

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Identifizierung, Validierung und
Charakterisierung neuer Tumorantigene in
Karzinomen der oberen Atemwege**

vorgelegt von
Martina Schaffrik

aus

Landshut

2005

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Michael Meisterernst betreut und vor der Fakultät vertreten.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 23.05.2005

(Martina Schaffrik)

Dissertation eingereicht am 23.05.2005

1. Gutachter: Prof. Dr. Michael Meisterernst

2. Gutachter: Prof. Dr. Horst Domdey

Mündliche Prüfung am 05.10.2005

Teile dieser Arbeit wurden publiziert bzw. werden zur Publikation eingereicht:

1. **Schaffrik M.**, Mack B., Gires O. The genelocus ADAT3b encodes for two proteins, overexpressed in head and neck carcinomas. *Manuskript in Vorbereitung*.
2. Gires O., Andratschke M., Schmitt B., Mack B. and **Schaffrik M.** (2005) Cytokeratin 8 associates with the external leaflet of plasma membranes in tumour cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **4**,1154-62.
3. Rauch J.*, Ahlemann M.*, **Schaffrik M.***, Mack B., Ertongur S., Andratschke M., Zeidler R., Lang S. and Gires O. (2004) Allogenic antibody-mediated identification of head and neck cancer antigens. *Biochem Biophys Res Commun*, **1**, 156-62.
4. Gires O.*, Munz M.*, **Schaffrik M.***, Kieu C., Rauch J., Ahlemann M., Eberle D., Mack B., Wollenberg B., Lang S., Hofmann T., Hammerschmidt W., Zeidler R. (2004) Profile identification of disease-associated humoral antigens using AMIDA, a novel proteomics-based technology. *Cell Mol Life Sci*, **10**,1198-207.

*: Diese Autoren waren zu gleichen Teilen an der Arbeit beteiligt.

für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Tumore des Kopf- und Hals-Bereichs	2
1.1.1 Epidemiologie	2
1.1.2 Prognose	2
1.1.3 Karzinogenese	4
1.1.4 Neue Diagnose- und Therapiestrategien	8
1.2 Immuntherapie	9
1.2.1 Die unspezifische adoptive Immuntherapie	10
1.2.2 Die spezifische adoptive Immuntherapie	10
1.3 Tumorantigene	12
1.4 Techniken zur Identifizierung von Tumorantigenen	16
1.5 Zielsetzung	20
2 Material	21
2.1 Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte	21
2.2 Antikörper	26
2.3 Bakterien	27
2.4 Plasmide	27
2.5 Zelllinien	28
2.6 Verwendete Oligonukleotide	28
3 Methoden	30
3.1 Zellkultur	30
3.1.1 Kultivierung von Zelllinien	30
3.1.2 Gewinnung von Einzelzellsuspensionen aus Tumorbiopsien	31
3.1.3 Bestimmung der Zellzahl	31
3.2 Immunpräzipitation und 2D-Gelelektrophorese	31
3.2.1 Immunpräzipitation	31
3.2.2 Erste Dimension der 2D-PAGE: Isoelektrische Fokussierung	32
3.2.3 Zweite Dimension der 2D-PAGE: SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese	33
3.3 Protein-Analysen mittels Massenspektrometrie	35
3.3.1 Tryptischer Verdau	35
3.3.2 Beschichten der Ankerplatten mit DHB-Matrix	36
3.3.3 MALDI-ToF-Analyse	36
3.4 FACS-Analysen	36
3.5 Fluoreszenzfärbungen	37

3.6	Immunzytochemie	38
3.7	Immunhistochemische Schnittfärbungen	38
3.8	<i>In situ</i> Hybridisierung	39
3.9	Quantifizierung der humoralen Antwort gegen CK8	40
3.10	Molekularbiologische Methoden	40
	3.10.1 Agarose-Gelelektrophorese	41
	3.10.2 5'-RACE	41
	3.10.3 Relative Quantifizierung der Genexpression mittels <i>real-time</i> Polymerase-Kettenreaktion	41
3.11	Bakterienkultur	43
	3.11.1 Vermehrung und Aufbewahrung	43
	3.11.2 Transformation von <i>E.coli</i>	43
3.12	Transformation von eukaryotischen Zellen	44
3.13	Western Blot	44
3.14	MTT Analysen	45
4	Ergebnisse	46
4.1	Identifizierung und Validierung neuer Tumorantigene in Plattenepithel- karzinomen der oberen Atemwege (PEK)	46
	4.1.1 Entwicklung einer Proteom-basierenden Technik zur Isolierung und Identifizierung von Tumorantigenen (AMIDA)	46
	4.1.2 Isolierung und Identifizierung potenzieller Tumorantigene in PEK der oberen Atemwege	52
	4.1.3 Validierung der AMIDA-Antigene CK8 und AAA-TOB3/KIAA1273	54
	4.1.3.1 CK8-AK als zirkulierende Biomarker	54
	4.1.3.2 CK8 als Tumormarker in PEK der oberen Atemwege	58
	4.1.3.3 Ektopische CK8-Expression an der Oberfläche von PEK	60
	4.1.3.4 Überexpression von AAA-TOB3 bzw. KIAA1273 in PEK	66
4.2	Charakterisierung von AAA-TOB3 und KIAA1273	70
	4.2.1 Der Genlokus ATAD3B	70
	4.2.2 Homologe Proteine von AAA-TOB3 und KIAA1273	75
	4.2.3 C-Myc Regulation von AAA-TOB3 und KIAA1273	79
	4.2.4 Subzelluläre Lokalisation von AAA-TOB3 und KIAA1273	81
	4.2.5 Zellulärer Systeme zur funktionellen Untersuchung von AAA-TOB3 und KIAA1273	84
	4.2.5.1 Transiente und konstitutive Überexpression von AAA-TOB3 und KIAA1273 in Karzinomzelllinien	84
	4.2.5.2 Transiente Repression von AAA-TOB3 und KIAA1273 in Karzinomzelllinien	92
5	Diskussion	97
5.1	Entwicklung einer neuen „ <i>Target Identification</i> “-Technologie	97
5.2	AMIDA-Antigene als Biomarker und Ziele für die Immuntherapie	102
5.3	Funktionelle Charakterisierung von KIAA1273 und AAA-TOB3	106
5.4	Ausblick	110

6 Zusammenfassung	112
Literaturverzeichnis	114
Abkürzungsverzeichnis	123
Danksagung	127

1 Einleitung

Jedes Jahr erkranken mehr als 10 Millionen Menschen weltweit an Krebs, mehr als 7 Millionen sterben jährlich daran. Bis zum Jahr 2020 wird die Zahl der Neuerkrankungen vermutlich auf jährlich über 15 Millionen ansteigen (Boutayeb *et al.*, 2005, <http://www.who.int/ent/>). In Deutschland wird bereits jeder Dritte im Laufe seines Lebens mindestens einmal mit der Diagnose Krebs konfrontiert, jeder Vierte erliegt dem Leiden. In den Industrienationen ist Krebs derzeit die zweithäufigste Todesursache nach den Herz- und Kreislauferkrankungen. Aufgrund der enormen Erfolge, die in den letzten Jahren bei der Vorbeugung von Herz-Kreislauferkrankungen erreicht wurden, und des Anstiegs der durchschnittlichen Lebenserwartung, wird Krebs voraussichtlich bald die häufigste Todesursache in den entwickelten Ländern sein (Broschüre, Robert-Koch-Institut 2004; Krebs-Informationsdienst KID, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, 2004).

Trotz intensiver Krebsforschung in den letzten Jahrzehnten und zahlreichen Fortschritten bei Diagnose- und Therapiestrategien, ist es nur bei einigen Krebsentitäten gelungen, die Mortalität drastisch zu senken. Ursächlich hierfür ist die Komplexität der Erkrankung; nahezu jeder Tumor stellt ein individuelles Problem dar. Daher sind die wichtigsten Voraussetzungen zur Erhöhung der Prognose eine optimale Früherkennung und eine differenzierte, individuelle und somit gezielte und erfolgsversprechende Therapie.

1.1 Tumore des Kopf- und Hals-Bereichs

1.1.1 Epidemiologie

Tumore in der Kopf-Hals-Region gehören mit einer jährlichen globalen Inzidenz von über 500.000 zu den häufigsten Krebsentitäten. Weltweit stehen sie an sechster, bei Männern sogar an fünfter Stelle (American Academy of Otolaryngology, www.entnet.org/healthinfo/tabacco/cancer.cfm, 2005).

Bei etwa 95% aller Wucherungen im Kopf-Hals-Bereich handelt es sich um Tumore epithelialen Ursprungs (Gath *et al.*, 1999). Sie werden auch als Karzinome der oberen Atemwege oder der Hals-Rachen-Region (HR) bezeichnet und gehören zur Gruppe der Plattenepithelkarzinome. Die häufigsten Karzinome der oberen Atemwege sind Wucherungen in der Mundhöhle, in den Nasenhohlräumen, des Kehlkopfs (Larynx), des Pharynx mit Oropharynx, Hypopharynx und Laryngopharynx oder des Ösophagus (Abb. 1.1).

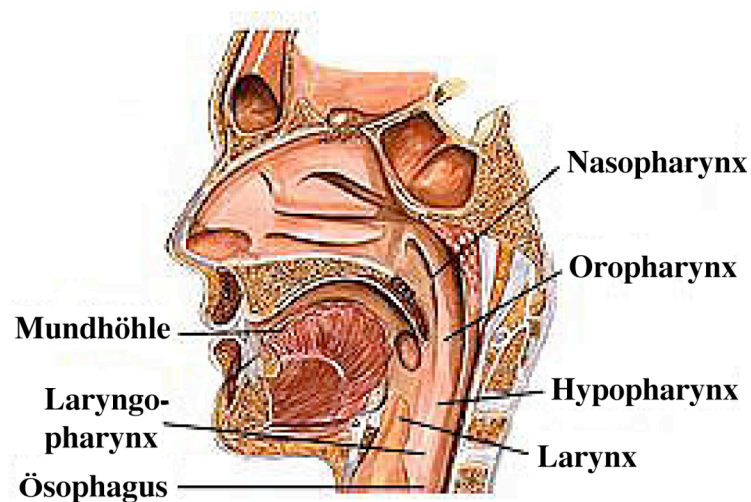


Abb. 1.1: Hohlräume der Hals-Rachen-Region.

1.1.2 Prognose

Trotz zahlreicher Entwicklungen in Chirurgie, Strahlen- und Chemotherapie hat sich die Prognose dieser Erkrankungen in den letzten 40 Jahren nicht verbessert. Die 5-Jahres Überlebensrate beträgt durchschnittlich 50% und gehört somit zu den schlechtesten unter den häufigsten Tumorarten (Gath *et al.*, 1999; Spitz *et al.*, 1994; American Academy of otolaryngology, www.entnet.org/healthinfo/tabacco/cancer.cfm, 2005).

Ursachen der schlechten Prognose

Wichtigster prognostischer Faktor bei Karzinomen der oberen Atemwege ist die lymphogene Metastasierung zum Zeitpunkt der Erstdiagnose. Die Anwesenheit einer einzigen Lymphknotenmetastase (LKM) reduziert die Überlebensrate um mindestens 50% (Enepekides *et al.*, 1999). So können Patienten mit einem Karzinom in frühem Stadium (Stadium I: Primärtumor in der längsten Ausdehnung ≤ 2 cm) mit einer durchschnittlichen 5-Jahres Überlebensrate von 85% rechnen. Bei Patienten mit Tumoren von großer lokaler Ausdehnung und zusätzlichem Befall von Lymph-knoten reduziert sich die Überlebensrate durchschnittlich auf 30% (Lang *et al.*, 2002). Die Symptomatik wird bei Karzinompatienten im Hals- und Rachenraum mit Schluckbeschwerden, Atemnot und Heiserkeit meist erst in späten Tumorstadien erkennbar. Da es immer noch keine ausreichenden Vorsorgeuntersuchungen für Risikogruppen gibt, besitzen mehr als zwei Drittel der Patienten bei ihrer Erstvorstellung bereits Tumore in den weit fortgeschrittenen Stadien III und IV (Vernham *et al.*, 1994; Vokes *et al.*, 1993). Patienten, die bereits LKM besitzen, entwickeln nach abgeschlossener Therapie mit höherer Wahrscheinlichkeit Rezidive und Fernmetastasen in anderen Organen (vorwiegend Lunge und Skelettsystem), die zu einem erneuten Ausbruch der Krankheit und zu dieser äußerst schlechten Prognose führen (Ferlito *et al.*, 2001). Lokoregionären Lymphknoten werden routinemäßig histologisch auf disseminierte Tumorzellen überprüft. Intensive Studien (Rinaldo *et al.*, 2004; Ferlito *et al.*, 2001) ergaben jedoch, dass bis zu 80% aller als tumornegativ, N0 (N: regionale Lymphknoten; 0: kein Tumorbefall), diagnostizierten, lokoregionären Lymphknoten, die während der OP oder bei Nachuntersuchungen entnommen werden, tatsächlich doch Mikrometastasen enthalten. Ursächlich für diese hohe falsch-negativ Rate sind okkulte Tumorzellen (*minimal residual disease*, MRD). Diese sind mit routinemäßigen histopathologischen Methoden nicht detektierbar und bilden aufgrund der schnellen Progression dieses Karzinom-typs früh Rezidive und neue Metastasen.

Die korrekte Bestimmung von disseminierten Tumorzellen in Lymphknoten und den Grenzbereichen des Primärtumors besitzt bei HR-Karzinomen eine immense prognostische Bedeutung. Aus diesem Grunde sind sensitive und geeignete Marker zur Erkennung von MRD zwingend notwendig. Zuverlässige biologische Marker, die zu einem frühen Zeitpunkt mit dem Tumor assoziiert und für eine routine-

mäßige Frühdiagnose geeignet sind, würden den früheren Einsatz einer Therapie ermöglichen und somit zu einer Steigerung der Prognose führen. Molekulare Marker könnten außerdem Zielstrukturen für neue Therapiekonzepte darstellen. Bisher sind jedoch nur sehr wenige geeignete molekulare Biomarker verfügbar.

1.1.3 Karzinogenese

Die Entstehung von Tumoren ist ein mehrstufiger Prozess, der auch zum heutigen Stand der Forschung nicht vollständig geklärt ist. Er beinhaltet genomische Mutationen, die der Zelle einen eindeutigen Selektionsvorteil verschaffen. Die sequenzielle Akkumulation verschiedener genomischer Alterationen führt schließlich zu einer unkontrollierten zellulären Expansion. Als Krebs bezeichnet man die Endstufe dieses Prozesses, der sich über einen Zeitraum von Jahrzehnten erstrecken kann. Krebs ist durch zwei Haupteigenschaften charakterisiert: zum einen durch unkontrollierte Zellproliferation und zum anderen durch die Fähigkeit der Krebszellen in umliegende Gewebe einzudringen. Man nimmt an, dass sich ca. 5-10 chromosomale Abberationen und Mutationen in Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen ansammeln müssen, um eine gesunde Zelle in eine Tumorzelle zu transformieren. Diese müssen im Wesentlichen zu folgenden Veränderungen führen (Hanahan und Weinberg, 2000):

- Verlust der Sensitivität gegenüber proliferationsinhibitorischen Signalen und Differenzierungssignalen
- Induktion von autokrinen Wachstumssignalen
- uneingeschränktes replikatives Potential
- Resistenz gegenüber Apoptose
- Gewebeinvasion und Metastasierung
- verstärkte Angiogenese

Bei Tumoren der oberen Atemwege erfolgt die Karzinogenese, ausgehend vom gesunden Epithel, über die Hyperplasie und Dysplasie zum *Carcinoma in situ*, und kann schließlich im invasiven Karzinom mit Metastasenbildung enden (Abb. 1.2).

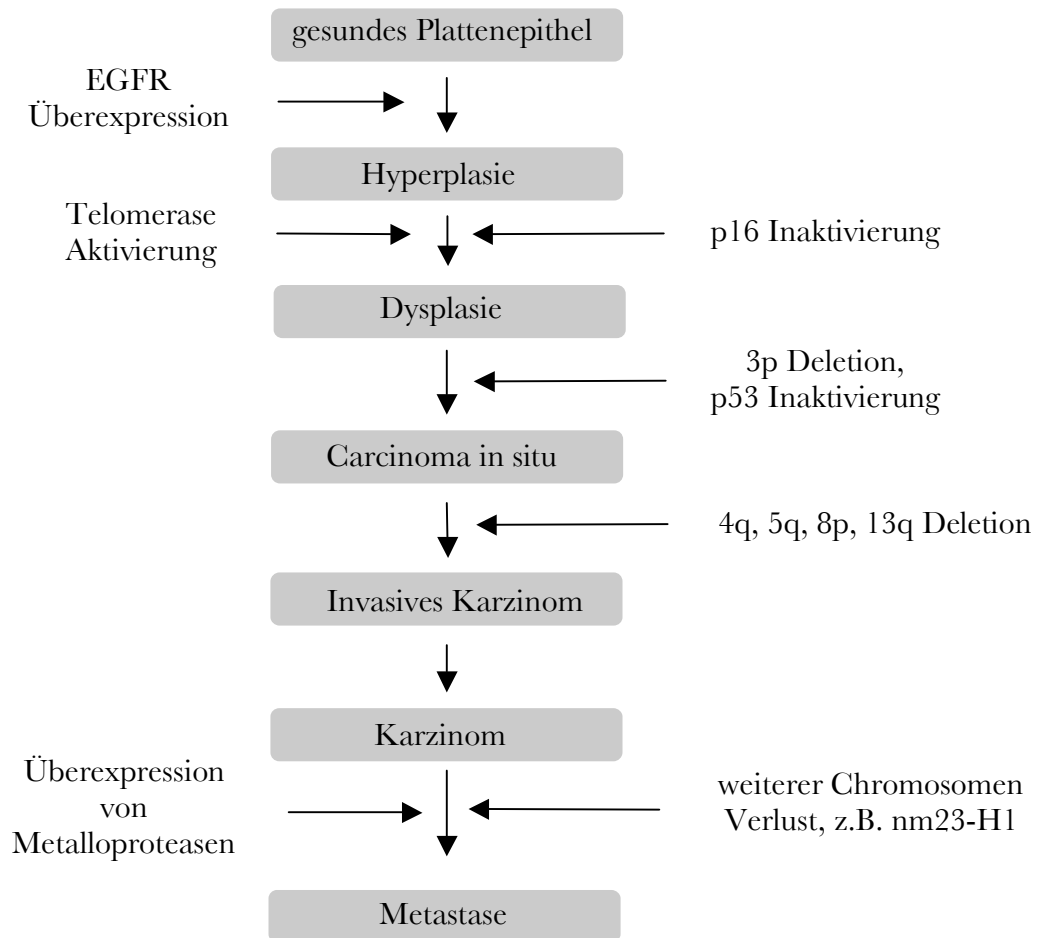


Abb. 1.2: Karzinogenese bei Karzinomen der oberen Atemwege. Die angegebenen Mutationen sind Beispiele für häufig auftretende Ereignisse. Nicht jedes HR-Karzinom wird durch diese Mutationen verursacht.

Zusammenfassend: einzelne veränderte Zellen der epithelialen Basalzellschicht zeigen vermehrtes Zellwachstum, einhergehend mit einer Zunahme der Zellgröße und einer Abnahme der Differenzierung, bis die Basalmembran letztendlich durchbrochen wird, entartete Zellen benachbartes Gewebe infiltrieren und auf die Lymphknoten oder andere Organe übergreifen.

Molekulare Veränderungen

Die molekularen Veränderungen, die sich in den einzelnen Abschnitten ereignen, sind bis jetzt größtenteils unklar. Es wird aber von genetischen Veränderungen hauptsächlich an 10 chromosomalen Loci ausgegangen: 3p, 4q, 5q21-22, 7p11, 8q21-24, 9p21-22, 11q13, 11q23, 13q, 14q, 17p, 18q und 22q (Nagpal *et al.*, 2003). Der Verlust der Heterozygotie (*loss of heterozygosity, LOH*) nimmt mit fortschreitender Karzinogenese zu (Abb. 1.2). Besonders wichtig für die Entwicklung von HR-Karzinomen scheinen jedoch drei Schlüsselmodifikationen zu sein: Mutationen des

Tumorsuppressor-Proteins p53 (Chr. 17p), die Inaktivierung des zyklinabhängigen Kinaseinhibitors p16 (Chr. 9p) und die Überexpression des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors EGFR (*epidermal growth factor receptor*; Chr. 7p11). Genetische Veränderungen, welche die Expression oder Funktion dieser Proteine stören, können in respektive 40% (Taylor *et al.*, 1999), 70% (Sartor *et al.*, 1999), und 90% (Grandis *et al.*, 1993) aller Karzinome der oberen Atemwege nachgewiesen werden.

Risiken

Irreversible Mutationen und andere genetische Alterationen können durch äußere Einflüsse hervorgerufen werden (UV- oder Radiostrahlung und kanzerogene Stoffe) oder vererbt sein. So erhöht das Auftreten von HRK bei Verwandten ersten Grades das Risiko, selbst einen Tumor zu entwickeln, bis um den Faktor 3,8 (Copper *et al.*, 1995; Foulkes *et al.*, 1996).

Die Hauptrisikofaktoren an einem Tumor der oberen Atemwege zu erkranken sind allerdings v.a. die exogenen Noxen Tabak (20fach erhöhtes Risiko), mit seinen (pro-)kanzerogenen Inhaltsstoffen (z.B. Benz-(a)-pyren oder Nitrosamine), und Alkohol (5fach erhöhtes Risiko). Über 80% aller Tumore im Hals-Rachenraum sind mit hohem Tabakkonsum assoziiert (*American cancer society*, 2005). Die Kombination von gesteigertem Tabak- und Alkoholkonsum führt sogar zu einem 50fach erhöhtem Erkrankungsrisiko (Rodriguez *et al.*, 2004). Die kanzerogenen Inhaltsstoffe des Tabaks verursachen Punktmutationen hauptsächlich durch Guanin-Nukleotid Transversionen (Brennan *et al.*, 1995). Alkohol wirkt vermutlich ko-kanzerogen, indem es zu Acetaldehyd metabolisiert wird und in dieser Form DNA-Schäden hervorrufen kann. Die Metabolisierung von Alkohol reduziert außerdem die Detoxifizierung anderer Karzinogene z.B. durch das Abfangen von Glutathion. Außerdem kann sie das Zytochrom p450 Enzym CYP2E1 (*Cytochrome P450 2E1*) induzieren, das in die Aktivierung verschiedener Prokarzinogene involviert ist (Poschl und Seitz, 2004).

Ernährungsfaktoren und Virusinfektionen (HPV, *human papilloma virus* und EBV, *Epstein-Barr Virus*) spielen eine synergistische Rolle in der Karzinogenese. Onkogene Virusproteine, wie die HPV-Proteine E6 und E7 können außerdem Schlüsselproteine in wichtigen Kontrollmechanismen der Zellproliferation und Apoptose (z.B. p53) inaktivieren und somit unabhängig von dem Verlust der Heterozygotie die Karzinogenese vorantreiben (Braakhuis *et al.*, 2004).

Onkogene und Tumorsuppressorgene

Bei der Entstehung und Entwicklung von Tumoren sind hauptsächlich zwei Kategorien von Genprodukten involviert: die der Protoonkogene und die der Tumorsuppressorgene.

Protoonkogene sind zelluläre Gene, deren Genprodukte zu abnormem Zellwachstum bzw. zur Tumorgenese führen, wenn sie vermehrt gebildet oder aktiviert werden. Dieser unkontrollierte Funktionsgewinn (*gain of function*) kann durch Genmutation, chromosomale Translokation, Genamplifikation oder retrovirale Insertion hervorgerufen werden. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um Wachstumsfaktoren oder deren Rezeptoren (z.B. EGFR/erb, c-erb-2/HER-2, Hst-1, Int-2), intrazelluläre Signalüberträger (z.B. Ras, Raf, STAT-3), Transkriptionsfaktoren (z.B. c-Myc, Fos, Jun, c-Myb), Zellzykluskontrollproteine (z.B. Zyklin D1) und Proteine, die in der Apoptose involviert sind (z.B. Bcl-2, Bax). Ein Beispiel ist die Überexpression von EGFR in Karzinomzellen, die eine Autophosphorylierung von Tyrosinresten im intrazellulären Bereich des Rezeptors zur Folge hat und somit zu einer konstitutiven Aktivierung mitogener Signale führt.

