
AKAP3	A kinase (PRKA) anchor protein 3	12p13	NM_006422		X
AR	androgen-receptor mRNA	Xq11	M34233	X	
AR	androgen receptor mutant gene	Xq11	M73069	X	
ASP	AKAP-associated sperm protein	7q22	NM_031916		X
ATP12A	ATPase, H+/K+ transporting, nongastric, alpha polypeptide	13q11	NM_001676	X	
C4ORF6	chromosome 4 open reading frame 6	4p16	NM_005750		X
C15ORF2	chromosome 15 open reading frame 2	15q11	NM_018958	X	
CAMP	cathelicidin antimicrobial peptide	3p21	NM_004345	X	
CAPZA1	capping protein alpha subunit isoform 1	1p12	NM_006135	X	
CBL	Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence	11q23	NM_005188	X	
CCT6B	chaperonin containing TCP1, subunit 6B	17q11	NM_006584		X
CDO	surface glycoprotein, Ig superfamily member	11q23	NM_016952	X	
CETN1	centrin, EF-hand protein, 1	18p11	NM_004066	X	
CLECSF1	C-type lectin, superfamily member 1	16q23	NM_005752	X	
CLG01	clg01 protein	20q12	NM_014477		X
CLGN	calmegin	4q28	NM_004362		X
CSE-C	sialic acid-specific 9-O-acetyltransferase I	11q24	AF300796	X	
CYP3A43	cytochrome P450 polypeptide 43	7q21	NM_022820	X	
DAZAP1	DAZ associated protein 1	19p13	NM_018959	X	
DKFZp434D0127	hypothetical protein DKFZp434D0127	12q21	NM_032147	X	
DKFZp434J037	hypothetical protein DKFZp434J037	1q31	NM_030952	X	
DKFZp564D152	cDNA DKFZp564D152	6q22	AL136629	X	
DMC1	meiosis-specific homologous recombination	22q13	NM_007068		X
DNAI1	dynein, axonemal, intermediate polypeptide, 1	9p21	NM_012144	X	
DNAI1	dynein, axonemal, intermediate polypeptide, 1	9p21	NM_012144	X	
DYRK5	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 5	1q31	AF327561	X	
EGR4	early growth response 4	2p13	NM_001965	X	
ENTPD2	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2	9q34	NM_001246		X
EPPIN3	eppin-3	20q12	NM_020398	X	
ERCC6	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency	10q11	NM_000124	X	
FABP6	fatty acid binding protein 6, ileal (gastrotropin)	5q23	NM_001445	X	
FDXR	ferredoxin reductase	17q25	NM_024417	X	
FHL1	four and a half LIM domains 1 protein isoform C	Xq27	NM_001449	X	
FKBP6	FK506-binding protein 6 (36kD)	7q11	NM_003602	X	
FLJ13031	hypothetical protein FLJ13031	10q11	NM_024688		X
FLJ20132	hypothetical protein FLJ20132	19p13	NM_017682	X	
FLJ21162	hypothetical protein FLJ21162	4q27	NM_024873	X	
FLJ22596	hypothetical protein FLJ22596	11q13	NM_025086	X	

Symbol	Gene	Chromosome	Acc.-Nr.	A	B
FLJ22944	hypothetical protein FLJ22944	10q25	NM_025145		X
FLJ23121	hypothetical protein FLJ23121	6q24	NM_024694	X	
FLJ23305	hypothetical protein FLJ23305	6q25	NM_025059		X
FLJ23447	hypothetical protein FLJ23447	19p13	NM_024825	X	
FLJ23588	hypothetical protein FLJ23588	22q13	NM_022785	X	
FOXE3	forkhead box E3	1p32	NM_012186	X	
FSCN3	fascin homolog 3	7q31	NM_020369		X
GAPDS	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, testis-specific	19q13	NM_014364		X
GAR22	GAS2-related on chromosome 22	22q12	NM_006478	X	
GE36	GE36 gene	1q25	NM_030933	X	
GKAP42	protein kinase anchoring protein GKAP42	9q21	NM_025211	X	
GLP	golgin-like protein	15q22	NM_018652		X
GPX5	glutathione peroxidase 5	6p21	NM_001509	X	
GRB10	growth factor receptor-bound protein 10	7p11	NM_005311	X	
GSG2	haspin	17p13	NM_031965	X	
GTX	GTX gene	10q26	AF184215	X	
H4FG	H4 histone family, member G	6p21	NM_003542	X	
HCG II	HCG II	6p21	X81001	X	
HDJ2	HDJ2 protein	9p12	AJ277242	X	
HE3-BETA	human epididymis-specific 3 beta	14q11	NM_022360	X	
HEM1	hematopoietic protein 1	12q13	NM_005337	X	
HSF2BP	heat shock transcription factor 2 binding protein	21q22	NM_007031		X
HSPA1L	heat shock 70kD protein 1-like	6p21	NM_005527	X	
HTR7	5-hydroxytryptamine receptor 7	10q21	NM_000872	X	
IL13	interleukin 13	5q31	NM_002188	X	
IL13RA2	interleukin 13 receptor, alpha 2	Xq13	NM_000640		X
ING1	ING1 tumor suppressor, variant A	13q34	AF149721	X	
IRAK-M	interleukin-1 receptor-associated kinase M	12q13	NM_007199	X	
KIAA1446	KIAA1446 protein	n/a	NM_020836	X	
KLK13	kallikrein 13	19q13	NM_015596	X	
KNSL6	kinesin-like 6	1p34	NM_006845	X	
KNSL7	kinesin-like 7	3p21	NM_020242		X
KRTHB6	keratin, hair, basic, 6	17q12	NM_002284	X	
LANCL2	testis-specific adriamycin sensitivity protein LanC-like 2	7q31	NM_018697	X	
LHCGR	luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor	2p21	NM_000233	X	
LIG3	ligase III, DNA, ATP-dependent, transcript variant beta	17q11	NM_002311		X
LOC51145	erythrocyte transmembrane protein	9q34	NM_016158	X	
LOC51270	E2F-like protein	Xq26	NM_016521	X	
LOC51281	testis specific ankyrin-like protein 1	2q37	NM_016552		X
LOC51314	NM23-H8	7p15	NM_016616		X
LOC56311	testis-specific ankyrin motif containing protein	7q31	NM_019644	X	
LOC57151	lysozyme homolog	17q11	NM_020426	X	
LOC64180	putative metalloproteinase, family M19	16q22	NM_022357		X
LOC65122	preferentially expressed antigen of melanoma	1p36	NM_023014		X
LPO	lactoperoxidase	17q23	U39573	X	
LW-1	LW-1	Xq28	NM_016153		X
MAGE-D2	MAGE-D2	Xp11	AF320907	X	
MAGE-D4	MAGE-D4	Xp11	AF320908	X	
MAGE-E1	MAGE-E1	Xq13	AF320909	X	
MAGE-G1	MAGE-G1	15q12	AF320911	X	
MAGE-H1	MAGE-H1	Xp11	AF320912	X	

