

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Abteilung für Innere Medizin II
des Krankenhauses Nordwest
Frankfurt am Main

**Identifikation eines neuen Brustkrebsantigens NW-BR-3
mittels serologischem Screening (SEREX)**

Dissertation zur Erlangung eines Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von
Marc Hendrik Unkelbach
Bielefeld

Frankfurt am Main 2005

Für Leo

Dekan:	Professor Dr. med. Joseph Pfeilschifter
Referent:	Privatdozent Dr. med. Dirk Jäger
Koreferent:	Professor Dr. med. Martin-Leo Hansmann
Tag der Promotion:	2. Mai 2006

1	Einleitung	5
1.1	Ätiologie des Mammakarzinoms.....	5
1.2	Einteilung der Mammakarzinome	6
1.3	Tumorimmunologische Aspekte und Fragestellung.....	9
1.3.1	Krebstherapie.....	9
1.3.2	Humorales vs. zelluläres Immunsystem.....	10
1.4	SEREX	13
1.5	Fragestellung	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Methodisches Konzept dieser Arbeit	18
2.2	Allgemeines zur SEREX-Methode	18
2.3	Patientenserum	19
2.4	Allgemeine Vorbereitungen	19
2.4.1	Bakterienstämme	19
2.4.2	Anfertigen der Glycerolstocks.....	20
2.4.3	Anfertigen der Bakterienkulturen für die Transfektion.....	20
2.4.4	Amplifikation der cDNA-Library	21
2.4.5	Bestimmung des Anteils rekombinanter Klone.....	21
2.4.6	Präabsorbtion der Seren.....	21
2.5	Screening	22
2.5.1	Transfektion und Blotten der exprimierten Proteine	22
2.5.2	Färben.....	22
2.5.3	Auswertung und Identifizierung „positiver“ Klone	23
2.5.4	Klonierung.....	24
2.5.5	In vivo Exzision.....	24
2.6	DNA Extraktion	25
2.7	Exzision.....	26
2.8	Sequenzierung	26
2.9	Analyse der gewonnenen Daten.....	27
2.10	RT-PCR.....	27
2.11	Gelelektrophorese.....	28
2.12	Material und Aufarbeitung	28

2.13	Konstruktion der cDNA expression library.....	29
2.14	Blotting.....	29
2.15	cDNA Extraktion.....	30
2.16	RT-PCR.....	30
2.17	Datenbankabgleich.....	30
2.18	Northern Blot.....	31
2.19	„Rapid Amplification of cDNA Ends“ (RACE).....	31
3	Ergebnisse.....	32
3.1	Positive Klone.....	32
3.2	NY-BR-1 als Brustdrüsendifferenzierungs-Antigen.....	33
4	Diskussion.....	39
5	Zusammenfassung.....	42
6	Abstract.....	43
7	Literatur.....	44
8	Danksagung.....	48
9	Lebenslauf.....	49
10	Ehrenwörtliche Erklärung.....	52

1 Einleitung

Ziel dieser Einteilung ist, einen Überblick über die heute bekannten Ätiologien der Mammakarzinome zu geben, die gängige klinische Einteilung zu beschreiben, wichtige molekulare Faktoren und Therapiekonzepte zu erläutern, sowie eine kurze Einführung in die Funktion des Immunsystems zu geben.

1.1 Ätiologie des Mammakarzinoms

In der Bundesrepublik Deutschland erkranken pro Jahr etwa 51700 Frauen an Brustkrebs¹. Das Mammakarzinom ist damit die häufigste Krebserkrankung der Frau und für 25,9% aller Malignomneuerkrankungen (vor Darmkrebs, Leukämien und Lymphomen, Tumoren des Gebärmutterkörpers, Magenkrebs, Bronchialkarzinom und Ovarialkarzinom) bei Frauen verantwortlich. Das theoretische Risiko, bis zum Alter von 74 Jahren an Brustkrebs zu erkranken, beträgt für jede anderweitig gesunde Frau ca. 8%.

Laut Angaben des Statistischen Bundesamtes starben in Deutschland im Jahr 2002 knapp 18000 Frauen an Brustkrebs.

Die Altersverteilung ist eingipflig, mit einem Peak im 50.-55. Lebensjahr. Insgesamt ist die Erkrankung vor dem 35. Lebensjahr extrem selten, ebenso die Erkrankung des Mannes mit unter 1% der Fälle (hier jedoch meist ein hochmaligner Prozess). Das Gesamtkollektiv der Mammakarzinom-Patientinnen zeigt für fünf Jahre eine Gesamtüberlebensrate von 76,4%, für zehn Jahre von 59,4% und für 15 Jahre von 46,7%.

Diese Zahlen erklären das hohe Interesse der Forschung, eine hochwirksame Therapie gegen das Mammakarzinom zu entwickeln.

Man geht heute von einer multifaktoriellen Genese der Erkrankung aus, wobei einige Risikofaktoren sicher assoziiert sind. Diese umfassen das weibliche Geschlecht, höheres Alter, positive Familienanamnese (genetische Disposition), erhöhte Exposition (endogen oder exogen) an Östrogen, Ernährungseinflüsse (fette Ernährung), gutartige Erkrankung der Brust, sowie Umwelteinflüsse. Allerdings muß hier auch erwähnt werden, dass etwa 50% der mit Brustkrebs diagnostizierten Frauen außer der Geschlechtszugehörigkeit und höherem Lebensalter keine bisher identifizierten Risikofaktoren besitzen.

Etwa 5% aller Mammakarzinome entstehen aufgrund einer erblichen Disposition. Frauen mit Keimbahnmutationen in einem der prädisponierenden Gene haben ein hohes Risiko, im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs zu erkranken. Trägt eine Frau eine Mutation im BRCA 1- oder BRCA 2-Gen und entwickelt ein Mammakarzinom, so ist die Wahrscheinlichkeit eines kontralateralen Mammakarzinoms 64%². Frauen mit einem lobulären Carcinoma in situ (LCIS) oder atypischer duktaler Hyperplasie (ADH) haben ein höheres relatives Risiko, Brustkrebs zu entwickeln^{3,4}.

1.2 Einteilung der Mammakarzinome

Entsprechend der WHO Empfehlung werden Mammakarzinome in nichtinvasive (carcinoma in situ) und invasive Karzinome eingeteilt. Ferner hat sich eine TNM-Klassifikation bewährt, die Tumorgröße, regionären Lymphknotenbefall und Metastasierung berücksichtigt. (siehe Tabelle 1)

Bei Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom werden Staging-Untersuchungen vor

Beginn der systemischen Primärtherapie zur Abklärung einer metastatischen Erkrankung empfohlen (⁵).

Tabelle 1

T _{is}	Carcinoma in situ = nicht infiltrierendes intraduktales oder lobuläres Karzinom Carcinoma in situ oder M. Paget der Mamille ohne nachweisbaren Tumor
T ₁	Tumor <2cm (T _{1mic} <0,1cm, T _{1a} <0,5cm, T _{1b} 0,5-1cm T _{1c} 1-2cm)
T ₂	Tumor 2-5cm
T ₃	Tumor >5cm
T ₄	Tumor jeglicher Größe mit Infiltration der Brustwand (T _{4a}) oder Haut (T _{4b}), [T _{4c} = T _{4a} + T _{4b}] entzündliches (inflammatorisches) Karzinom (T _{4d})
N ₀	Keine befallenen Lymphknoten nachweisbar
N ₁	Bewegliche, ipsilaterale axilläre Lymphknoten
N ₂	Untereinander oder an anderen Strukturen fixierte, ipsilaterale axilläre LK
N ₃	Lymphknoten entlang der ipsilateralen A. mammaria interna
M ₀	Keine Fernmetastasen nachweisbar
M ₁	Nachgewiesene Fernmetastasen (auch kontralaterale Mamma und Lymphknoten ab supraklavikulärer Lokalisation)

Tabelle 1 zeigt die TNM-Klassifikation der Mammakarzinome

Die Therapie richtet sich nach der Größe und Histologie des Tumors, dem Lymphknotenstatus und der Metastasierung, denjenigen Faktoren, die letztendlich auch die Prognose bestimmen.

Die komplette Exstirpation des Tumors mit einem tumorfreien Resektionsrand (R0) ist die Basis der Therapie für alle nicht fortgeschrittenen Mammakarzinome. Generell ist beim Fehlen von Gegenanzeigen hier eine brusterhaltende Operation anzustreben, da randomisierte klinische Untersuchungen gezeigt haben, daß unter Berücksichtigung bestimmter klinischer und histologischer Parameter die brusterhaltende Therapie identische Überlebensraten wie die Mastektomie erzielt ^{6, 7}. Von einer brusterhaltenden Therapie sollte Abstand genommen

werden bei Vorliegen eines multizentrischen Karzinoms, bei inflammatorischen Mammakarzinomen sowie bei einem sehr ungünstigen Tumor-Brust-Größenverhältnis. Wenn trotz Nachresektionen die Resektion in sano nicht erreicht werden kann oder wenn eine Nachbestrahlung technisch nicht möglich ist oder von der Patientin abgelehnt wird, ist ebenfalls die Mastektomie indiziert. Auch der Wunsch der Patientin, mittels Mastektomie operiert zu werden, sollte befolgt werden.

Empfehlungen zur adjuvanten Therapie des Mammakarzinoms berücksichtigen Tumorgroße, Lymphknotenstatus, Grading, Rezeptorstatus, Menopausenstatus und Alter als wichtigste Faktoren zur Risikoeinstufung und zur Entscheidung über die Notwendigkeit der adjuvanten Therapie ⁸.

Die Risikoeinstufung erfolgt in zwei Gruppen. Zu der Gruppe mit niedrigem Risiko gehören Frauen, die alle der folgenden Bedingungen erfüllen müssen: Patientinnen 35 Jahre oder älter, Tumordurchmesser unter 2 cm, Grading I, positiver Östrogen- und/oder Progesteronrezeptor und tumorfreie Lymphknoten in der Axilla (N0). Alle anderen Patientinnen sind der Gruppe mit erhöhtem Risiko zuzuordnen. Bei Frauen mit niedrigem Risiko kann auf eine adjuvante systemische Therapie verzichtet werden. Im Einzelfall kann eine endokrine Therapie sinnvoll sein. Bei Frauen mit erhöhtem Risiko und rezeptornegativem Befund sollte eine Chemotherapie in Betracht gezogen werden. Bei Frauen mit erhöhtem Risiko und rezeptorpositivem Befund ist entweder die alleinige endokrine Therapie oder die Kombination von Chemotherapie mit endokriner Therapie zu erwägen.

Lokal fortgeschrittene Tumoren sollen bei Inoperabilität mit Systemtherapie in Kombination mit einer Radiotherapie behandelt werden. Patientinnen, die auf eine primäre systemische Chemotherapie nicht ansprechen, haben eine ungünstige Prognose ⁹. Bei diesen ist das weitere therapeutische Vorgehen – z.B. Operation, Radiotherapie oder eine Kombination – in-

dividuell festzulegen. Das Ziel der Behandlung dieser Patientinnen ist die Erhaltung der bestmöglichen Lebensqualität bei lokaler Tumorkontrolle.

1.3 Tumorimmunologische Aspekte und Fragestellung

Mit Einführung der molekularbiologischen Methoden in die Medizin gelang die Etablierung von völlig neuen Möglichkeiten, sowohl was die Diagnose als auch die Therapie von malignen Tumoren angeht. So ist es heute sehr einfach möglich, einen Therapieverlauf anhand serologischer Marker (zum Beispiel mittels CEA oder α -Fetoprotein) zu kontrollieren. Dennoch steckt die Diagnose von Tumoren durch alleinige Kontrolle von serologischen Markern noch in den Anfängen und wird nach in den AWMF S3 Leitlinien (Arbeitsgemeinschaft der **Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften**) sogar als nicht notwendig zur Diagnostik bezeichnet ¹⁰. Ein Ansatz hier ist, das Vorhandensein von Antikörpern zu bestimmen, die gegen bestimmte Proteine gerichtet sind, die ausschließlich von Tumorzellen exprimiert werden.