Tumorsuppressorgene (TSGs) kodieren für Proteine, die das Zellwachstum verhindern. Diese Proteine sind in der Zellzyklusregulation bzw. dem -arrest und in der Apoptose involviert. TSGs können durch Punktmutationen, Deletionen oder durch eine Sequestrierung durch zelluläre und virale Proteine in ihrer Funktion inaktiviert sein (*loss of function*). Eines der wichtigsten TSG ist p53. Es ist nicht nur für den Erhalt der genomischen Stabilität wichtig, sondern spielt darüber hinaus auch eine wichtige Rolle im Fortschreiten des Zellzyklus, der zellulären Differenzierung, DNA-Reparatur und Apoptose (Levine *et al.*, 1997). Einige Studien zeigten, dass übermäßiger Genuss von Tabak zu p53 Mutationen als frühes Ereignis in der Karzinogenese führt (van Oijen *et al.*, 1999). Das virale, onkogene Protein E6 bindet an p53 und fördert seine Ubiquitin-vermittelte Degradation (Sisk *et al.*, 2002). Dies führt zu einer Apoptoseresistenz und zu einem Verlust der chromosomalen Stabilität. Ein weiteres Schlüsselereignis in der Karzinogenese von HRK ist die Deletion bzw. Inaktivierung von p16 (CDKN2A). P16 verhindert die Interaktion von CDK4 und CDK6 mit Zyklin D und fungiert somit als negativer Proliferationsregulator in der Zelle. Die Abwesenheit von p16 führt zu einer unkontrollierten Zellproliferation (Liggett *et al.*, 1998).

1.1.4 Neue Diagnose- und Therapiestrategien

Die wichtigsten Therapiestrategien bei Patienten mit Karzinomen im Kopf-Hals-Bereich sind immer noch die operative Entfernung des Primärtumors und die nachfolgende Radio- und/oder Chemotherapie. Da auch die Kombination dieser Methoden zu keiner verbesserten Prognose führte, wird seit einigen Jahren nach neuen und effektiveren Wegen in der Diagnostik und Therapie gesucht. Das Verständnis der molekularen Veränderungen im Tumor deckt zunehmend neue Wege der Karzinogenese auf und bietet immer mehr Angriffspunkte für neue diagnostische und therapeutische Verfahren. Zuverlässige Biomarker sollten zu einer früheren Diagnose, einer besseren Überprüfung der Tumorprogression, der Identifizierung okkulten Tumorzellen und zu einer individuellen, gezielten und somit erfolgreicherer Therapie führen.

Biomarker

Biomarker oder molekulare Marker sind Substanzen, die mit einem Risiko oder der Anwesenheit von Neoplasien assoziiert sind. Qualitative und quantitative Analysen von Biomarkern können eine Aussage über Wahrscheinlichkeit, Existenz, Progression und Prognose von Tumoren liefern. Molekulare Biomarker können außerdem interessante Zielstrukturen für neue Therapiestrategien sein. Die wichtigsten Parameter eines diagnostischen oder prognostischen Biomarkers sind seine Sensitivität und Spezifität. Die Sensitivität entspricht der Wahrscheinlichkeit, dass ein erkranktes Individuum im Test ein positives Ergebnis liefert. Die Spezifität bezeichnet die Wahrscheinlichkeit, dass ein Individuum ohne die fragliche Krankheit ein negatives Testresultat liefert. Ein idealer Biomarker sollte bei einer vorgegebenen Spezifität von 95% eine Sensitivität von mindestens 50% aufweisen (Gion *et al.*, 2004).

Man unterscheidet drei Klassen von molekularen Biomarkern: DNA-Marker, RNA-Marker und Protein-Marker (Sidransky *et al.*, 2002).

- DNA-Marker sind tumorassoziierte Mutationen, freie DNA in z.B. Plasma oder Urin, Hypermethylierungen von Promotorregionen, Mikrosatelliten-Instabilität oder Verlust der Heterozygotie (*Loss of heterozygosity, LOH*) und virale DNA.

- RNA-Marker entstehen durch die erhöhte Transkription von Genen in Tumorzellen.
- Klassische Protein-Marker werden von Karzinomzellen vermehrt oder strukturell verändert synthetisiert oder aktiv sezerniert, bzw. durch Tumornekrose freigesetzt. Protein-Marker sind häufig immunogen und werden dann als tumorspezifische oder -assoziierte Antigene (TA) bezeichnet (siehe 1.3). Antikörper oder andere Proteine, die der Organismus als Reaktion auf TAs bildet, werden ebenfalls als Protein-Marker bezeichnet.

Obwohl seit den frühen 90er Jahren eine Fülle an genetischer Information erhältlich ist, die zunehmend Aufschluss über die molekularen Vorgänge in malignen Erkrankungen geben, sind wenig neue Biomarker für Karzinome der oberen Atemwege identifiziert worden (Wayne *et al.*, 1999). Die meisten Studien befassten sich mit der Eignung nur einiger weniger Marker, wie p53, p16, EGFR oder viraler Proteine im klinischen Einsatz (Wayne *et al.*, 1999), leider mit bisher geringen Erfolgen für die Diagnose, Prognose und Therapie (Quon *et al.*, 2001).

Neue Studien bei anderen Karzinomentitäten zeigten, dass TAs ein großes Potenzial als molekulare Biomarker besitzen, denn sie weisen mehrere Vorteile auf: Zum einen werden sie tumorspezifisch bzw. -assoziiert exprimiert und erleichtern dadurch die Visualisierung vereinzelter Tumorzellen. Werden TAs sezerniert, können sie als zirkulierende Biomarker dienen, wie z.B. CEA (*carcinoembryonic antigen*) oder PSA (*prostate specific antigen*). Zum anderen erzeugen Tumorantigene eine zelluläre und/oder humorale Immunantwort. Tumorspezifische oder -assoziierte Antikörper besitzen ebenfalls ein großes Potential als zirkulierende Biomarker. Darüber hinaus sind die gezielte Unterstützung der spezifischen T-Zellantwort oder der Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen Tumorantigene viel versprechende Ansätze in der Immuntherapie.

1.2 Immuntherapie

Die Immuntherapie umfasst mehrere Ansätze: Die Applikation monoklonaler Antikörper, die Vakzinierung mit Peptiden oder Proteinen, den Einsatz von zytotoxischen T-Zellen und die allgemeine Unterstützung des Immunsystems durch Zytokinverabreichung (z.B. IL-2, Interferon α). Ziel der adoptiven Immuntherapie ist es, die

adaptive und/oder angeborene Immunantwort des Tumorpatienten zu unterstützen und dadurch eine Regression des Tumors zu erreichen. Die adoptive Immuntherapie beinhaltet die unspezifische und die spezifische adoptive Immuntherapie.

1.2.1 Die unspezifische adoptive Immuntherapie

Die unspezifische adoptive Immuntherapie umfasst die Stimulation zytotoxischer T-Lymphozyten, die nicht auf eine bestimmte Spezifität selektiert oder spezifisch reaktiviert wurden, sondern alle Spezifitäten des Spenderbluts repräsentieren. Das Fehlen an Spezifität produziert jedoch häufig toxische Nebenwirkungen.

1.2.2 Die spezifische adoptive Immuntherapie

Große Hoffnung liegt daher auf der spezifischen adoptiven Immuntherapie. Sie kann Antikörper- oder T-Zell-vermittelt erfolgen. Essentiell für die spezifische adoptive Immuntherapie ist es, tumorspezifische oder tumorassoziierte Antigene (TA) als Zielstrukturen zur Verfügung zu haben.

Die T-Zell-vermittelte adoptive Immuntherapie

Die T-Zell-vermittelte Immuntherapie umfasst im Allgemeinen die Stimulation von tumorinfiltrierenden (TIL) oder zytotoxischen CD8⁺-Lymphozyten, die Peptide von Tumorantigenen spezifisch erkennen. Diese Peptide werden von den Tumorzellen über MHC I (*major histocompatibility complex*) Moleküle auf der Zelloberfläche präsentiert und unterscheiden somit Tumorzellen von gesunden Zellen.

Wird ein Tumorpatient mit TAs oder immunogenen Peptiden davon immunisiert, kann dies zu einer verstärkten Stimulation spezifischer T-Lymphozyten *in vivo* führen. Alternativ können antigenspezifische T-Zellen *in vitro* aktiviert, expandiert und dem Patienten reinfundiert werden.

Monoklonale Antikörper vermittelte adoptive Immuntherapie

Monoklonale Antikörper (mAK), die gegen TAs auf der Zelloberfläche von Tumoren gerichtet sind, können eine antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität durch Opsonisierung induzieren. Dabei werden Tumorzellen, an deren Oberfläche Antikörper gebunden sind, von Phagozyten und natürlichen Killerzellen erkannt und abgetötet. Phagozyten und natürliche Killerzellen tragen auf ihrer Zelloberfläche Rezeptoren, die Fc-Regionen der gebundenen Antikörper erkennen. Wirk-

samer sind mAKs, die mit zellulären Toxinen oder Radioisotopen konjugiert werden. Injiziert man solche mAKs in Tumoreareale, können sie spezifisch Tumorzellen vernichten (Scott *et al.*, 1997). Eine Weiterentwicklung monoklonaler AKs sind bispezifische Antikörper. Sie besitzen drei Bindestellen, i.e. eine Spezifität gegen ein TA und gegen einen Rezeptor, der auf Effektorzellen exprimiert wird (CD20 auf B-Zellen oder CD3 auf T-Zellen). Der Fc-Teil wird von APCs gebunden. Dadurch entsteht ein Drei-Zell-Komplex, der zu einer effektiven Aktivierung der Immunzellen gegen die Tumorzelle führt (Zeidler *et al.*, 2000). Einige rekombinante mAKs befinden sich bereits in klinischen Studien: Rituximab bei Non-Hodgkin Lymphomen (McLaughlin *et al.*, 2001) oder Trastuzumab (Herceptin) beim Mammakarzinom (Baselga *et al.*, 2001). Rituximab erkennt CD20, das auf 90% der B-Zell Lymphomen exprimiert wird. Klinische Studien mit Rituximab in Kombination mit Radioisotopen ließen deutliche therapeutische Effekte bei CD20-positiven Non-Hodgkin Lymphomen in niedrigen und mittleren Stadien erkennen (Witzig *et al.*, 2002). Trastuzumab ist spezifisch für den Rezeptor HER2/neu. Die Applikation von Trastuzumab in Kombination mit einer Chemotherapie führte bei Mammakarzinompatienten zu deutlich verbesserten Überlebensraten, im Vergleich zur Chemotherapie (Slamon *et al.*, 2002).

Vorraussetzungen für eine erfolgreiche Immuntherapie

Inzwischen ist bewiesen, dass einige Vorraussetzungen für eine erfolgreiche Immuntherapie gegeben sein müssen. Der Immunzustand der Patienten muss getestet und gegebenenfalls aktiviert werden (z.B. Zytokintherapie, Blocken der Produktion von Prostaglandin und anderen inhibitorischen Faktoren). Bei der Immunisierung mit Antigenen erhält man das effektivste Ansprechen mit möglichst mehreren patienten- und tumorspezifischen Antigenen gleichzeitig (Young *et al.*, 2004). Präklinische und klinische Studien, die mehrere immuntherapeutische Ansätze kombinierten, verliefen erfolgreich und zeigten in mehreren Fällen eine Tumorregression. Ein Beispiel ist die Immunisierung von Melanompatienten mit Peptiden des TA gp100 und die zusätzliche Applikation von Antikörpern gegen CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4*; Phan *et al.*, 2003). In Mausmodellen konnte die Kombination des adoptiven Transfers aktivierter gp100-spezifischer T-Zellen und einer Vakzinierung mit gp100 Peptiden auch große Tumore deutlich reduzieren. Diese Reduktion konnte durch eine zusätzliche Administration von IL2 verstärkt werden (Overwijk *et*

al., 2003). Trotzdem müssen künftig noch einige Limitationen umgangen werden, die bislang eine breite Anwendung immuntherapeutischer Verfahren limitieren. Eine davon ist in vielen Tumorentitäten die geringe Anzahl bekannter Tumorantigene. Bislang sind weltweit lediglich elf monoklonale AK gegen Tumorantigene auf dem Markt.

Immuntherapie bei Karzinomen der oberen Atemwege

Bei Karzinomen des Hals-Rachen Bereiches wurden bisher kaum Studien zur Immuntherapie veröffentlicht, obwohl diese Tumoren generell stark mit T-Lymphozyten infiltriert sind. Außerdem konnten zytotoxische T-Zelllinien mit einer Spezifität gegen den autologen Tumor aus peripheren Blutzellen (PBMCs: *peripheral blood mononuclear cells*) und TILs isoliert werden (Chikamatsu *et al.*, 1995). Die Tumorantigene, die hierbei von den CD8⁺-Zellen erkannt wurden, waren jedoch unbekannt. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass die Kombination von EGFR-Antikörpern mit dem Chemotherapeutikum Cisplatin ein gesteigertes Ansprechen der HRK-Patienten auf die Therapie hervorruft (Shin *et al.*, 2001). Somit könnte die Immuntherapie eine viel versprechende adjuvante Behandlung von HR-Karzinomen darstellen.

1.3 Tumorantigene (TA)

Was sind Tumorantigene und wie kann das Immunsystem sie als „fremd“ erkennen? Ein Tumor entsteht aus körpereigenen Zellen, deren Proteinspektrum folglich als „eigen“ vom Immunsystem toleriert wird. „Fremd“ werden Proteine, wenn sie strukturell verändert sind, ektopisch lokalisieren und/oder aberrant exprimiert werden. Ergeben diese Modifikationen für den Organismus unbekannte immunogene Peptide, oder werden sie in sehr hohen Konzentrationen exprimiert, führt dies zu einer autologen Immunantwort. TAs sind für die Immuntherapie und Diagnostik interessant, wenn sie nicht auf den Tumor eines individuellen Patienten beschränkt sind, sondern bei einer Vielzahl von Patienten auftreten. Sind TAs einzigartig, können sie nur in einem für den jeweiligen Patienten angepassten Ansatz benutzt werden. Man unterscheidet mehrere Klassen von Tumorantigenen (Tabelle 1.1).

Tumorspezifische Antigene

Tumorspezifische Antigene werden ausschließlich in Tumorzellen und nicht in gesunden Zellen exprimiert. Demzufolge sind sie ideale Kandidaten für eine spezifische Immuntherapie. Tumorspezifische Antigene sind virale Antigene, Translokations- und *Cancer-Testis* Antigene oder können durch Punktmutationen hervorgerufen werden.

Punktmutationen und Translokationen treten in Neoplasien häufig auf und ergeben oft neuartige immunogene Peptide, wie beispielsweise p53 oder BCR-ABL.

Cancer-Testis Antigene (*CTA*) sind Proteine, die natürlicherweise nur während der Embryonalentwicklung, wenn das Immunsystem noch nicht vollständig entwickelt ist, exprimiert werden. Zu späteren Zeitpunkten sind sie nur in immunprivilegierten Geweben, wie Plazenta oder Hoden zu finden. Man geht davon aus, dass die Expression von *CTAs* über CpG Inseln reguliert wird. In gesunden, somatischen Zellen sind die Promoterbereiche methyliert, wodurch die Expression der Gene stark reprimiert ist. In Tumorzellen kommt es hingegen häufig zu Demethylierungen und somit zur Expression der *CTAs*, die dann immunogen wirken können. Keimzellen zeigen eine konstitutive Hypomethylierung, die zu einer Expression der *CTAs* führt (De Smet *et al.*, 1996; Erickson *et al.*, 1993). *CTAs* sind derzeit Gegenstand vieler klinischer Studien mit ersten Erfolgen. So konnte in sieben von 25 Patienten mit malignem Melanom eine signifikante und in drei Fällen sogar eine komplette Tumorregression nach Behandlung mit MAGE-3 Peptiden festgestellt werden (Marchand *et al.*, 1999). Ein Problem der bekannten Translokations- und *CT*-Antigene ist, dass sie nur in wenigen Tumoren gebildet werden und Immuntherapien daher nur bei ausgesuchten Patienten erfolgsversprechend sind.

Tumorspezifische Spleiß-Varianten sind ebenfalls gute Angriffspunkte für eine Immuntherapie, werden aber noch seltener gebildet und sind daher eher problematisch. Tumorspezifisches, post-translationales Protein-Spleißen wurde bisher nur beim Fibroblasten Wachstumsfaktor 5 (FGF5), beschrieben (Hanada *et al.*, 2004) und könnte ebenfalls für die Immuntherapie geeignet sein.

Gleiches gilt für tumor-spezifische post-translationale Modifikationen. Diese Modifikationen sind oft sehr immunogen und können veränderte Acetylierungen, Glykosylierungen oder Isoaspartylierungen umfassen. Die Isoaspartylierungen von Zyto-

TA Klasse	Erklärung	Beispiel	Referenz
Mutation	tumorspezifische Punktmutationen, Frameshiftmutationen	p53, CDK4	Scanlan <i>et al.</i> , 1998; Mandruzzato <i>et al.</i> , 1997
Virale	viruspezifische Proteine, im Tumor exprimiert	E6 und E7 (HPV)	Wayne <i>et al.</i> , 1999
Cancer/Testis (CT), Carzinofetal	nur in Tumoren und immundefizienten Geweben (z.B. Testis) exprimiert	MAGE-A, NY-ESO-1, CEA	van der Bruggen <i>et al.</i> , 1991; Jäger <i>et al.</i> , 1998; Kawakami <i>et al.</i> , 2004
Translokation	tumorspezifische Translokation	BCR-ABL	Berke <i>et al.</i> , 2000
Spleiß-Variante	tumorspezifische Spleiß-Variante	cTAGE, gp100	Usener <i>et al.</i> , 2003; Kawakami <i>et al.</i> , 2004
Amplifizierung	im gesunden Gewebe wenig, im Tumor stark exprimiert	HER2/neu, EpCAM, PSA	Hynes <i>et al.</i> , 1994; Litnov <i>et al.</i> , 1999;
Post-translationale Modifikation	tumorspezifische post-translationale Modifikation	Cytochrom C	Mamula <i>et al.</i> , 1999
Post-translationales Protein Spleißen	tumorspezifisches post-translationales Protein Spleißen	<i>fibroblast growth factor 5</i> (FGF5)	Hanada <i>et al.</i> , 2004
Differenzierung	exprimiert in Tumoren und normal differenzierten Zellen	Tyrosinase, PSA, gp100, SCC	Briehard <i>et al.</i> , 1993; Balsar, <i>et al.</i> , 1999

Tabelle 1.1. Klassifizierung von Tumorantigenen

chrom c führt z.B. sowohl zu einer humoralen als auch zellulären Immunantwort in Mäusen (Mamula *et al.*, 1999). Diese Antigene sind jedoch mit gängigen Methoden wie SEREX (siehe 1.4) schwer zu identifizieren.

Tumorassoziierte Antigene

Tumorassoziierte Antigene sind Differenzierungs- und Amplifizierungsantigene.

Differenzierungsspezifische Antigene werden nicht nur vom Tumor, sondern auch in bestimmten gesunden Zellen exprimiert. Die Tyrosinase, ein Protein das für die Produktion von Melanin nötig ist, wird z.B. in gesunden Melanozyten und Melanomzellen hergestellt. Vertreter diese Antigengruppe werden von den meisten Tumoren gebildet, sind aber nicht tumorspezifisch, sondern tumorassoziiert.

Amplifizierungsantigene sind Proteine, die zwar in einigen Geweben gebildet werden, aber im Tumor deutlich überexprimiert sind. Sie stellen die häufigste Gruppe der TAs dar. Man nimmt an, dass diese Überexpression zu einer erhöhten Präsentationsdichte von immunogenen Peptide dieser TAs auf den Tumorzellen und zu einer verstärkten Kreuzpräsentation durch APCs führt. Dadurch wird die Immunantwort gegen diese hoch exprimierten, aber strukturell natürlichen Proteine aktiviert. Gelangen Antigene durch Sezernierung bzw. Ausschüttung nach Apoptose oder durch Streuung von Tumorzellen in drainierende Lymphknoten, können sie dort direkt zu einer Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen führen. Auf diese Weise können auch Differenzierungsantigene, die nicht überexprimiert sind, immunogen wirken (Spiotto *et al.*, 2003).

Immuntherapien mit Vertretern der letzten beiden Antigengruppen können zwei Probleme mit sich bringen: Diese Antigene werden zwar in Tumoren vieler Patienten gebildet, können aber aufgrund ihrer ubiquitären Gewebeexpression entweder nur eine geringe Immunantwort hervorrufen oder aber starke Nebenwirkungen haben. Sie besitzen allerdings ein großes Potential als Biomarker. Zum einen werden sie von vielen Tumoren exprimiert, zum anderen können positive Tumorzellen immunhistochemisch leicht identifiziert werden. Da sie von APCs kreuzpräsentiert werden können, führen sie häufig zu einer humoralen Antwort, die ebenfalls als Marker genutzt kann. Einige überexprimierte TAs werden sezerniert und können direkt im Blut nachgewiesen werden, z.B. CEA oder PSA.

Tumorantigene bei Karzinomen der oberen Atemwege

Neben p53, EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*), CEA (*carcinoembryonic antigen*) und SCC (*squamous cell carcinoma antigen*) sind bei Karzinomen der oberen Atemwege kaum tumorassoziierte bzw. tumorspezifische Antigene bekannt. Bei Beginn der vorliegenden Arbeit waren für diese Erkrankung keine Verfahren zur Identifikation neuer TAs durchgeführt worden. Die bereits bekannten Tumorantigene sind aufgrund ihrer geringen Spezifität (Sp) und Sensitivität (Sn) nicht als diagnostische und prognostische Marker im HRK-Bereich geeignet (z.B. SCC, höchste Sn bei Ösophagus mit $Sn \leq 37\%$ bei $Sp=95\%$; Lamerz *et al.*, 2001).

1.4 Techniken zur Identifizierung von Tumorantigenen

Eine erste Methode tumorassoziierte bzw. -spezifische Antigene zu identifizieren, wurde bereits 1988 von Boon und Kollegen (De Plaen *et al.*, 1988) entwickelt. Sie bestand darin, cDNA Banken, die aus Tumorproben gewonnen wurden, in Expressionssysteme zu klonieren und mit tumorspezifischen CD8⁺ T-Zellen zu screenen. Diese Technik wurde von Falk *et al.* (1991) und Mandelboim *et al.* (1994) modifiziert. Sie eluierten Antigenpeptide von den MHC I Molekülen auf Tumorzellen, beluden Antigen-Prozessierungs defiziente Zellen damit und sequenzierten die Peptide, falls eine Reaktivität mit TILs festzustellen war. Beide Methoden führten hauptsächlich beim malignen Melanom zur Identifikation einiger TAs, sind aber äußerst aufwendig (Rosenberg *et al.*, 2001).

SEREX

Von einigen Tumorantigenen war bekannt, dass sie auch eine humorale Antwort hervorrufen können (p53: Schlichtholz *et al.*, 1992; Her-2/neu: Disis *et al.*, 1994). Die Gruppe um Pfreundschuh entwickelte auf dieser Basis SEREX (*serological identification of antigens by recombinant expression cloning*, Chen *et al.*, 1997), die bisher am häufigsten eingesetzte Technik, um das Repertoire zirkulierender Antikörper in Krebspatienten zu untersuchen (Abb. 1.3). Bei dieser Technik werden cDNA Banken aus Tumorproben generiert und in λ -Phagen Vektoren kloniert. Die daraus resultierenden rekombinanten Phagen werden anschließend in *E.coli* transfiziert. Rekombinante Proteine, die während der lytischen Infektion der Bakterien exprimiert werden, lassen sich auf Filter übertragen und werden mit Seren von Tumorpatienten oder

gesunden Spendern inkubiert. Alle Klone, die mit Serumantikörper reagieren, können so mit einem human-IgG spezifischen Zweitantikörper detektiert werden. Die reaktiven Antigene können anschließend durch Sequenzierung der cDNA-Fragmente identifiziert werden. Alternativ wurde SEREX mit cDNA Banken durchgeführt, die aus Testisproben hergestellt wurden, um vermehrt *cancer-testis* spezifische Tumorantigene zu identifizieren. SEREX wurde inzwischen bei sehr vielen Tumoren verschiedenen Ursprungs angewendet und führte zur Identifikation einer großen Anzahl neuer Antigene (SEREX-Datenbank: www2.licr.org/CancerImmuneDB/).