Symbol	Gene	Chromosome	Acc.-Nr.	A	B
MAN1B1	mannosidase, alpha, class 1B, member 1	9q34	NM_016219	X	
MBD2	methyl-CpG binding domain protein 2, testis-specific	18q21	NM_015832		X
MGC4766	similar to testis specific protein TES101RP	19q13	NM_031451		X
MOV10L1	Moloney leukemia virus 10-like 1, homolog (mouse)	22q13	NM_018995		X
MSH4	mutS (E. coli) homolog 4	1p31	NM_002440		X
MTL5	metallothionein-like 5, testis specific (tesmin)	11q13	NM_004923		X
NR0B1	nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1	Xp21	NM_000475	X	
NR5A1	nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1	9q33	NM_004959	X	
NR6A1	nuclear receptor subfamily 6, group A, member 1	9q33	NM_001489		X
NRD1	nardilysin (N-arginine dibasic convertase)	1p32	NM_002525	X	
NXF2	nuclear export factor 2	Xp21	NM_017809		X
NY-REN-60	Homo sapiens ubiquitin specific protease mRNA	17q22	NM_032582	X	
OAZ3	ornithine decarboxylase antizyme 3	1q21	NM_016178		X
OBP2A	odorant-binding protein 2A	9q34	NM_014582	X	
OBP2B	odorant-binding protein 2B	9q34	NM_014581	X	
OXCT2	3-oxoacid CoA transferase 2	1p34	NM_022120	X	
PAPT	testis-specific poly(A) polymerase	n/a	NM_020144	X	
PAX5	paired box gene 5	9p13	NM_016734	X	
PCDHA9	protocadherin alpha 9	5q31	NM_014005	X	
PCDHB1	protocadherin beta 1	5q31	NM_013340	X	
PDE4C	phosphodiesterase 4C, cAMP-specific	19	NM_000923	X	
PDHA2	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 2	4q22	NM_005390	X	
PKD2L1	polycystic kidney disease 2-like 1	10q24	NM_016112	X	
PNMA1	paraneoplastic antigen MA1	14q24	NM_006029	X	
PPP3CC	protein phosphatase 3, catalytic subunit, gamma isoform	8p21	NM_005605	X	
PRKACB	protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, beta	1p36	NM_002731	X	
PRKG2	protein kinase, cGMP-dependent, type II	4q13	NM_006259	X	
PRTD-NY3	hypothetical protein PRTD-NY3	19p13	NM_030924		X
PTHR2	parathyroid hormone receptor 2	2q33	NM_005048	X	
RAB27B	member RAS oncogene family	18q21	NM_004163	X	
RANBP2L1	RAN binding protein 2-like 1	2q13	NM_005054	X	
RBMS3	RNA binding motif, single stranded interacting protein 3	3p24	NM_014483	X	
RFPL3S	ret finger protein-like 3 antisense	22q12	AJ010233		X
RFX4	regulatory factor X, 4	12q24	NM_032491	X	
RNF16	ring finger protein 16	1q42	NM_016102		X
RNF17	ring finger protein 17	13q12	NM_031277		X
RNF18	ring finger protein 18	11p11	NM_020358	X	
RNF9	ring finger protein 9	6p21	NM_006778	X	
RORA	RAR-related orphan receptor A	15q21	NM_002943	X	
(RTN5)	testis specific reticulon 5 protein	2p16	AF333336	X	
S100A7	S100 calcium-binding protein A7	1q21	NM_002963	X	
S2P	S2P protein	Xp22	NM_015884		X
SAC	soluble adenylyl cyclase	1q24	NM_018417	X	
SATB1	special AT-rich sequence binding protein 1	3p23	NM_002971	X	
SCN11A	sodium channel, voltage-gated, type XI, alpha polypeptide	3p21	AF188679	X	
SCNN1D	sodium channel, nonvoltage-gated 1, delta	1p36	NM_002978	X	
SGP28	specific granule protein (28 kDa)	6p12	NM_006061	X	

Symbol	Gene	Chromosome	Acc.-Nr.	A	B
SLC25A14	solute carrier family 25, member 14	Xq24	NM_003951	X	
SLC30A3	solute carrier family 30, member 3	7p14	NM_003459	X	
SLC6A5	solute carrier family 6, member 5	11p15	NM_004211	X	
SOX30	SRY-box 30	5q33	NM_007017		X
SOX5	SRY-box 5	12p12	NM_006940	X	
SPAG4	sperm associated antigen 4	20q11	NM_003116		X
SPAG8	sperm associated antigen 8	9p13	NM_012436		X
SPATA1	spermatogenesis associated protein 1	1p22	NM_022354		X
SPRR2C	small proline-rich protein 2C	1q21	NM_006518	X	
SSFA2	sperm specific antigen 2	2q31	NM_006751	X	
STK13	serine/threonine kinase 13	19q13	NM_003160		X
STK31	serine/threonine kinase 31	7p21	NM_031414		X
STK39	serine threonine kinase 39	2q24	NM_013233	X	
SYNGR4	synaptogyrin 4	19q13	NM_012451	X	
TAF7L	TAF7-like RNA polymerase II	Xq22	NM_024885		X
TAS2R1	taste receptor, type 2, member 1	5p15	NM_019599	X	
TBX22	T-box 22	Xq21	NM_016954		X
TBX4	T-box 4	17q21	NM_018488		X
TCFL5	transcription factor-like 5	20q13	NM_006602	X	
TCP11	t-complex 11	6p21	NM_018679		X
TDRD1	tudor domain containing 1	10q26	NM_031278		X
TESK1	testis-specific kinase 1	9p13	NM_006285	X	
TESK2	testis-specific kinase 2	1p32	NM_007170	X	
TEX11	testis expressed sequence 11	Xq12	NM_031276		X
TEX12	testis expressed sequence 12	11q22	NM_031275		X
TEX14	testis expressed sequence 14	17q23	NM_031272		X
TEX15	testis expressed sequence 15	8p12	NM_031271		X
TKTL1	transketolase-like 1	Xq28	NM_012253		X
TMSB10	thymosin, beta 10	2p11	NM_021103	X	
TNFSF7	tumor necrosis factor ligand superfamily, member 7	19p13	NM_001252	X	
TSBP	testis specific basic protein	6p21	NM_006781		X
TSGA10	testis specific, 10	2q11	NM_025244		X
TSGA14	testis specific protein A14	7q32	NM_018718	X	
TSLRP	testis specific leucine rich repeat protein	8q24	NM_012472	X	
TSP50	testes-specific protease 50	3p14	NM_013270		X
TSP-NY	testis-specific protein TSP-NY	12q24	NM_032573		X
TSX	TSX gene	X	AH009213	X	
TUBA2	tubulin, alpha 2	13q11	NM_006001	X	
TULP2	tubby like protein 2	19q13	NM_003323	X	
UMPK	uridine monophosphate kinase	1p32	NM_012474	X	
USP1	ubiquitin specific protease 1	1p31	NM_003368	X	
VR22	alpha-catenin-like protein	10q22	NM_013266		X
ZAN	zonadhesin variant 1	7q22	NM_003386		X
ZNF202	zinc finger protein 202	11q23	NM_003455	X	

Tab. 20b: Darstellung von intronlosen Genen bzw. solchen, von denen hoch homologe Pseudogene existieren. Diese Gene wurden nicht weiter analysiert.