1.3.1 Krebstherapie

Die Wirksamkeit antiöstrogener Behandlung ist gut untersucht und bei östrogenrezeptorpositiven Karzinomen Standard. Diese könnten in naher Zukunft durch eine Immuntherapie begleitet werden, die weiterzuentwickeln das Ziel der vorliegenden Arbeit ist. Die Frage, weshalb die entarteten Zellen nicht hinreichend von den Zellen des Immunsystems erkannt und

zur Apoptose gebracht werden, ist ebenfalls noch nicht sicher geklärt. Sicher ist, daß sich die Tumorzellen mit einigen Methoden erfolgreich gegen die Angriffe wehren:

Die Immuntherapie basiert auf der Annahme, daß der Körper (das Immunsystem) des Menschen entartete Zellen sehr wohl als Tumorzellen erkennt, daß sich diese allerdings einer effektiven Immunantwort entziehen können, etwa durch Herabregulation bestimmter Antigene, Verlust von MHC-I Molekülen oder durch aktive Beeinflussung der Immunantwort (Toleranz).

1.3.2 Humorales vs. zelluläres Immunsystem

Neben der Einteilung des Immunsystems in ein Antigen-unspezifisches und Antigen-spezifisches kann man die Immunantwort in humorale und zelluläre Effektoren einteilen.

Hier soll näher auf das Antigen-spezifische Immunsystem eingegangen werden. Dieses System setzt sich aus den beiden Komponenten der spezifischen zellulären sowie der spezifischen humoralen Immunabwehr zusammen. Hierbei stellen die Lymphozyten den Mittelpunkt des Systems dar, da sie nicht nur für die spezifische zelluläre Immunabwehr, sondern auch für die Produktion von Antikörpern verantwortlich sind. Als Antigene werden höhermolekulare Fremdstoffe bezeichnet, die zur Bildung von Antikörpern und von aktivierten, sensibilisierten Lymphozyten führen.

Die Vorläuferzellen der Lymphozyten, die Stammzellen des Knochenmarkes, differenzieren in myeloische (als Vorläufer der unspezifischen Abwehr) oder lymphatische Stammzellen. Ein Teil der lymphatischen Stammzellen wandert im Laufe der embryonalen und kindlichen Entwicklung in den Thymus aus (T-Lymphozyten, T-Zellen), ein anderer Teil verbleibt im

Knochenmark (Bone marrow: B-Lymphozyten, B-Zellen). Ziel beider Systeme ist es jedoch den Zellen durch Mutation und Selektion die sogenannte Immunkompetenz zu verleihen, sie also zwischen körpereigen und körperfremd differenzieren zu lassen. Die Reifung der Lymphozyten in den zentralen lymphatischen Organen ist gekennzeichnet durch die Ausbildung einer Unzahl verschiedener Antigenrezeptoren an der Zelloberfläche, wobei jeder einzelne Lymphozyt jedoch nur einen spezifischen Typ trägt. Zelltypen mit Rezeptoren, die gegen körpereigene Strukturen gerichtet sind, werden normalerweise während der Reifung vernichtet (sogenannte "Klonale Deletion"), so daß gegenüber körpereigenem Gewebe eine natürliche Toleranz entsteht.

Anschließend an diese Differenzierung gelangen beide Lymphozytenarten (insgesamt etwa 100 Millionen verschiedene Klone) über das Blut- und Lymphgefäßsystem in die peripheren lymphatischen Organe (Milz, Lymphknoten etc.). Nach Antigenkontakt kommt es zu folgender Differenzierung:

B-Lymphozyten tragen an ihrer Oberfläche Antikörper als Rezeptoren, welche körperfremde Antigene binden und in die Zelle einschleusen. Hier werden sie zu Peptidfragmenten abgebaut. Diese werden dann an MHC II-Proteine gebunden und an die Zelloberfläche zurücktransportiert. Dieser MHC II-Antigen-Komplex wird in der Folge von T-Helferzellen (CD4-Zellen) erkannt. Es kommt zum Andocken und zur Aktivierung der B-Lymphozyten. Die Folge ist entweder eine Proliferation und Differenzierung in Plasmazellen, welche dann in Folge selbst Antikörper (Immunglobuline) produzieren und in den extrazellulären Raum ausschütten, oder aber - nach Einwanderung in Lymphfollikel (von z. B. Milz oder Lymphknoten) - eine Differenzierung zu B-Gedächtniszellen. Aus diesen entstehen erst nach einem zweiten Antigen-Kontakt in kurzer Zeit Antikörper-produzierende Plasmazellen.

T-Lymphozyten wirken spezifisch auf Körperzellen, die fremde Proteine – zum Beispiel von intrazellulären Erregern – enthalten, wobei die Erkennung durch Rezeptoren erfolgt, welche

Antigene an Hand von Peptidfragmenten identifizieren, die über MHC-Proteine an die Zelloberfläche gebunden sind.

Im Gegensatz dazu erkennen B-Zellen Antigene in ihrer intakten Form. Prinzipiell unterscheidet man bei den T-Lymphozyten drei verschiedene Effektorzellen: Zytotoxische CD8-Zellen, sogenannte "Killerzellen", töten infizierte Zellen ab, CD4-Entzündungszellen (T_H1) sind darauf spezialisiert, Makrophagen durch intrazelluläre Bakterien zu aktivieren, und CD4-Helferzellen (T_H2) regen antigenbindende B-Zellen dazu an, sich zu Plasmazellen zu differenzieren und Antikörper zu sezernieren. Daneben gibt es sowohl bei CD4- als auch bei CD8-Zellen langlebige Formen mit Gedächtnisfunktion bzw. CD8-Zellen mit Supressorfunktion; diese unterdrücken in bestimmten Fällen selektiv Entzündungsreaktionen, ausgelöst durch CD4-Zellen. Eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunität gegen Viren spielen die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), die weder zu B- noch zu T-Lymphozyten gehören.

Die humorale Abwehr beruht einerseits auf unspezifischen löslichen Faktoren wie Lysozym, Interferonen oder dem Komplement-System, andererseits auf einer spezifischen Reaktion zwischen Antigen und Antikörper, wodurch der Eindringling schließlich unschädlich gemacht werden kann. Antikörper sind Immunglobuline, die man in fünf Gruppen unterteilt (IgG, IgM, IgE, IgA, IgD). Meist wird der Fremdkörper zuerst von den B-Zellen erkannt und den T-Helferzellen präsentiert, die anschließend für eine verstärkte Antikörperproduktion sorgen. Im Serum treten zuerst IgM, später IgG auf. Bestimmte Erreger können durch die humorale Abwehr nicht gänzlich unschädlich gemacht werden. Diese Abwehrlücke wird dann von der zellulären Abwehr geschlossen.

Auch hier ist wieder die Phagozytose, diesmal durch Makrophagen Ausgangspunkt. Die infizierte Zelle wird als Antigen präsentiert und aktiviert die T-Lymphozyten. Diese sind nun in der Lage, Zytokine freizusetzen und die infizierten Zellen abzutöten. Das Immunsystem

ist einerseits durch die unspezifische angeborene Immunität, andererseits durch die frühe Prägung der spezifischen Abwehrzellen in der Lage, Stoffe als körpereigen oder körperfremd, d.h. als Antigen, zu erkennen und entsprechend zu reagieren. Diese Vorgänge laufen kontinuierlich ab, so dass der Organismus permanent in der Lage ist, gegen Infektionen, Toxine, aber auch gegen körpereigene, mutierte Tumorzellen vorzugehen.

Das Gebiet der Tumorummunologie sucht nach Wegen, das Immunsystem gegen Tumorspezifische Antigene zu aktivieren und dadurch einen Anti-Tumoreffekt zu bewirken. Solche Strategien setzen die Identifizierung tumorspezifischer Antigene voraus.

Eine Methode, wie solche Tumorantigene identifiziert werden könne, ist die SEREX-Technik. Diese Methode identifiziert Tumorantigene basierend auf einer spontanen Antikörperantwort (IgG) im Patienten.

Diese Technik hat im Gegensatz zu anderen T-Zell-basierenden Klonierungsstrategien den Vorteil, daß sie in allen Tumorsystemen funktioniert. Auch und gerade in epithelialen Tumoren und solchen, die in Kultur nur selten oder gar nicht wachsen.

1.4 SEREX

Die hier vorgestellte Arbeit beschäftigt sich mit der Identifizierung und Charakterisierung neuer mögliche Zielstrukturen, die für die Krebstherapie relevant sein könnten. Wir verwandten dafür die SEREX-Technik (Serological analysis of recombinant cDNA expression libraries). Diese Technik ermöglicht es, Tumorpatientenserum auf tumorspezifische Antikörper zu screenen, und das Zielantigen im Tumor selbst zu identifizieren und klonieren.

Die Schwierigkeit der T-Zell basierten Identifizierung tumorspezifischer Antigene besteht darin, daß zunächst zytotoxische (CD8+) T-Zelllinien mit spezifischer Tumorreaktivität generiert werden müssen, so dass – mit einigen Ausnahmen wie RAGE¹¹ (renal cell cancer-associated antigen) die meisten T-Zell definierten Antigene aus Melanomen kloniert wurden, die häufig gut in Kultur wachsen. Die 1995 von Sahin et al. erstmals publizierte SEREX Methode erlaubt – anders als die T-Zell basierte – ohne eine vorhandene stabile Tumorzelllinie und CD8+ T-Zelllinie nach Antigenen zu suchen, welche vom menschlichen Immunsystem erkannt und im Körper eine hochtitrige IgG-Antikörper-Antwort auslösen¹². So konnten bis dato nur Antigene bestimmter Tumorentitäten wie z.B. Melanome¹³, Nierenzellkarzinome¹⁴ und ZNS Tumore¹⁵ gefunden werden. Dies erklärt sich aus der Stabilität der oben genannten Tumorzelllinien.

Es wurden mit SEREX einige bereits bekannte Antigene z.B. MAGE-1¹⁶ und MAGE-4a¹⁷, die ursprünglich durch Klonierung der von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) erkannten Epitope in Melanomen gefunden wurden, als auch neue Antigene z.B. NY-ESO-1¹⁸, SSX2¹⁹, SCP-1²⁰, CT-7¹⁷ und OY-TES-1¹⁹ identifiziert.

Die Tatsache, dass bereits bekannte Antigene auch mit SEREX gefunden wurden bedeutet, dass wenigstens einige der neuen Antigene auch Zielstrukturen für CTL sein können.

Die mit Hilfe von SEREX gefundenen Antigene können in verschiedene Klassen eingeteilt werden:

1. „Cancer/Testis“ Antigene (CTA), die sowohl in normalem Testis- und fetalem Ovarialgewebe, als auch in einer unterschiedlichen Zahl von Tumoren exprimiert sind.^{17-19, 21}
2. Differenzierungsantigene, die nur in einem spezielle, differenzierten Normalgewebe und in dem entsprechenden Tumorgewebe exprimiert sind (normale Melanozyten und Melanom²²; normales Mammagewebe und Mammakarzinom²¹)

3. Mutationen normaler Gene^{23,24}
4. Amplifizierte bzw. überexprimierte „eigen“ Antigene, in Tumorgewebe im Vergleich zu Normalgewebe überexprimiert.
5. (Retro)virale Antigene¹²
6. Splicevarianten Antigene²⁵.