SEREX
(Serological Identification of Recombinantly Expressed Clones)

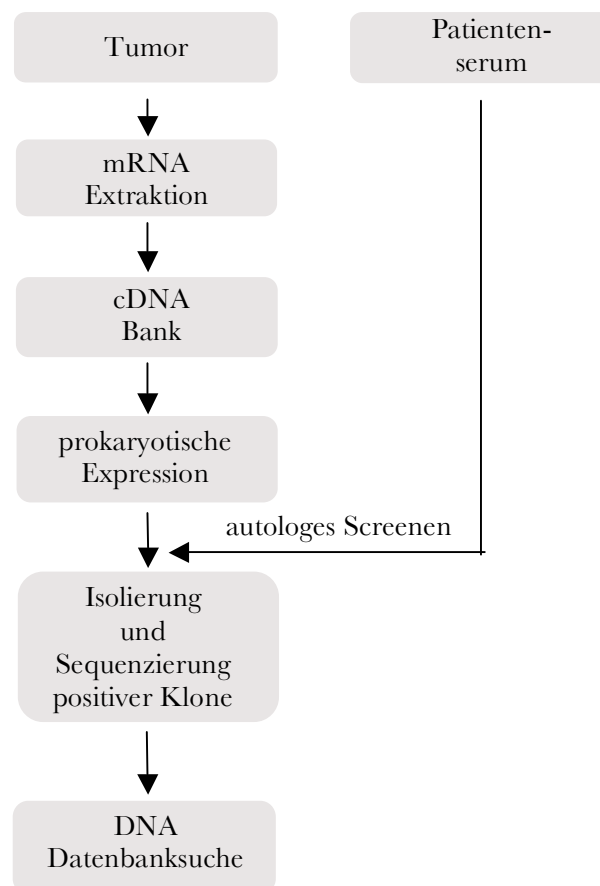


Abb. 1.3: SEREX-Verfahren zur Identifikation von Tumorantigenen

Gegen einige Antigene, wie beispielsweise NY-ESO-1, konnte eine simultane B- und T-Zellantwort nachgewiesen werden (Jaeger *et al.*, 1998). Somit sind Antigene, die eine humorale Immunantwort hervorrufen, auch potenzielle Kandidaten für eine Immuntherapie.

PROTEOMEX

PROTEOMEX, eine Proteom-basierende Technik (Klade *et al.*, 2001), kombiniert eine zweidimensionale Gelelektrophorese mit anschließenden Western-Blot Analysen (Abb. 1.4). Zunächst werden mittels 2D-Gelelektrophorese zelluläre Proteine von Tumorproben bzw. entsprechenden gesunden Geweben bezüglich ihrer Ladung und ihres isoelektrischen Punkts aufgetrennt. Für jede Probe werden zwei 2D-Gele hergestellt, wovon eines Silber gefärbt wird und die getrennten Proteine des zweiten Gels auf eine Membranen übertragen werden. Diese wird mit Serum von Tumorpatienten bzw. gesunden Spendern inkubiert. Gebundene Serumantikörper werden mit human IgG- oder IgM-spezifischen Zweitantikörpern detektiert. Unterschiede der erhaltenen Proteinmuster (Tumor und gesund) liefern potenzielle tumorassoziierte Antigene. Die Antigene können nicht direkt aus dem Westernblot identifiziert werden. Sie müssen vielmehr mit den Spotmustern eines parallel hergestellten Silbergels abgeglichen, ausgeschnitten und im Massenspektrometer analysiert werden.

PROTEOMEX

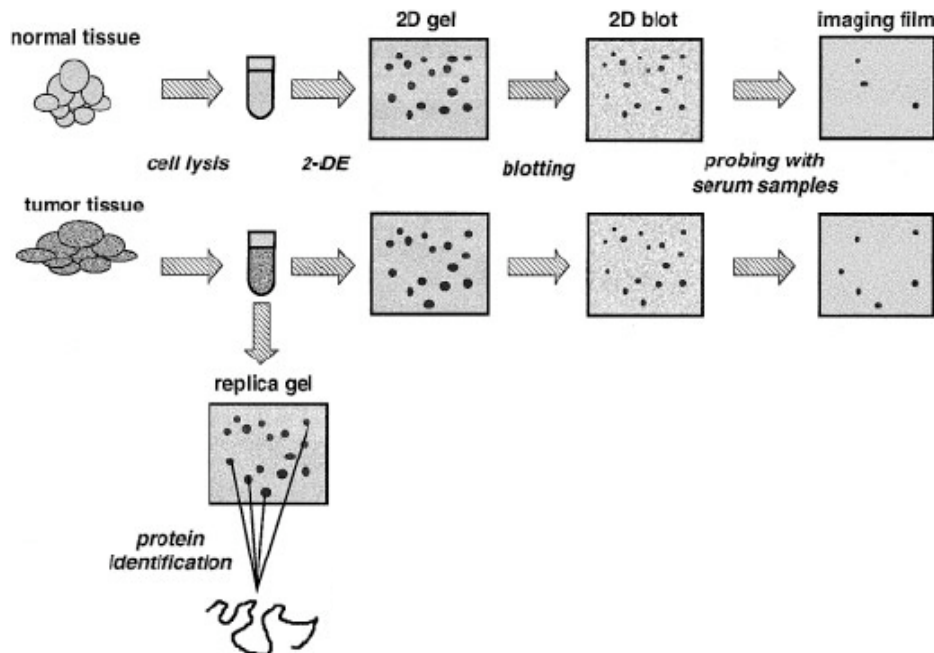


Abb. 1.4: PROTOMEX-Verfahren zur Identifikation von Tumorantigenen

SEREX und PROTEOMEX im Vergleich

Die rekombinante Expression der TAs bei SEREX bewirkt eine hohe Sensitivität und hat den Vorteil der einfachen Identifizierung der Tumorantigene durch die Sequenzierung der entsprechenden cDNA-Fragmenten. Mit SEREX ist es allerdings nicht möglich, Tumorantigene zu identifizieren, die durch post-translationale Modifikationen hervorgerufen werden. Außerdem ist diese Technik sehr aufwendig, da bis zur Sequenzierung bereits mehrere Wochen benötigt werden. Darüber hinaus müssen pro Screen mindestens 1×10^6 Klone getestet werden, um eine ausreichende Menge an verschiedenen Antigenfragmenten zur Verfügung zu haben. Dies entspricht ca. 40-200 Kolonienfilter, die mittels Immunblot gescreent werden müssen. Daher ist SEREX für ein schnelles und gleichzeitiges Screening verschiedener Patienten ungeeignet (Seliger *et al.*, 2002). Der große Vorteil von PROTEOMEX gegenüber SEREX ist die Möglichkeit, Antigene zu detektieren, die aufgrund von post-translationalen Modifikationen immunogen wirken. Ein Beispiel hierfür ist die N-Glykosylierungsisoform von Annexin I (Brichory *et al.*, 2001), die ausschließlich mit PROTEOMEX identifiziert werden konnte. PROTEOMEX ermöglicht außerdem den Einsatz von fraktionierten Proteinlysaten, wie z.B. Membranfraktionen, die Hinweise auf eine ektopische Lokalisation der Antigene geben können. Aberrante post-translationale Modifikationen oder ektopische Lokalisationen (z.B. an der Zytoplasmamembran) sind häufig tumorspezifisch und somit interessante Zielstrukturen für die Immuntherapie. Außerdem können viele Patienten in einem kurzen Zeitraum gleichzeitig analysiert werden, da sich dieses Verfahren in wenigen Tagen durchführen lässt. Dies geschieht jedoch auf Kosten der Sensitivität. In einer humanen Zelle existieren schätzungsweise 300.000 bis 500.000 Proteine, wenn man alle posttranskriptionelle und -translationale Modifizierungen mit einbezieht. Eine klassische 2D-Gelelektrophorese erlaubt es nur einen Bruchteil, maximal ca. 3000 der abundantesten Proteine (Kopienzahl ≥ 10.000), eindeutig aufzutrennen (Klade *et al.*, 2001). Technische Schritte, wie die Denaturierung durch Harnstoff, die zur Auftrennung der Proteine im Gel notwendig ist, kann ebenfalls zu einem Verlust einiger Epitope und somit potenzieller TAs führen. Bei beiden Techniken, SEREX und PROTEOMEX müssen die Immunblots mit dem zugehörigen Silbergel bzw. den Kolonieplatten abgeglichen werden. Dies erhöht die Gefahr, falsche Antigene durch einen ungenauen Vergleich der Spotmuster zu isolieren.

1.5 Zielsetzung

Die äußerst schlechte Prognose bei Karzinomen der oberen Atemwege wird durch zwei Ursachen hervorgerufen: einer fehlenden Frühdiagnostik und der Schwierigkeit, minimale residuale Erkrankungen (MRD) festzustellen und zu behandeln. Die späte Diagnose und MRD-Zellen sind die Ursache von Rezidiven und Metastasen, die mit einer geringen Überlebensrate korreliert. Biomarker, z. B. tumorspezifische oder -assoziierte Antigene (TA), die Karzinome im Frühstadium bzw. okkulte Tumorzellen definieren, sind dringend erforderlich. Zudem wären neue Therapiestrategien, die genau diese vereinzelt Karzinomzellen zum Ziel haben, äußerst wertvoll. Ein viel versprechender Ansatz ist die Immuntherapie, deren Voraussetzung die Kenntnis tumorspezifischer oder tumorassoziierter Antigene ist.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer neuen Technik zur Identifizierung von TAs bei Tumoren im Hals-Rachen-Bereich, welche die Nachteile von SEREX und PROTEOMEX umgeht, deren Vorteile jedoch implementiert. Grundlage dieser Methode sollte eine Immunpräzipitation mit nachgeschalteter 2D-Gelelektrophorese sein. Mit dieser Technik sollten TAs mit autologen Patientenserum präzipitiert, aufgetrennt und identifiziert werden. Anschließend sollten interessante TAs validiert und auf ihr Potential in der Diagnostik und Immuntherapie untersucht werden. Außerdem sollten interessante TAs hinsichtlich ihres Beitrags zur Karzinogenese initial analysiert werden.

2 Material

2.1 Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

Alle in der Arbeit genannten und hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von Amersham (Freiburg), Merck (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

Reagenzien

Artikel	Bezugsquelle
ABC Kit Vectastain	Vector, Burlingame (USA)
Acrylamid, Protogel ultra pure	Schröder Diagnostics, Stuttgart
Agar, Bacto-	Gibco BRL, Karlsruhe
Agarose	Roche, Mannheim
Ammoniumbikarbonat	Sigma, Taufkirchen
Anorganische Salze, Säuren, Basen	Merck, Darmstadt
Annexin-V-Biotin, Anticoagulant	Roche, Mannheim
Anorganische Salze, Säuren, Basen	Merck, Darmstadt
Antibiotika (Tetracyclin, Ampicillin, Chloramphenicol, Kanamycin)	Sigma, Taufkirchen; Roche, Mannheim
Bakterienmedienkomponenten (Trypton, Hefeextrakt)	Gibco BRL, Karlsruhe
BCA Protein Assay	Pierce, Rockford (USA)
Bio-Plex Amino Coupling Kit	Bio-Rad, München
Bio-Plex Calibration Kit	Bio-Rad, München
Bio-Plex COOH Bead 024	Bio-Rad, München
Bio-Plex Human Serum Diluent Kit	Bio-Rad, München
Bio-Plex Sheath Fluid	Bio-Rad, München
Blocklösung, <i>in situ</i> Hybridisierung	Roche, Mannheim
Blocklösung, Roti-Block	Roth, Karlsruhe
5-Bromo-chloro-3-indolyl Phosphat (BCIP)	Roche, Mannheim
Coomassie R350	Serva, Heidelberg

Fortsetzung auf der folgenden Seite

Artikel	Bezugsquelle
2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB)	Sigma, Taufkirchen
Denhardt's Lösung	Sigma, Taufkirchen
DEPC	Merck, Darmstadt
Dextransulfat	Sigma, Taufkirchen
DMEM	Seromed/Biochrom, Berlin
DIG RNA Labeling Kit	Roche, Mannheim
2,5-Dihydroxybenzoesäure	Sigma, Taufkirchen
Dithioerythritol (DTE)	Sigma, Taufkirchen
DNA-modifizierende Enzyme	MBI Fermentas, St. Leon-Rot; New England Biolabs, Schwalbach
ECL Westernblotting System	Amersham, Freiburg
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]- carbodiimidhydrochlorid (EDC)	Sigma, Taufkirchen
Formamid (deionisiert)	Sigma, Taufkirchen
Fötale Kälberserum (FKS)	Seromed/Biochrom, Berlin
Gene Racer Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Glyzin	Sigma, Taufkirchen
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche, Mannheim
High Pure RNA Isolation Kit	Roche, Mannheim
Höchst 33342	Molecular Probes, Eugene (USA)
2-Hydroxy-5-Methoxy-Benzoesäure	Sigma, Taufkirchen
n-Hydroxysulfosuccinimid (S-NHS)	Sigma, Taufkirchen
Iodacetamid	Sigma, Taufkirchen
IPG Buffer	Amersham, Freiburg
Kollagenase, Typ 8	Sigma, Taufkirchen
Lachsspermien DNA	Stratagene, Amsterdam (NL)
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche, Mannheim
Maleinsäure	Sigma, Taufkirchen

Fortsetzung auf der folgenden Seite

Artikel	Bezugsquelle
Mitotracker Red	Molecular Probes, Eugene (USA)
Thiazolylblau-Tetrazolium Bromid	Sigma, Taufkirchen
Natriumdodecyl sulfat (SDS)	Sigma, Taufkirchen
Nitroblau Tetrazolium (NBT)	Roche, Mannheim
Nukleotide (dNTPs)	Boehringer Mannheim/Roche
Organische Lösungsmittel, Alkohole	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS-Tabletten	Gibco BRL, Karlsruhe
Peptidfragmentstandard für MALDI-ToF	Sigma, Taufkirchen
Plasmidpräparation „Jetstar“	Genomed, Bad Oeynhausen
Advantage GC2 Polymerase Mix	BD Clonotech, Heidelberg
Polyvinylalkohol (PVA)	Sigma, Taufkirchen
Proteinase K	Dako, Glostrup (DK)
Protein A Sepharose „4 Fast Flow“	Amersham, Freiburg
Proteingrößenstandard „Benchmark“	Invitrogen, Karlsruhe
QIAquick Gel Extraction Kit	Quiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Quiagen, Hilden
DNAQuiaShredder	Quiagen, Hilden
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, St. Leon-Rot; New England Biolabs, Schwalbach
Reverse Transcription System	Promega, Madison (USA)
siRNA	Eurogentec, Philadelphia (USA)
Taq-Polymerase, PCR-Reagenzien	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Transfektionsreagenz „MATRA“	IBA, Göttingen
Triethanolamin	Merck, Darmstadt
TriPure	Roche, Mannheim
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, (Tris)	Merck, Darmstadt
Triton-X 100	Sigma, Taufkirchen
Trizma Base	Sigma, Taufkirchen
t-RNA	Sigma, Taufkirchen
Trypsin, Zellkultur	Seromed/Biochrom, Berlin

Fortsetzung auf der folgenden Seite

Artikel	Bezugsquelle
Trypsin, Porcine, Seq.Grade Modified	Promega, Madison (USA)
Tween	Serva, Heidelberg
Weizenkeimagglutinin Texas-Red	Molecular Probes, Eugene (USA)
Zytokeratin 8 (rekombinat)	Progen, Heidelberg

Tabelle 2.1: Verwendete Chemikalien

Verbrauchsmaterialien

Artikel	Bezugsquelle
3 MM Whatman-Papier	Bender & Hobein, München
Chamber Slides (Glas, Permanox)	LAB-TEK Nunc, Wiesbaden
Chambered Coverglass, 1.5 Borosilicate	LAB-TEK Nunc, Wiesbaden
Einmalpipetten	Costar, New York (USA)
Immobilon-P Membran	Millipore, Bedford (USA)
IPG-Strips	Amersham, Freiburg
Kanülen	BD, Heidelberg
Mutiscreen-BV Filterplatten	Millipore, Bedford (USA)
Objektträger „Superfrost“	Nunc, Wiesbaden
Pipettenspitzen	Gilson, Bad Camberg
Röhrchen, steril, Zellkultur	Falkon/BD Le Pont de Claix (F); Nunc, Wiesbaden
Hyperfilm ECL	Amersham, Freiburg
Slide-A-Lyzer Dialysis, 10,000 MW	Pierce, Rockford (USA)
Skalpelle	Feather/PFM, Köln
Spritzen, 5 ml/10 ml/20 ml	Braun, Melsungen
Sterilfilter	Millipore, Bedford (USA)
Tiefkühlgefäße/Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Zellkultur-Multiloch-Platten	Falkon/BD, Heidelberg
Zellkulturflaschen und -schalen	Nunc, Wiesbaden
Zellsiebe	Falcon/BD, Heidelberg
Zentrifugengefäße 1,5 ml/2 ml	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugengefäße silanisiert	Costar, New York (USA)

Tabelle 2.2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Geräte

Artikel	Bezugsquelle
2D-Elektrophoresekammern: Hoefler-SE600, Ettan Dalt	Amersham, Freiburg
Agarose-Elektrophorese-Dokumentation	Cybertech CS1, Berlin
Agarose-Elektrophoresekammern	Amersham, Freiburg
Durchflusszytometer „FACSCalibur“	Becton-Dickinson, Heidelberg
Elektrophorese-Netzgeräte	Bio-Rad, Richmond (USA)
ELISA-Reader Elx800	Bio-Tek Instruments, Winooski (USA)
Filmkassetten	Amersham, Freiburg
Fluoreszenzmikroskop „Axiovert 200“ mit hochauflösender Digital Videokamera (Hamamatsu)	Zeiss, Oberkochen
Fokussierungsanlage „IPGphor“	Amersham, Freiburg
Fokussierungseinheiten Porzellan	Amersham, Freiburg
Glaswaren Schott	Roth, Karlsruhe
Inkubator für Zellkultur, CO ₂ -begast	Heraeus, München
konfokales Laser Sanning System TCS-SP2,	Leika, Solms
Leica DM IRB inversem Mikroskop	
Lyophilisator mit Speedvac	Bachofer, Reutlingen
Massenspektrometer (Reflex III)	Bruker, Rheinstetten
Mikroliter-Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Phasenkontrastmikroskop Standard 25	Zeiss, Oberkochen
Schüttelinkubatoren 2Certomat“	Braun Biotech, Melsungen
Sicherheitswerkbank Klasse II	Heraeus, Hanau
Stickstoff-Kühlagereinrichtung	Messer Cryotherm, Kirchen/Sieg
Thermocycler UNO	Biometra, Göttingen
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
UV-Mikrophotometer „GeneQuant Pro“	Pharmacia, Erlangen
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg; Sorvall, Bad Homberg

Tabelle 2.3: Verwendete Geräte

Sonstiges

Antikörperherstellung	Biogenes, Berlin
DNA-Sequenzierungen	Sequiserve, Vaterstetten
Oligonukleotidsynthese	Metabion, Martinsried

2.2 Antikörper

Antikörper (Klon, Konjugat)	Spezie/ Isotyp	Bezugsquelle (Kat. Nr.)
α -Aktin β	Ziege/IgG	Santa Cruz, Kalifornien (USA), sc-1616
α -CK8 (1E8)	Maus/IgG _{2a}	Hess, Heidelberg, MMS-162P
α -CK8 (35BH11)	Maus/IgM	DAKO, Hamburg, M0631
α -panCK	Maus/IgG	Immunotech, Marseille, 0128
α -EpCAM (C215)	Maus/IgG	freundlicherweise von Dr. Lindhofer zur Verfügung gestellt
α -HA (3F10)	Ratte/IgG ₁	Roche, Mannheim, 1867423
α -TOB3 (P35-49-4571, Tier: 6590, 207/4)	K*	Biogenes, Berlin, Antikörperserum
α -KIAA1273 (TOB3-A- 4066, Tier: 6149)	K*	Biogenes, Berlin, Antikörperserum
α -DIG, AP	Schaf/F(ab) ₂	Roche, Mannheim 1093274
α -Human IgG, PE	Ziege/F(ab) ₂	Dianova, Hamburg, 109-116-098
α -Maus IgG, PE	Ziege/F(ab) ₂	Dianova, Hamburg, 115-116-071
α -Maus IgG, Cy3	Ziege/Fc _γ	Dianova, Hamburg, 115-165-071
α -Maus IgG, HRP	K*/IgG	Dako, Glostrup (DK), P0260
α -Maus IgG, FITC	Ziege/IgG ₁	Southern Biotechnology Association, Birmingham, (USA), 07002
α -Maus IgG, Biotin	Ziege/IgG	Vector, Burlingame, BA-2020
α -Ziege IgG, HRP	K*/IgG	Dako, Glostrup (DK), P0449
α -Ratte IgG, Biotin	Ziege/IgG	Vector, Burlingame, BA-9400
Isotypenkontrolle, FITC	Maus/IgG ₁	Dianova, Hamburg

Tabelle 2.4: Verwendete Antikörper; K*: Kaninchen

2.2 Bakterien

Der verwendete Stamm wurde von Gibco BRL (Eggenstein) bezogen.

E. Coli DH5 α (Hanahan *et al.*, 1985):

F⁻, F80*dlacZ*M15, D(*lacZYA-argF*), U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺), *supE44*, l⁻, *thi-1*, *gryA96*, *relA1*

2.3 Plasmide

Die im Rahmen meiner Arbeit verwendeten Plasmide wurden teilweise durch mehrere Klonierungsschritte unter Verwendung üblicher Klonierungstechniken (Maniatis *et al.*, 1989) generiert. Einige der verwendeten Plasmide waren in der Arbeitsgruppe vorhanden oder wurden freundlicherweise von anderen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt. Die mit * gekennzeichneten Plasmide wurden in dieser Arbeit kloniert.