Symbol	Gene	Chromosome	Acc.-Nr.
	acrosin	22q13	NM_001097
ADAM5	a disintegrin and metalloproteinase domain 5	8p11	AJ132820
ADAM20	a disintegrin and metalloproteinase domain 20	14q24	NM_003814
C20ORF51	chromosome 20 open reading frame 51	20q13	NM_022099
CCIN	calicin	9p11	NM_005893
FLJ10251	hypothetical protein FLJ10251	11q21	NM_018039
FLJ10376	hypothetical protein FLJ10376	10p11	
FLJ12986	hypothetical protein FLJ12986	16q24	NM_025148
GJA10	connexin 59	1p34	NM_030772
H1FT	H1 histone family, member T (testis-specific)	6p21	NM_005323
HK1	hexokinase 1	10q22	NM_000188
HNRNPG-T	testes-specific heterogenous nuclear ribonucleoprotein G-T	11p15	NM_014469
HS322B1A	hypothetical protein	22q12	NM_015371
MGC5356	hypothetical protein MGC5356	20q13	NM_024059
OR7E24P	olfactory receptor, family 7	19p13	Y10529
PABP	testis-specific poly(A)-binding protein	13q12	NM_030979
PGK2	phosphoglycerate kinase 2	6p12	NM_138733
PKDREJ	polycystic kidney disease (polycystin) and REJ-like	22q13	NM_006071
PLSCR2	phospholipid scramblase 2	3q25	NM_020359
POU4F2	POU domain, class 4, transcription factor 2	4q31	NM_004575
PRKACG	protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, gamma	9q13	NM_002732
PYY2	peptide YY, 2	17q11	NM_021093
RBMY1A1	RNA binding motif protein, family 1, member A1	Yq11	NM_005058
RSHL1	Ortholog of mouse radial spokehead-like 1	19q13	NM_030785
SERPINA2	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A	14q32	NM_006220
SRY	sex determining region Y	Yp11	NM_003140
TCEB3L	transcription elongation factor (SIII) elongin A2	18q21	NM_016427
TZFP	testis zinc finger protein	19q13	NM_014383
WNT3	wingless-type MMTV integration site family, member 3	17q21	NM_030753

Tab. 21: Signifikant regulierte Gene nach Transfektion von 786-0 Zellen mit eGFP-IVT RNA.

Accession-Nr.	Genname	Regulation nach 8h	Regulation nach 24h	Regulation nach 72h
NM_000735	glycoprotein hormaones alpha chain precursor	2,50 (23%)		
NM_016115	ankyrin repeat –containing protein ASB-3	2.44 / 6 %	1.12 / 15 %	1.18 / 10 %
NM_004365	centrin 3	2.26 / 8 %	1.58 / 3 %	1.33 / - %
NM_002157	mitochondrial HSP10 10kDa chaperonin CPN10	2.24 / 5 %	1.65 / 6 %	1.19 / 5 %
NM_001568	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 6	2.17 / 4 %	1.34 / 8 %	0.98 / 1 %
NM_002787	proteasome subunit alpha type 2	2.16 / 3 %	1.47 / 4 %	1.06 / 2 %
NM_006036	KIAA0436	2.09 / 6 %	1.23 / 16 %	1.08 / - %
NM_018453	uncharacterised bone marrow protein BM036	2.07 / 5 %	1.32 / 4 %	1.13 / 6 %
NM_015659	PBK1 protein	2.07 / 3 %	1.44 / 5 %	1.07 / 10 %
XM_372975	TAR DNA-binding protein-43	2.05 / 8 %	1.52 / 8 %	1.19 / 7 %
NM_002294	lysosome-associated membrane glycoprotein 1 precursor	0.50 / 8 %	0.72 / 9 %	0.97 / 3 %
NM_003080	sphingomyelin phosphodieserase 2	0.50 / 6 %	0.71 / 13 %	0.78 / 7 %
NM_018188	FLJ10709	0.50 / 5 %	0.72 / 7 %	0.74 / 3 %
NM_002456	mucin 1 precursor	0.50 / 11 %	0.60 / 7 %	0.73 / 5 %
NM_004566	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3	0.50 / 11 %	0.60 / 16 %	0.88 / 7 %
NM_014225	serine/threonine protein phosphatase 2A	0.49 / 8 %	0.52 / 5 %	0.75 / 9 %
NM_003246	thrombospondin 1 precursor	0.49 / 5 %	0.88 / 6 %	1.17 / 10 %
NM_004064	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B	0.49 / 15 %	0.68 / 14 %	0.59 / 5 %
NM_002353	tumor-associated calcium signal transducer 2 precursor	0.48 / 4 %	0.50 / 13 %	0.52 / 8 %
AK_097824	heat-shock related 70kDa protein 2	0.48 / 4 %	0.85 / 22 %	0.92 / 13 %
NM_005231	SRC substrate cortactin	0.48 / 19 %	0.71 / 9 %	1.11 / 17 %
AK_022870	FLJ12808	0.48 / 10 %	0.77 / 12 %	0.93 / 6 %
NM_003790	WSL-1 protein precursor	0.48 / - %		
NM_006354	DA3-like protein	0.47 / 5 %	0.73 / 6 %	0.84 / 5 %
XM_376567	KIAA1856	0.47 / 1 %		1.30 / - %
XM_375834	NF-kappa B inhibitor epsilon	0.46 / 7 %	0.61 / 8 %	
NM_002384	methyl-CpG binding protein	0.46 / 4 %	0.77 / 11 %	0.80 / 12 %
NM_021078	HGCN5 histone acetyltransferase	0.45 / 5 %		0.84 / 15 %
NM_001719	bone morphogenetic protein 7 precursor	0.45 / 12 %	0.58 / 4 %	0.70 / 7 %
NM_006509	transcription factor RELB	0.43 / 8 %	0.63 / 16 %	0.76 / 8 %
NM_016463	HSPC195	0.43 / 27 %	0.64 / 9 %	0.62 / 7 %
NM_000660	transforming growth factor beta 1 precursor	0.43 / 21 %	0.52 / 18 %	0.73 / 6 %
NM_004393	agrin precursor	0.43 / 14 %	0.63 / 11 %	0.76 / 9 %
NM_003204	nuclear factor erythroid 2 related factor 1	0.42 / 13 %	0.81 / 10 %	0.97 / 6 %
NM_007346	opioid growth factor receptor	0.42 / 11 %	0.76 / 6 %	0.73 / 6 %
NM_006663	RELA associated inhibitor	0.41 / 6 %	0.56 / 20 %	0.75 / 13 %
NM_005716	GAIP C-terminus interacting protein GIPC	0.40 / 7 %	0.65 / 21 %	0.70 / 10 %
NM_000392	canalicular multispecific organic anion transporter 2	0.40 / 6 %	0.74 / - %	
NM_003126	spectrin alpha chain, brain	0.39 / 8 %	0.67 / 5 %	1.06 / 7 %
	NF-kappa B essential modulator	0.39 / 18 %	0.69 / 20 %	0.93 / 14 %
XM_293669	alpha-actinin 4	0.39 / 12 %	0.71 / 6 %	0.82 / 6 %
NM_002428	matrix metalloproteinase-15 precursor	0.39 / 14 %	0.61 / 20 %	0.94 / - %
NM_000546	cellular tumor antigen p53	0.38 / 8 %	0.69 / 5 %	0.90 / 5 %
NM_002775	serine protease HTRA1 precursor	0.38 / - %		
NM_004496	hepatocyte nuclear factor 3-alpha	0.36 / 6 %	0.61 / 16 %	0.74 / 5 %
NM_001728	basigin precursor	0.35 / 3 %	0.75 / 6 %	0.92 / 6 %
AJ_002425	transcription factor p65	0.33 / 21 %	0.42 / 13 %	0.53 / 10 %
NM_006457	enigma protein	0.31 / 9 %	0.61 / 3 %	0.80 / 6 %
NM_002383	MYC-associated zinc finger protein	0.31 / 8 %	0.43 / 4 %	0.63 / 9 %