Für eine spezifische Immuntherapie eignen sich also vor allem CTA und Differenzierungsantigene als Targets, da sie die Voraussetzungen der Expression in Tumorgewebe, aber fehlende Expression in Normalgewebe, hervorragend erfüllen.

Neben den oben bereits erwähnten CTA wurden mittels SEREX auch mehrere Differenzierungsantigene isoliert, so das Melanozyten- Differenzierungsantigen Rab 38²² und kürzlich das Mamma-Differenzierungsantigen NY-BR-1²⁶, das in etwa 80% aller Mammakarzinome exprimiert wird und in Normalgeweben nur in Testis und Brustdrüsengewebe nachweisbar ist.

Erste klinische Studien zur Immunisierung gegen CT-Antigene²⁷⁻²⁹ und Differenzierungsantigene³⁰⁻³² zeigen, dass antigenspezifische CD8+ T-Zellreaktionen in vivo induziert werden konnten, die in einzelnen Fällen mit klinischer Tumorrückbildung assoziiert waren. So kann die mittels SEREX gefundene kodierende cDNA des entsprechenden prokaryotisch exprimierten humanen Antigens isoliert und direkt sequenziert werden. Durch den Vergleich mit vorhandenen Datenbanken können Sequenzabnormalitäten (Mutationen, Deletionen) identifiziert werden und in vielen Fällen kann über Datenbankvergleich (EST, Unigene) auch das Expressionsmuster des Antigens definiert werden. Ebenso ermöglicht SEREX die serologische Analyse von Normalseren und Patientenseren gegen spezifische Antigene. Hierbei erweist sich die SEREX-Methode als besonders vorteilhaft für ein Screening, da bei dieser Methode auf die Etablierung von stabilen Tumor oder CD8+- T-Zelllinien verzichtet werden

kann. Dies gilt vor allem für Tumoren mit schwierigen Kulturumständen (z.B. Prostatakarzinom, Kopf-Hals-Tumore, Mammakarzinome, Kolonkarzinome). Die so gefundenen Antigene können dann in weiteren Versuchen auf ihre weitere Eigenschaft als Targets für CD8+ T-Zelllinien untersucht werden.

1.5 Fragestellung

Der Fragestellung dieser Arbeit liegt die Suche nach geeigneten Antigenen Strukturen zugrunde, die vom Immunsystem selbständig erkannt werden und eine IgG-Antwort provozieren. Diese Frage wird mittels des serologischen Screenings einer Testis library mit Serum einer Brustkrebspatientin mit besonders günstigem klinischen Krankheitsverlauf nachgegangen. Die Möglichkeit neuer potentieller Target-Antigene für Immuntherapiestrategien soll diskutiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Methodisches Konzept dieser Arbeit

Die in dieser Arbeit beschriebene Isolierung von Antigenen eines Mammakarzinoms wurde nach der von Sahin und Türeci etablierten SEREX-Methode¹² durchgeführt.

Eine aus Mammakarzinom etablierte cDNA Bank diente der prokaryotischen Expression von rekombinanten Proteinen. Klone, die mit Immunglobulinen der Klasse G (IgG) im autologen Serum der Patientin reagierten, wurden isoliert und durch Bestimmung ihrer Nukleinsäuresequenz und ihres Expressionsverhaltens in verschiedenen Geweben molekular charakterisiert.

2.2 Allgemeines zur SEREX-Methode

Aus Tumorgewebe wird zuerst die RNA extrahiert und der Anteil der mRNA isoliert. Hier von ausgehend wird eine unidirektional klonierte Lambda-Phagen cDNA-Library etabliert, die dann prokaryotisch in *E. coli* exprimiert wird. Nach Wachstum der Bakterien auf einer Agarplatte liegen die exprimierten Proteine hier in lytischen Plaques hochangereichert vor, wobei jeder Plaque einen distinkten cDNA-Klon mit klonaler Expression eines rekombinanten Proteins repräsentiert. Die Agarplatten werden nun auf Nitrozelluloseplatten geblottet und mit präabsorbiertem autologem Patientenserum inkubiert. Reagieren nun patienteneigene Antikörper mit prokaryotisch exprimierten Proteinen, binden sie an die Folie. Diese An-

tikörper werden nun mit Hilfe eines sekundären, an alkalische Phosphatase gekoppelten und gegen die konstante Region von humanem IgG gerichteten Antikörpers markiert und sichtbar gemacht. Durch örtliche Rückverfolgung von der Folie auf die Agarplatte können nun „positive“ Plaques erkannt, isoliert und selektiv kloniert werden. Nach abschließender Überführung in die Plasmidform steht die DNA nun für weitergehende molekularbiologische Untersuchungen zur Verfügung.

2.3 Patientenserum

Als Testserum stand Material (gereinigtes und präabsorbiertes Normalserum) einer 60-jährigen Mammakarzinompatientin (metastasiertes ductales Karzinom) aus dem Krankenhaus Nordwest, Frankfurt zur Verfügung, die einen für die Krankheit ungewöhnlich guten Verlauf hatte. Tumorgewebe und Zelllinien kamen aus dem Krankenhaus Norwest, Frankfurt, sowie dem New York Presbyterian Hospital und Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, beide New York City, NY, USA.

2.4 Allgemeine Vorbereitungen

2.4.1 Bakterienstämme

Die hier verwendeten E. coli Stämme XL-1 Blue und SOLR entstammen dem Stratagene-Kit cDNA Synthesis Kit und sind dort als Glycerolstocks enthalten. Durch Ihre Tetrazyklinresistenz lassen sich die erforderlichen Mengen selektiv und frei von Wildtypen anzüchten.

2.4.2 Anfertigen der Glycerolstocks

Die Glycerolstocks der Bakterien werden auf LB-TET (12,5 µg/g Tetrazyclin) Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37⁰ C inkubiert. Anschließend werden einzelne Kolonien in 50 ml LB-Medium, versetzt mit 12,5 µg Tetrazyclin auf einem Schüttler bis zur *mid-log Phase* (OD₆₀₀ etwa 0,3 bis 0,7) wachsen gelassen. Diese Suspension wird dann für etwa 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 1500 x g zentrifugiert. Das verbleibende Bakterienpellet wird in 5 ml LB-Medium aufgenommen und kann nach Suspension in 40% Glycerol bei -80⁰ C gelagert werden.

2.4.3 Anfertigen der Bakterienkulturen für die Transfektion

Je ein Aliquot der Bakterienstämme XL-1 Blue und XL-1 Blue MRF werden zur selektiven Anzüchtung auf LB-Tet-Agarplatten über Nacht bei 37⁰ C inkubiert. Eine Bakterienkolonie wird in 50 ml LB-Medium, versetzt mit 2,5 ml 0,2 M Magnesiumsulfatlösung und 1 ml 10%iger Maltoselösung, bei 37⁰ C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,8 kultiviert. Anschließendes Zentrifugieren bei 1500 x g und Aufnehmen des Pellets in 0,01 M Magnesiumsulfatlösung bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5.

2.4.4 Amplifikation der cDNA-Library

Eine primäre Testis-cDNA-Library mit $>10 \times 10^6$ pfu (plaque forming units) wurde auf 20 Agarplatten ausgebracht, mit SM Medium versetzt und 12 Stunden inkubiert. Das SM Medium wurde aufgenommen und gepoolt. Der Titer der so amplifizierten Library bestimmt und dann für weitere Screenings eingesetzt.

2.4.5 Bestimmung des Anteils rekombinanter Klone

Im Gen lacZ des Lambda ZAP II Vektors ist die *multiple-cloning-site* lokalisiert, dieses Gen kodiert für die Beta-Galaktosidase. Der Zusatz von IPTG, welches den Lac-Repressor durch Konformitätsänderung vom Promotor löst, erfolgt die Induktion des Gens. Bei Expression katalysiert das Enzym Beta-Galaktosidase den Abbau des Glukoseanalogons 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-Beta-D-galaktopyranosid (X-Gal) zum blauen Reaktionsprodukt. Rekombinante Klone bilden also weiße lytische Plaques, während die nicht-rekombinierten Klone lytische Plaques mit blauem Hof bilden.

2.4.6 Präabsorbtion der Seren

Um eine möglichst hohe Sensitivität und Spezifität im Screening zu erreichen, ist es unbedingt erforderlich, die Patientenseren von Antikörpern gegen Bestandteile von E. coli zu reinigen. Hierzu wird das Serum 1:10 verdünnt über eine spezielle Affinitätssäule mit TBS

gespült, das austretende Serum ist dann frei von Antikörpern gegen E. coli-Bestandteile. Das so gereinigte Serum wird mit 0,02% Natriumazid versetzt, sterilfiltriert, auf 1:200 verdünnt und ist so mehrere Wochen bei 4⁰C haltbar.

2.5 Screening

2.5.1 Transfektion und Blotten der exprimierten Proteine

Zur Transfektion werden 600µl Arbeitslösung von XL-1 Blue mit etwa 4000pfu der cDNA-Library für 15 Minuten bei 37⁰C inkubiert. Auf jeden Ansatz werden 6ml TOP-Agar gegeben, der im Wasserbad auf 50⁰C vorgeheizt ist, vermischt und mit 6 ml Agar, der mit 30 µl IPTG zur Phagenstimulation versetzt ist, auf eine NZY-Agar Petrischale ausgegossen. Diese werden über Nacht bei 37⁰C inkubiert. Der zu erwartende optimale Plaquedurchmesser beträgt ca. 1-1,5 mm. Eine Nitrozelluloseplatte im Durchmesser der Petrischale wird blasenfrei auf die Agarplatte zum Blotten der exprimierten Proteine gelegt, mit Markierungen versehen und für etwa 3 Stunden bei 37⁰C inkubiert.

2.5.2 Färben

Nach Abkühlen der Platten bei 4⁰C werden die Folien vorsichtig entfernt und die Platten weiterhin bei 4⁰C gelagert. Auf einem Schüttler werden die Folien insgesamt 3 Mal für etwa 15 Minuten in TBS-T gewaschen. Es folgt das Blocken der unspezifischen Bindung der Fo-

lien mit 5% Humanalbumin und TBS für 15 Minuten, bevor dann jede Platte mit etwa 12-15ml des 1:200 verdünnten Patientenserums einzeln in einer sauberen staub- und fettfreien Petrischale über Nacht bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert wird.

Nach dem Abnehmen des Serums (das Serum kann wieder verwendet werden) erfolgt die Inkubation, ebenfalls auf dem Schüttler für 60 Minuten, mit dem sekundären, gegen den konstanten Teil von humanem IgG gerichteten und an alkalische Phosphatase gebundenen Antikörper (,alkaline phosphatase-conjugated goat antihuman Fc γ secondary antibody'), verdünnt mit 0,5% Humanalbumin. Die alkalische Phosphatase sorgt im alkalischen Milieu für den Umsatz von 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat (BCIP) zu einem Niederschlag von Indigo um. Das als Farbverstärker zugegebene 4-Nitroblau-Tetrazoliumbromid (NBT) wird hier zum roten Diformazan reduziert. Die Entwicklung sollte bei abgedunkeltem Raum stattfinden, um einen Umsatz durch Licht zu reduzieren. Die Reaktion wird durch Abspülen der Platten mit destilliertem Wasser gestoppt.

2.5.3 Auswertung und Identifizierung „positiver“ Klone

Kolonien, die auf der Nitrozelluloseplatte eine positive Reaktion hinterlassen, werden auf der zugehörigen Agarplatte mit Hilfe der Markierung aufgesucht, zusammen mit einer negativen Kolonie zur Negativkontrolle mittels einer sterilen Pipettenspitze mitsamt dem Agar aufgenommen, in ein 1,5ml Eppendorff Reaktionsgefäß überführt, mit 500 μ l SM-Puffer überschichtet und zur Elution der Phagen gut geschüttelt. Nach anschließendem Zusatz von Chloroform und Zentrifugation wird der Überstand abgenommen und bei 4⁰C gelagert.