Plasmid	Beschreibung
141pCAG-3SIP	CMV, SV40, IRES, Puromycinresistenz; freundlicherweise von Dr. T. Schröder zur Verfügung gestellt
141pCAG-TOB3-HA_1*	TOB3-HA cDNA sense in 141 pCAG-3SIP
141pCAG-KIAA1273-HA_1*	KIAA1273-HA cDNA sense in 141 pCAG-3SIP
pEYFP-N1	CMV, YFP, G418-Resistenz, BD Clontech, freundlicherweise von Dr. M. Schlee zur Verfügung gestellt
pEYFP-TOB3_5*	TOB3 cDNA sense in pEYFP-N1
pEYFP-KIAA1273_5*	KIAA1273 cDNA sense in pEYFP-N1
pDrive	Klonierungsvektor, T7/Sp6, Ampicillin-/ Kanamycinresistenz, Qiagen
pDrive- KIAA1273_1*	KIAA1273 cDNA sense in pDrive (<i>in situ</i> Hybrid.)
pCR 4-TOPO TA	Klonierungsvektor, T7/Sp6, Ampicillin-/ Kanamycinresistenz, Invitrogen
IRALp962O1117	RZPD Klon, cDNA KIAA1273
IRALp962D034Q2	RZPD Klon, cDNA TOB3

Tabelle 2.5: Verwendete Plasmide

2.4 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden folgende Zelllinien verwendet bzw. etabliert:

Zelllinie	Ursprung	Referenz
22A	Hypopharynx-Karzinom	ATCC
ANT-1	Hypopharynx-Karzinom	in unserem Labor etabliert
FaDu	Hypopharynx-Karzinom	ATCC
GHD	Hypopharynx-Karzinom	in unserem Labor etabliert
HCT-8	Kolon-Karzinom	ATCC
HEK293	embryonale Niere	Graham <i>et al.</i> , 1977
HeLa	Zervix-Karzinom	ATCC
HLAC78	Larynxkarzinom	ATCC
HLAC79	Larynxkarzinom	ATCC
MCF-7	Mammakarzinom	ATCC
P493-6	B-Zelllinie	Polack <i>et al.</i> , 1996
PCI-1	Hypopharynx-Karzinom	Pittsburgh Cancer Institute
PCI-13	Hypopharynx-Karzinom	Pittsburgh Cancer Institute
SKBr3	Mammakarzinom	ATCC

Tabelle 2.6: Verwendete Zelllinien

2.6 Verwendete Oligonukleotide

Nr.	Sequenz 5'-3'	Verwendung
1a	ATGTCGTGGCTCTTCGGCGTTAAC	TOB3 RT-PCR
1b	TTTGAGCTTGGACTGTTGCTCCAAC	TOB3 RT-PCR, 5'-RACE
2a	ATGCAGCTGGAAGCCCTGAACC	KIAA1273 RT-PCR
2b	CTGCAGAGCACAGCACTCACCAG	KIAA1273 RT-PCR, 5'-RACE
3a	TGTCGCTCTTGAAGTCAGAGGAGA	GAPDH RT-PCR
3b	AGAACATCATCCCTGCCTCTACTG	GAPDH RT-PCR
4a	CGATGGTACCGATCCTGGGTGCAG ATGCAGCTGGAAG	KIAA1273/TOB3 ISH
4b	ATCGCTCGAGCTACAACAGGGGGTGC CCTGGGGG	KIAA1273/TOB3 ISH
5b	GTTGCTGCTGCTTCAGTTGGTC	RT-PCR (Primer C)

Nr.	Sequenz 5'-3'	Verwendung
6a	GTTGGAGCAACAGTCCAAGCTCAAA	TOB3 (c-Myc-Kinetik)
6b	GTTGCTGCTGCTTCAGTTGGTC	TOB3 (c-Myc-Kinetik)
7a	CTGGTGAGTGCTGTCTCTGCAG	KIAA1273 (c-Myc-Kinetik)
7b	GTTGCTGCTGCTTCAGTTGGTC	KIAA1273 (c-Myc-Kinetik)
8a	CTCCTTCTCCAACGCTGAGT	CD19 (c-Myc-Kinetik)
8b	TGGAAGTGTCACTGGCATGT	CD19 (c-Myc-Kinetik)
9a	TCCGTCCTCGGATTCTCTGC	c-Myc (c-Myc-Kinetik)
9b	CCAGTGGGCTGTGAGGAGGT	c-Myc (c-Myc-Kinetik)
10a	CTGAAAGCTTGTCGCCACCATGTCGT GGCTCTTCGGC	TOB3-YFP Fusion
10b	CTGAGGATCCCGCAACAGGGGGTGCC C	TOB3-YFP Fusion
11a	CTGAGAATTCGTCGCCACCATGTTGT CCAGGTTGGTCTTG	KIAA1273-YFP Fusion
11b	CTGAGGATCCCGCAACAGGGGGTGCC C	KIAA1273-YFP Fusion
12a	CTGAGAATTCGTCGCCACCATGTCGT GGCTCTTCGGC	TOB3-HA Fusion
12b	CTGAGAATTCCTAAGCGTAATCTGGAA CATCG	TOB3-HA Fusion
13a	CTGAGAATTCGTCGCCACCATGCAGC TGGAAGCCCTG	KIAA1273-HA Fusion
13b	CTGAGAATTCTACAACAGGGGGTGCC CTG	KIAA1273-HA Fusion
5	AGACGCUGUUUGCCAAGAA	siRNA I
6	GGUUCGUGCCUUUGUGA	siRNA II
7	GCAGCAGCGACUUCUCAAU	siRNA III

Tabelle 2.7: Verwendete Oligonukleotide

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Kultivierung von Zelllinien

Alle Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) kultiviert, welches mit 10% fötalem Kälberserum (FKS), Natriumpyruvat (1 mM) und Antibiotika (100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin) supplementiert war. Die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre gehalten.

Adhärente Zellen wurden zur Subkultivierung mit PBS serumfrei gewaschen, mit 0.05% Trypsin/0.02% EDTA aus der Kulturflasche gelöst, mit Medium (10% FKS) gewaschen und in der gewünschten Dichte neu ausplattiert. Die Zentrifugationsschritte zum Waschen und Aufkonzentrieren der Zellen erfolgten in 15 ml bzw. 50 ml Einmal-Zentrifugenröhrchen bei 300 x g für 5-10 min und 20°C.

Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung wurden 1×10^7 Zellen abzentrifugiert, in 1 ml Einfriermedium resuspendiert, in vorgekühlte Einfriereröhrchen gegeben und für 10 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Zellen bei eingefroren und bei -80°C gelagert oder für eine längere Lagerung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Einfriermedium: DMEM, 10% FKS, 10% DMSO

Rekultivierung

Zur Rekultivierung wurden die Zellen in vorgewärmten Kulturmedium (37°C) mit 10% FKS verdünnt (1:20), abzentrifugiert (5 min, 300 g, 20°C) und anschließend in frischem Medium resuspendiert und ausplattiert.

3.1.2 Gewinnung von Einzelzellsuspensionen aus Tumorbiopsien

Alle Tumorbiopsien wurden routinemäßig während der Operation entnommen und unverzüglich verarbeitet. Zur Vereinzelnung der Zellen wurden die Proben mit einem Skalpell in ca. 1-2 mm große Stückchen zerkleinert und 2 h bei 37°C mit Kollagenase (Endkonzentration 2 mg/ml, Typ 8) und DNase I (Endkonzentration 0,2 mg/ml, Typ IV) haltigem DMEM inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen im jeweils geeigneten Puffer resuspendiert und im Durchflusszytometer analysiert, immunzytochemisch gefärbt oder zu Proteinlysaten verarbeitet.

3.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde in einer Neubauer-Kammer bestimmt. Um tote von lebenden Zellen zu unterscheiden, wurde jeweils ein Zellaliquot (15 µl) mit einem Volumen einer 0.2%igen Trypanblaulösung (in PBS) gemischt. Tote Zellen nehmen den Farbstoff auf und sind daher im Mikroskop an ihrer Blaufärbung zu erkennen.

3.2 Immunpräzipitation und 2D-Gelelektrophorese

3.2.1 Immunpräzipitation

In der Immunpräzipitation wurden sowohl Membranfraktionen als auch Komplettlysate von Einzelzellsuspensionen primärer Tumorbiopsien bzw. der Zelllinie GHD verwendet. Zur Gewinnung von Membranfraktionen wurden 5×10^7 Tumorzellen in hypotonem Puffer I inkubiert (30 min bei 4°C) und anschließend mit einer 23G-Nadel aufgebrochen. Alle löslichen Kompartimente wurden durch Zentrifugation (3000 g, 4°C, 10 min) abgetrennt und die membranassoziierten Proteine mit tritonhaltigem Puffer II solubilisiert. Ein zweiter Zentrifugationsschritt bei 10000 g (4°C, 10 min) entfernte die unlöslichen Reste. Im Fall von kleinen Biopsien wurden alternativ Gesamtzelllysate verwendet. Dafür wurden 1×10^7 Zellen mit Puffer II lysiert (10 min, 4°C) und die Überstände nach Zentrifugation (3000 g, 4°C, 10 min) als Komplettlysate verwendet.

Hypotoner Puffer I:	10 mM HEPES (pH 7.9), 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl ₂ , 0.1 mM EGTA, 0.5 mM DTT
Puffer II:	50 mM TBS (pH 7.4), 1% (v/v) Triton X 100, EDTA-Complete™

Die so gewonnenen Proteinlysate wurden vor jeder Immunpräzipitation 3 h mit ungekoppelter Protein-A-Matrix inkubiert (100 µl). Damit wurden Proteine, die eine unspezifische Affinität zu der Protein-A-Matrix haben aus dem Lysat entfernt. Die Immunpräzipitation wurde in autologer Weise durchgeführt. Dafür wurden jeweils eine Tumorbiopsie und 20 ml Blut eines HR-Karzinompatienten während der Operation entnommen. Nach der Serumgewinnung wurden die Serumantikörper auf Protein-A-Matrix immobilisiert (300 µl Serum, 50 µl Matrix, 2 h, 4°C) und nach Schneider *et al.* (1982) kovalent gekoppelt. Die Antikörper-Protein-A-Matrix wurde bei 4°C mit der Lysatprobe über Nacht in einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose-Matrix mehrmals mit Puffer II gewaschen (500 g, 10 min, 4°C), um unspezifische Bindungen zu lösen. Die präzipitierten Antigene wurden in 2D-Lysepuffer eluiert und denaturiert. Um die Protein A Sepharose-Matrix komplett zu entfernen wurden die Proben 10 min bei 10000 g und 4°C zentrifugiert. Die Proteine im Überstand wurden anschließend elektrophoretisch in einer ersten Dimension bezüglich ihres isoelektrischen Punktes (IEP) und in einer zweiten Dimension bezüglich ihrer molekularen Masse aufgetrennt.

2D-Lysepuffer: 9 M Harnstoff, 4% CHAPS, 65 mM DTT, 5 mM EDTA

3.2.2 Erste Dimension der 2D-PAGE: Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Zur isoelektrischen Fokussierung von Proteinen wurden pH-Gradientengelstreifen (IPG: immobilisierter pH Gradient) unterschiedlicher Länge (18 cm und 24 cm) und pH-Bereiche (pH 3-10 und pH 4-7) benutzt. Jede Probe wurde mit IPG-Puffer und Bromphenolblau (BPB) versetzt (18 cm Streifen: 350 µl 2D-Lysepuffer, 2 µl IPG-Puffer, 1 µl BPB; 24 cm Streifen: 460 µl 2D-Lysepuffer, 3 µl IPG-Puffer, 2 µl BPB) und in einer IPGphor-Fokussierungseinheit aufgetrennt. Die Laufbedingungen der Fokussierung sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst: Die Fokussierung erfolgte über den Zeitraum von 30 h bei 20 °C und 50 µA/Streifen. Die üblicherweise erhaltene Gesamtvoltstundenzahl betrug 60 kWh bei 18 cm und 70 kWh bei 24 cm Streifen. Nach der Fokussierung wurden die IPG-Streifen entweder bei -80°C eingefroren bzw. die zweite Dimension (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese) durchgeführt.

Stufen	Spannung (V)	18 cm, Dauer (h)	24 cm, Dauer (h)
Rehydrierung	0	0.1	0,17
1	30	8	8
2	50	4	4
3	200	2	2
4	500	2	2
5	2000	2	2
6	4000	2	2
7	8000	1	1
8	8000	9	19

Tabelle 3.1: Laufbedingungen der IEF für IPG-Streifen von 18 cm und 24 cm Länge

Resolving-Puffer: 1.5 mM Tris (pH 8.8), 0.4% SDS, 1.5 mM NaN₃; (zwei Wochen bei 4°C haltbar)

Bromphenolblaupuffer: 3 mM Bromphenolblau in Resolving Puffer

3.2.3 Zweite Dimension der 2D-PAGE: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die IPG-Streifen wurden nach der Fokussierung sukzessive mit bromphenolblauhaltigem Equilibrierungspuffer behandelt (je 20 min, RT), der 65 mM DTE bzw. 250 mM 2-Iodacetamid enthielt. Die so equilibrierten Gelstreifen wurden anschließend auf 10-15%ige SDS-Polyacrylamidgele aufgelegt, mit 0.5% Agarose (in Equilibrierungspuffer) fixiert und die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Laufbedingungen für die unterschiedlichen Apparaturen sind in Tabelle 3.2 zusammengestellt.

Apparatur	Anzahl Gele	Proteineinwanderung	Proteinauftrennung
Hoefler Kammer	1-4	5 W; 0.3 h	60 W; 2-3 h
Ettan Dalt	1-12	3 W/Gel; 0.3 h	18 W/Gel; 2-5 h

Tabelle 3.2: Laufbedingungen der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Equilibrierungspuffer: 6 M Harbstoff, 3.3 M Glycerin, 70 mM SDS, 3.3% Resolving-puffer (2 Wochen haltbar)

SDS-Laufpuffer: 1.92 M Glyzin, 0.25 M Tris, 1% SDS, pH 8.3

Die Detektion der Proteine erfolgte anschließend mit Coomassie- oder Silberfärbung. Die verwendeten Protokolle sind in Tabelle 3.3 und 3.4 zusammengefasst:

Schritt	Lösung	Dauer (min)
1	Fixierer	15
2	Entfärber	1
3	0.02% Coomassie	45
4	Entfärber	5
5	Entfärber	20
6	Entfärber	60
7	Entfärber	60
8	Aufbewahrung	30

Tabelle 3.3: Coomassie-Färbeprotokoll

Fixierlösung:	40% Methanol; 10% Essigsäure
Entfärbelösung:	25% Ethanol; 8% Essigsäure
Coomassie-Stocklösung:	0.2% Coomassie R350; 60% Methanol
Aufbewahrungslösung:	25% Ethanol; 8% Essigsäure; 4% Glycerin

Schritt	Lösung	Dauer (min)
1	Fixierer	45
2	Ethanol 50%	20
3	Ethanol 50%	20
4	Ethanol 50%	20
5	Sensitivierung	2
6	Wasser	1
7	Wasser	1
8	Silber	30
9	Wasser	1
10	Entwickler	variabel
11	Stopp	10
12	Aufbewahrung	20

Tabelle 3.4: Silber-Färbeprotokoll

Fixierlösung:	40% Ethanol; 10% Essigsäure
Sensitivierungslösung (SL.):	1.5 mM Natriumthiosulfat
Silberlösung:	12 mM Silbernitrat; 0.075% Formaldehyd (37%)
Entwicklerlösung:	0.57 M Natriumcarbonat; 2.5% SL.; 0.05% Formaldehyd (37%)
Stopplösung:	40 mM EDTA oder 40% Ethanol; 10% Essigsäure
Aufbewahrungslösung:	20% Ethanol; 4% Glycerin

3.3 Protein-Analysen mittels Massenspektrometrie

Interessante Proteinspots wurden aus Coomassie- bzw. Silber-gefärbten 2D-Gelen ausgeschnitten, tryptisch verdaut und anschließend mit einer organischen Matrix auf einer Anker-Metallplatte für die MALDI-ToF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight*) Analyse kristallisiert und vermessen. Die erhaltenen „peptid mass fingerprints“ wurden zur Identifizierung des jeweiligen Proteins mit geeigneten Proteindatenbanken (OWL, NCBI, MSDB) verglichen (<http://www.matrix-science.com>).

3.3.1 Tryptischer Verdau

Die ausgeschnittenen Proteinspots wurden mit einem Skalpell zerkleinert, in silanierte 500 µl Eppendorf Gefäße überführt und zweimal mit 100 µl Wasser (Millipore, Bedford) bei RT gewaschen. Nach kurzer Zentrifugation wurde das Wasser entfernt. Um das Silber auszuwaschen, wurden die Spots mit 30 µl Entfärber versetzt und so lange im Schüttler inkubiert, bis keine Färbung mehr sichtbar war (5-10 min). Anschließend wurde dreimal mit Millipore-Wasser nachgewaschen. Die Gelstücke wurden dann zweimal abwechselnd 10-15 min mit 50% Azetonitril bzw. 50 mM Ammonium-Bicarbonat (frisch angesetzt) gewaschen, in 20 µl Ammonium-Bicarbonat und 0.5 µl Trypsin (Endkonzentration 100 ng/µl) aufgenommen und über Nacht bei 37°C verdaut. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und die Gelstücke ein zweites Mal mit ca. 30 µl 70% Azetonitril für 20 min bei RT inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit dem erstem vereinigt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und unter Vakuum in einer Speedvac lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde anschließend in 50 µl Wasser aufgenommen und erneut getrocknet. Dieser Prozess wurde solange wiederholt bis keine Salzurückstände mehr nachweisbar waren. Anschließend wurde das Lyophilisat bei -20°C gelagert.

Entfärber: 30 mM Kaliumhexacyanoferrat und 100 mM Natriumthiosulfat
im Verhältnis 1:1 vermischt/frisch angesetzt)

3.3.2 Beschichten der Ankerplatte mit DHB-Matrix (2,5-Dihydroxybenzoesäure)

Die Anker-Metallplatte wurde vor jeder Messung mit 50% Methanol gesäubert und luftgetrocknet. Das Lyophilisat wurde in 10 µl Resolving Puffer unter Ultraschall gelöst und jeweils 1 µl dieser Lösung anschließend mit 1 µl des DHB-Mixes vermischt; 0,5 µl dieser Mischung wurden auf die Anchorplatte gegeben und nach Kristallisation in einem MALDI-ToF Massenspektrometer (Reflex III) vermessen.

Resolving-Puffer:	10% Azetonitril; 0,1% Trifluoressigsäure in Milliporewasser
DHB-Mix:	bestehend aus 9 Teilen DHB-Lösung und einem Teil HMB-Lösung
DHB-Lösung:	20 mg/ml 2,5-Dihydroxybenzoesäure in 20% Azetonitril und 0,1% Trifluoressigsäure
HMB-Lösung:	20 mg/ml 2-Hydroxy-5-Methoxybenzoesäure in 20% Azetonitril und 0,1% Trifluoressigsäure

3.3.3 MALDI-ToF-Analyse

Die Peptidfragmente wurden auf die Ankerplatte aufgetragen und nach Kokristallisierung mit der DHB-Matrix in einem MALDI-ToF Massenspektrometer unter Hochvakuum analysiert. Die Peptidfragmente wurden mit Hilfe eines Lasers ionisiert und deren massen- und ladungsabhängige Flugzeit durch ein angelegtes Spannungsfeld bestimmt. Die so erhaltenen Massenspektren wurden anschließend kalibriert und zur Identifizierung des jeweiligen Proteins mit „peptid mass fingerprint“ Proteindatenbanken verglichen (<http://www.matrix-science.com>).

3.4 FACS-Analysen

Die Expression von Proteinen in Einzelzellen kann mit Hilfe des Durchflusszytometers (*fluorescence-activated cell sorter*, FACS) analysiert werden. Sofern das zu analysierende Protein nicht mit einem Fluoreszenzfarbstoff fusioniert ist, kann es mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers detektiert werden. Dieser muss dabei entweder direkt an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sein oder mittels markierten Sekundärantikörper abgegriffen werden. Verwendete Primär- und Sekundärantikörper waren Fluoresceinisothiocyanat (FITC, grün) bzw. Phycoerythrin (PE, rot) konjugiert.

Extrazelluläres FACS

5×10^5 Zellen wurden pelletiert und in einer 1:50 Verdünnung des jeweiligen Antikörpers ($200 \mu\text{g/ml}$) in FACS-Puffer für eine Stunde bei 4°C inkubiert und dreimal mit FACS-Puffer gewaschen. Bei Verwendung eines Sekundärantikörpers wurden die Zellen anschließend mit dem jeweiligen Sekundärantikörper ($20 \mu\text{g/ml}$) eine weitere halbe Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde die Oberflächenexpression im Durchflußzytometer bestimmt.

FACS-Puffer: PBS + 2% FKS

Intrazelluläres FACS

Für intrazelluläre FACS-Analysen wurden je 1×10^6 Zellen abzentrifugiert, 10 min in $200 \mu\text{l}$ 1% Paraformaldehyd bei Raumtemperatur fixiert und anschließend mit FACS-Puffer gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellen wurde das Pellet 20 min in $300 \mu\text{l}$ 0.2% Triton X 100 inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 1 ml FACS-Puffer wurden die Zellen entsprechend der extrazellulären FACS-Analyse, mit Primär- und Sekundärantikörpern inkubiert und nach dem letzten Waschschrift im Durchflußzytometer gemessen.

3.5 Fluoreszenzfärbungen

Fluoreszenzfärbungen wurden sowohl an adhärenent wachsenden Zellen (Chamber-Slides, siehe 3.5.2) bzw. an Zytospins durchgeführt. Für Zytospins wurden trypaninierte Zellen (5×10^5 Zellen) auf Objektgläser zentrifugiert (600-800 rpm, 5 min, RT) und anschließend mit Azeton fixiert. Alle weiteren Behandlungs- und Färbeschritte waren mit denen an Gewebeschnitten, wie unter 3.6.1 beschrieben, identisch. Zur Visualisierung der Antigen-Antikörper-Reaktion wurden Alexa 488 (grün) und Alexa 594 (rot) gekoppelte Sekundärantikörper eingesetzt. Zellkerne wurden mit Höchst 33342 visualisiert. Die Dokumentation erfolgte im Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200, Zeiss). Die Färbung von Zellorganellen zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation von Proteinen wurde an adhärenenten Zellen auf Objektträgern durchgeführt. Dazu wurden die Zellen bei einer Dichte von 60% mit KIAA1273-YFP- bzw. TOB3-YFP-Plasmid DNA transfiziert und weitere 24 h auf den Objektträgern kultiviert. Zur Visualisierung des Endoplasmatischen Retikulums diente Texas-Red-konjugiertes Weizenkeim Agglutinin (Molecular Probes). Mito-

chondrien wurden mit Mito-Tracker Red (Molecular Probes) gefärbt. Beide Färbelösungen wurden nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Dokumentation erfolgte an lebenden Zellen mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskops (DM IRB, Leica), das mit geeigneten Lasern ausgestattet war (UV Diodenlaser, Argon/Krypton Laser, Helium/Neon Laser). Die Fluoreszenzbilder wurden mit folgenden Absorptions- und Emissionslängen aufgenommen. Absorptionen: 405 nm (blau), 488 nm (grün) und 543 nm (rot); Emissionen: 457-490 nm (blau), 510-540 nm (grün) und 565-580 nm (rot).

3.6 Immunzytochemie

Immunzytochemische Färbungen wurden an adhärenenten, transfizierten Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden auf Chamber-Slides® (LAB-TEK) ausplattiert und bis zu einer Dichte von 60% kultiviert, dann mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert und weitere 24 h kultiviert. Die Proben wurden nach Entfernen des Mediums mit PBS gewaschen, mit Azeton fixiert und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert. Alle weiteren Behandlungs- und Färbeschritte waren mit denen an Gewebeschnitten, wie unter 3.6.1 beschrieben, identisch.

3.7 Immunhistochemische Schnittfärbungen

Die Gewebeproben von Karzinompatienten und gesunden Probanden wurden routinemäßig während der Operation entnommen, sofort in Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Alle in dieser Arbeit angewandten immunhistochemischen Färbungen wurden an Gefrierschnitten durchgeführt. Dazu wurden $4\ \mu\text{m}$ dicke Kryoschnitte auf silanisierte Glasobjektträger aufgezogen, getrocknet und 10 min in Azeton bei RT fixiert. Die Schnitte wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Schnitte in Azeton nachfixiert und für 10 min in PBS rehydriert. Zur Inaktivierung der endogenen Peroxidase wurde eine 0.3% Wasserstoffperoxidlösung in PBS verwendet. Um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu vermeiden, wurden die Schnitte anschließend 20 min mit 10%igem Ziegenserum behandelt. Die Primärantikörper wurden in 1:10 bis 1:500 Verdünnungen eingesetzt und die Proben über Nacht bei 4°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde PBS an Stelle des Erstantikörpers verwendet. Nach einmali-

gem Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit dem entsprechenden Biotin konjugierten Sekundärantikörper für 30 min bei RT inkubiert, in PBS gewaschen und die Antigen-Antikörperreaktion unter Verwendung des Avidin-Biotin-Peroxidase Systems nach *Hsu et al.* (1981) detektiert. Alle Proben wurden zur Visualisierung der Zellen mit einer Eosin-Kernfärbung gegengefärbt. Die Färbeintensität der einzelnen Proben wurde von zwei Personen unabhängig voneinander bestimmt.

3.8 *In situ* Hybridisierung

Für die *in situ* Hybridisierung wurden Kryoschnitte (5 µm) für 10 min in 4 % PFA fixiert, mit PBS gewaschen und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils 2x5 min in 30%, 50%, 70%, 96%, 100% Ethanol) dehydriert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Schnitte bei -80°C bis gelagert. Bei Bedarf wurden die Schnitte aufgetaut, die endogene alkalische Phosphatase mit HCl (0.2 N) inaktiviert und das Gewebe mit Proteinase K (10 µg/ml) behandelt, um die RNA für die Sonden zugänglich zu machen. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Schnitte in 0.1 M Glyzin/0.05 M PBS gegeben und anschließend bei Raumtemperatur in 4% PFA fixiert. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Präparate stets mit PBS gewaschen. Um positiv geladene Moleküle zu neutralisieren wurde das Gewebe in 0.1 M Triethanolamin/ 0.25% Essigsäureanhydrid inkubiert und anschließend mit 2xSSC gewaschen. Zur Prähybridisierung wurden die Präparate mit Prähybridisierungspuffer in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur 5 h inkubiert. Für die Sonden wurden die jeweiligen PCR-Produkte in den PCR-Klonierungsvektor pDrive kloniert und sequenziert. Dieser Vektor besitzt sowohl eine T7 als auch eine SP6 Polymerasebindestelle, die eine Transkription des PCR Fragments in 5'- und 3'-Orientierung erlauben. Auf diese Weise können Sense- und Antisense-RNA-Sonden generiert werden. Die sequenzierten KIAA1273 bzw. TOB3-pDrive Klone wurden mit *Bam*HI oder *Hind*III-Restriktion linearisiert und DIG-markierte RNA Sonden mittels *in vitro* Transkription im Kit-System (DIG RNA Labeling Kit) nach Angaben des Herstellers produziert.