Accession-Nr.	Genname	Regulation nach 8h	Regulation nach 24h	Regulation nach 72h
NM_005560	laminin alpha 5 chain	0.28 / 6 %	0.36 / 11 %	0.68 / 6 %
NM_024816	FOS-related antigen 2	0.28 / 14 %	0.69 / 11 %	0.80 / 5 %
NM_002378	tyrosine-protein kinase CSK	0.27 / 13 %	0.38 / 12 %	0.49 / 13 %
NM_002229	transcription factor JUN-B	0.24 / 18 %	0.44 / 15 %	0.56 / 11 %
NM_000091	integrin alpha-3 precursor	0.23 / 23 %	0.49 / - %	0.85 / - %
NM_030582	collagen alpha 1 (XVIII) chain	0.23 / 12 %	0.40 / 7 %	0.55 / 5 %
NM_000213	integrin beta-4 precursor	0.21 / 13 %	0.47 / 5 %	0.66 / 7 %
NM_006887	butyrate response factor 2	0.19 / 3 %	0.32 / 8 %	0.49 / 6 %
NM_002404	microfibril-associated glycoprotein precursor	0.61 / 8 %	0.50 / 15 %	0.50 / 8 %
NM_005502	ATP-binding cassette protein M-ABC1	0.53 / 32 %	0.49 / 21 %	0.77 / 9 %
NM_003745	suppressor of cytokine signalling 1	0.61 / 17 %	0.48 / - %	0.65 / 18 %
NM_002502	nuclear factor NF-kappa-B P100 subunit		0.42 / 31 %	

Tab.22: Zusammenstellung der Gene, die sich anhand ihrer Funktion gruppieren lassen, die durch Transfektion von MCF-7 Zellen mit SSX2, SYT-SSX1 oder SYT-SSX2 im Vergleich zu einer Kontrolltransfektion mit eGFP mindestens um den Faktor 2¹ differentiell exprimiert werden bei einem Signifikanzkriterium von 5%. Die nicht angegebenen Werte liegen im nicht signifikanten Regulationsbereich d.h. <2¹. Bei den in der Tabelle angegebenen Werten handelt es sich jeweils um die Exponenten zur Basis zwei; die sich ergebende Zahl drückt den Faktor der differentiellen Expression aus.

Funkt. Gruppe	Gen Id.	Genname	Kat.	Veränderung nach 8h			Kat.	Veränderung nach 24h		
				SSX2	SYT-SSX1	SYT-SSX2		SSX2	SYT-SSX1	SYT-SSX2
Wachstumsfaktoren	NM_002569.1	furin					D	0,24	0,52	1,05
	D86962.1	growth factor receptor-bound protein 10					D	-0,16	0,86	1,84
	NM_006548.1	IGF-II mRNA-binding protein 2	A	1,10	1,65	1,76	D	0,99	0,83	1,83
	M31159.1	insulin-like growth factor binding protein 3					D	0,03	0,61	1,28
	NM_002178.1	insulin-like growth factor binding protein 6					F	1,04	0,43	1,12
	NM_001553.1	insulin-like growth factor binding protein 7					D	0,04	0,66	1,60
	NM_016545.1	immediate early response 5					D	0,35	0,54	1,37
	NM_002826.2	quiescin Q6					D	0,44	0,62	1,05
	BC000125.1	transforming growth factor, beta 1	F	1,27	0,93	1,04	D	0,94	0,81	1,97
	D50683.1	transforming growth factor, beta receptor II	-D	-0,20	-0,55	-1,24				
	AF022375.1	vascular endothelial growth factor	D	0,23	0,76	1,27	D	0,05	0,70	1,37
	NM_024745.1	likely ortholog of mouse Shc SH2-domain binding protein 1					-D	-0,67	-0,34	-1,11
	AL133386	bone morphogenetic protein 5	-D	-0,43	0,02	-1,06				
	AL157414	bone morphogenetic protein 7	E	-0,02	1,11	1,44	E	-0,16	0,65	1,50
	BC000704.1	tetraspan 3					E	0,08	1,48	2,08
	M87771.1	fibroblast growth factor receptor 2	E	0,14	1,04	1,04				
	NM_001657.1	amphiregulin					-E	0,22	-0,96	-1,10
	NM_000142.2	fibroblast growth factor receptor 3	E	0,95	2,14	2,85	E	-0,08	1,44	2,42
	M63310.1	annexin A3					-E	-0,05	-0,95	-1,50
	AB018580.1	aldo-keto reductase family 1, member C3	-E	-0,62	-1,18	-1,57	-E	-0,53	-1,02	-1,17
NM_001565.1	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	D	-0,12	-0,87	1,65					
NM_001395.1	dual specificity phosphatase 9	D	0,18	0,81	1,49					
NM_000399.2	early growth response 2	B	1,06	-0,42	0,45					

Funkt. Gruppe	Gen Id.	Genname	Kat.	Veränderung nach 8h			Kat.	Veränderung nach 24h		
				SSX2	SYT-SSX1	SYT-SSX2		SSX2	SYT-SSX1	SYT-SSX2
Wachstumsfaktoren	NM_004430.1	early growth response 3					E	0,18	1,29	1,36
	NM_001965.1	early growth response 4	D	0,62	-0,12	1,07				
	NM_000641.1	interleukin 11	F	1,75	0,89	1,40				
	NM_002507.1	nerve growth factor receptor member 16	E	0,26	1,27	2,16				
	BC001422.1	placental growth factor	E	0,13	1,74	2,40				
	NM_002607.1	platelet-derived growth factor alpha polypeptide	E	0,37	1,13	1,55				
	NM_003378.1	VGF nerve growth factor inducible	D	0,78	0,82	1,39	D	0,74	0,48	1,21
Onkogene + tumorassoziierte Gene	NM_012323	v-maf F					A	1,58	1,47	2,34
	NM_005079	tumor protein D52					-A	-0,10	-0,62	-1,07
	NM_005556	keratin 7					B	1,15	-0,17	-0,38
	M_31213	Papillary thyroid carcinoma-encoded protein					-B	-1,22	0,10	0,19
	NM_001333	cathepsin L2					D	0,25	0,83	1,50
	NM_014314	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide					D	0,48	0,62	1,28
	XM_496651	human L-Myc protein gene					D	-0,09	0,63	1,40
	NM_012302	latrophilin 1					D	-0,17	0,30	1,07
	NM_006500	melanoma cell adhesion molecule					D	0,74	0,76	1,30
	NM_012334	myosin X					D	0,49	0,60	1,34
	NM_006618	putative DNA/chromatin binding motif					D	0,64	0,63	1,07
	NM_003107	SOX-4					D	-0,04	0,54	1,01
	NM_005360	v-maf					D	0,31	0,50	1,50
	NM_030761	wingless-type MMTV member 4					D	-0,06	0,99	1,13
	NM_006522	wingless-type MMTV member 6					D	0,16	0,71	1,75
	NM_000610	CD44 antigen	-E	-0,27	-0,66	-1,07	-D	-0,06	-0,53	-1,09
	AF_022109	CDC6 cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae)					-D	-0,58	-0,26	-1,08
	NM_007331	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1					-D	-0,29	-0,44	-1,03
	NM_006818	ALL1-fused gene from chromosome 1q					E	0,09	1,10	1,48
	NM_001706	B-cell CLL/lymphoma 6 (E	0,08	0,98	1,51
NM_022083	chromosome 1 open reading frame 24					E	0,07	1,78	2,64	