2.5.4 Klonierung

Die Schritte 2.5.1 und 2.5.2 werden nun auf kleineren, halbierten Platten wiederholt, was einer Klonierung mit Negativkontrolle entspricht. Die beiden Hälften einer Platte werden nun getrennt, die eine Hälfte durchläuft das normale Protokoll mit Serum, die andere wird direkt mit dem sekundären Antikörper inkubiert, um falsch positive Klone zu entdecken. Diese entstehen bei rekombinanter Expression von tumorinfiltrierenden Antikörper produzierenden B-Lymphozyten, an die der sekundäre Antikörper direkt bindet. Richtig positive Klone werden nun ohne Negativkontrolle wie unter 2.5.3 beschrieben aufgenommen.

2.5.5 In vivo Exzision

50ml-Kulturen von XL0LR in LB-Medium (plus 50µg/ml Kanamycin) und XL-1 Blue in LB-Medium (plus 50µg/ml Tetrazyklin) werden angesetzt und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Die entstehenden Suspensionen werden 1:100 verdünnt und zu einer OD₆₀₀ von 0,2 bis 0,5 aufgezo-gen. Beide Kulturen werden bei 1500 x g abzentrifugiert und in 0,01M Magnesiumsulfat auf eine OD₆₀₀ von 1,0 eingestellt. Zu 200µl der XL-1 Blue Arbeitslösung werden 250 µl der unverdünnten monoklonalen Phagenstocklösung eines isolierten Klons und 50µl der ExAssist Helferphagenlösung zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von etwa 15 Minuten bei 37°C werden 3ml 37°C warmes LB-Medium zugegeben und erneut für 3 Stunden unter Schütteln inkubiert. Die Bakteriensuspension wird für 15

Minuten bei Raumtemperatur mit 2000 x g zentrifugiert, der Überstand asserviert und für 15 Minuten im Wasserbad auf 70⁰C erhitzt. Nach Pelletierung des Zelldebris verbleiben im Überstand exzidierte pBluescript SK(+) Phagemide. Von dieser werden 100µl auf 200 µl der Arbeitslösung von XL0LR gegeben und für weitere 15 Minuten bei 37⁰C inkubiert. Nun werden 25 µl dieser Suspension auf einer LB-Tet-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Die Kolonien enthalten nun den pBluescript-Vektor mit dem gesuchten Insert.

2.6 DNA Extraktion

Die Plasmid Mini-Präparation mit dem Wizard Miniprep DNA Purification System (Promega) ergibt DNA in ausreichender Reinheit, um sie auf einem ABI-PRISM-Sequenzier zu analysieren, da die Sequenzierqualität stark abhängig ist von der Verunreinigung der Probe mit RNA, Proteinen und natürlich der Qualität der extrahierten Plasmid-DNA selbst. Die Plasmid Mini-Präparation von Quiagen basiert auf der von Birnboim und Doly beschriebenen Methode der alkalischen Extraktion von Plasmid-DNA. Hierbei werden die Bakterien durch Zugabe von RNase in NaOH und SDS aufgelöst, wobei SDS die Bakterienmembranen solubilisiert und zelluläre Proteine denaturiert, die chromosomale DNA und Plasmide hingegen durch das alkalische Milieu allein denaturieren. Dies wird nach Zugabe von Kaliumacetat neutralisiert. Die Proteine, chromosomale DNA und Zellbestandteile fallen durch die hohe Salzkonzentration aus, so dass sie sich nach Ultrazentrifugation von der Plasmid-DNA absetzen. Über eine Gelsäule, bei der die Plasmid-DNA bindet, die restlichen Bestandteile jedoch aufließen können, lässt sich schließlich nach Auswaschen der Säule hochgereinigte Plasmid-DNA gewinnen.

Hierzu werden Bakterien mit dem infrage kommenden Klon aus dem Glycerolstock auf einer LB-Amp-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37⁰C inkubiert, eine Kolonie steril in 2ml LB-Amp-Medium übertragen und für weitere 24 Stunden auf einem Schüttler bei 37⁰C inkubiert. Nun wird die Suspension für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit 5000 x g zentrifugiert, das Pellet in 300µl P1 Puffer (alle Angaben entsprechend Promega) aufgenommen und sofort mit 300µl P2 Puffer neutralisiert. Nach 5 Minuten Inkubation folgt 300µl P3 Puffer und 10 Minuten Lagerung der Probe auf Eis. Der Überstand nach 30 Minuten Zentrifugation bei 13000 x g wird sofort auf eine prääquilibrierte Quiagen-Tip-20 Säule gegeben und mit exakt 4ml QC Puffer gewaschen. Die Plasmid-DNA wird nun mit 800µl QF Puffer aus der Matrix eluiert, mit 0,7% Isopropanol gefällt und mit 1ml kaltem Ethanol gewaschen. Nach Trocknung des Pellets wird es in 20µl reinem H₂O gelöst und steht nun zur Sequenzierung zur Verfügung. Es werden etwa 20µg DNA extrahiert, eine Menge, die in der Regel für eine Sequenzierung ausreicht.

2.7 Exzision

cDNA-Inserts wurden nach EcoRI-XhoI-Verdau der betreffenden Plasmide auf einem 1,0% Agarose Gel analysiert und Klone mit unterschiedlich großen Inserts wurden DNA sequenziert.

2.8 Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA erfolgte extern durch die Firma GATC, Konstanz auf Applied Biosystems-PRISM Sequenzern.

2.9 Analyse der gewonnenen Daten

Die so gewonnenen Nukleinsäuresequenzen wurden mit der NIH GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=gene>) und EST-Database (BLAST-Search [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>]) abgeglichen (siehe Tabelle 2). Hierbei wurden solche Gene als bekannt deklariert, die eine hohe Übereinstimmung mit solchen aus der Genombank hatten, als unbekannt solche, die keine oder nur sehr wenige Übereinstimmungen hatten. Über Vergleich zu EST Datenbanken konnte für jedes identifizierte Antigen das Expressionsmuster in Normal- und Tumorgewebe ermittelt werden. Bei weitgehend unbekannt Genen folgte die weitere Expressionsanalyse mittels RT-PCR (Polymerase Chain Reaktion) und Northern Blot.

2.10 RT-PCR

Um die Expressionsanalyse der cDNA per PCR durchzuführen, wurden mRNAs aus verschiedenen Tumorgeweben und Tumorzelllinien extrahiert (RNeasy Kit, Quiagen), Normalgewebe RNA wurde von der Firma Clontech bezogen. Sequenzspezifische Primer wurden von den Firmen Operon bzw. Roth bezogen, um Sequenzen von etwa 300 bis 600 Basenpaaren zu amplifizieren (primer melting temperature 65-70°C). Die verschiedenen PCR wurden

bei individuell angepassten 'annealing' Temperaturen mit 30 Amplifikationszyklen in einem Thermal Cycler (Applied Biosystems, Eppendorf, Biometra) durchgeführt.

2.11 Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden in 1-1,5% Agarosegelen mit Ethidiumbromid Gelelektrophoretisch aufgetrennt unter UV-Licht semiquantitativ auf Expression in den einzelnen Geweben hin untersucht.

2.12 Material und Aufarbeitung

Bei dem in dieser Arbeit untersuchten Serum handelt es sich das einer 60-jährigen Patientin (T.K. NW 1189), die im Krankenhaus Nordwest in Frankfurt, Abteilung für Innere Medizin II (Onkologie) behandelt wurde und bei der ein für ihre Krankheit erstaunlich guter Verlauf beobachtet werden konnte. So entwickelte sie 14 Jahre nach erfolgter Mastektomie bei primärem duktalem Karzinom eine Metastasierung mit Beteiligung der Lymphknoten und der Pleura. Nach der Chemotherapie zeigte sich eine volle Remission sämtlicher Metastasen, ein Jahr nach der Behandlung entwickelte sie eine Metastasierung in die supraclavikulären Lymphknoten. Nach erneuter Chemotherapie zeigte sich jedoch abermals eine Vollremission für weitere 14 Monate nach der Therapie.

Als untersuchtes Material stand Serum dieser Patientin zur Verfügung, das 1:200 mit TBS verdünnt und von Antikörpern gegen Escherichia coli und λ -Phagen durch Präabsorbktion gereinigt wurde.

2.13 Konstruktion der cDNA expression library

Es wurde eine Testis cDNA library wie folgt konstruiert: Aus Testisgewebe wurde die Gesamt-RNA extrahiert, die resultierende m-RNA angereichert und in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA wurde in einen λ -Phagen Vektor ligiert, und anschließend die Transfektion in E. coli durchgeführt. Die so präparierten Bakterien, die nun auch Testisproteine produzieren, wurden auf 130mm großen Agarplatten aufgeimpft und wachsen gelassen, so daß nach 24 Stunden eine Dichte von etwa 4000 bis 5000 (pfu) erreicht war.

2.14 Blotting

Diese Platten wurden auf 130mm große Nitrozelluloseplatten geblottet, so daß die m-RNA in die Platten diffundieren konnte. Nach einigen Waschsritten wurden die Platten mit dem verdünnten und präabsorbierten Serum inkubiert. Nach weiterem Waschen wurden die Filter mit alkalische-Phosphatase markierten, gegen humane Antikörper gerichteten Fc γ Ziegen Antikörpern inkubiert und die die reaktiven Klone mittels ‚5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat‘ (BCIP) gefärbt.

2.15 cDNA Extraktion

Die in dieser Reaktion positiven Klone wurden subkloniert, aufgereinigt und in vivo exziiert zu pBK-CMV Plasmiden (Stratagene). Die Plasmid DNA wurde mittels ‚Wizard Miniprep DNA Purification System‘ von Promega extrahiert. Die cDNA Inserts wurden mit den Restriktionsendonukleasen EcoR1 und Xho1 aus der Plasmid DNA herausgeschnitten.

2.16 RT-PCR

In der RT-PCR wurden mit genspezifischen Primern die Expression des betreffenden Gens in cDNA aus Normalgeweben (Gehirn, Leber, Herz, Niere, Lunge, Trachea, Kolon, Knochenmark, Dünndarm, Thymus, Milz, Magen, Brustdrüse, Prostata, Testis, Uterus und Skelettmuskulatur) untersucht. Die Bedingungen waren stets an die verwendeten Primer angepasst (65°-70° Celsius annealing Temperatur, 95° Denaturierung, 30 Zyklen)

2.17 Datenbankabgleich

Der Datenbankabgleich geschah mit den Datenbanken des National Institute of Health GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>) und EST Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/>). Als bekannte Gene wurden solche bezeichnet, die eine Sequenzhomologie zu bekannten Genen aufwiesen, als neue Gene solche, die keinen Eintrag in der GenBank hatten.