Prähybridisierungspuffer: 50% deionisiertes Formamid, 4x SSC, 5x Denhardts, 25 µg/ml Lachsspermien DNA, 0.1% SDS, 50 µg/ml t-RNA, 5% Dextran Sulfat

20xSSC:

3 M NaCl, 0.3 M Natriumcitrat, pH 7.0

3.9 Quantifizierung der humoralen Antwort gegen CK8

Die Quantifizierung der humoralen Antwort gegen Zytokeratin 8 wurde in einem adaptierten Bioplex-System durchgeführt. Dazu wurde rekombinantes Zytokeratin 8 kovalent unter Verwendung des Bioplex Amino-Kopplungs-Kits auf Fluoreszenz gefärbte Polystyrol-Matrix (5 µg Zytokeratin 8 auf $1,25 \times 10^8$ Kügelchen) immobilisiert. Dies erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Diese Matrix wurde 1 h mit Seren (1:100 verdünnt in Bioplex-Serumdiluenten) von Karzinompatienten oder gesunden Probanden inkubiert (1 h bei RT) und weitere 30 min bei RT mit einem anti-human PE-gekoppelten Sekundärantikörper behandelt. Die Menge an gebundenen CK8-spezifischen Antikörpern und die Anzahl der gemessenen Kügelchen wurden im Bioplex-System bestimmt. Als mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) wurde für jede Probe die PE-Fluoreszenz von insgesamt 100 gemessenen Kügelchen angegeben. Die Signifikanz wurde mit Hilfe eines ungepaarten Student'schen T Tests berechnet. Die Sensitivität (S) wurde wie folgt bestimmt: $S = a:(a + b)$, wobei a für die Anzahl der Seren mit einer MFI oberhalb des Grenzwerts und b für die Anzahl der Seren mit einer MFI (*mean fluorescence intensity*) unterhalb des Grenzwerts steht. Die Spezifität entspricht der Anzahl der gesunden Seren mit einer MFI unterhalb des Grenzwertes und ist in Prozent angegeben. Als Negativkontrolle wurde BSA (*Bovine Serum Albumin*) beladene Matrix verwendet. Als Positivkontrolle und Standard wurden bei jeder Messung zwei positive Seren gemessen. Zusätzlich wurde eine Standardkurve mit verschiedenen Verdünnungen eines Maus anti-CK8 Antikörpers und PE-konjugiertem Zweit-antikörper bestimmt.

3.10 Molekularbiologische Methoden

Sofern hier nicht im Detail geschildert, wurden gängige Techniken wie zum Beispiel DNA-Messung, Präparation von Plasmid-DNA, RNA-Isolierungen, Nukleinsäure-Präzipitation, Vektor-Klonierungen, *etc.* in Anlehnung an Standardprotokolle (Maniatis *et al.* 1989) oder gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.10.1 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden je nach Größe in Agarosegelen geeigneter Konzentration (0.8-2%) aufgetrennt. Die Migrationsgeschwindigkeit der DNA ist dabei dem Logarithmus der Fragmentgröße umgekehrt proportional. Zur Visualisierung der Nucleinsäuren unter UV-Licht wurde die Agarose mit Ethidiumbromid (0.75 µg/ml) versetzt. Die Laufbedingungen wurden durch die Spannung begrenzt, die sich aus dem Abstand der beiden Elektroden (3V/cm) errechnete.

Laufpuffer:	1x TBE (45 mM Tris-Borat, 1 mM EDTA) oder 1x TAE (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA)
6 x Ladepuffer:	0.25% Bromphenolblau, 0.25% Xylencyanol EF, 30% Glycerin in Wasser
Marker:	Gene Ruler 1 kb DNA Marker (250 bp–10 kb), φX174 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker (72-1353 bp), 1 kb DNA Marker (75-12216 bp), Invitrogen

3.10.2 5' RACE

Die Adapter gelinkte cDNAs der Zelllinie GHD wurden nach Angaben des Herstellers hergestellt (GeneRacer™ Kit, Invitrogen). Die RT erfolgte unter der Verwendung einer Superkript II (Invitrogen). Die 5' RACE wurde mit einem Advantage GC Polymerase-Mix (Clontech, BD) und zugehörigem Enhancer (Endkonzentration: 5%) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 95°C für 3 min; 5 Zyklen mit 95°C 20 s, 68°C 1 min, anschließend 35 Zyklen mit 95°C 20 s, 65°C 30 s, 68°C 1 min; 68°C für 5 min. Die Banden der PCR-Produkte wurden direkt in einen pCR-4-TOPO Vektor kloniert (Invitrogen) bzw. in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt, kloniert und sequenziert.

3.10.3 Relative Quantifizierung der Genexpression mittels *real-time* Polymerase-Kettenreaktion

Alle RT-Reaktionen wurden nach dem Zwei-Stufen-Protokoll durchgeführt, d.h. die Reverse Transkription und die nachfolgende PCR fanden im separaten Reaktionsgefäßen statt. Die RNA wurde stets mit DNase behandelt und mittels PCR auf das Vorhandensein von genomischer DNA überprüft.

Reverse Transkription

Die Reverse Transkriptase schreibt einsträngige RNA in eine „*complementary*“ oder cDNA um. Dies erfolgte mit Hilfe des Reverse Transkription Systems (Promega) nach Angaben des Herstellers. Für jede Reaktion wurde 1 µg RNA eingesetzt.

Quantitative Polymerasekettenreaktion

Die „*real-time*“ PCR ermöglicht die Amplifikation und die Bestimmung von DNA-Produkten in Echtzeit. Dadurch kann die DNA-Menge quantifiziert werden. Hierzu verwendet man den interkalierenden Farbstoff SYBR Green®. Dieser Farbstoff lagert sich in die doppelsträngige DNA ein, so dass nach Ende der Elongationsphase die Fluoreszenzintensität des eingelagerten Farbstoffes bestimmt wird. Dies erlaubt die Messung von PCR-Kinetiken und eine relative Quantifizierung der Genexpression auf transkriptioneller Ebene.

Die quantitative Polymerasekettenreaktion erfolgte unter Verwendung des Light-Cycler DNA Master SBYR Green I Kits (Roche) und einem Light-Cycler-System von Roche. Alle PCR-Reaktionen wurden in einem Reaktionsvolumen von 10 µl mit 1 µl des Fast Starter Master Mixes, je 1 pmol sowohl des sense als auch des antisense Primers, 3 mM MgCl₂ und 10-50 ng cDNA durchgeführt. Die Amplifizierung erfolgte in 45 Zyklen mit jeweils einer 1 sek. Denaturierungsphase bei 94 °C, 10 sec Annealingphase bei 63-70°C und einer Elongationsphase bei 72°C für 5-25 sec. Die Fluoreszenzintensität der Proben wurde nach jedem Zyklus am Ende der Elongationsphase bestimmt. Nach dem Durchlaufen des Amplifikationsprogramms wurde das Schmelzverhalten der amplifizierten DNA analysiert. Dazu wurde die DNA langsam (0.1°C/ sec) von 60°C auf 94°C erhitzt und die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. Bei jedem Messdurchgang wurde die Effizienz der PCR-Reaktion mit Hilfe von Standardkurven bestimmt. Die Standardkurven wurden aus verschiedenen Verdünnungen der Matrix-DNA mit mindestens vier Meßwerten gebildet. Die Amplifikationseffizienz ergab sich nach folgender Formel aus der Standardkurve (SK):

$$E = 10^{(-1/a)} \text{ mit}$$

E = Amplifikationseffizienz

a = Steigung der SK mit logarithmischer Auftragung der Konzentration an Matrix-DNA

Zur Berechnung der relativen Genexpression wurden folgende Formeln herangezogen:

$$NR_{(CP)} = N_{P(CP)} / N_{R(CP)} \quad \text{und} \quad \text{normalisierte Ratio} = \frac{\{E_Z^{\Delta n(Z)}\}}{\{E_R^{\Delta n(R)}\}}$$

mit

$NR_{(CP)}$ = Normalisiertes Verhältnis

N_P = Anzahl der Zielmoleküle

N_R = Anzahl der Referenzmoleküle

mit

E_Z = Amplifikationseffizienz des Zielgens

E_R = Amplifikationseffizienz des Referenzgens

Δn = Zyklus (Zeitpunkt 0) - Zyklus (Zeitpunkt X)

Z = Zielgen

R = Referenzgen

3.11 Bakterienkultur

3.11.1 Vermehrung und Aufbewahrung

Bakterien wurden als Suspensionskultur in Luria Broth Medium (LB) oder zur Vereinzelung von Kolonien auf LB-Agar-Platten kultiviert. Bei Selektion auf Resistenz gegen Antibiotika wurde dem LB-Medium das Antibiotikum aus einem 1000-facher Stock zugegeben. Zur Lagerung von Bakterien über längere Zeiträume wurde eine dichtgewachsene Bakterienflüssigkultur mit 15% Glycerin in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

LB- Medium: 1 % Trypton; 0.5 % Hefeextrakt; 1 % NaCl, pH 7.2

Bacto-Agar-Platten: 12.5 % Bacto-Agar ad 1L LB-Medium

Endkonzentrationen der Antibiotika:

Ampicillin	100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
Chloramphenicol	34 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
Kanamycin	30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

3.11.2 Transformation von *E.Coli*

Die Herstellung transformationskompetenter *E.coli*-Stämme erfolgte durch Inkubation einer *E.coli* DH5 α -Kultur in TFB-Puffer auf Eis (Hannahan *et al.*, 1985). Zu einem Aliquot (200 μl) der so behandelten Bakterien wurden ca. 50 ng eines Ligierungsansatzes bzw. 1 ng Plasmid-DNA pipettiert und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschockschritt bei 42°C für 1 min. Nach Zugabe von

800 µl LB-Medium und einer 30-minütigen Anzucht bei 37°C wurde die Zellsuspension auf Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

TFB-Puffer	10 mM K-Mes, pH 6.2, 50 mM CaCl ₂ , 45 mM MnCl ₂ , 100 mM RbCl
------------	--

3.12 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Die Transfektion der Zellen mit Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des MATRA-Reagenz (IBA) durchgeführt. Die Zellen wurden über Nacht in 6-Loch-Platten, 24-Loch-Platten, 96-Loch-Platten bzw. 8-Kammern Chamber-Slides bis zu einer Dichte von ca. 70% kultiviert. Die Transfektion erfolgte in serumfreiem Medium nach Angaben des Herstellers. Stabile Transfektanten wurden durch anschließende Selektion mit Puromycin bis zu einer maximalen Konzentration von 1 µg/ml gewonnen. Nach siRNAs Transfektionen wurden die Zellen trypsiniert (1 h nach Transfektion) und zur weiteren Kultivierung in Petrischalen ausplattiert.

3.13 Western Blot

Die Proteine wurden in 10-15 %igen SDS-Polyacrylamidgelen in vertikaler Elektrophorese aufgetrennt (Laufbedingungen: 180 V; 30 mA/Gel) und anschließend auf eine Immobilon-P Transfermembran (Millipore) übertragen (Westernblot; 100 V; 500 mA; 40-45 min). Durch 30-minütige Inkubation der Membran in Blockpuffer wurden unspezifische Bindungen von Antikörpern unterbunden. Die Detektion der Proteine erfolgte mit spezifischen Primärantikörpern bzw. Antiseren (1:100 bis 1:20000 in Waschpuffer) und Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpern (1:1000 - 1:5000) nachgewiesen.

10 x Laufpuffer:	250 mM Tris, 2 M Glycin, 1% SDS
------------------	---------------------------------

10 x Blotting-Puffer:	250 mM Tris, 1.26 M Glycin
-----------------------	----------------------------

Waschpuffer:	Phosphatgepufferte Saline (PBS) + 0.2 % Tween
--------------	---

Blockpuffer:	Roti-Block (ROTH), 1:10 in Aqua dest.
--------------	---------------------------------------

3.12 MTT Analysen

Die Konversion des Substrats MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid) durch eine mitochondriale Dehydrogenase dient als Maß für den Metabolismus und die Vitalität von Zellen (Mosmann *et al.*, 1983). Durch die enzymatische Umsetzung entsteht ein Formazan-Produkt, das durch Messung der optischen Dichte quantifiziert wird. Je 3×10^3 Zellen wurden in 96-Loch Platten ausgesät und nach Adhärenz transfiziert. Zur Messung der MTT-Konversion wurde den Zellen je 10 μl /Loch MTT Reagenz zugegeben. Nach vierstündiger Inkubation bei 37°C wurden die gebildeten Farbkristalle in 200 μl /Loch eines 24:1 Isopropanol und 1 M HCl komplett lysiert und anschließend die optische Dichte (OD) bei 690 nm in einem ELISA Gerät gemessen. Zum Vergleich verschiedener Experimente wurden die gemessenen OD-Werte stets auf den am ersten Tag einer Zeitreihe gemessenen Wert standardisiert.

MTT-Reagenz	100 mg (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid) in 20 ml PBS
-------------	--

4 Ergebnisse

Tumorpatienten besitzen eine humorale Antwort gegen Tumorantigene (TA). Auf der Basis dieser Auto-Immunantwort sollten in der vorliegenden Arbeit TAs im Bereich von Hals-Rachen-Karzinomen identifiziert werden. Dazu sollte eine neue Technik entwickelt werden, die es erlaubt TAs aus dem kompletten Proteom zu isolieren.

4.1 Identifizierung und Validierung neuer Tumorantigene in Plattenepithelkarzinomen (PEK) der oberen Atemwege

4.1.1 Entwicklung einer Proteom-basierenden Technik zur Isolierung und Identifizierung von Tumorantigenen (AMIDA)

Die Besonderheit der AMIDA-Technologie (*auto-antibody mediated identification of antigens*) ist die Selektion und Aufreinigung von Antigenen vor einer zweidimensionalen Auftrennung und der anschließenden Isolierung tumorspezifischer bzw. -assoziierter Antigene. Das AMIDA-Verfahren ist in Abbildung 4.1 schematisch dargestellt und wird im Folgenden genauer beschrieben.

Immunpräzipitation

Blut und Tumorbiopsien von Patienten, die an einem Plattenepithelkarzinom im Bereich der oberen Atemwege leiden, wurden routinemäßig während der OP als Ausgangsmaterial für die Immunpräzipitation (IP) entnommen. Die Biopsie wurde zu einer Einzelzellsuspensionen verarbeitet und lysiert. Bei einer ausreichenden Menge an Zellmaterial ($\geq 5 \times 10^7$) wurden Membranfraktionen (MF) isoliert und als Proteinquelle für die IP verwendet. Ansonsten wurde ein Gesamtlysat aus 1×10^7 Zellen eingesetzt. Antikörper wurden aus dem Blut gewonnenen und kovalent (*Crosslink*) an eine Protein-A-Matrix gekoppelt. Die immobilisierten Antikörper wurden zur selektiven IP von TAs verwendet.

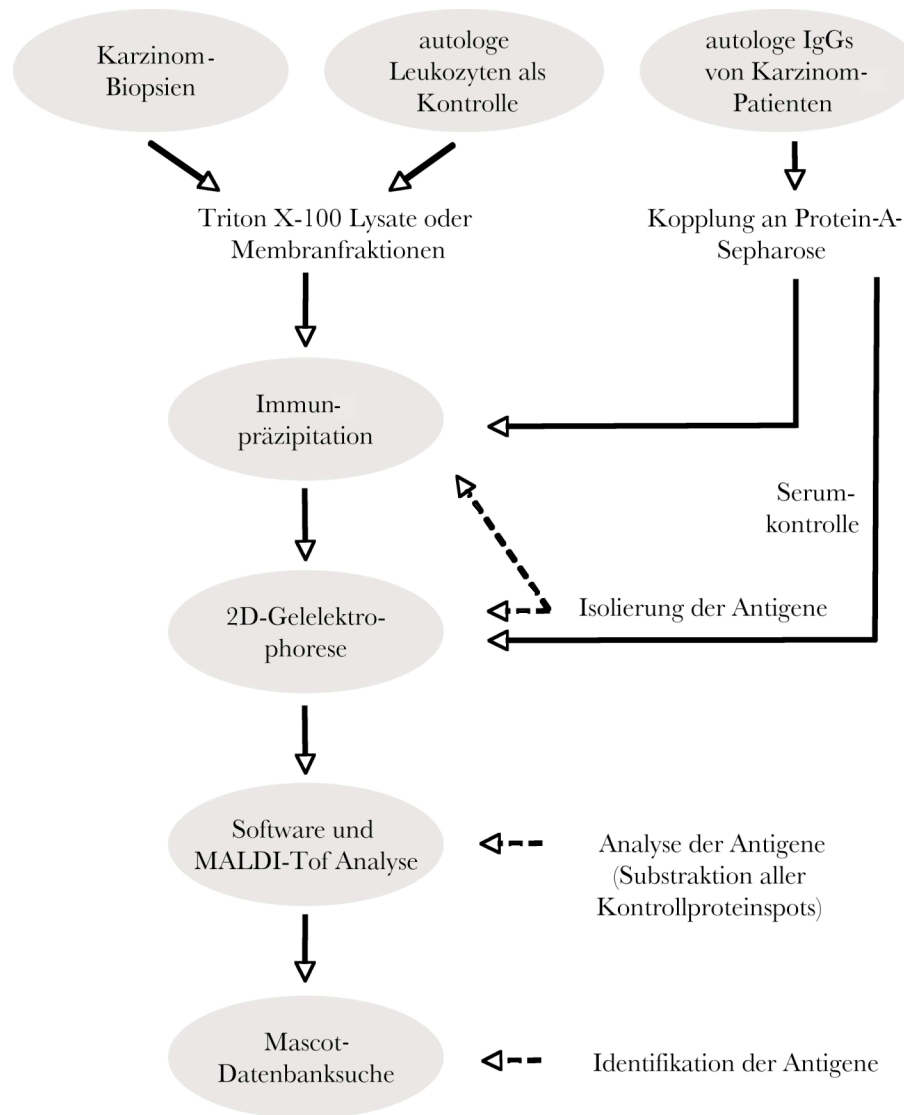


Abb. 4.1: Flussdiagramm der autologen AMIDA-Technologie

Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die präzipitierten Antigene wurden anschließend in einer ersten Dimension (isoelektrischen Fokussierung (IEF)) über einen pH-Gradienten (pH 3-10 und pH 4-7) bezüglich ihres isoelektrischen Punktes (IEP) aufgetrennt. In einer zweiten Dimension wurden die Präzipitate aufgrund ihres Molekulargewichtes über eine vertikale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) separiert. Zur Visualisierung der Antigene wurden die Gele mit Coomassie- bzw. Silbernitrat-gefärbt. Die IP mit Serumantikörpern reduziert die Komplexität des zu analysierenden Proteingemisches deutlich. Proteine aus einer Membranfraktion wurden mit (b) bzw. ohne (a) vorgeschalteter IP in einem 2D-Gel aufgetrennt und anschließend mit einer Silberfärbung visualisiert (Abb. 4.2).

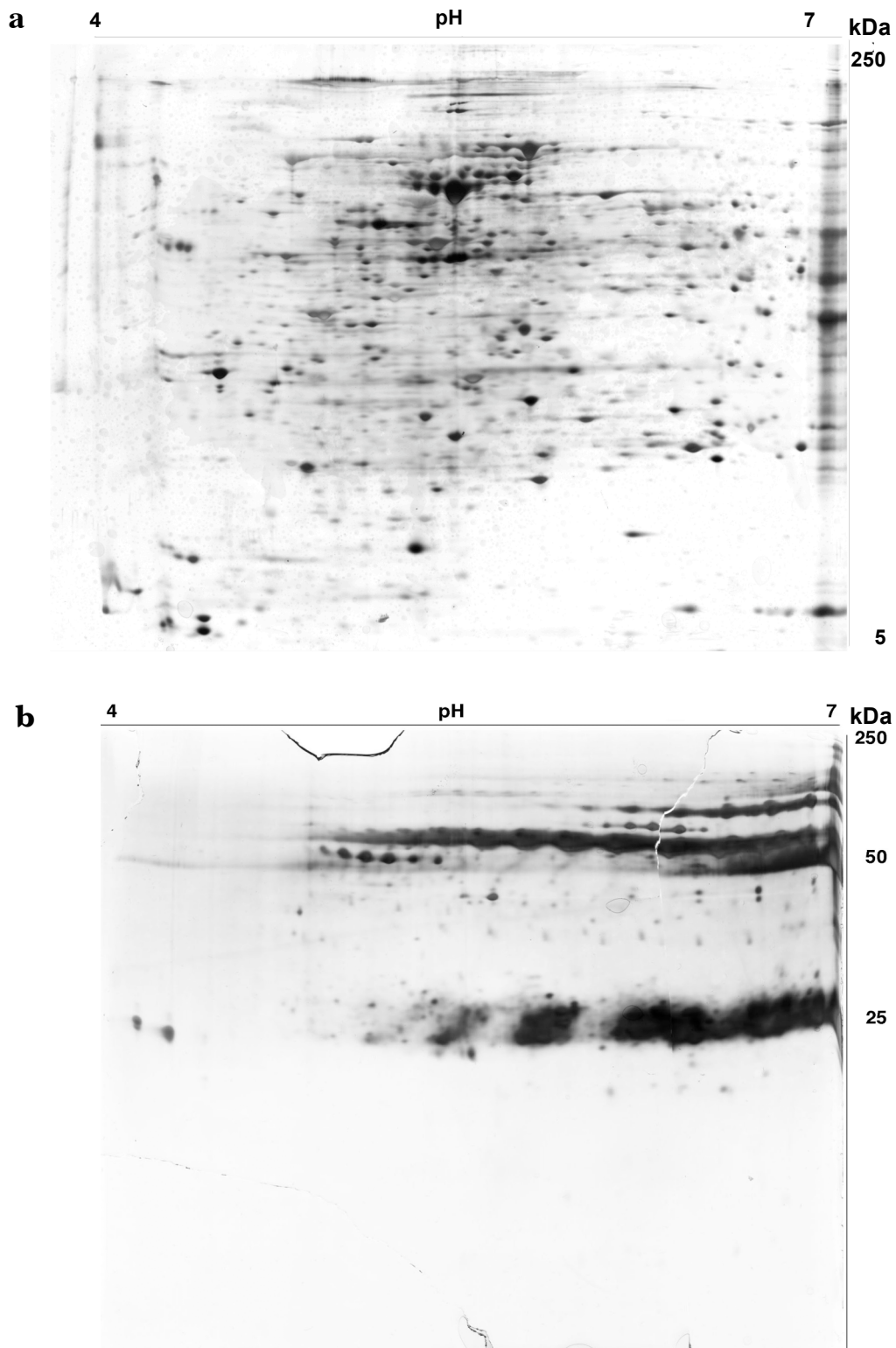


Abb. 4.2: Reduktion der Proteinkomplexität durch AMIDA. Gezeigt ist beispielhaft (a) eine Membranfraktion der Zelllinie GHD, die zweidimensional in einem 11%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt wurde oder (b) Proteine aus einer Membranfraktion der Zelllinie GHD, die mit autologen Serumantikörpern isoliert und wie in (a) aufgetrennt wurden.

Kontrollen

Um tumorspezifische bzw. -assoziierte Antigene von unspezifischen Proteinspots bzw. natürlichen Autoantigenen unterscheiden zu können, wurden mehrere Kontrollen eingeführt. Serum- und Lysatproteine können unspezifisch an die Protein-A-Matrix binden und als falsch-positive Antigene ko-präzipitiert werden. Unspezifisch gebundene Proteine wurden folgendermaßen identifiziert. Die Protein-A-Matrix wurde ohne immobilisierte Antikörper mit dem Proteinlysate inkubiert und alle unspezifisch gebundenen Lysatproteine in einer 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Serumproteine und AK, die ebenfalls unspezifisch an die Matrix binden, wurden nach dem *Crosslink* denaturiert und alle abgelöst, d.h. nicht kovalent gebundenen, Proteinkomponenten ebenfalls in einer 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Außerdem wurden Kontrollexperimente mit gesunden Leukozyten durchgeführt, um natürliche Autoantigene ausschließen zu können. Dabei wurden Antigene mit autologem Patientenserum aus Leukozytenlysaten präzipitiert und aufgetrennt. Durch den Vergleich der resultierenden Proteinmuster aller Kontrollen und der eigentlichen AMIDA-IP mittels ImageMaster 2D-Software konnten tumorspezifische bzw. -assoziierte Antigene differenziert werden. In Abb. 4.3 sind repräsentative Beispiele von Coomassie- und Silber-gefärbten Gelen gezeigt.