Funkt. Gruppe	Gen Id.	Genname	Kat.	Veränderung nach 8h			Kat.	Veränderung nach 24h		
				SSX2	SYT-SSX1	SYT-SSX2		SSX2	SYT-SSX1	SYT-SSX2
Onkogene + tumorassoziierte Gene	NM_004702	cyclin E2					-D	-0,64	-0,27	-1,07
	NM_000389	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	D	0,70	0,90	1,04				
	NM_000076	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	E	0,32	1,88	3,32	E	-0,02	1,18	3,21
	NM_006096	N-myc downstream regulated gene 1					E	0,09	1,77	1,88
	NM_003944	selenium binding protein 1					E	0,11	1,05	1,19
	NM_001218	carbonic anhydrase XII					-E	-0,57	-0,72	-1,22
	NM_006989	Ca2+-promoted Ras inactivator	D	0,41	0,59	1,45				
	NM_001338	coxsackie virus and adenovirus receptor	E	1,01	1,45	1,52				
	NM_005860	folliculin-like 3	E	0,19	1,32	1,47				
	NM_004789	LIM homeobox protein 2	E	-0,33	1,44	2,33				
	NM_006822	RAB40B	D	-0,18	0,76	1,28				
	NM_004165	Ras-related associated with diabetes	F	1,03	0,90	1,28				
	NM_002923	regulator of G-protein signalling	B	1,36	0,07	0,47				
	NM_014059	RGC32 protein	D	0,44	0,22	1,94				
	NM_014720	Ste20-related serine/threonine kinase	-E	-0,73	-0,86	-1,21				
	NM_006000	tubulin, alpha 1	D	0,51	0,54	1,01				
	NM_001069	tubulin, beta polypeptide	A	0,96	1,82	2,45				
	NM_006291	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2	D	0,38	1,02	1,36				
	NM_002546	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (-F	1,39	-0,06	-0,84				
	NM_002353	tumor-associated calcium signal transducer 2	-E	-0,25	-0,75	-1,28				
NM_006113	vav 3 oncogene	-F	-1,13	-0,37	-1,20					
NM_005252	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	D	0,67	0,31	1,56					
XM_034274	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 1	-D	-0,22	-0,34	-1,05					

Funkt. Gruppe	Gen Id.	Genname	Kat.	Veränderung nach 8h			Kat.	Veränderung nach 24h		
				SSX2	SYT-SSX1	SYT-SSX2		SSX2	SYT-SSX1	SYT-SSX2
Tumor-suppressor	NM_014333	immunoglobulin superfamily, member 4					E	0,25	1,37	1,96
	NM_001753	caveolin 1, caveolae protein, 22kDa	-E	-0,54	-0,67	-1,27	-E	-0,35	-0,56	-1,16
	NM_001233	caveolin 2	-E	-0,37	-0,78	-1,52	-E	-0,24	-0,76	-1,33
	NM_005434	BENE protein	-D	-0,25	-0,61	-1,30				
Neuronale Gene	NM_006528	tissue factor pathway inhibitor 2	B	1,02	-0,70	-0,64				
	NM_001703.1	brain-specific angiogenesis inhibitor 2					D	0,17	0,44	1,12
	NM_022467.1	carbohydrate (N-acetylgalactosamine 4-0) sulfotransferase 8	D	-0,03	0,87	1,01	D	0,18	0,60	1,19
	AJ224869	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	D	0,61	0,71	1,44	D	0,22	0,67	1,86
	BG546884	cysteine-rich motor neuron 1					D	0,14	0,76	1,20
	NM_019885.1	cytochrome P450 retinoid metabolizing protein	A	1,47	1,11	2,30	D	0,13	0,39	1,70
	NM_004405.2	distal-less homeo box 2	E	0,31	1,05	2,09	D	0,04	0,74	2,15
	NM_004395.1	drebrin 1	D	0,67	0,84	1,02	D	0,26	0,60	1,08
	AW189015	ephrin-A3	D	0,58	0,84	1,59	D	0,13	0,79	1,34
	NM_004438.1	EphA4	D	0,08	0,69	1,01	D	0,27	0,89	1,16
	X75208	EphB3	D	0,33	0,75	1,37				
	AL556409	galanin	D	0,46	0,99	1,24	D	-0,06	0,37	1,21
	AF004222	reticulon 2					D	0,38	0,82	1,04
	NM_003043.1	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6	-A	-1,26	-1,30	-1,10	D	0,27	0,62	1,40
	AA719797	ESTs, Weakly similar to JC5624 olfactory receptor HTPCR92 - human [H.sapiens]					-D	-0,26	-0,45	-1,26
	NM_001823.1	creatine kinase, brain					E	0,61	1,35	2,35
	AF141347.1	tubulin, alpha 3					E	-0,10	1,37	2,01
	BF059159	roundabout, axon guidance receptor, homolog 1 (Drosophila)					E	0,10	1,17	1,68
	AL136550.1	brain cell membrane protein 1	D	0,53	0,28	1,02				
	NM_007030.1	brain-specific protein p25 alpha	E	0,39	1,00	1,30				
BG111635	calpastatin	-E	-0,02	-0,64	-1,13					
NM_006426.1	dihydropyrimidinase-like 4	E	0,50	1,23	1,93					

Funkt. Gruppe	Gen Id.	Genname	Kat.	Veränderung nach 8h			Kat.	Veränderung nach 24h		
				SSX2	SYT-SSX1	SYT-SSX2		SSX2	SYT-SSX1	SYT-SSX2
Neuronale Gene	AA142942	ESTs, Weakly similar to neuronal thread protein [Homo sapiens]	-E	0,28	-0,79	-1,11				
	NM_013984.1	neuregulin 2	D	-0,11	0,12	1,10				
	M69148.1	midkine (neurite growth-promoting factor 2)	-C	-0,32	-0,68	-0,61				
	NM_015678.1	neurobeachin	-D	0,20	-0,57	-1,05				
	NM_005010.1	neuronal cell adhesion molecule	-D	-0,28	-0,72	-1,11				
	NM_002522.1	neuronal pentraxin I	E	0,37	1,83	2,75				
	NM_000909.1	neuropeptide Y receptor Y1	-D	0,53	-0,69	-1,30				
	AA576961	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	-E	-0,62	-0,90	-0,94				
	NM_021785.2	retinoic acid induced 2	E	0,82	1,30	1,70				
	NM_005985.1	snail homolog 1	D	0,32	0,71	1,56				
NM_007231.1	solute carrier family 6 member 14	-E	0,05	-0,86	-1,74					
NM_005629.1	solute carrier family 6 member 8	A	1,27	1,31	2,06					
Transkriptionsfaktoren	NM_001674.1	activating transcription factor 3	D	1,03	0,55	1,49	D	0,69	0,46	1,44
	NM_001430.1	endothelial PAS domain protein 1 (HIF2A)	E	0,13	1,04	1,09	D	0,23	0,78	1,27
	AF019214.1	HMG-box containing protein 1					D	0,37	0,83	1,14
	AF280094.1	SP110 nuclear body protein					D	0,49	0,62	1,00
	NM_021953.1	forkhead box M1					-D	-0,31	-0,34	-1,04
	AW027312	regulatory factor X, 5					E	0,61	1,05	1,17
	BF209507	activated RNA polymerase II transcription cofactor 4	-D	-0,41	-0,40	-0,91				
	NM_004364.1	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	D	0,05	0,93	1,48				
	NM_012188.2	forkhead box l1	-D	0,46	-0,56	-1,06				
	AU145890	Homo sapiens cDNA FLJ11796 fis	D	-0,14	0,89	1,23		-0,07	0,97	1,35
	U12767.1	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	D	0,15	0,38	1,20				
	NM_000238.1	potassium voltage-gated channel, subfamily H member 2	D	0,11	0,74	1,27				
	AI572079	snail homolog 2	-E	-0,55	-1,90	-1,91				
	NM_018419.1	SRY (sex determining region Y)-box 18	E	0,35	1,40	2,55				
	AJ223321	zinc finger protein 238	E	0,75	1,05	1,83				