2.18 Northern Blot

Die Northern Blot Analyse wurde mit kommerziell erhältlichen poly(A)⁺ (2µg/Bahn) ,Human Multiple Tissue Northern' (MTN™) Blot I and II (Clontech) durchgeführt. Es wurden ³²P-markierte PCR Sonden mit 300-600 bp Länge verwendet und die Blots nach Herstelleranleitung hybridisiert und gewaschen. (ExpressHyb Kit, Clontech)

2.19 ,Rapid Amplification of cDNA Ends' (RACE)

RACE Reaktionen (5'- und 3'-RACE) wurden mit gen- und adapterspezifischen Primern, Marathon Testis-Normal cDNA und Advantage II Polymerase (Clontec) durchgeführt. Die Produkte wurden weiter in den PCR direct cloning Vektor pGEMT ligiert und durch Restriktionsanalyse (Mapping und Sequenzierung) analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 Positive Klone

Insgesamt $1,2 \times 10^6$ pfu der Testis cDNA-Library wurden mit dem 1:200 verdünnten Serum der Patientin NW1189 gescreent. Hierbei konnten 24 positive Klone isoliert und sequenziert werden, wobei eine Analyse in GenBank und EST Datenbank eine Verteilung dieser Klone auf 13 verschiedene Gene – von uns als NW-BR-1 bis NW-BR-13 bezeichnet - ergab, von denen 12 als bekannt, eines jedoch als unbekannt eingestuft wurde (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2

Klone	Name	GenBank	UniGene Cluster
3	NW-BR-1	NY-BR-1	Hs.326736
1	NW-BR-2	SCP-1	Hs.112743
9	NW-BR-3	Clone 18CGI1F2	Hs.339651
1	NW-BR-4	KIAA1005	Hs.12328
1	NW-BR-5	KIAA0635	Hs.185091
2	NW-BR-6	LZ16	Hs.42390
1	NW-BR-7	PRDM5	Hs.192867
1	NW-BR-8	CTC-260F20	Hs.279574
1	NW-BR-9	TFNR	Hs.272808
1	NW-BR-10	ROCK1	Hs.17820
1	NW-BR-11	MARKL1	Hs.118843
1	NW-BR-12	GCP3	Hs.9884
1	NW-BR-13	<i>unknown</i>	<i>unknown</i>

Tabelle 2 zeigt die im Screening gefundenen Gensequenzen und ihre Bezeichnungen (soweit bekannt) in GenBank und UniGene Cluster

Ausgehend vom Expressionsmuster der untersuchten Gene in Normal- und verschiedenen Tumorgewebe lassen sie sich zwei verschiedene Gruppen einteilen: Ein Teil mit gewebe-spezifischer Expression, sowie Gene mit ubiquitärer Expression. 13 Klone repräsentieren hier drei bekannte Gene (NW-BR-1 bis 3, d.h. 3x NY-BR-1, 1x SCP-1, und 9x Clone

18CGI1F2) mit spezifischen Expressionsprofilen, die restlichen elf Klone repräsentieren neun bekannte und ein unbekanntes Gen mit ubiquitärer Expression.

3.2 NY-BR-1 als Brustdrüsendifferenzierungs-Antigen

Drei in diesem Screening identifizierte Klone repräsentieren NY-BR-1. Die NY-BR-1 cDNA Klone, die in dieser Arbeit analysiert wurden, sind lediglich inkomplette cDNA Klone, wobei der längste von Position 1754bp bis zum 3'-Ende der kompletten cDNA von NY-BR-1 reicht. NY-BR-1 wurde bereits in einer früheren autologen Mammakarzinom SEREX Analyse charakterisiert und es konnte gezeigt werden, dass NY-BR-1 lediglich in normalem Brustgewebe und normalem Testisgewebe exprimiert wird. Allerdings zeigen auch 80% der Mammakarzinome NY-BR-1 Expression, wohingegen andere Tumorentitäten NY-BR-1 negativ sind. Dies konnte mit Hilfe von RT-PCR gezeigt werden (siehe Abbildung 1).

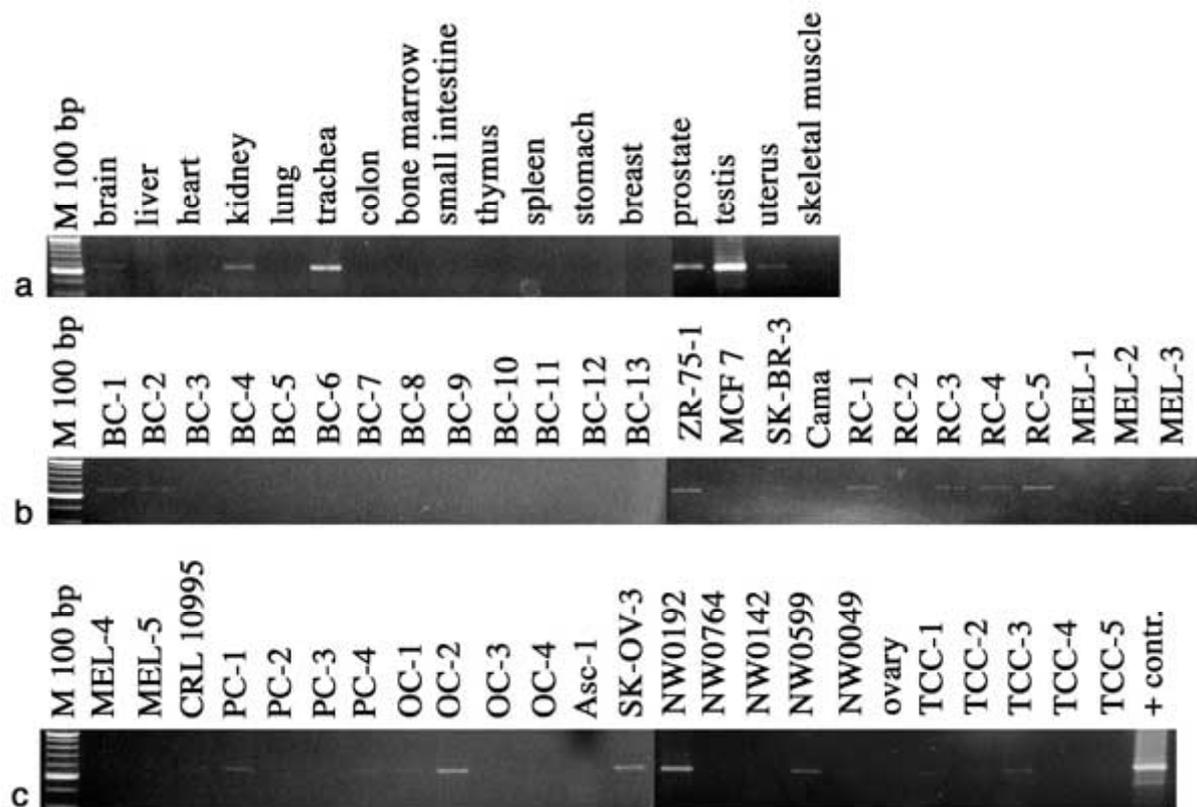


Abb. 1 Analyse der NW-BR-3 mRNA Expression mittels RT-PCR. Es zeigen sich starke Banden in Normalgeweben von Testis, schwache Banden in Hirn, Niere, Trachea, Uterus und Prosata (a). Alle anderen getesteten Gewebe zeigen kein Signal. (b) und (c) NW-BR-3 Expression in verschiedenen Tumoren und Zelllinien: ZR-75-1, MCF 7, SK-BR-3, Cama (Mamma-Ca); CRL 10995 Prostata-Ca; Asc-1, SK OV-3, NW0192 - NW0049 Ovarial-Ca. Abkürzungen stehen für: BC, Mamma-Ca; MEL, Melanom; OC, Ovarial-Ca; PC, Prostata-Ca; RC, Nierenzell-Ca; TCC, Urothel-Ca.

Einer der hier isolierten Klone repräsentiert SCP1, ein ebenfalls mit Hilfe von SEREX identifiziertes CT-Antigen. Der Vergleich in der EST Datenbank und UniGene zeigte das Expressionsmuster von SCP1 in normalem Hodengewebe und in verschiedenen Tuorgeweben. Der hier gefundenen Klon zeigte eine 100% Sequenzhomologie mit dem SCP1 GenBank Eintrag (X95654) über die gesamte Länge der cDNA Sequenz. Dies ist das erste Mal, daß SCP1 in einer SEREX Mammakarzinom Analyse identifiziert wurde.

Neun von 24 hier beschriebenen Klonen stammten von demselben Gen, welches wir als NW-BR-3 beschrieben. Vergleiche des längsten dieser neun Klone mit der GenBank zeigten eine exakte Übereinstimmung mit dem GenBank Klon 18CGI1F2, einem nicht näher klassifizierten Gen auf Chromosom 18. Vergleiche mit der EST-Datenbank zeigte eine 99% Übereinstimmung mit einer cDNA von einer testikulären Zelllinie, sowie annähernd exakte Übereinstimmungen mit einer cDNA aus Hoden, Retina, Medulla, Uteruskarzinom, anaplastisches Oligodendrogliom und Nierentumoren (UniGene Cluster Hs.339651), wobei keine dieser cDNA Stränge die NW-BR-3 Sequenz am 5' oder 3' Ende überragte. Die verfügbare NW-BR-3 cDNA Sequenz (siehe Abbildung 2) besteht (ohne poly A) aus 1825bp mit einer coding region von 1551bp, einer 5'-untranslated-region von 8bp und einer 3'-untranslated-region von 187bp (ebenfalls ohne poly A). Da wir kein Stopkodon in der fraglichen 5'-untranslated-region fanden, wurde eine 5'-RACE-PCR mit ‚Adaptor Ligated Normal Testis cDNA‘ von Clontech mit jeweils spezifischen Primern durchgeführt, um die möglicherweise fehlende 5'-Sequenz zu definieren. Versuche mit verschiedenen Primern konnten jedoch die cDNA-Sequenz am 5'-Ende nicht komplettieren.