Maldi-ToF-Analysen

Proteine, die nicht mit den Kontrollen präzipitierten, wurden ausgeschnitten, im Gel tryptisch verdaut und die erhaltenen Peptide mittels MALDI-ToF Massenspektrometrie (Bruker Reflex III) analysiert. Die Identifizierung des jeweiligen Proteins mit Hilfe der erhaltenen Massenspektren (*peptide mass fingerprints*) erfolgte über einen Datenbankvergleich (<http://www.matrixscience.com>). Im Durchschnitt konnten 50% aller ausgeschnittenen Proteinspots von silbergefärbten Gelen und 80% der Coomassie-gefärbten Proteine identifiziert werden. Beispiele für das Ergebnis einer Datensuche mit Silber und Coomassie-gefärbten Spots sind in den Abbildungen 4.4 gezeigt.

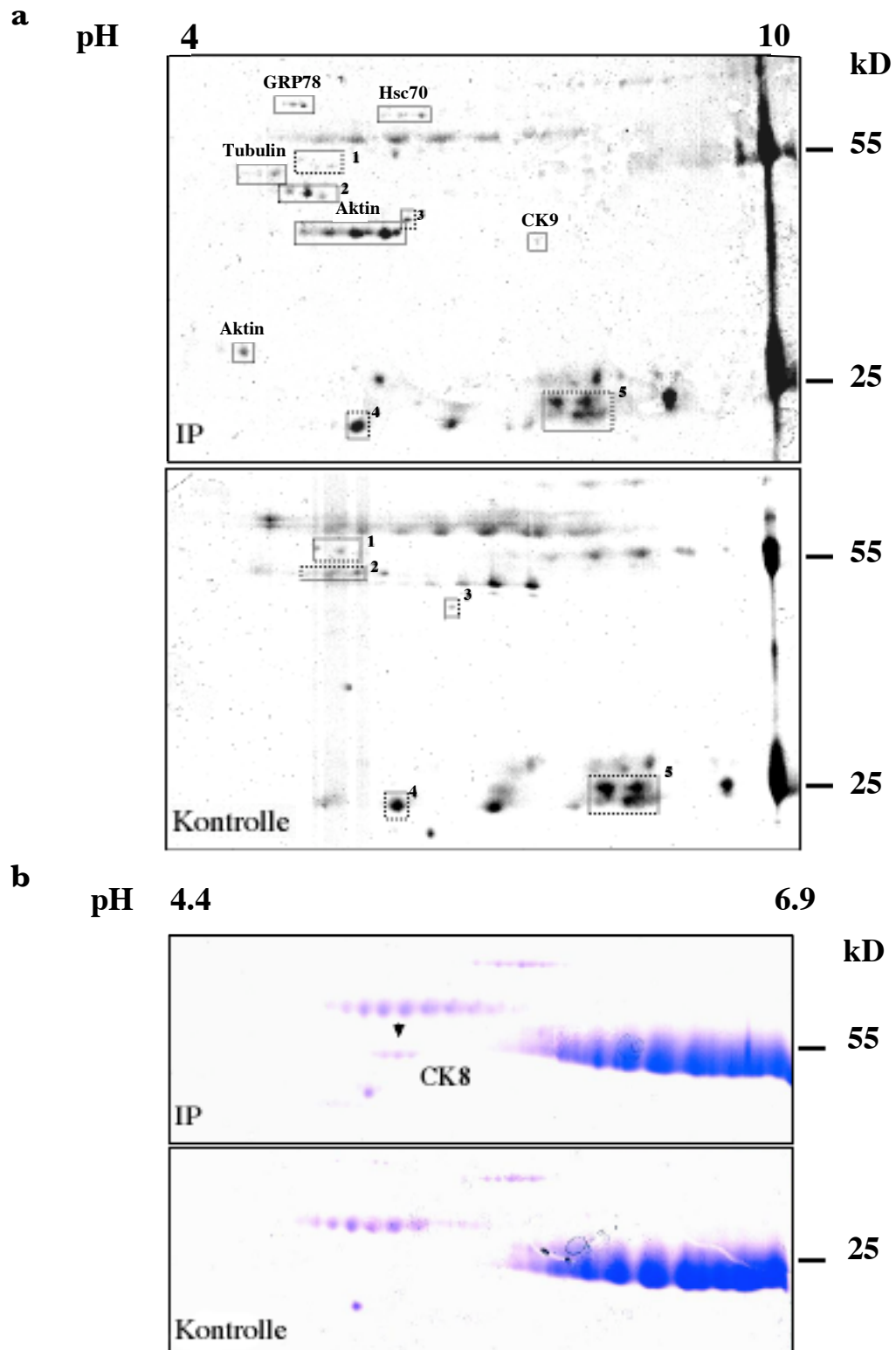


Abb. 4.3: Repräsentative Ausschnitte aus Silber- (a) und Coomassie-gefärbten (b) 2D-Gelen des AMIDA-Screenings. Die ausgeschnittenen und mit MALDI-TOF MS identifizierten Proteinspots sind markiert. Dargestellt sind beispielhaft Ausschnitte aus Gelen der Immunpräzipitation von Tumorproben und Kontrollen. Zusätzliche Spots, die als Orientierungsmarker dienen, sind gerahmt und nummeriert (1-5).

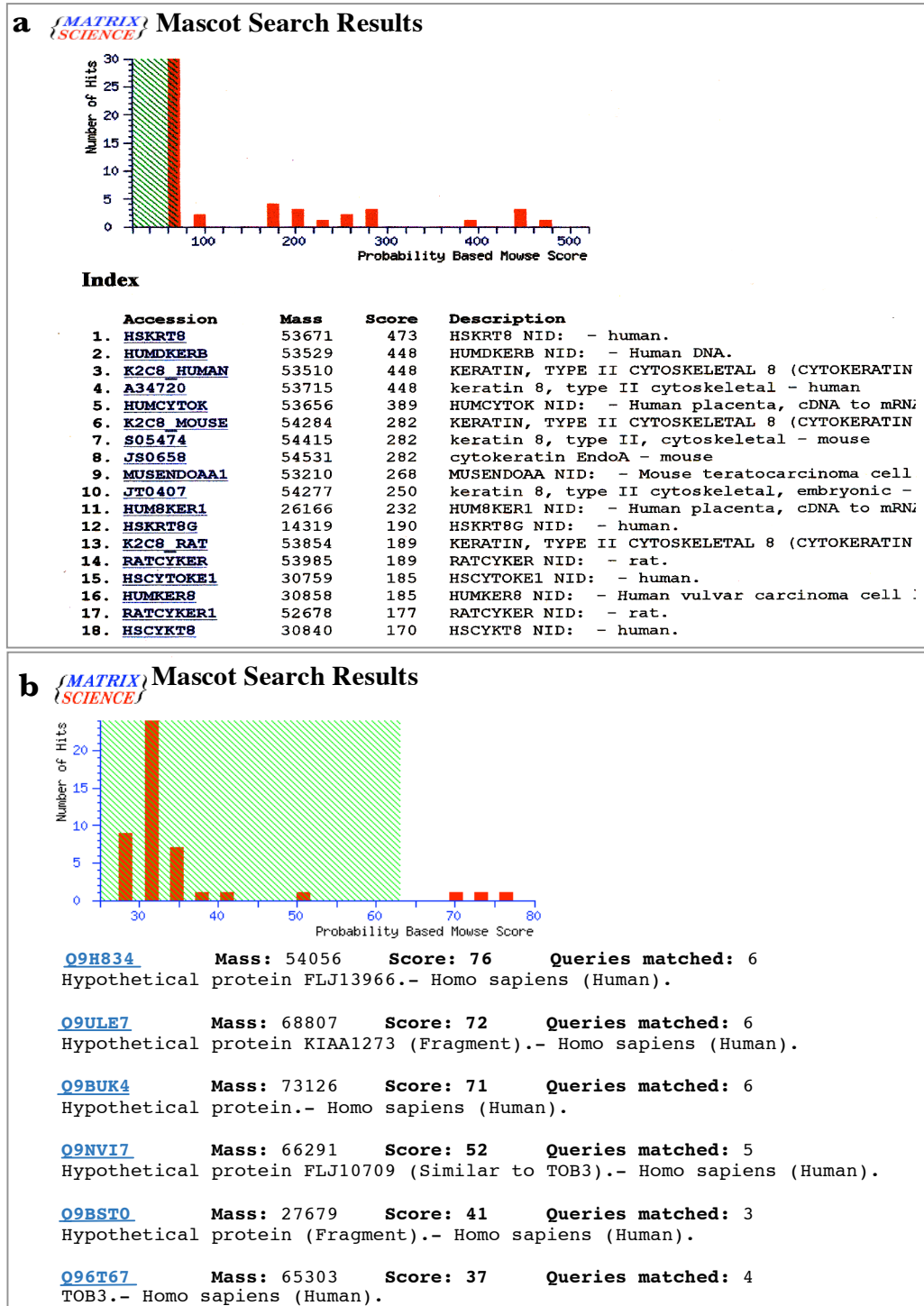


Abb. 4.4: Repräsentative Ergebnisse der Datenbanksuche nach einer MALDI-ToF Analyse. (a) Gezeigt ist das Suchergebnis für Zytokeratin 8. Das analysierte Protein wurde aus einem Coomassie-gefärbten 2D-Gel ausgeschnitten, tryptisch verdaut und mittels MALDI-ToF analysiert. (b) Ein weiteres Protein wurde aus einem silbergefärbten 2D-Gel ausgeschnitten, und wie in (a) verarbeitet. Die ersten drei Ergebnisse (Score ≥ 70) sind Sequenzen unterschiedlicher Proteinfragmente des hypothetischen Proteins KIAA1273.

4.1.2 Isolierung und Identifizierung potenzieller Tumorantigene in Plattenepithelkarzinomen der oberen Atemwege

Das AMIDA-Verfahren wurde mit Proben von insgesamt sechs HRK-Patienten durchgeführt. Dabei wurden 27 verschiedene potenzielle TAs identifiziert (Tabelle 4.1), die in drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden können:

- (i) Proteine, die bereits als TAs beschrieben wurden (Grp78) oder mit Autoimmunerkrankungen assoziiert sind (Vimentin oder Hsc70).
- (ii) Proteine mit bekannter Funktion, welche bis *dato* nicht mit Tumoren in Zusammenhang gebracht wurden (Tropomyosin alpha oder Elongin A2).
- (iii) Proteine mit unbekannter Funktion, wie die KIAA-Proteine oder das hypothetische 41.3 kDa Protein.

In Tabelle 4.1 sind die Datenbank-Eingangsnummern, die Identifizierungswerte, die Proteinquelle (Membranfraktion oder Komplettylysate), Referenzen, übereinstimmende Peptide und die Sequenzabdeckung für alle 27 identifizierten Proteine zusammengefasst. Vier Proteine, das Zytokeratin 16, die Betakette der ATP-Synthase, β -Aktin und das mutierte Zytokeratin 9 wurden aus mehreren Patientenproben isoliert.

Für einen AMIDA-Screen werden mindestens 1×10^7 Tumorzellen benötigt. Die Tumorbiopsien reichten meist nur für eine Immunpräzipitation aus. Deshalb wurde die Reproduzierbarkeit von AMIDA mit einer Tumorzelllinie (GHD) überprüft, die aus einer größeren Tumorbiopsie eines Patienten etabliert wurde. Diese Zelllinie wurde als Proteinpool für unabhängige IPs mit autologen Antikörpern des Patienten verwendet. Parallel dazu wurde mit der Tumorbiopsie dieses Patienten ein AMIDA-Screen durchgeführt. Die durchgeführten Experimente ergaben eine hohe Reproduzierbarkeit der AMIDA-Technologie: Zytokeratin 8 konnte z.B. mit dem Lysat der Zelllinie in jedem von vier unabhängigen Experimenten isoliert und im Massenspektrometer mit Scores von 336 bis 473 als hoch signifikant identifiziert werden.

Tabelle 4.1: Datenbank-Eingangsnummer (N°), Proteinname und Mascot Search Scores (ID Score) der isolierten AMIDA Antigene

N°	Protein	ID Score	Lysat	Referenz *	überein. Peptide	max. SA	HK
Q96I66	unbekanntes Protein	72	KZL	TREMBL	7	18%	1/6
JC4313	Zytokeratin 16	71	KZL	TAA (1)	9	28%	2/6
Q96PV1	KIAA1937	99	KZL	(2)	13	19%	1/6
P35557	D-Glucose Hexokinase	75	KZL	TAA (3)	8	7%	1/6
Q9p2V9	Elongin A2	66	KZL	(4)	13	13%	1/6
P06753	Tropomyosin alpha	72	KZL	(5)	11	48%	1/6
Q9ULK3	KIAA1217	65	MF	(2)	8	9%	1/6
1MABB	ATP-Synthase Betakette	129	MF	(6)	17	27%	2/6
P08670	Vimentin	298	MF	a-Ag(7)	36	64%	1/6
Q96LL7	cDNA FLJ25393	64	MF	TREMBL	9	14%	1/6
P11021	Grp78	269	KZL	TAA (8)	24	47%	1/6
1KAX	Hitzeschock verwandtes Protein 70	99	KZL	a-Ag (9)	29	46%	1/6
Q91575	Tubulin beta	240	KZL	TAA (10)	25	51%	1/6
ATHUB	Aktin beta	146	KZL	TAA (10)	18	50%	3/6
ATHUG	Aktin gamma	161	KZL	TAA (10)	19	48%	1/6
D42825	Krüppel-Typ Zinkfingerprotein ZNF-70	76	KZL	(11)	6	38%	1/6
CSHUA	Zyclophilin A	66	KZL	TAA (12)	6	41%	1/6
O00109	Keratin 9 Mutante	110	MF/ KZL	(13)	13	28%	3/6
BAA86587	KIAA1273	100	MF	(2)	6	19%	1/6
P05787	Zytokeratin 8	473	MF	TAA (14,15)	36	56%	1/6
S55024	Nebulin	87	MF	(16)	35	15%	1/6
I61769	Zytokeratin 6d	129	MF	TAA	18	55%	1/6
Q9Y2K3	KIAA1000	63	KZL	(2)	17	23%	1/6
Q96ES1	Serin-Proteinase ähnliches Protein	107	KZL	(17)	11	35%	1/6
C1HURB	komplemente subcomponent C1r	106	KZL	(18)	14	39%	1/6
Q9B5S71	Hyp. Protein 41.3kD	96	KZL	TREMBL	9	32%	1/6
Q9UJD9	RPS2 ähnliches Protein	69	KZL	TREMBL	12	41%	1/6

Ein Score ≥ 62 steht für einen p Wert < 0.05 . KZL: komplettes Zellysat; MF: Membranfraktion; a-Ag: Autoantigen; TAA: Tumorassoziertes Antigen; TREMBL: Datenbank Eintrag; Überein. Peptide: übereinstimmende Peptid; SA: Sequenzabdeckung; HK: Häufigkeit.

*: (1) Vaidya *et al.*, 2000; (2) Nagase *et al.*, 2001; (3) Ross *et al.*, 2000; (4) Aso *et al.*, 2000; (5) Perry *et al.*, 2001; (6) Leyva *et al.*, 2003; (7) Xue *et al.*, 1997; (8) Mintz *et al.*, 2003; (9) Ohguro *et al.*, 1999; (10) Bachvaroff *et al.*, 1980; (11) Aubry *et al.*, 1992; (12) Meza-Zepeda *et al.*, 2002; (13) Kobayashi *et al.*, 1996; (14) Hembrough *et al.*, 1996; (15) Hembrough *et al.*, 1995; (16) Wang *et al.*, 1996; (17) Long *et al.*, 1984; (18) Arlaud *et al.*, 2002

4.1.3 Validierung der AMIDA-Antigene CK8 und AAA-TOB3/KIAA1273

4.1.3.1 CK8-AK als zirkulierende Biomarker

Tumorantigene werden bei der AMIDA-Technologie aufgrund spezifischer Serumreaktivitäten im Blut von Patienten isoliert. Somit könnten erhöhte Mengen an Serumantikörper gegen AMIDA-Antigene zirkulierende Biomarker darstellen. Als Biomarker sind diese AK allerdings erst interessant, wenn sie in einer Vielzahl von Patienten anwesend sind und eine ausreichende Spezifität besitzen. Im Folgenden sollten deshalb die Häufigkeit und die Konzentration von Serumantikörpern im Blut gesunder Probanden und Tumorpatienten am Beispiel des AMIDA-TAs Zytokeratin 8 (CK8) bestimmt werden. Dazu wurde ein adaptiertes Bioplex-Verfahren etabliert, in dem das Prinzip eines ELISAs mit dem der LUMINEX-Fluoreszenz Technologie verbunden wird. Dieses Verfahren ermöglicht eine schnelle Bestimmung der Serumreaktivität gegen Antigene in einer Vielzahl an Probanden und somit eine schnelle Beurteilung, ob ein TA ein Potenzial als molekularer Biomarker besitzt.

Rekombinantes humanes CK8 wurde kovalent auf eine Polystyrol-Matrix gekoppelt, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist und somit im Bioplex-System erkannt werden kann. Diese Matrix wurde anschließend mit Seren von gesunden Probanden (n=67) oder HRK-Patienten (n=60) inkubiert und alle gebundenen CK8-spezifischen Serumantikörper mit einem PE-gekoppelten human-IgG-spezifischen Antikörper detektiert (Abb. 4.5). Pro Matrix werden somit zwei Fluoreszenzen gemessen: die Fluoreszenz der Matrix und die PE-Fluoreszenz des sekundären Antikörpers. In jeder gemessenen Probe wird von einer vorgegebenen Menge Matrix die PE-Fluoreszenz, und somit die Menge an CK8-spezifischen Antikörpern, quantifiziert. Insgesamt wurden zwei unabhängige Experimente im Duplikat durchgeführt und für jede Serumprobe die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) berechnet. Als Negativkontrolle wurde die ungekoppelte bzw. eine mit BSA konjugierte Matrix mit den jeweiligen Seren und dem PE-konjugierten Zweitantikörper inkubiert. Dadurch konnte die unspezifische Bindung von Serumproteinen an die Polystyrol-Matrix bzw. an BSA quantifiziert werden. Die ungekoppelte Matrix ergab eine vernachlässigbare Hintergrundfluoreszenz. Die Serumreaktivitäts-

ten gegenüber BSA lagen zwischen 1000 FI und 2000 FI und wurden als unspezifische Reaktivität von den CK8-Werten abgezogen.

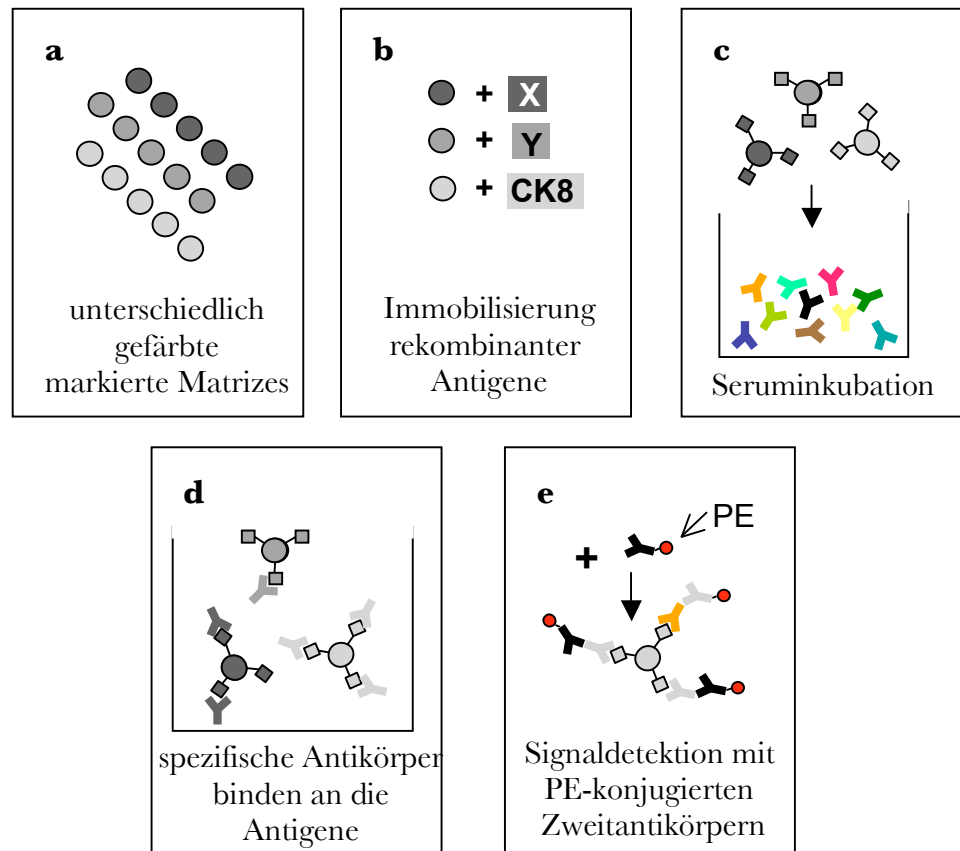


Abb. 4.5: Schematische Darstellung des Bioplex-Systems. (a) Kugelförmige Polystyrol-Matrizes sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. (b) Verschiedene TAs, in diesem Experiment nur CK8, werden auf jeweils eine Matrix mit einer „Farbkodierung“ kovalent gebunden. (c+d) Spezifische Serumantikörper binden an TAs. (e) Die gebundenen Antikörper werden mit einem human-IgG-spezifischen PE-gekoppelten Zweitantikörper detektiert.

Es zeigte sich, dass die Seren der Tumorpatienten (Mittelwert aller Tumorseren: 9500 MFI, $p \leq 0.0001$) signifikant höhere CK8-spezifische AK-Konzentrationen aufwiesen als die Seren gesunder Probanden (Mittelwert: 2500 MFI) (Abb. 4.6a). Die Einteilung der Patienten anhand des TNM Stadiums, d.h. nach Größe und Streuung des Tumors, ergab, dass bereits Patienten mit kleinen Karzinomen (T1 und T2) eine hohe AK-Konzentration gegen CK8 aufwiesen. Weiter fortgeschrittene Stadien (T3 und T4) zeigten im Mittel niedrigere Werte (Abb. 4.6b).