Funkt. Gruppe	Gen Id.	Genname	Kat.	Veränderung nach 8h			Kat.	Veränderung nach 24h		
				SSX2	SYT-SSX1	SYT-SSX2		SSX2	SYT-SSX1	SYT-SSX2
Signaltransduktion	NM_002741	protein kinase C-like 1					-A	-0,58	-0,92	-1,09
	NM_000729	cholecystokinin	B	1,07	0,19	0,10	B	1,17	-0,07	0,04
	NM_000737	chorionic gonadotropin, beta polypeptide					B	1,12	-0,03	0,52
	NM_003856	interleukin 1 receptor-like 1					B	1,19	0,20	0,30
	NM_006449	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 3					D	0,27	0,58	1,20
	NM_000264	patched homolog					D	0,01	0,50	1,47
	NM_006202	phosphodiesterase 4A, cAMP-specific	E	0,37	1,17	2,14	D	-0,01	0,50	1,55
	NM_001124	adrenomedullin	E	0,63	1,16	1,64	E	0,29	1,11	1,86
	NM_002662	phospholipase D1, phosphatidylcholine-specific					D	0,53	0,70	1,01
	NM_000676	adenosine A2b receptor	-A	0,21	-0,85	-1,34				
	NM_007315	signal transducer and activator of transcription					D	0,42	0,74	1,28
	NM_003866	inositol polyphosphate-4-phosphatase, type II					-D	0,47	-0,30	-1,10
	NM_003877	suppressor of cytokine signaling 2					-E	-0,13	-0,70	-1,11
	NM_000700	annexin A1	-A	-0,12	-1,05	-0,77				
	NM_001220	calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II beta	E	-0,15	1,02	1,53				
	NM_002026	fibronectin 1	-E	-0,16	-0,85	-0,94				
	NM_013281	fibronectin leucine rich transmembrane protein 3	-D	-0,22	-0,46	-1,27				
	NM_000407	glycoprotein Ib (platelet), beta polypeptide	D	0,09	0,65	1,00				
	NM_005261	GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle	B	1,87	-0,25	0,75				
	NM_004297	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 14	-F	-0,95	-0,50	-1,05				
NM_144586	hypothetical protein MGC29643	B	1,05	0,07	0,13					
NM_006558	KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 3	D	0,59	0,83	1,36					
NM_017572	MAP kinase-interacting serine/threonine kinase 2	F	1,11	0,84	1,01					

Funkt. Gruppe	Gen Id.	Genname	Kat.	Veränderung nach 8h			Kat.	Veränderung nach 24h		
				SSX2	SYT-SSX1	SYT-SSX2		SSX2	SYT-SSX1	SYT-SSX2
Signaltransduktion	NM_000916	oxytocin receptor	-E	-0,28	-1,02	-1,16				
	NM_005825	RAS guanyl releasing protein 2					D	0,87	-0,03	1,67
	NM_018287	Rho GTPase activating protein 12	-D	0,29	-0,63	-1,16				
	NM_004626	wingless-type MMTV integration site family, member 11	D	0,07	0,89	2,10				
Histone	NM_021065.1	H2A histone family, member G					B	1,09	0,37	0,89
	AL353759	H2A histone family, member L					D	0,75	0,75	1,13
	BC002842.1	H2B histone family, member B					D	0,75	0,51	1,02
	NM_003530.1	H3 histone family, member B	B	1,59	0,48	0,92	D	0,85	0,65	1,22
	AA451996	H2A histone family, member O					F	1,39	0,79	1,30
	BC001131.1	H2B histone family, member A	B	1,69	0,36	0,53	F	1,40	0,75	1,36
	NM_003528.1	H2B histone family, member Q	B	1,00	0,18	0,26	F	1,32	0,86	1,45
	NM_003536.1	H3 histone family, member K	B	1,26	0,07	0,23	F	1,25	0,75	1,20
	NM_003543.2	H4 histone family, member H					F	1,61	0,69	1,08
	NM_021052.1	H2A histone family, member A						1,62	0,80	0,92
	NM_003509.1	H2A histone family, member C	B	1,10	0,08	0,29				
	NM_018267.1	H2A histone family, member J	B	1,09	0,17	0,02				
	NM_021064.1	H2A histone family, member P	B	1,69	-0,06	0,32				
	NM_003548.1	H4 histone, family 2	B	1,08	0,08	0,33				
Biosynthese und Metabolismus	NM_002970.1	spermidine/spermine N1-acetyltransferase					B	1,25	0,54	0,64
	BC000723.1	carnitine acetyltransferase					C	0,15	1,03	0,90
	U56418.1	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 2	E	0,35	1,20	1,60	D	-0,04	0,74	1,46
	NM_000698.1	arachidonate 5-lipoxygenase					D	0,29	0,65	1,09
	NM_003654.1	carbohydrate (keratan sulfate Gal-6) sulfotransferase 1	D	0,02	0,77	1,50	D	0,04	0,43	1,18
	NM_018413.1	chondroitin 4-sulfotransferase					D	0,02	0,41	1,12
	NM_000127.1	exostoses (multiple) 1					D	0,27	0,82	1,19
	W87398	likely homolog of mouse glucuronyl C5-epimerase					D	-0,31	0,79	1,33
	NM_001071.1	thymidylate synthetase					-D	-0,64	-0,51	-1,11
	AB050855.1	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 3					-D	-0,15	-0,15	-1,04
	NM_005165.1	aldolase C					E	0,40	1,25	1,86
	NM_000050.1	argininosuccinate synthetase					E	-0,07	1,94	2,64
	NM_000274.1	ornithine aminotransferase					E	0,07	1,08	1,90