TCGGCACGAGCGGAAGCGGGTCCCGCAGGTCGCCACGGTTGGGGGAAACGCGGCGGACGCCGCCCCCGTCCCGAA	75
GGGGACTCGAAA <u>ATGT</u> ACAGCCAGCGGTTTGGCACCGTACAGCGGGAGGTTAAGGGCCCCACCCCAAAGTGGTG	150
M Y S Q R F G T V Q R E V K G P T P K V V	21
ATCGTGAGATCCAAGCCTCCTAAAGGCCAAGGAGCTGAGCACCATCTAGAAAGAATCCGACGCAGCCATCAGAAG	225
I V R S K P P K G Q G A E H H L E R I R R S H Q K	46
CATAATGCTATTTTGGCTTCCATTAAGTCAAGTGAGCGGGATCGCTTGAAAGCTGAGTGGGACCAGCACAAATGAC	300
H N A I L A S I K S S E R D R L K A E W D Q H N D	71
TGCAAGATTTTGGACAGCCTTGTGCGAGCAAGAATCAAGGATGCTGTGCAAGGGTTTATCATTAAACATTGAAGAA	375
C K I L D S L V R A R I K D A V Q G F I I N I E E	96
AGACGAAATAATTTTCAGGCTACGTGAGCTTTTAGCATTAGAAGAAAATGAGTATTTTACAGAAATGCAATTGAAG	450
R R N N F R L R E L L A L E E N E Y F T E M Q L K	121
AAAGAAACCATTGAGGAGAAAAAGATAGGATGAGAGAGAAAACATAATTACTAAAAGAGAAGAATGAAAAAGAG	525
K E T I E E K K D R M R E K T K L L K E K N E K E	146
AGGCAGGATTTTGTGGCTGAAAAGCTAGACCAGCAATTCAGGGAACGCTGTGAGGAGCTCCGTGTTGAATTGTTA	600
R Q D F V A E K L D Q Q F R E R C E E L R V E L L	171
TCTATCCATCAGAAGAAGGTGTGTGAGGAGCGGAAAGCACAGATTGCATTTAATGAGGAGCTGAGCAGGCCAAAAG	675
S I H Q K K V C E E R K A Q I A F N E E L S R Q K	196
CTGGTGGAAAGAGCAGATGTTCTCCAACTCTGGGAGGAAGACCGATTAGCCAAGGAAAAGCGAGAAGCCCAAGAG	750
L V E E Q M F S K L W E E D R L A K E K R E A Q E	221
GCGAGGAGACAGAAAGAGCTGATGGAGAACAACACGCCTGGGGCTGAATGCCAGATCACCAGCATCAAGGCACAA	825
A R R Q K E L M E N T R L G L N A Q I T S I K A Q	246
AGGCAGGCGACACAGCTGCTGAAGGAAGAGGAGGCACGCCTTGTGGAAAGTAACAACGCACAGATTAACATGAG	900
R Q A T Q L L K E E E A R L V E S N N A Q I K H E	271
AATGAACAGGATATGCTAAAGAAACAGAAGGCAAAGCAGGAACTAGGACCATTTGCAAAAAGCCCTACAAGAG	975
N E Q D M L K K Q K A K Q E T R T I L Q K A L Q E	296
AGGATAGAACATATTCAGCAGGAATACAGAGACGAACAGGACTTGAACATGAAGCTCGTGCAAAGGGCCCTTCAA	1050
R I E H I Q Q E Y R D E Q D L N M K L V Q R A L Q	321
GACTTACAGGAAGAGGCAGATAAAAAGAAACAAAAAGAGAAGATATGATAAGAGAACAGAAGATATACCATAAA	1125
D L Q E E A D K K K Q K R E D M I R E Q K I Y H K	346
TATTTGGCACAGAGACGTGAGGAAGAAAAAGCTCAGGAGAAAAGAAATTTGACAGAATATTAGAGGAAGACAAGGCA	1200
Y L A Q R R E E E K A Q E K E F D R I L E E D K A	371
AAGAAGTTGGCTGAGAAGGACAAGGAGCTGAGACTTGAAGAGGAGGCAAGGAGACAGCTTGTGGATGAGGTCATG	1275
K K L A E K D K E L R L E K E A R R Q L V D E V M	396
TGTACAAAGAAAACCTCAAGTTCAAGAAAAGTTGCAACGAGAAGCTAAAGAACAGGAAGAACGTGCTATGGAACAG	1350
C T R K L Q V Q E K L Q R E A K E Q E E R A M E Q	421
AAACACATAAATGAAAGTCTTAAAGAACTTAAGTGTGAAGAGAAGGAGAATTTTGCAAGACGCCAACGTTTAGCC	1425
K H I N E S L K E L N C E E K E N F A R R Q R L A	446
CAGGAGTACAGGAAGCAACTTCAGATGCAAAATCGCCTACCAGCAGCAGTCCCAAGAAGCAGAGAAGGAAGAGAAA	1500
Q E Y R K Q L Q M Q I A Y Q Q Q S Q E A E K E E K	471
CGCCGAGAGTTTGAAGCAGGTGTAGCAGCAAACAAGATGTGTTTGGACAAGGTCCAGGAGGTCCCTGTCCACCCAT	1575
R R E F E A G V A A N K M C L D K V Q E V L S T H	496
CAAGTGTGCCTCAAACATTTCATCCCATGCGCAAGGCATGCCCCAGTAAGCTTCCACCGT <u>AGT</u> TCCGTGAGCAT	1650
Q V L P Q N I H P M R K A C P S K L P P .	516
CAATATATCTTTTCTTGGTCTTTTAATATTTTAACTACAGTATGCTTGTATGCTTCTTTTAACTCCTGGATAAA	1725
CTTTTCTTTTTTCCCTGAGTTTGTGTAATTAATTGAACATAAATTTTCTTCTTTGAATAAACCTGTGCCTATTTT	1800
GGAGTTCACAGACTTACAAATCCCA	1825

Abb. 2 NW-BR-3 cDNA und Aminosäuresequenz. Das Translations-Start und Stopkodon sind unterstrichen. Die RT-PCR Analyse wurde mit den Primern AGCGGTTTGGCACCGTACAGC und AGCTGTGTCGCCTGCCTTTGTGC durchgeführt. Die Northern-Blot Analyse wurde mit den Primern GAAAAGGAGGCAAGGAGACAGC und TGATGCTCACGGAACACTACGGTG generiert.

Alle RACE Versuche zeigten, daß der im SEREX Screening gefundene Klon das vollständige Transkript darstellt. Zusätzlich zeigte sich beim Screenen einer Testis-Library mit einem NW-BR-3 PCR-Produkt als Probe ein einziger Klon mit gleicher cDNA Sequenz wie NW-BR-3. Keiner der isolierten Klone zeigte ein längeres 5'-Ende als der ursprünglich gefundene NW-BR-3 Klon. Im Northern Blot, mit einem NW-BR-3 PCR-Produkt als Probe, zeigte sich eine klare Bande bei etwa 1,9kb (siehe Abb. 3) in normalen Testisgewebe, was ebenfalls zeigt, dass die NW-BR-3 cDNA Sequenz das komplette NW-BR-3 Transskript darstellt.

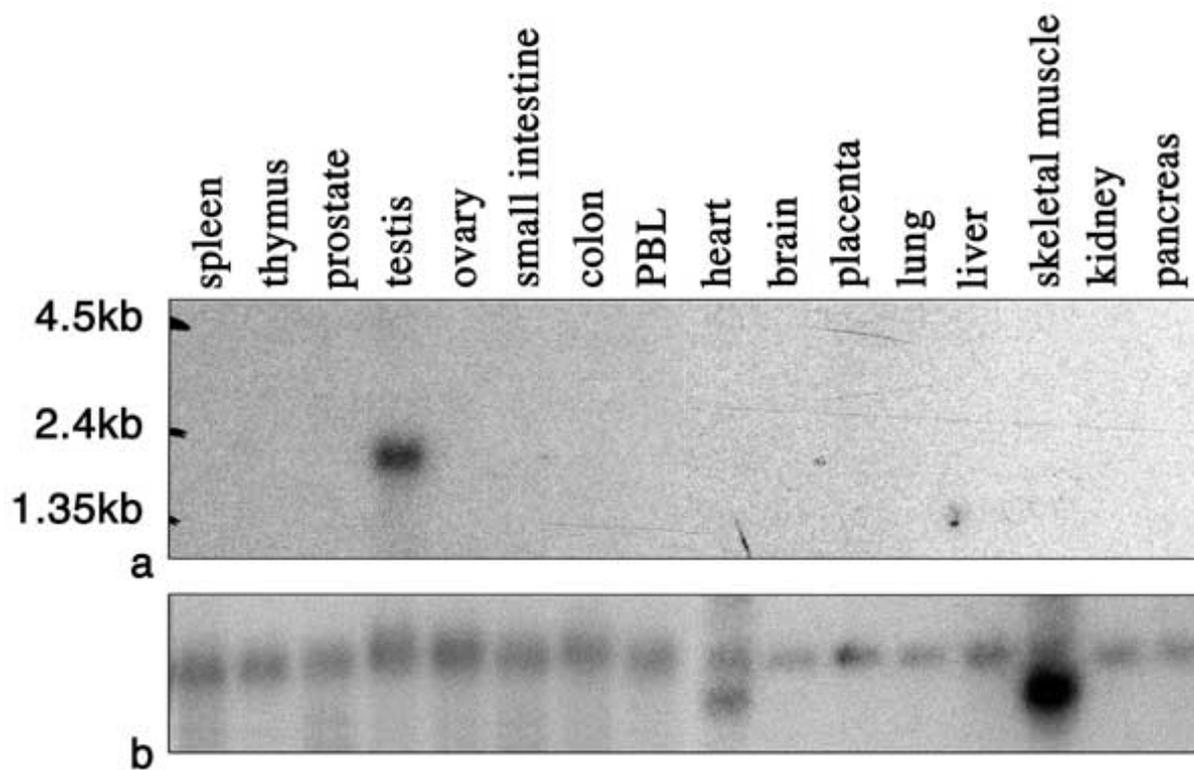


Abb. 3 Northern Blot Analyse der NW-BR-3 mRNA Expression. (a) Die NW-BR-3 Sonde hybridisiert bei etwa 1.9 kb. Kein sichtbares Signal in allen anderen Geweben. (b) Kontrolle mit einer Aktin-Sonde.

Der ‚open reading frame‘ (ORF) von NW-BR-3 (von bp88 bis bp1638) würde für ein Polypeptid von 516 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 62.123 kDa kodieren.

NW-BR-3 zeigt in der Datenbankanalyse eine 71,4% Nukleotidsequenzhomologie (das entsprechende kodierte Polypeptid hätte eine Aminosäuresequenzhomologie von 70,5%) zu einer Maus cDNA aus Mäuse-Testis. Ein Vergleich zwischen dem Maus NW-BR-3 Analogon mit der NW-BR-3 Sequenz zeigt die ‚translation initiation site‘ des Mausgens an Position 346 der NW-BR-3 cDNA Sequenz, was bedeutet, dass das entsprechende NW-BR-3 Polypeptid am aminoterminalen Ende über das Mauspeptid hinausragt (siehe Abb. 4). Über die Funktion dieses Mausgens ist in der Literatur nichts bekannt.

NW-BR-3	MYSQRFGTVQREVKGPTPKVVIVRSKPPKGGABHHLERIRRS HQKHNAI LASIKSSERDRLKAEWDQHNDCKIL	75
NW-BR-3	DSLVRARIKDAVQGF I INIEERRNNFRLRELLALEENEYFTEMQLKKETIEEKKDRMREKTKLLKEKNEKERQDF	150
m-BR-3	MOGFVINTTEERRNK--LRELLASEENEYFSEMQLKGETIEEKKDKMRERTKLLREKKEKERQEF	62
NW-BR-3	VAEKLDQQFRERCEELRVELLSIHQKKVCEERKAQIAFNEELSRQKLVEEQMFSKLWEEDRLAKEKREAQEARRQ	225
m-BR-3	VAEKLDQQFRERCEELRTKLASIEKKVVEERNAQIEFNKELKRQKLVEEHLFARLWEEDRLAKERREAQEERQ	137
NW-BR-3	KELMENTRLGLNAQITSIKAQRQATQLLKEEERLVESSNAQIKHENSQDMLKQKAKQETRTILQKALQERIEH	300
m-BR-3	RELQNTRLGLDAQVTSIQARQGGARRMKEEEARILEQNKAIKREDBQEKLQKQRRQETRSSLKAVQDKIES	212
NW-BR-3	IQQEYRDEQDLNMKLVQRALQDLQEBADKKKQKREDMIREQKIYHKYLAQRREEEKAQEKEFDRILEEDKAKKLA	375
m-BR-3	MQREYREDLDLNMKLVGRALQDLQEBADKKKQKREEMGREQKIYNDYLMQRREEEKAQEKELNRLLEDIKAKKLA	287
NW-BR-3	EKDKELRLEKEARRQLVDEVCMTRKLVQVEKLOREAKEQEERAMEQKHINESLKELNCEEKENFARRQRLAQEYR	450
m-BR-3	EKDRELALQRAARKQLMNEVMNTRKLVQVERLQKLRQEELALHEQRISES LKVLHQEDMEDFARRCALAEYR	362
NW-BR-3	KQLQMQIAYQQQSQAEEKEEKRRFEAGVAANKMCLDKVQEVLS THQVLPQNIHPMRKACPSKLPF.	516
m-BR-3	NQLQMQIAHQQAAREAEKEEERQEFEAGLAANKACLDKIQRILSENQALSQNVHPMRRGYDPKPL.	428

Abb. 4 Alignment der NW-BR-3 und Maus-Testis m-BR-3 Proteinsequenz.