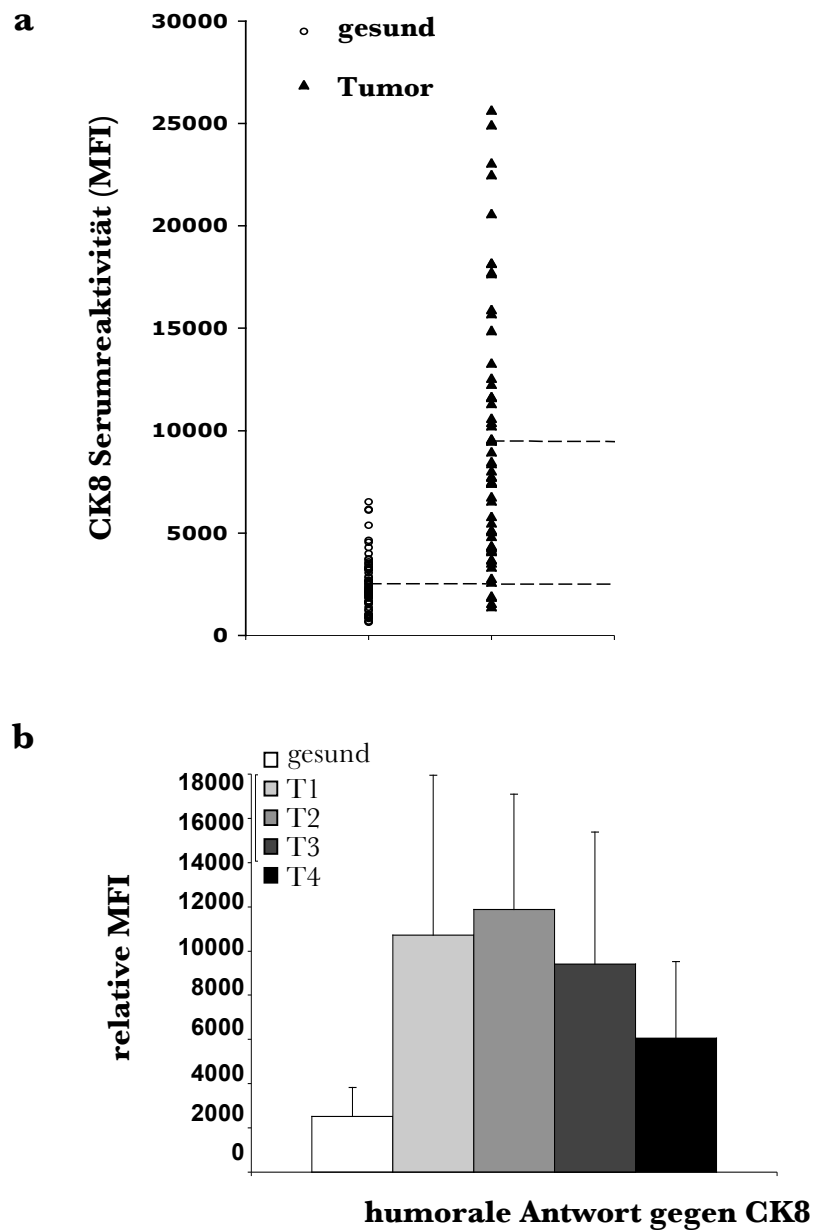


Abb. 4.6: Bioplex-Messung der humoralen Antwort gegen CK8 in Seren gesunder Probanden und Patienten mit HR-Karzinomen. Rekombinantes CK8 wurde kovalent an eine fluoreszenzmarkierte Polystyrolkugelmatrix immobilisiert und mit humanen Seren inkubiert (1:100). Danach wurden die gebundenen Antikörper mit einem PE-konjugierten human-IgG spezifischen Zweitantikörper detektiert. Die PE-Fuoreszenz wurde im Bioplex-System quantifiziert. (a) Die MFI der Serumproben wurde nach zwei unabhängigen Experimenten gemittelt. Offene Kreise repräsentieren Serumproben von gesunden Probanden, geschlossene Dreiecke die Serumproben von HRK Patienten ($p < 0.0001$). Die durchschnittlichen MFI-Werte, über alle gesunden Proben bzw. Tumorproben berechnet, sind mit gestrichelter Linie dargestellt. (b) Durchschnittliche MFI-Werte aller gesunden Proben bzw. Tumorproben, unterteilt nach Tumorstadien. Die CK8-AK Konzentrationen wurden mit dem Tumorstadium der Patienten korreliert und sind als MFIs mit Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Experimenten dargestellt. p-Werte: gesund/T1 = 0.006; gesund/T2, T3, T4 < 0.0001.

Ideale Tumormarker für die Diagnostik sollten bei einer Spezifität von $\geq 95\%$, eine Sensitivität von $\geq 50\%$ aufweisen. Für CK8 ergibt sich bei einer Spezifität von 95% über alle Stadien (MFI: 5500, Abb.4.6a) eine Sensitivität von 70% (Abb. 4.7a). Betrachtet man nur die Patienten im Stadium T1 und T2, ergibt sich mit 84% (Abb. 4.7b) eine noch höhere Sensitivität (Spezifität: 95%, MFI: 5750).

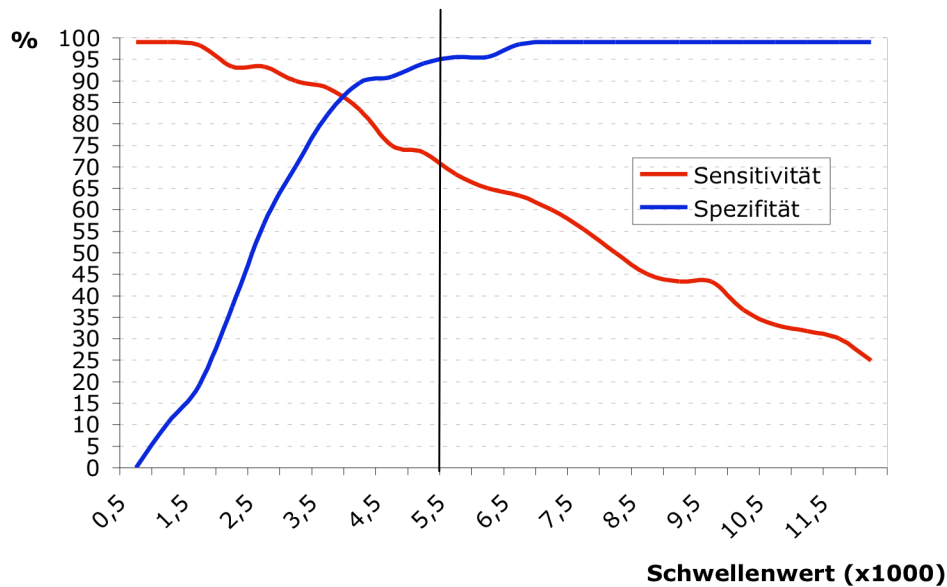
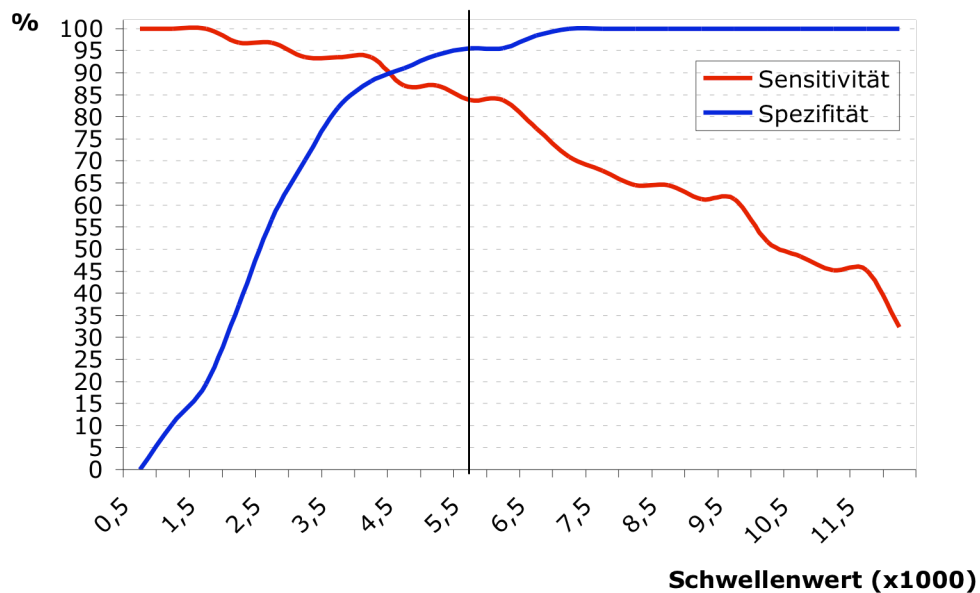
a**b**

Abb. 4.7: Spezifität und Sensitivität von CK8-AK in Abhängigkeit vom Schwellenwert.

(a) Berechnet über alle Tumorstadien. (b) Berechnet über die TNM-Stadien T1 und T2.

4.1.3.2 CK8 als Tumormarker in Plattenepithelkarzinomen der oberen Atemwege

Bei einigen Karzinomentitäten, vorwiegend beim Lungenadenokarzinom und beim Mammakarzinom wurde bereits eine Überexpression des Intermediärfilaments Zytokeratin 8 beschrieben (Korsching *et al.*, 2002; Gharib *et al.*, 2002). Bisher ist jedoch wenig über eine differenzielle intrazelluläre CK8-Expression bei Karzinomen im Bereich der oberen Atemwege im Vergleich zu gesundem Rachenepithel bekannt. Deshalb wurde die CK8-Expression in Tumorgewebe von HRK-Patienten und in gesundem Rachenepithel untersucht. Dazu wurden Gefrierschnitte von verschiedenen Tumorbiopsien (n=23; davon Metastasen: n=2) und gesunde Rachenepithelien (n=4) mit einem CK8-spezifischen Antikörper (35 β H11) immunhistochemisch gefärbt. Es zeigte sich, dass in 76% der untersuchten HRK-Biopsien eine hohe CK8-Expression im Tumorgewebe festzustellen war, wobei alle untersuchten Metastasen sehr hohe CK8-Mengen aufwiesen (+++). Alle gesunden Rachenepithelien zeigten hingegen keine bzw. nur eine sehr schwache CK8-Expression (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2: CK8-Expression in primären HRKs und in gesundem Rachenepithel

Gewebe	Färbeintensität			
	0	+	++	+++
Primäre HR-Karzinome	1/21 (5%)	4/21 (19%)	8/21 (38%)	8/21 (38%)
Metastasen	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	2/2 (100%)
Gesundes Rachenepithel	2/4 (50%)	2/4 (50%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)

Expression: keine (0); schwach (+); moderat (++); stark (+++)

Interessanterweise war im Vergleich zu gesundem Epithel bereits in Hyperplasien eine deutlich erhöhte CK8-Expression nachweisbar, die mit zunehmender Karzinogenese noch weiter anstieg. In Abb. 4.8 ist repräsentativ die Biopsie eines Hypopharynxkarzinompatienten gezeigt, die Areale verschiedener Entartungsstadien enthielt. CK8 war im morphologisch gesunden Rachenepithel des Patienten nur sehr schwach exprimiert (Abb. 4.8a und d), während das hyperplastische Epithel

eine deutliche CK8-Färbung zeigte (Abb. 4.8b und c, links). Diese verstärkte sich an den Rändern der Wucherung, wo die Zellen vermehrt proliferierten (Abb. 4.8b). In bereits neoplastischen Bereichen war eine sehr intensive CK8-Färbung festzustellen (Abb. 4.8c, rechts und e). Die einzelnen Stufen der Karzinogenese wurden anhand der Zellmorphologie beurteilt. Interessanterweise zeigten HRK-Lymphknotenmetastasen (n=2) ein extrem hohes CK8-Expressionsniveau, das ausschließlich auf die Karzinomzellen beschränkt war (Abb. 4.8f).

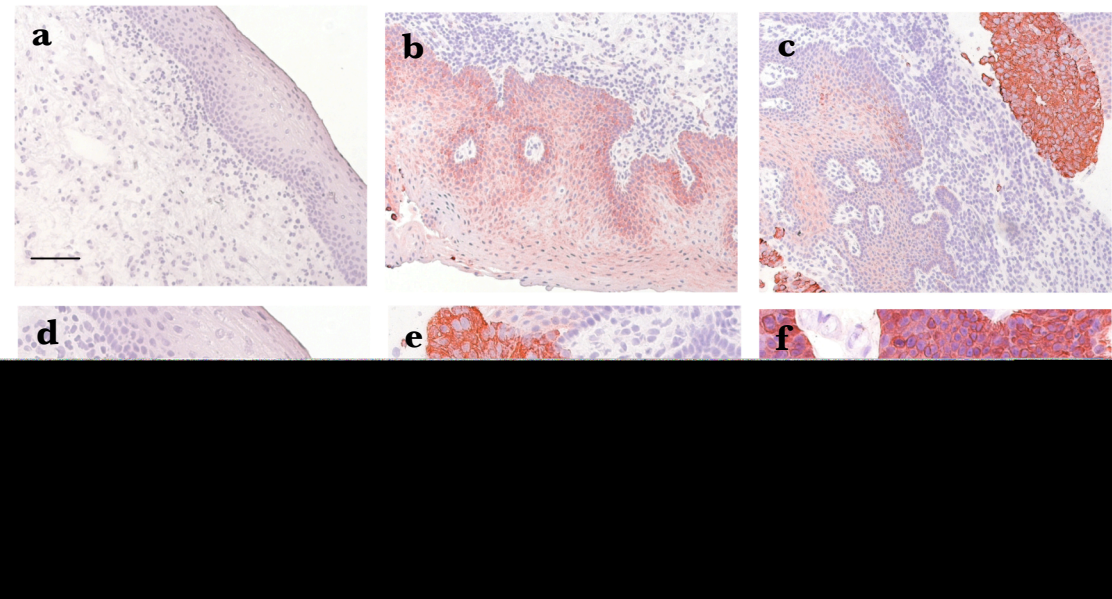


Abb. 4.8: CK8-Expression in morphologisch gesundem Rachenepithel, Hyperplasie, Karzinom und Metastase. Gefrierschnitte autologer Tumorbiopsien wurden mit einem CK8-spezifischen Antikörper (35 β H11) in Kombination mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper gefärbt. Gezeigt sind repräsentativ verschiedene Bereiche einer HR-Biopsie eines Hypopharynxkarzinompatienten. Tumorfreies, gesundes Epithel (a, d), Hyperplasie (b, c) und Karzinom (c, oben rechts und e) färbten sich unterschiedlich stark mit CK8-spezifischen Antikörpern. Die CK8-Expression einer HRK-Lymphknotenmetastase ist in f dargestellt. Balken: a, b, c, 40 μ m; d, e, f, 80 μ m.

Korrelation von CK8-Expression im Tumor und CK8-AK-Konzentrationen im Blut
 Im Folgenden stellte sich die Frage, ob eine positive Korrelation zwischen der CK8-Quantität im Tumorgewebe und der AK-Konzentration gegen CK8 im Blut von Karzinompatienten besteht. Dazu wurden von insgesamt 16 Karzinompatienten die AK-Konzentrationen gegen CK8 im Serum mit den CK8-Mengen in Karzinomzellen verglichen. Es konnte jedoch keine signifikante Korrelation zwischen diesen beiden Parametern festgestellt werden (Abb. 4.9).

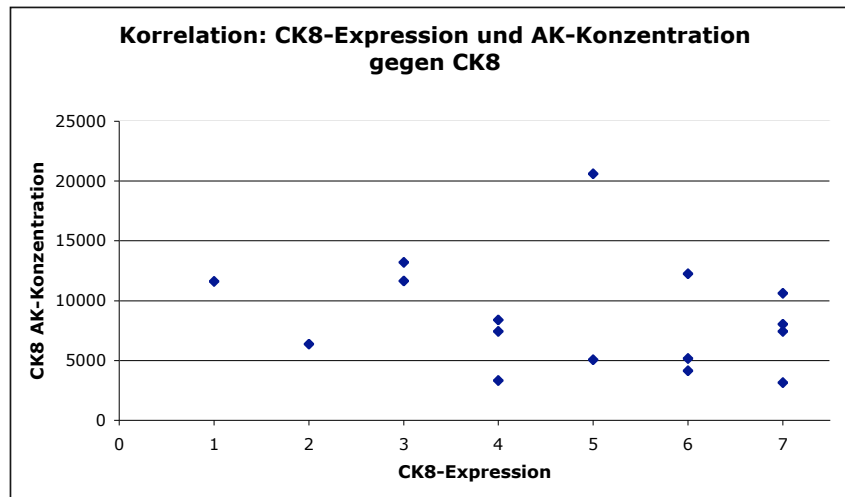


Abb. 4.9: CK8-Expression im Tumor und AK-Konzentrationen gegen CK8 im Serum.

Die CK8-Expression in Tumorbiopsien und die AK-Konzentration in den autologen Seren von 16 HRK-Patienten wurden bestimmt. Es ergab sich keine Korrelation von Expression und AK-Konzentration. Einteilung der CK8-Expressionsstärke: 1, keine; 2, punktuell schwach; 3, homogen schwach; 4, punktuell moderat; 5, homogen moderat; 6, punktuell stark; 7, homogen stark.

4.1.3.3 Ektopische CK8-Expression an der Oberfläche von Plattenepithelkarzinomen

Mit Hilfe des AMIDA-Verfahrens wurden insgesamt vier verschiedene Zytokeratine, CK6d, 8, 9 und 16 als potenzielle Tumorantigene identifiziert. Bemerkenswert ist, dass CK6d und CK8 aus Membranfraktionen präzipitiert wurden, was für eine ungewöhnliche Lokalisation dieser ansonsten zytoplasmatischen Proteine spricht. Um diese ektopische Lokalisation zu verifizieren, wurden im Folgenden Durchflusszytometrie-Experimente mit Immunfärbungen durchgeführt.

CK8 Oberflächenlokalisierung in Zelllinien

Die Oberflächenexpression der Zytokeratine wurde beispielhaft an CK8 und zunächst an der Zelllinie GHD überprüft, da CK8 mit dem Proteinlysate dieser Zelllinie reproduzierbar präzipitiert wurde (siehe 4.1.2). Nicht-permeabilisierte GHD-Zellen wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen CK8 (1E8) gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Dieser Antikörper erkennt die letzten 12 C-terminalen Aminosäuren von CK8. Die FACS-Analyse ergab eine eindeutige Lokalisation von CK8 an der Zelloberfläche von vitalen, nicht-permeabilisierten Zellen (Abb. 4.10, links), die aber verglichen mit der Menge an zytoplasmatischem CK8 geringer war (Abb. 4.10, mitte). Die Färbung nicht-permeabilisierter GHD-Zellen mit einem Antikörper (panCK), der außer CK8 noch weitere Zytokeratine (CK2, 5, 6, 8, 10, 11,

14/15, 18, 19) erkennt, ergab eine deutlich stärkere Verschiebung (Abb. 4.10, rechts), was auf eine ektopische Oberflächenexpression weiterer Zytokeratine hinweist.

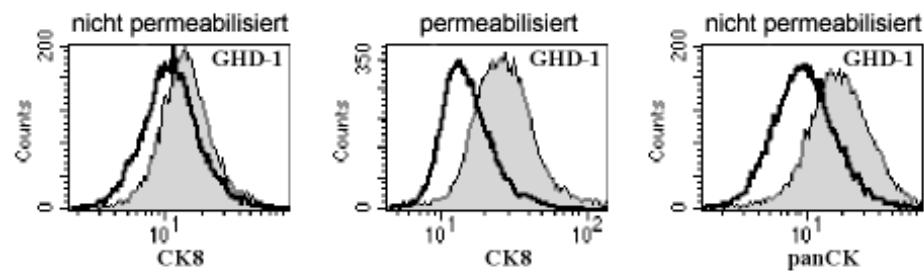


Abb. 4.10: CK8-Lokalisation an der Oberfläche der Zelllinie GHD. Die CK8-Oberflächenexpression wurde an permeabilisierten (mitte) und unbehandelten (links) GHD-Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Die Messung erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper gegen CK8 (1E8) in Kombination mit einem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper. Zusätzlich wurden nicht permeabilisierte GHD-Zellen mit einem panCK Antikörper (CK2, 5, 6, 8, 10, 11, 14/15, 18, 19) gefärbt (rechts). Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten.

Die FACS-Analysen weiterer epithelialen Karzinomzelllinien verschiedenen Ursprungs ergaben in 8 der 12 untersuchten Zelllinien eine CK8-Lokalisation auf der Zelloberfläche (Abb. 4.11). Bei den HRK-Zelllinien PCI-1, PCI-13, ANT-1, FaDu und der Kolonkarzinomzelllinie HCT8 war eine starke Expression von CK8 an der Plasmamembran nachweisbar, wobei die Hypopharynxzelllinie FaDu die stärkste Expression zeigte. Ebenso wiesen die Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und SKBr3 und die Zervixkarzinomzelllinie HeLa eine aberrante CK8-Lokalisation auf. Die Zelllinien HLAC78, HLAC79, 22A (alle HRK) und HEK-293 (Adenovirus transformierte humane embryonale Nierenfibroblasten) waren negativ. Um die FACS-Daten zu bestätigen, wurden Zytospins unbehandelter FaDu-Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen CK8 und EpCAM doppelgefärbt. EpCAM ist ein Oberflächenprotein, welches in vielen Plattenepithelkarzinomen stark überexprimiert ist. Immunfluoreszenzfärbungen an nicht-permeabilisierten Zellen zeigten ebenfalls, dass sich CK8, wie EpCAM an der Plasmamembran befindet (Abb. 4.12).

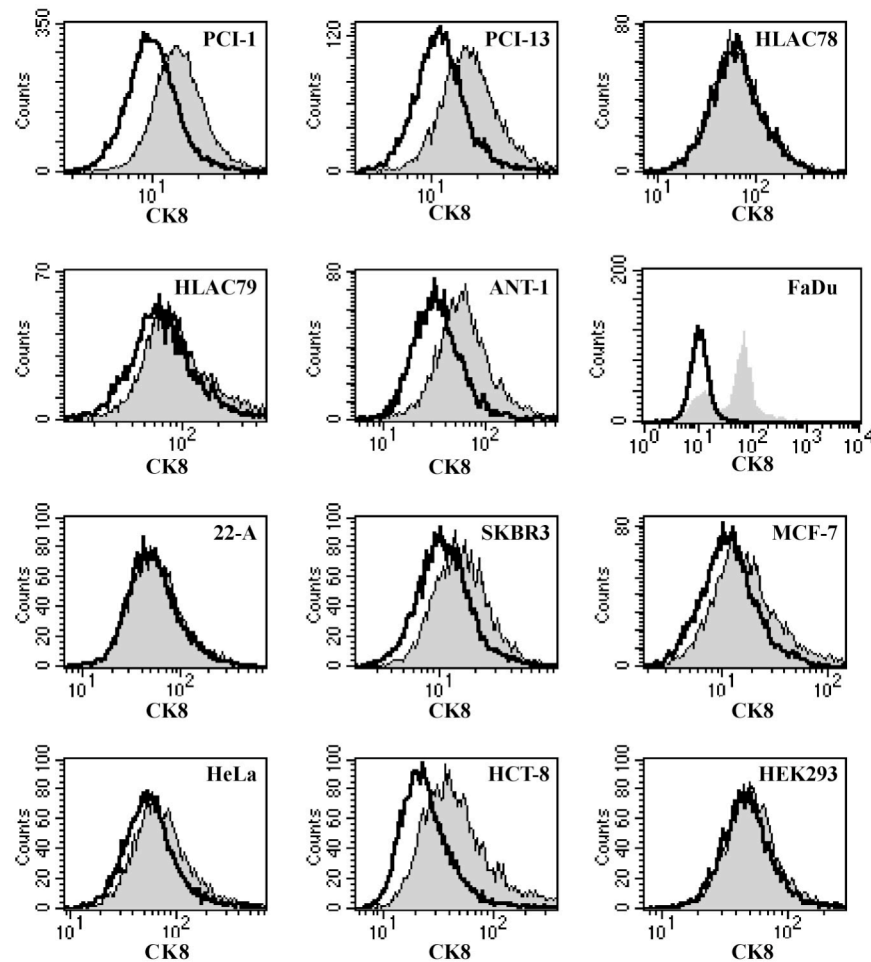


Abb. 4.11: CK8-Oberflächenexpression auf Zelllinien verschiedenen Ursprungs. Acht (PCI-1, PCI-13, ANT-1, FaDu, SkBr3, MCF-7, HeLa, HCT-8) der zwölf getesteten, nicht-permeabilisierten Zelllinien zeigten eine aberrante Lokalisation von CK8 an der Zelloberfläche. FaDu zeigte die stärkste Expression. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten. HRK: PCI-1, PCI-13, ANT-1, FaDu, 22A, HLAC-78, HLAC-79; Kolonkarzinom: HCT-8; Mammakarzinom: SkBr3, MCF-7; Zervixkarzinom: HeLa.

Hierbei ergab die CK8-Färbung in permeabilisierten Zellen ein erwartetes dreidimensionales Netz von dünnen Fäden im Zytoplasma (Abb. 4.12). Um sicher zu gehen, dass es sich bei der Oberflächenfärbung von CK8 nicht um ein Artefakt, hervorgerufen durch eine teilweise durchlässige Zytoplasmamembran handelt wurden zusätzlich FaDu-Zellen mit PFA-SE (Paraformaldehyd, Sukrose und Glykol-bis-succinimidylsuccinat (EGS)) behandelt, um die Plasmamembran zu versiegeln. EGS, ein Crosslinkreagenz, reagiert mit primären Aminosäuregruppen und mit der ϵ -Aminogruppe von Lysin. Außerdem wurde Sukrose zugefügt, eine Beschädigung der Zellen zu verhindern. Nach der Behandlung wurden die Zellen mit dem CK8-spezifischen Antikörper gefärbt und im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert.