Funkt. Gruppe	Gen Id.	Genname	Kat.	Veränderung nach 8h			Kat.	Veränderung nach 24h		
				SSX2	SYT-SSX1	SYT-SSX2		SSX2	SYT-SSX1	SYT-SSX2
Biosynthese und Metabolismus	NM_020139.1	oxidoreductase UCPA					E	-0,09	1,11	1,66
	NM_024642.1	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 12 (GalNAc-T12)					E	-0,29	2,21	3,08
	AF074331.1	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2	-D	0,06	-0,51	-1,13	-E	0,03	-0,81	-1,15
	NM_001353.2	aldo-keto reductase family 1, member C1					-E	0,04	-0,87	-1,05
	AF195624.1	choline phosphotransferase 1					-E	-0,48	-0,77	-1,02
	BC000192.1	dihydrofolate reductase					-E	-0,80	-0,71	-1,15
	NM_000463.1	UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A1					-E	-0,21	-0,91	-1,21
	NM_019093.1	UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A3	-E	-0,53	-0,79	-1,34	-E	-0,27	-0,91	-1,16
	NM_001072.1	UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A6					-E	-0,13	-0,77	-1,24
	AV691323	UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A9	-E	-0,57	-0,70	-1,22	-E	-0,26	-1,02	-1,22
	NM_001159.2	aldehyde oxidase 1	-E	-0,12	-1,00	-1,39				
	NM_020299.1	aldo-keto reductase family 1, member B10 (aldose reductase)	-E	-0,59	-1,11	-1,03				
	AL354872	cystathionase	B-E	1,09	-0,88	-0,92				
	BC000961.2	degenerative spermatocyte homolog, lipid desaturase	-E	-0,02	-0,73	-1,07				
	NM_005794.1	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2	B	1,15	-0,18	0,03				
	NM_003837.1	fructose-1,6-bisphosphatase 2	B	1,22	0,05	0,25				
	NM_000196.1	hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 2	E	0,29	1,00	1,59				
	NM_020379.1	mannosidase, alpha, class 1C, member 1	E	0,01	1,35	1,88				
NM_014403.1	sialyltransferase 7D	E	0,16	1,04	1,14					

Funkt. Gruppe	Gen Id.	Genname	Kat.	Veränderung nach 8h			Kat.	Veränderung nach 24h		
				SSX2	SYT-SSX1	SYT-SSX2		SSX2	SYT-SSX1	SYT-SSX2
Kollagene	NM_001853.1	collagen, type IX, alpha 3					D	-0,06	0,87	1,52
	X99135	collagen, type VI, alpha 1					D	0,01	0,61	1,44
	AY029208.1	collagen, type VI, alpha 2					D	0,27	0,72	1,28
	NM_000088.1	collagen, type I, alpha 1					E	-0,20	1,18	2,22
	AI130969	collagen, type V, alpha 1					E	0,05	1,06	1,92
Hämoglobin-assoziierte Gene	AF021834.1	tissue factor pathway inhibitor					B	1,11	-0,35	-0,35
	AI190022	acetylcholinesterase	D	0,66	0,69	1,23	D	0,60	0,74	1,26
	AF105974.1	Alpha one globin	E	0,90	1,80	2,65	E	0,65	1,84	3,37
	T50399	hemoglobin, alpha 1	A	1,00	2,10	2,64	E	0,87	2,09	3,31
	BC005931.1	hemoglobin, alpha 2	E	0,82	1,90	2,57	E	0,85	1,92	3,36
	V00489	human-alpha globin gene with flanks	E	0,84	1,99	2,54	E	0,72	1,88	3,08
Transporter	NM_004669.1	chloride intracellular channel 3		0,85	0,41	0,69	A	1,25	1,26	1,40
	N74607	aquaporin 3					B	1,32	0,21	0,26
	AF000381.1	folate receptor 1 (adult)					C	0,03	1,00	0,29
	NM_021727.1	fatty acid desaturase 3					D	-0,01	0,76	1,34
	U41163	Highly similar to S6AA_HUMAN Sodium- and chloride-dependent creatine transporter 2 (CT2)	D	0,79	0,77	1,44	D	0,43	0,48	1,02
	NM_006423.1	Rab acceptor 1 (prenylated)					D	0,62	0,74	1,04
	NM_030971.1	similar to rat tricarboxylate carrier-like protein					D	0,31	0,61	1,07
	NM_005630.1	solute carrier family 21 member 2	D	0,22	0,95	1,17	D	0,11	0,40	1,23
	NM_003059.1	solute carrier family 22 member 4					D	0,12	0,72	1,06
	NM_004915.2	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1					E	0,37	1,83	2,49
	U05598.1	aldo-keto reductase family 1, member C2					-E	0,06	-0,80	-1,12
	AF098951.2	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2					-E	-0,17	-0,67	-1,08
	NM_016121.1	NY-REN-45 antigen					-E	-0,54	-0,79	-1,00
	NM_003645.1	solute carrier family, member 2	-D	-0,45	-0,41	-0,84	-F	-0,92	-0,47	-1,20
	BC000006.1	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 1 polypeptide	-E	0,00	-0,69	-1,09				
	AI539710	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1	-E	-0,06	-0,74	-1,05				
NM_006598.1	solute carrier family 12 member 7	D	0,25	0,77	1,06					

Gruppe	Gen Id.	Genname	Kat.	Veränderung nach 8h			Kat.	Veränderung nach 24h		
				SSX2	SYT-SSX1	SYT-SSX2		SSX2	SYT-SSX1	SYT-SSX2
Trans- porter	NM_004207.1	solute carrier family 16 member 3	E	0,35	1,44	1,73				
	NM_003459.1	solute carrier family 30 member 3	D	0,13	0,67	1,04				
	AB040875.1	solute carrier family 7, member 11	-A	-1,26	-1,30	-1,10				
Immunsystem	NM_004116.1	FK506 binding protein 1B, 12.6 kDa	D	0,80	0,83	1,51	D	0,28	0,53	1,36
	D83043.1	major histocompatibility complex, class I, B					D	0,46	0,54	1,09
	AI583173	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1					D	0,18	1,06	1,22
	NM_025217.1	UL16 binding protein 2					D	-0,06	0,38	1,11
	NM_007005.1	BCE-1 protein					E	-0,10	1,16	1,50
	NM_004750.1	cytokine receptor-like factor 1					E	0,16	1,38	2,49
	AF052094.1	dipeptidylpeptidase 7	E	0,15	1,33	1,29	E	0,42	0,99	1,37
	NM_013314.1	B-cell linker	-E	-0,19	-1,43	-1,18				
	NM_005475.1	lymphocyte adaptor protein	D	-0,08	0,59	1,50				
	NM_004221.1	natural killer cell transcript 4	D	0,72	0,34	1,07				
	Interferon-induzierte Gene	NM_002534.1	2',5'-oligoadenylate synthetase 1					D	0,39	0,45
AF063612.1		2'-5'-oligoadenylate synthetase-like					D	0,41	0,42	1,34
NM_006419.1		chemokine (C-X-C motif) ligand 13					D	0,27	0,56	1,15
NM_006332.1		interferon, gamma-inducible protein 30					D	0,62	0,66	1,38
BC001356.1		interferon-induced protein 35					D	0,49	0,64	1,06
NM_001548.1		interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1					D	0,66	0,82	1,45
BE888744		interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2					D	0,31	0,59	1,06
U88964		interferon stimulated gene					F	1,31	0,78	1,08
NM_001549.1		interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 4					D	0,49	0,41	1,24
AF030514.1		chemokine (C-X-C motif) ligand 11	D	-0,19	-0,69	1,11				
AF208043.1		interferon, gamma-inducible protein 16	D	0,06	-0,41	1,00				