4 Diskussion

Die SEREX Analyse hat bereits einige Tumorantigene mit potentiell diagnostischen und therapeutischen Nutzen in verschiedenen menschlichen Tumoren identifiziert^{12, 17, 18, 21-23, 25, 33-37}. Die durch SEREX definierten Tumorantigene^{19, 20} werden in eine Zahl von Subklassen unterteilt:

CT Antigene, Differentiationsantigene (differentiation antigens), Mutationsantigene (mutational antigens), überexprimierte Antigene, Splicevarianten Antigene und virale Antigene¹⁷. Hierbei ist jede Subklasse definiert über entweder eine strukturelle Variante oder ein charakteristisches Expressionmuster. Neu gefundene Tumorantigene müssen also folglich aufgrund einer sorgfältigen Analyse einerseits ihrer Struktur und andererseits ihres Expressionsmusters in Normal- und Tumorgewebe im Vergleich mit der EST-Datenbank oder durch Expressionsanalyse mittels Northern Blot oder RT-PCR klassifiziert werden.

Die vorliegende Arbeit erweiterte die Ergebnisse der SEREX-Analyse von Mammakarzinomen der Arbeitsgruppe^{17, 20, 26}. Es konnten 24 seroreaktive Klone identifiziert werden, welche insgesamt 13 verschiedene Gene repräsentieren, wobei der Vergleich mit Datenbankeinträgen in keinem der Klone strukturelle Fehlvarianten zeigte.

Drei der gefundenen Antigene (NW-BR-1, -2, und -3) zeigten jeweils tumorspezifische Expression, zwei weitere dieser Antigene entsprachen NY-BR-1 und SCP-1, welche bereits zuvor mittels SEREX^{20, 26} identifiziert werden konnten. NW-BR-3 ist ein neues Tumorantigen mit einem Cancer-Testis-Expressionsmuster.

NY-BR-1 wurde erstmalig in einem autologen SEREX-Screening eines Mammakarzinoms identifiziert²¹. NY-BR-1 ist ein Mamma-spezifisches Differenzierungs-Antigen mit einem

sehr restringierten Expressionsmuster, so wird es ausschließlich in normalem Brustgewebe und normalem Hodengewebe exprimiert, nicht aber in anderen Normalgeweben. Weiterhin wird NY-BR-1 in 80% der Mammakarzinome exprimiert, während andere Tumorgewebe NY-BR-1 negativ sind. Differenzierungsantigene wie NY-BR-1, mit einer Expression ausschließlich in nicht lebensnotwendigen Organen werden als gute Ziele einer Immunisierung gesehen. Melanozyten Differenzierungsantigene wie gp 100, Melan-A und Tyrosinase wurden bereits in Melanom-Impfstoffen verwandt. Immunantworten gegen diese Vakzinierung führten zu Tumorregression und Vitiligo. In einem weiteren Projekt werden derzeit CD 8+ T-Zell-Antworten gegen NY-BR-1 in Brustkrebspatientinnen evaluiert. Zusätzlich zu der Möglichkeit der antigenspezifischen Vakzinierung könnte NY-BR-1 als diagnostischer Tumorverlaufsmarker nützlich sein.

SCP-1 wurde erstmalig beschrieben im Rahmen des Screenings einer Testis-library mit dem Serum eines Patienten mit Melanom¹⁸. SCP-1 ist eine Komponente des synaptonemalen Komplexes, der während der meiotischen Prophase gebildet wird^{23, 24}. Tureci et al²⁰ konnten eine Expression von SCP-1 in einem Drittel der Mammakarzinome und malignen Gliome zeigen, ebenso in einem Viertel der Magenkarzinome²³.

Cancer Testis Antigene eignen sich aufgrund ihres Expressionsmusters hervorragend als Zielstruktur für eine Immuntherapie bei malignen Tumoren, das Fehlen von MHC-Klasse I Expression in CT-positiven testikulären Stammzellen lassen die Immunantwort gegen CT-Antigene tumorspezifisch werden. Tatsächlich zeigten sich in bisher durchgeführten klinischen Studien keine unerwünschten Nebenwirkungen^{27, 38, 39}.

Das in diesem Screening mit insgesamt 9 Klonen dominierende Antigen war NW-BR-3. Eine Datenbanksuche ergab eine Sequenzübereinstimmung zu einem Genomabschnitt auf Chromosom 18 (GenBank) und einer cDNA aus normalem Testis, Retina, Medulla und verschiedenen Tumoren (dbEST).

Das Expressionsmuster dieses neuen Antigens in Testis-Normalgewebe wurde mittels Northern Blot bestätigt, hier ließ sich ein Signal allerdings ausschließlich in Testisgewebe nachweisen. Eine zusätzlich durchgeführte RT-PCR zeigte zusätzlich schwache Signale in Normalgewebe von Hirn, Niere und Prostata. Diese Diskrepanz läßt sich am ehesten auf die etwas höhere Sensitivität der RT-PCR Technik zurückführen. Die Analyse der mRNA Expression in einer Reihe verschiedener Tumorgewebe ebenfalls mittels RT-PCR zeigte eine NW-BR-3 mRNA Expression in einigen Tumoren und Tumorzelllinien. Da die RT-PCR allerdings keine quantitative Untersuchung ist und die mRNA Menge nicht notwendigerweise mit der Proteinexpression korreliert, bleibt vorerst unklar, ob die Expression von NW-BR-3 Protein in Tumorgewebe tatsächlich höher ist als in nicht-testikulären Normalgeweben. Die Herstellung von NW-BR-3 Protein würde die Produktion von monoklonalen Antikörpern für die immunhistochemische Analyse von Normal- und Tumorgewebe ermöglichen. Hiermit ließe sich dann auch diese wichtige Frage klären. Immunhistochemische Bewertungen von Tumorantigenen zeigen häufig eine heterogene Expression schon in einer einzelnen Probe, hier vor allem in soliden Tumoren^{40, 41}. Antigen-spezifische Immuntherapieversuche für solide Tumoren müssen daher so ausgelegt sein, daß sie multiple Ziele gleichzeitig angreifen, um das Risiko eines Immun-switches in antigenlosen Tumorzell-Varianten zu vermindern. Aus genau diesem Grund sind weiterhin alle Anstrengungen notwendig, neue Ziele für die Immuntherapie zu finden, um hilfreiche Vakzine zu entwickeln. Diese Arbeit trägt dazu bei, neue potentielle Zielantigene für Immuntherapiestrategien zu identifizieren. Diese potentiellen Zielantigene müssen weiter charakterisiert werden und hinsichtlich T-Zell-Typisierung validiert werden.

5 Zusammenfassung

Die Tumorthherapie hat in den letzten Jahren, vor allem durch die Etablierung neuer molekularbiologischer Techniken, die den Tumor mittels spezifischer immunologischer Methoden angreifen, enorme Fortschritte erzielt. Nach wie vor ist das Mammakarzinom eine der häufigsten Krebsarten der Frau und immer noch eine der häufigsten Todesursachen. Die bisherigen nicht chirurgischen Therapiestrategien richten sich in erster Linie gegen die allgemeine Zellteilung (Strahlen- oder Chemotherapie) oder sind Antagonisten gegen einen Hormonrezeptor. Die Hinwendung zu speziellen molekularbiologischen Zielen mittels Antigenen scheint hier neue Möglichkeiten der Therapie zu eröffnen. So konnten Boon et al. Ziele von zytotoxischen T-Zellen bei Melanomen isolieren. Die hiermit gefundenen Antigene weisen ein gemeinsames charakteristisches Merkmal auf: ihre Expression in Normalgeweben ist auf Keimzellen in Testis und Ovar beschränkt. Folgerichtig wurde diese Klasse von Antigenen als *cancer-testis* Antigene beschrieben. Diese Technik stößt jedoch an ihre Grenzen, sobald die Etablierung von stabilen T-Zelllinien in bestimmten Tumoren nicht gelingt. Pfreundschuh et al. entwickelten daher die SEREX (*Serological Analysis of cDNA Expression libraries*) genannte Klonierungstechnik, die Antigene basierend auf einer spontanen humoralen Immunantwort des Patienten identifiziert, und somit auf die Etablierung von Zelllinien verzichtet. Die vorliegende Arbeit beschreibt die Identifizierung neuer Tumorantigene als potentielle Zielantigene für Immuntherapiestrategien beim Mammakarzinom. In einem Mammakarzinomscreening identifizierten wir die bereits zuvor beschriebenen Tumorantigene NY-BR-1 und SCR1, sowie ein weiteres, bisher unbekanntes Antigen NW-BR-3, welches ein Cancer-Testis ähnliches Expressionsmuster zeigt. Die Expression dieser Antigene und Implikationen für Immuntherapieansätze wird diskutiert.

6 Abstract

Enormous strides in cancer treatment have been made in the last decade. This is largely due to the development of methodologies capable of defining the antigenic targets on cancer cells that elicit a host immune response. Breast cancer is still one of the most entities in malignant tumors in women and one of the most causes of death. Previous non-surgical strategies are mostly targeting cell division itself (radiation or chemo therapy) or hormone receptors antagonists.

Facing specific molecular targets via antigens seems to strike new paths of curing cancer. It was Boon and colleagues who established molecular cloning of antigens recognized by cytotoxic T cells in melanoma. The group of antigens found with this method shared a characteristic feature; their expressions in normal tissues is restricted to germ cells in testis and ovary and are therefore called „cancer-testis“ antigens.

The limitations are the establishment of stable T- and tumor cell-lines. Pfreundschuh and colleagues invented an antigen-discovery strategy called SEREX (*Serological Analysis of cDNA Expression libraries*), which identifies target antigens by analyzing the patient's spontaneous humoral immune response without constructing a stable cell line. In this paper we describe the identification of new tumor antigens as possible targets in immune strategies in breast cancer. We found previous described antigens NY-BR-1 and SCR and one new antigen NW-BR-1 in breast cancer screening. NW-BR-1 shows a cancer-testis like expression profile. The expression as well as implications for future immune vaccine strategies is being discussed.

7 Literatur

1. Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J. & Pisani, P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 94, 153-6 (2001).
2. Ford, D., Easton, D. F. & Peto, J. Estimates of the gene frequency of BRCA1 and its contribution to breast and ovarian cancer incidence. *Am J Hum Genet* 57, 1457-62 (1995).
3. Campbell, H., MacKay, J. & Porteous, M. The future of breast and ovarian cancer clinics. *Bmj* 311, 1584-5 (1995).
4. Dupont, W. D. et al. Breast cancer risk associated with proliferative breast disease and atypical hyperplasia. *Cancer* 71, 1258-65 (1993).
5. Harder, F., Zuber, M. & Oertli, D. [Instrumental diagnosis for therapy decision making--what is possible and desirable, what is essential and what is superfluous--in breast surgery]. *Langenbecks Arch.Chir Suppl Kongressbd.* 114, 391 (1997).
6. van Dongen, J. A. et al. Randomized clinical trial to assess the value of breast-conserving therapy in stage I and II breast cancer, EORTC 10801 trial. *J.Natl.Cancer Inst.Monogr*, 15 (1992).
7. van Dongen, J. A. et al. Long-term results of a randomized trial comparing breast-conserving therapy with mastectomy: European Organization for Research and Treatment of Cancer 10801 trial. *J.Natl.Cancer Inst.* 92, 1143 (2000).
8. Goldhirsch, A., Glick, J. H., Gelber, R. D. & Senn, H. J. International Consensus Panel on the treatment of primary breast cancer. V: Update 1998. *Recent Results Cancer Res* 152, 481-97 (1998).
9. Brito, R. A. et al. Long-term results of combined-modality therapy for locally advanced breast cancer with ipsilateral supraclavicular metastases: The University of Texas M.D. Anderson Cancer Center experience. *J Clin Oncol* 19, 628-33 (2001).
10. 1997 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. Adopted on November 7, 1997 by the American Society of Clinical Oncology. *J.Clin.Oncol.* 16, 793 (1998).