Funkt. Gruppe	Gen Id.	Genname	Kat.	Veränderung nach 8h			Kat.	Veränderung nach 24h		
				SSX2	SYT-SSX1	SYT-SSX2		SSX2	SYT-SSX1	SYT-SSX2
Stress- / Apoptose-assoziierte Gene	NM_006030.1	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 2	D	-0,10	0,47	1,40	D	0,18	0,41	1,54
	U16996.1	dual specificity phosphatase 5					D	0,02	0,53	1,02
	NM_014456.1	programmed cell death 4					D	-0,01	1,15	1,19
	NM_017745.1	BCL-6 interacting corepressor	E	0,48	1,44	1,93	E	0,46	1,26	2,30
	NM_019058.1	HIF-1 responsive RTP801		0,99	0,51	0,60	E	0,90	1,55	1,99
	AL132665.1	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like	-E	-0,52	-0,82	-1,01				
	U56725.1	heat shock 70kDa protein 1A	B	1,35	0,61	0,74				
	L40378.1	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 9	F	1,71	0,77	1,55				
	AF070673.1	stannin	D	0,46	0,62	1,02				
Zelladhäsion + Komponenten der extrazellulären Matrix	NM_004105.2	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1					-A	-0,33	-0,64	-1,43
	NM_002281.1	keratin, hair, basic, 1					B	2,54	0,02	-0,38
	NM_002307.1	lectin, galactoside-binding, soluble, 7 (galectin 7)	B	1,21	0,11	0,24	B	1,45	0,05	0,29
	NM_002318.1	lysyl oxidase-like 2					B	1,38	-0,26	-0,14
	AV733308	integrin, alpha 6					D	0,20	0,67	1,26
	NM_015385.1	sorbin and SH3 domain containing 1					D	0,01	0,40	1,00
	AF207990.1	fer-1-like 3, myoferlin					-D	0,18	-0,54	-1,09
	AI610869	mucin 1, transmembrane					E	0,65	1,14	1,27
	NM_002356.4	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate					E	-0,02	1,18	1,12
	NM_016081.1	palladin					-E+B	0,07	-0,86	-1,20
	AF193421.1	activity-regulated cytoskeleton-associated protein	D	0,66	0,84	2,12				
	BE791251	claudin 3	-E	-0,05	-0,54	-1,02				
	AI653981	L1 cell adhesion molecule	A	1,11	1,70	1,74				
	NM_017821.1	rhomboid, veinlet-like 2 (Drosophila)	D	0,41	0,67	1,33				
	NM_000362.2	tissue inhibitor of metalloproteinase 3	B	1,07	0,40	0,69				
	NM_007127.1	villin 1	B	1,26	0,17	0,41				

Funkt. Gruppe	Gen Id.	Genname	Kat.	Veränderung nach 8h			Kat.	Veränderung nach 24h		
				SSX2	SYT-SSX1	SYT-SSX2		SSX2		SYT-SSX2
Zellentwicklung und -differenzierung	Z21533.1	hematopoietically expressed homeobox					B	-0,31	0,33	1,03
	NM_002166.1	inhibitor of DNA binding 2	D	0,41	0,64	1,18	D	0,20	0,70	1,52
	NM_030926.1	integral membrane protein 2C					D	-0,06	0,63	1,54
	AB033025.1	KIAA1199 protein	A	1,10	1,35	1,40	D	0,93	0,56	1,27
	NM_004235.1	Kruppel-like factor 4 (gut)					D	0,15	0,72	1,06
	BC003600.1	LIM domain only 4					D	-0,20	0,74	1,29
	D31771.1	msh homeo box homolog 2					D	-0,10	0,84	1,18
	AL049569	peptidyl arginine deiminase, type II					D	0,60	0,91	1,72
	AL541302	serine proteinase inhibitor, clade E member 2					D	0,25	0,69	2,16
	NM_005982.1	sine oculis homeobox homolog 1					D	0,20	0,30	1,02
	NM_003260.1	transducin-like enhancer of split 2 (E(sp1) homolog					D	-0,10	0,51	1,11
	NM_005078.1	transducin-like enhancer of split 3 (E(sp1) homolog	E	0,51	1,24	1,21	D	0,44	0,56	1,14
	AF054841.1	transmembrane 4 superfamily member 7					D	0,02	0,98	1,60
	NM_005797.1	epithelial V-like antigen 1	-E	-0,59	-1,22	-1,65	-D	0,21	-0,36	-1,07
	NM_003670.1	basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2					E	0,81	1,04	1,38
	NM_001321.1	cysteine and glycine-rich protein 2	A	1,72	1,75	1,94	E	0,29	0,97	2,41
	NM_002275.1	keratin 15					E	0,09	1,47	1,34
	AF003934.1	prostate differentiation factor					-E	0,09	-1,12	-1,49
	BC005127.1	adipose differentiation-related protein	B	1,07	-0,10	-0,15				
	NM_001934.1	distal-less homeobox 4	D	0,10	0,46	1,00				
	AF029778.1	jagged 2	E	0,04	1,57	2,18				
	NM_002448.1	msh homeo box homolog 1	D	0,30	0,68	1,72				
	BE328496	muscleblind-like protein MBLL39	-E	-0,38	-0,94	-1,07				
	AV724216	NDRG family member 4	D	0,59	0,80	1,09				
	NM_007079.1	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 3	E	-0,19	1,08	1,59				
	BF970427	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase	-E	-0,69	-0,85	-1,38				

Funkt. Gruppe	Gen Id.	Genname	Kat.	Veränderung nach 8h			Kat.	Veränderung nach 24h		
				SSX2	SYT-SSX1	SYT-SSX2		SSX2	SYT-SSX1	SYT-SSX2
Zellzyklus	NM_004354.1	cyclin G2					A	1,06	1,52	2,36
	AF225416.1	AD024 protein					-A	-0,85	-0,65	-1,13
	NM_005978.2	S100 calcium binding protein A2	B	2,37	0,13	0,07	B	3,01	-0,01	-0,33
	NM_014624.2	S100 calcium binding protein A6 (calcyclin)					B	1,33	0,19	0,10
	NM_020672.1	S100 calcium binding protein A14					-D	1,42	-0,47	-0,98
	AF321125.1	DNA replication factor					-D	-0,34	-0,38	-1,01
	U34690.1	coronin, actin binding protein, 1A	D	0,57	0,79	1,04				
	U64317.1	enhancer of filamentation 1 (cas-like docking; Crk-associated substrate related)	-A	-0,45	-0,87	-1,40				
	NM_018518.1	MCM10 minichromosome maintenance deficient 10 (S. cerevisiae)	D	0,20	0,66	1,23				
	NM_006622.1	serum-inducible kinase	-E	-0,53	-0,64	-1,22				

Publikationen

Koslowski,M., Bell,C., Seitz,G., Lehr,H.A., Roemer,K., Muntefering,H., Huber,C., Sahin,U., and Tureci,O. (2004). Frequent nonrandom activation of germ-line genes in human cancer. *Cancer Res.* 64, 5988-5993.

Koslowski,M., Tureci,O., Bell,C., Krause,P., Lehr,H.A., Brunner,J., Seitz,G., Nestle,F.O., Huber,C., and Sahin,U. (2002). Multiple splice variants of lactate dehydrogenase C selectively expressed in human cancer. *Cancer Res.* 62, 6750-6755.

Tureci,O., Sahin,U., Koslowski,M., Buss,B., Bell,C., Ballweber,P., Zwick,C., Eberle,T., Zuber,M., Villena-Heinsen,C., Seitz,G., and Pfreundschuh,M. (2002). A novel tumour associated leucine zipper protein targeting to sites of gene transcription and splicing. *Oncogene* 21, 3879-3888.

Poster

M. Koslowski, Ö. Türeci, C. Bell, C. Huber, U. Sahin. A transmembrane phosphatase selectively expressed in human cancer is associated with early metastatic disease. Jahrestagung DGHO, ÖGHO, SGH/SGMO (2003)