11. Neumann, E. et al. 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 (1998).
12. Sahin, U. et al. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92, 11810 (1995).
13. Carey, T. E., Takahashi, T., Resnick, L. A., Oettgen, H. F. & Old, L. J. Cell surface antigens of human malignant melanoma: mixed hemadsorption assays for humoral immunity to cultured autologous melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 3278-82 (1976).
14. Ueda, R. et al. Cell surface antigens of human renal cancer defined by autologous typing. *J.Exp.Med.* 150, 564 (1979).
15. Pfreundschuh, M. et al. Serological analysis of cell surface antigens of malignant human brain tumors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 75, 5122 (1978).
16. Gure, A. O. et al. CT10: a new cancer-testis (CT) antigen homologous to CT7 and the MAGE family, identified by representational-difference analysis. *Int.J.Cancer* 85, 726 (2000).
17. Chen, Y. T. et al. Identification of multiple cancer/testis antigens by allogeneic antibody screening of a melanoma cell line library. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 6919 (1998).
18. Chen, Y. T. et al. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94, 1914 (1997).
19. Gure, A. O. et al. SSX: a multigene family with several members transcribed in normal testis and human cancer. *Int.J.Cancer* 72, 965 (1997).
20. Tureci, O. et al. 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 (1998).
21. Jager, D. et al. Identification of a tissue-specific putative transcription factor in breast tissue by serological screening of a breast cancer library. *Cancer Research* 61, 2055 (2001).
22. Jager, D. et al. Serological cloning of a melanocyte rab guanosine 5'-triphosphate-binding protein and a chromosome condensation protein from a melanoma complementary DNA library. *Cancer Research* 60, 3584 (2000).
23. Scanlan, M. J. et al. Humoral immunity to human breast cancer: antigen definition and quantitative analysis of mRNA expression. *Cancer Immun.* 1, 4 (2001).

24. Obata, Y. et al. SEREX analysis of gastric cancer antigens. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 46 Suppl, S37 (2000).
25. Scanlan, M. J. et al. Characterization of human colon cancer antigens recognized by autologous antibodies. *Int.J.Cancer* 76, 652 (1998).
26. Jager, D. et al. Identification of a tissue-specific putative transcription factor in breast tissue by serological screening of a breast cancer library. *Cancer Res.* 61, 2055 (2001).
27. Marchand, M. et al. Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int J Cancer* 80, 219-30 (1999).
28. Jager, E. et al. Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8+ T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1+ cancers. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 12198 (2000).
29. Coulie, P. G., Van den Eynde, B. J., van der, B. P., Van Pel, A. & Boon, T. Antigens recognized by T-lymphocytes on human tumours. *Biochem.Soc.Trans.* 25, 544 (1997).
30. Jaeger, E. et al. Generation of cytotoxic T-cell responses with synthetic melanoma-associated peptides in vivo: implications for tumor vaccines with melanoma-associated antigens. *Int.J.Cancer* 66, 162 (1996).
31. Jager, E. et al. Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor enhances immune responses to melanoma-associated peptides in vivo. *International Journal of Cancer* 67, 54 (1996).
32. Rosenberg, S. A. et al. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat.Med.* 4, 321 (1998).
33. Gure, A. O. et al. Human lung cancer antigens recognized by autologous antibodies: definition of a novel cDNA derived from the tumor suppressor gene locus on chromosome 3p21.3. *Cancer Res.* 58, 1034 (1998).
34. Gure, A. O. et al. Serological identification of embryonic neural proteins as highly immunogenic tumor antigens in small cell lung cancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 4198 (2000).

35. Jager, D. et al. Cancer-testis antigens and ING1 tumor suppressor gene product are breast cancer antigens: Characterization of tissue-specific ING1 transcripts and a homologue gene. *Cancer Research* 59, 6197 (1999).
36. Obata, Y. et al. Identification of Cancer Antigens in Breast Cancer by the SEREX Expression Cloning Method. *Breast Cancer* 6, 305 (1999).
37. Scanlan, M. J. et al. Antigens recognized by autologous antibody in patients with renal-cell carcinoma. *International Journal of Cancer* 83, 456 (1999).
38. Jager, E. et al. Monitoring CD8 T cell responses to NY-ESO-1: correlation of humoral and cellular immune responses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 4760 (2000).
39. Jager, E. et al. Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *J.Exp.Med.* 187, 265 (1998).
40. Jungbluth, A. A. et al. Immunohistochemical analysis of NY-ESO-1 antigen expression in normal and malignant human tissues. *Int J Cancer* 92, 856-60 (2001).
41. Jungbluth, A. A. et al. Monoclonal antibody MA454 reveals a heterogeneous expression pattern of MAGE-1 antigen in formalin-fixed paraffin embedded lung tumours. *Br J Cancer* 83, 493-7 (2000).

8 Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mir geholfen haben, diese Arbeit zu schreiben.

Zunächst Herrn Professor Knuth für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung der notwendigen Materialien und Laborräume.

Herrn PD Dr. Jäger für die geistige und moralische Unterstützung, sowie für die Hilfestellung bei Unklarheiten.

Frau Claudia Frei, ohne deren Hilfe und Kenntnisse ich diese Arbeit nicht hätte durchführen können.

Meinen Eltern und Schwiegereltern für das beständige Drängen und die damit erfolgte schrittweise Progression des Werks.

Meinem Bruder für die unermüdliche Geduld bei der Erstellung von Tabellen und Präsentationen.

Herrn Professor Hagen für den finalen Motivationsschub zum Abschluß der Arbeit.

Und schließlich meiner Frau Leonie für die uneingeschränkte Unterstützung bei allen unseren Projekten.

9 Lebenslauf

Curriculum Vitae

* 30.08.1975

in Bielefeld

Ausbildung:

1986 -1995:	Karls gymnasium Stuttgart
1996 – 2003	Studium der Humanmedizin an der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main.
Oktober 2003	Drittes Staatsexamen Note 2,0

Arbeitserfahrungen:

Nov 2003 – Feb 2006	Arzt im Zentrum der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/ Main.
Seit März 2006	Arzt an der Klinik für Hals- Nasen und Ohrenkranke der Universität Würzburg

Lehrveranstaltungen:

- Stellvertretender Lehrbeauftragter im Fach HNO
- Seit 2003 Lehrer im OTA-Kurs für das Fach HNO
- Seit 2005 Ausrichter des Studentenkurses Neurootologie/ Schädelbasi sanatomie

Mitgliedschaften

Seit 2003	Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie
-----------	--

Veröffentlichungen

Abstracts und Vorträge

- Unkelbach MH, Adunka O, Radeloff A, Gstöttner W, Mack M. Evaluation der Kochlealänge anhand präoperativer CT Daten für eine genauere Insertion bei der elektrisch akustischen Stimulation (EAS), HNO-Informationen 2005; 84: 51-231,ISSN 0344-9319
- Unkelbach MH, Mack MG, Gstöttner W, Adunka O. Predicting basal cochlear length for electric-acoustic stimulation, 10th symposium on Cochlear Implants in Children, Dallas, TX, USA, Abstract book, 70, 2005.
- Unkelbach MH, Adunka O, Radeloff A, Kiefer J, Gstöttner W. Reduktion des Insertions-traumas mit einer neuen Cochlea Implantat Elektrode, HNO Informationen 2004; 29:50-193, ISSN 0344-9319.
- Adunka O, Unkelbach M, Radeloff A, Wilson B, Gstoettner W. Outcomes of hearing preservation and cochlear vulnerability in cochlear implant recipients. 10th Symposium on Cochlear Implants in Children, Dallas, TX, Abstract Book, 69, 2005
- Adunka O, Kiefer J, Radeloff A, Unkelbach MH, Gstoettner W. Preservation of inner ear structures with a promontory cochleostomy. II Meeting Consensus on Auditory Implants, Valencia, Spain, Abstract Book, 100, 2004.
- Adunka O, Kiefer J, Radeloff A, Unkelbach MH, Gstoettner W. A new cochlear implant electrode array for deep and atraumatic insertions. II Meeting Consensus on Auditory Implants, Valencia, Spain, Abstract Book, 202, 2004.
- Adunka OF, Kiefer J, Unkelbach MH, Radeloff A, Gstoettner WK. Development and evaluation of an improved cochlear implant electrode design for electric acoustic stimulation. 7th European Symposium on Pediatric Cochlear Implantation, Geneva, Switzerland, Abstract Book, 76, 2004.
- Adunka OF, Kiefer J, Unkelbach MH, Gstoettner W. Evaluation of a cochlear implant electrode for deep and atraumatic insertions. VIII international Cochlear Implant Conference, Indianapolis, Indiana, USA, Abstract Book, 72, 2004
- Adunka O, Kiefer J, Unkelbach MH, Gstoettner W. An Improved Electrode Design for Electric and Acoustic Stimulation. 4th Congress of Asia Pacific Symposium on Cochlear Implant and Related Sciences (APSCI), Taipei, Taiwan, Abstract Book, 75, 2003

Veröffentlichungen

Artikel

- Adunka O, Unkelbach MH, Mack MG, Radeloff A, Gstoettner W. Predicting basal cochlear length for electric-acoustic stimulation. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2005 Jun;131(6):488-92.
- Adunka O, Kiefer J, Unkelbach MH, Radeloff A, Gstoettner W. Evaluating cochlear implant trauma to the scala vestibuli. Clin Otolaryngol. 2005 Apr;30(2):121-7.
- Adunka O, Gstoettner W, Hambek M, Unkelbach MH, Radeloff A, Kiefer J. Preservation of basal inner ear structures in cochlear implantation. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec. 2004;66(6):306-12.
- Adunka O, Kiefer J, Unkelbach MH, Radeloff A, Lehnert T, Gstottner W. Evaluation of an electrode design for the combined electric-acoustic stimulation Laryngorhinootologie. 2004 Oct;83(10):653-8. German.
- Adunka O, Unkelbach MH, Mack M, Hambek M, Gstoettner W, Kiefer J. Cochlear implantation via the round window membrane minimizes trauma to cochlear structures: a histologically controlled insertion study. Acta Otolaryngol. 2004 Sep;124(7):807-12.
- Adunka O, Kiefer J, Unkelbach MH, Lehnert T, Gstoettner W. Development and evaluation of an improved cochlear implant electrode design for electric acoustic stimulation. Laryngoscope. 2004 Jul;114(7):1237-41.
- Adunka O, Unkelbach MH, Gstottner W, Hambek M, Knecht R. AdOnco Ein klinisch-wissenschaftliches Datenbanksystem zur Erfassung und Auswertung onkologischer Daten im Kopf-Hals Bereich. HNO. 2005 Jan;53(1):39-45. German.
- Jager D, Unkelbach M, Frei C, Bert F, Scanlan MJ, Jager E, Old LJ, Chen YT, Knuth A. Identification of tumor-restricted antigens NY-BR-1, SCP-1, and a new cancer/testis-like antigen NW-BR-3 by serological screening of a testicular library with breast cancer serum. Cancer Immun. 2002 Jun 28;2:5.

10 Ehrenwörtliche Erklärung

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die am Fachbereich Medizin zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel

„Identifikation eines neuen Brustkrebsantigens NW-BR3 mittels serologischem Screening (SEREX)“

im Krankenhaus Nordwest, Abteilung für innere Medizin II in Frankfurt am Main unter Leitung von Herrn PD Dr. med. Dirk Jäger ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt. Die vorliegende Arbeit wurde in Cancer Immunity unter dem Titel: „Identification of tumor-restricted antigens NY-BR-1, SCP-1, and a new cancer/testis-like antigen NW-BR-3 by serological screening of a testicular library with breast cancer serum“ publiziert.

Frankfurt am Main, den 14.12.2005

Marc H. Unkelbach