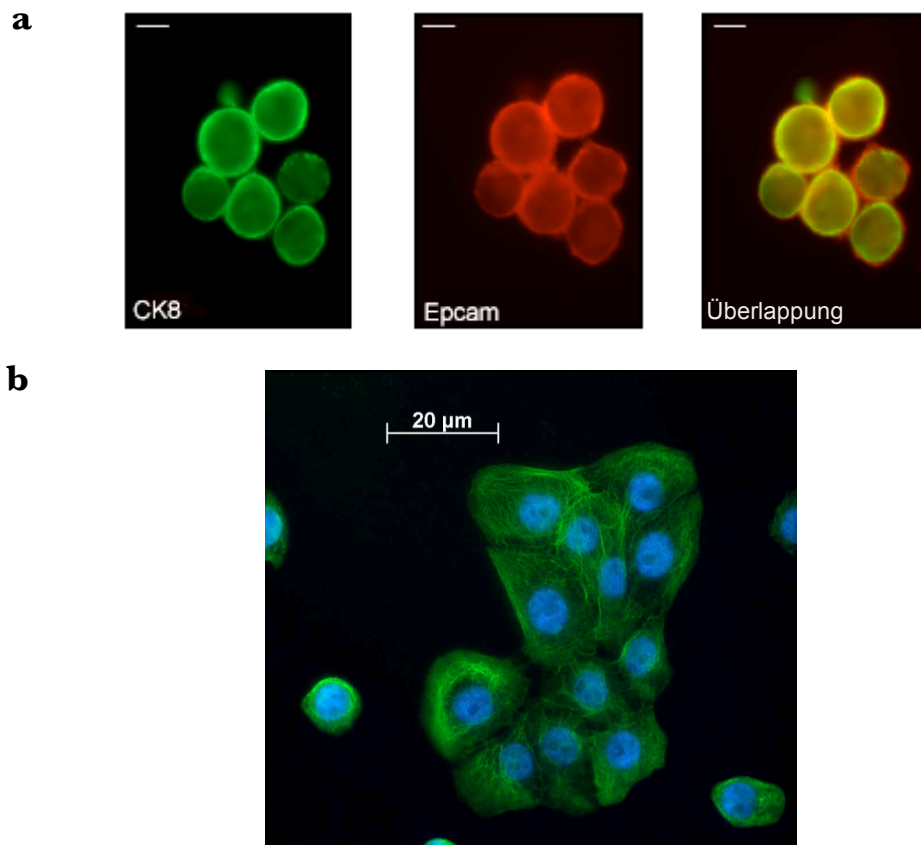


Abb. 4.12: Ko-Lokalisation von CK8 und EpCAM an der Zelloberfläche. (a) Zytospins von nicht-permeabilisierten FaDu-Zellen wurden mit einem CK8-spezifischen Antikörper und einem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper (links) bzw. mit einem Antikörper gegen EpCAM in Kombination mit einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper (mitte) doppelgefärbt. Balken: 10 µm. (b) Adhärente, permeabilisierte FaDu-Zellen wurden mit einem CK8-spezifischen Antikörper und einem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten.

Als Kontrolle wurde Aktin in FaDu-Zellen, die mit PFA-SE behandelt bzw. permeabilisiert waren, gefärbt. Vertikale und horizontale Schnittebenen im konfokalen Mikroskops zeigten für CK8 das charakteristische Muster einer Membranlokalisation (Abb. 4.13a, oben). Das Zytoplasma blieb ausgespart und die Plasmamembran wurde stark gefärbt. Nach der PFA-SE Behandlung der Zellen konnte Aktin nicht detektiert werden (Abb. 4.13a, unteres Bild), obschon es in permeabilisierten Zellen vorhanden und auf zytoplasmatische und perinukleäre Regionen beschränkt war (Abb. 4.13b). Dies betätigte das effiziente Versiegeln der Zellmembran für Antikörper mit PFA-SE.

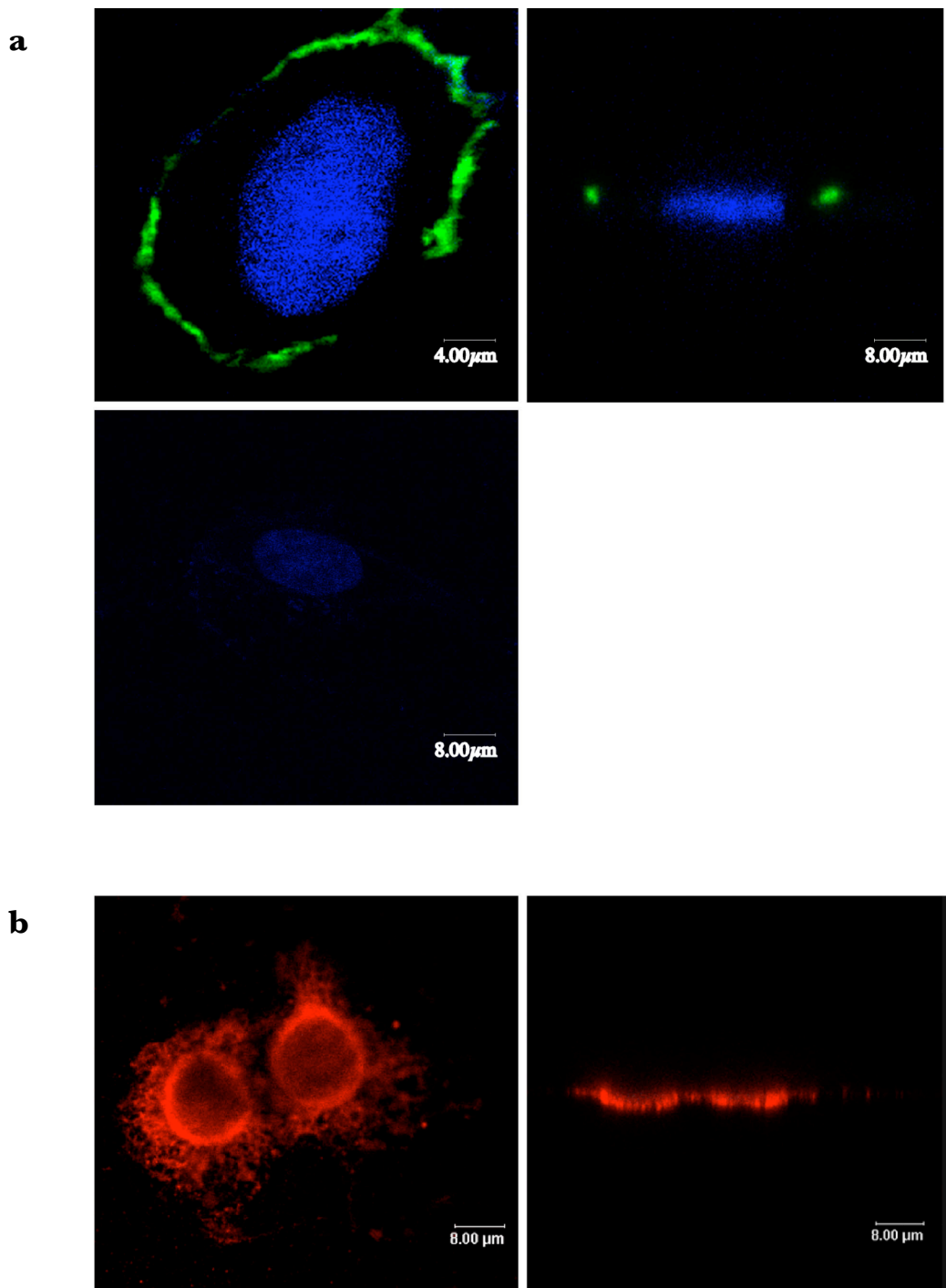


Abb. 4.13: CK8- und Aktin-Expression in FaDu-Zellen. (a) FaDu-Zellen wurden in Chamberslides kultiviert und mit PFA-SE behandelt, um die Plasmamembran zu versiegeln. CK8 bzw. Aktin wurden mit spezifischen Antikörpern in Kombination mit Cy-2 (grün) bzw. Streptavidin Alexa Fluor 594 (rot) konjugiertem Sekundäntikörper detektiert. Die CK8-Färbung ist in den oberen Bildern, die Aktinfärbung im unteren Bild dargestellt. (b) Die Aktinexpression wurde in permeabilisierten FaDu-Zellen mit den unter (a) beschriebenen Antikörpern detektiert. Die Fluoreszenz wurde in einem konfokalem Laser-Scanning Mikroskop in der horizontalen (links) bzw. vertikalen (rechts) Ansicht aufgenommen. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten.

CK8 Oberflächenlokalisierung in primären Karzinomen

CK8 lokalisierte auf der Plasmamembran von Karzinomzellen. Um zu testen, ob dies auch für primäre Karzinomzellen zutrifft, wurde die CK8-Lokalisation im Folgenden auf primären HRK-Zellen untersucht. Dazu wurden FACS-Analysen an nicht-permeabilisierten Einzelzellsuspensionen frisch isolierter Tumorbiopsien (n=9) durchgeführt (Abb. 4.14). Hierbei diente EpCAM als Marker für Tumorzellen, wobei tote Zellen mittels Propidiumiodidfärbung (PI) ausgeschlossen wurden (Abb. 4.14a).

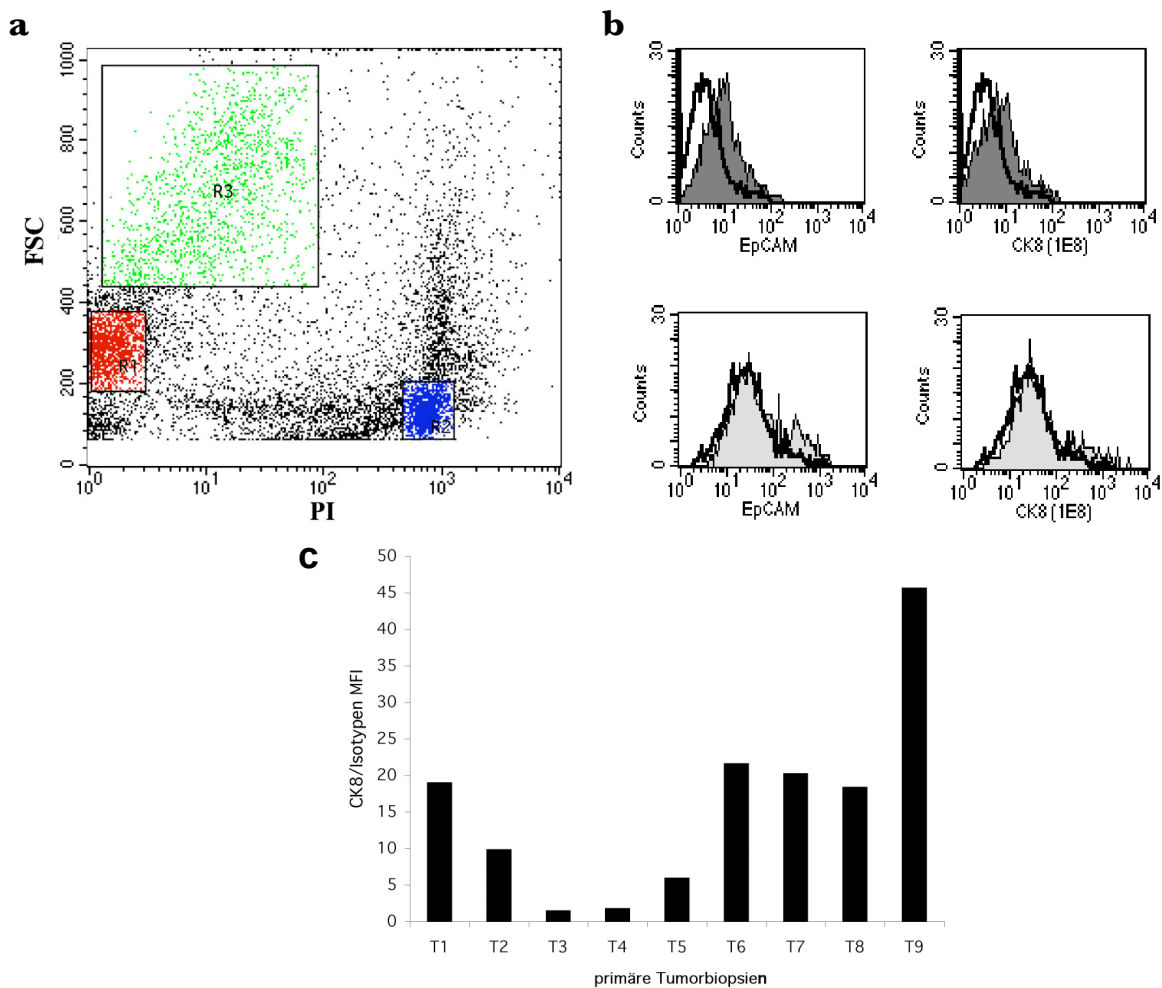


Abb. 4.14: CK8-Lokalisation auf primären HRK-Zellen. Zellen primärer HRK-Biopsien wurden vereinzelt und mit CK8- bzw. EpCAM-spezifischen Antikörpern in Kombination mit FITC- bzw. PE-gekoppelten Zweitantikörpern gefärbt (a). Subpopulationen von Zellen wurden definiert: vitale EpCAM⁺-Karzinomzellen (R1, rot), PI⁺ tote Zellen (R2, blau), große EpCAM⁻ und PI⁻ Zellen (R3, grün). PI-negative und EpCAM-positive Karzinomzellen exprimieren CK8 an der Oberfläche (b, oben). Große, EpCAM-negative, tumorinfiltrierende Zellen zeigten keine ektopische CK8-Expression (b, unten). (c) Gezeigt sind CK8-Fluoreszenzintensitäten von neun primären HRKs. Alle Werte wurden auf die Fluoreszenzintensitäten der entsprechenden Kontrollen normalisiert (CK8/Isotypen MFI). a und b sind Histogramme bzw. Dotplots der Tumorbiopsie Nr. 4.

Alle untersuchten Tumorproben zeigten eine CK8-Lokalisation an der Zellmembran (Abb. 4.14d). Große, tumorinfiltrierende Zellen, die durch ihre negative EpCAM-Färbung und ihre typische Morphologie (SSC >400) definiert wurden, zeigten keine CK8-Oberflächenlokalisierung (Abb. 4.14c). In Abb. 4.14a, b und c sind die Ergebnisse der Durchflusszytometeranalysen der Tumorbiopsie 4 (Abb. 4.14d) dargestellt.

4.1.3.4 Überexpression von AAA-TOB3 bzw. KIAA1273 in Plattenepithelkarzinomen

Das Hauptziel der AMIDA-Technologie war die Identifizierung neuer Tumorantigene. Insgesamt konnten 17 neue potenzielle Tumorantigene isoliert werden, wobei sechs dieser Proteine in der Literatur bis *dato* keine eindeutige Funktion zugewiesen wurde. Unter diesen AMIDA-Antigenen schien das hypothetische Protein KIAA 1273 für eine nähere Untersuchung besonders interessant, da es nach ersten Hinweisen (zu finden unter: <http://www.kazusa.or.jp/huge/gfpage/KIAA1273/>) nur in wenigen Geweben, darunter Hirn, Testis, Ovar, und in Leber vermehrt exprimiert wird.

Identifikation von AAA-TOB3

In der Mascot-Datenbanksuche wurde das hypothetische Protein KIAA1273 mit sechs übereinstimmenden Peptiden identifiziert (Abb. 4.4; Seite 51). Alle Ergebnisse der Datenbanksuche mit Scores größer als 70 stellten sich als C-terminale Proteinfragmente von KIAA1273 heraus. Diese sechs Peptide befinden sich alle im C-terminalen Bereich des Proteins und konnten zum Zeitpunkt der Identifikation nur der Sequenz von KIAA1273 zugewiesen werden. Sequenzvergleiche mit neueren Datenbankeinträgen lieferten jedoch noch ein weiteres Protein, dem ebenfalls genau diese Peptide zugeordnet werden konnten. Hierbei handelt es sich um AAA-TOB3 (AAA: *ATPase associated with various cellular activities*), dessen zelluläre Funktion noch unbekannt ist und ebenfalls bislang nicht mit Tumoren assoziiert wurde. Beide Proteinsequenzen sind über einen weiten Bereich (554 Aminosäuren) völlig identisch und unterschieden sich nur in ihren N-terminalen Regionen (Abb. 4.15a). AAA-TOB3 und KIAA1273 besitzen in ihrem gemeinsamen C-Terminus neben einer AAA-ATPase-Domäne und einer Nukleotidbindestelle, eine potenzielle Transmembrandomäne. Verschiedene Suchprogramme (PSORT, HMM-TOP) ergaben für

KIAA1273 noch eine weitere potenzielle Transmembrandomäne am Beginn des N-Terminus (Abb. 4.15b).

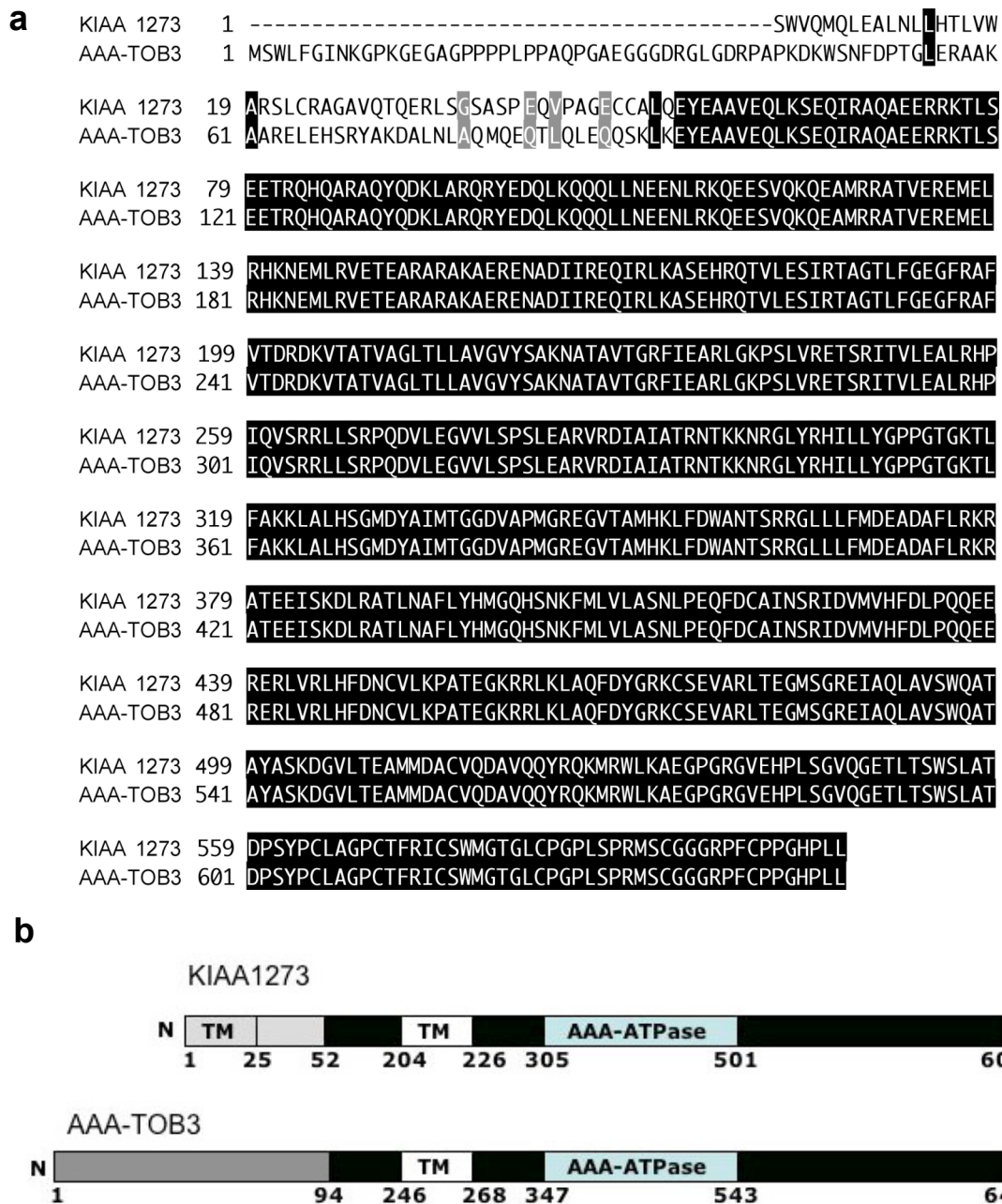


Abb. 4.15: (a) Vergleich der Aminosäuresequenzen von AAA-TOB3 und KIAA1273. (b) Domänen der Proteine AAA-TOB3 und KIAA1273. Die identischen AmS sind schwarz, die differentiellen AmS grau dargestellt. Die Aminosäurepositionen sind mit Zahlen angegeben. TM: Transmembrandomäne; AAA-ATPase: *ATPase associated with various cellular activities*

Expression von AAA-TOB3 und KIAA1273 in Plattenepithelkarzinomen

Die Grundlage für die hypothetische Aminosäuresequenz von KIAA1273 ist nur ein EST-Klon (*expressed sequence tag*, BC009938), außerdem war die Existenz von KIAA1273 bis *dato* nicht verifiziert worden. Daher war nicht klar, ob KIAA1273 tatsäch-

lich in Zellen existiert und ob beide Proteine in Karzinomen exprimiert werden. Deshalb wurden RT-PCR-Experimente an primären Plattenepithelkarzinomen und -zelllinien verschiedenen Ursprungs mit spezifischen Primern für den jeweiligen 5'-Bereich durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass sowohl KIAA1273 als auch AAA-TOB3 in allen getesteten HRK-Zelllinien, der Zervixkarzinomzelllinie HeLa und in primären Karzinomen der oberen Atemwege vorkommen (Abb. 4.16a und b).

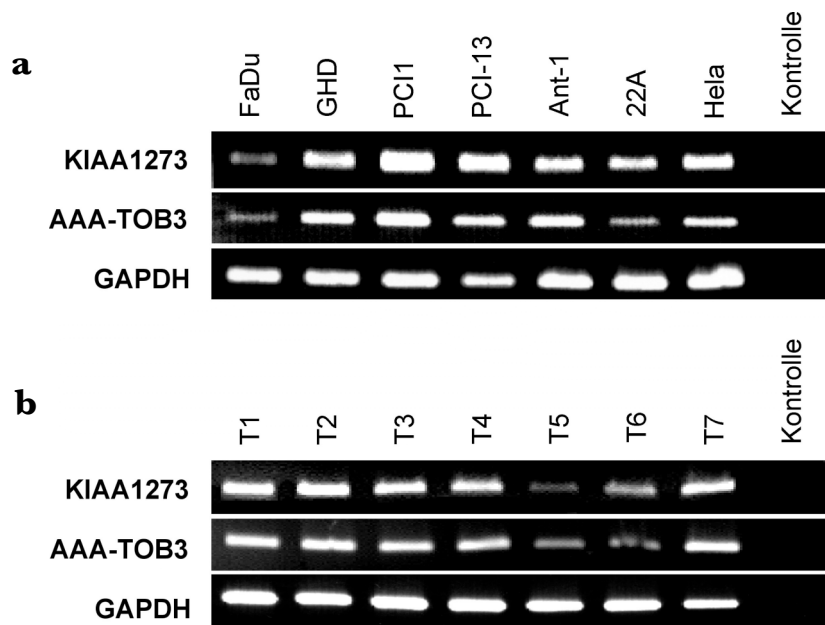


Abb. 4.16: KIAA1273- und AAA-TOB3-Expression in Zelllinien und primären Karzinomen. Die Gesamt-RNA wurde aus Karzinomzelllinien (a) bzw. Primärkarzinomen (b) isoliert und in einer RT-PCR auf die Expression von KIAA1273 und AAA-TOB3-Transkripte untersucht. Kontrolle: H₂O-Negativ-kontrolle.

Des Weiteren wurden zur Validierung des Expressionsprofils beider Transkripte in Neoplasien und gesundem Rachenepithel *in situ* Hybridisierungsexperimente (ISH) durchgeführt, da bis *dato* für keines der beiden Proteine Antikörper käuflich zu erwerben waren. Zudem stellten sich polyklonale Antikörperseren, die im Zuge dieser Arbeit hergestellt wurden (siehe S. 85), als ungeeignet für immunhistochemische Analysen heraus. Für die ISH wurden Gefrierschnitte verschiedener Tumorbiopsien (n=5) von Patienten mit Hypopharynx- bzw. Oropharynxkarzinomen und als Kontrolle insgesamt fünf Gewebeproben von gesunder Rachenschleimhaut untersucht. Die hierbei verwendete RNA-Sonde war gegen den gemeinsamen Bereich von KIAA1273 und AAA-TOB3 gerichtet und konnte daher beide Isoformen gleichzeitig erkennen. Es zeigte sich, dass 80% der untersuchten HR-Karzinome (n=5) im

Vergleich zu Epithelzellen der gesunden Rachenschleimhaut erhöhte Mengen an KIAA1273/AAA-TOB3-Transkripten aufwiesen (Abb. 4.17 und Tabelle 4.2).

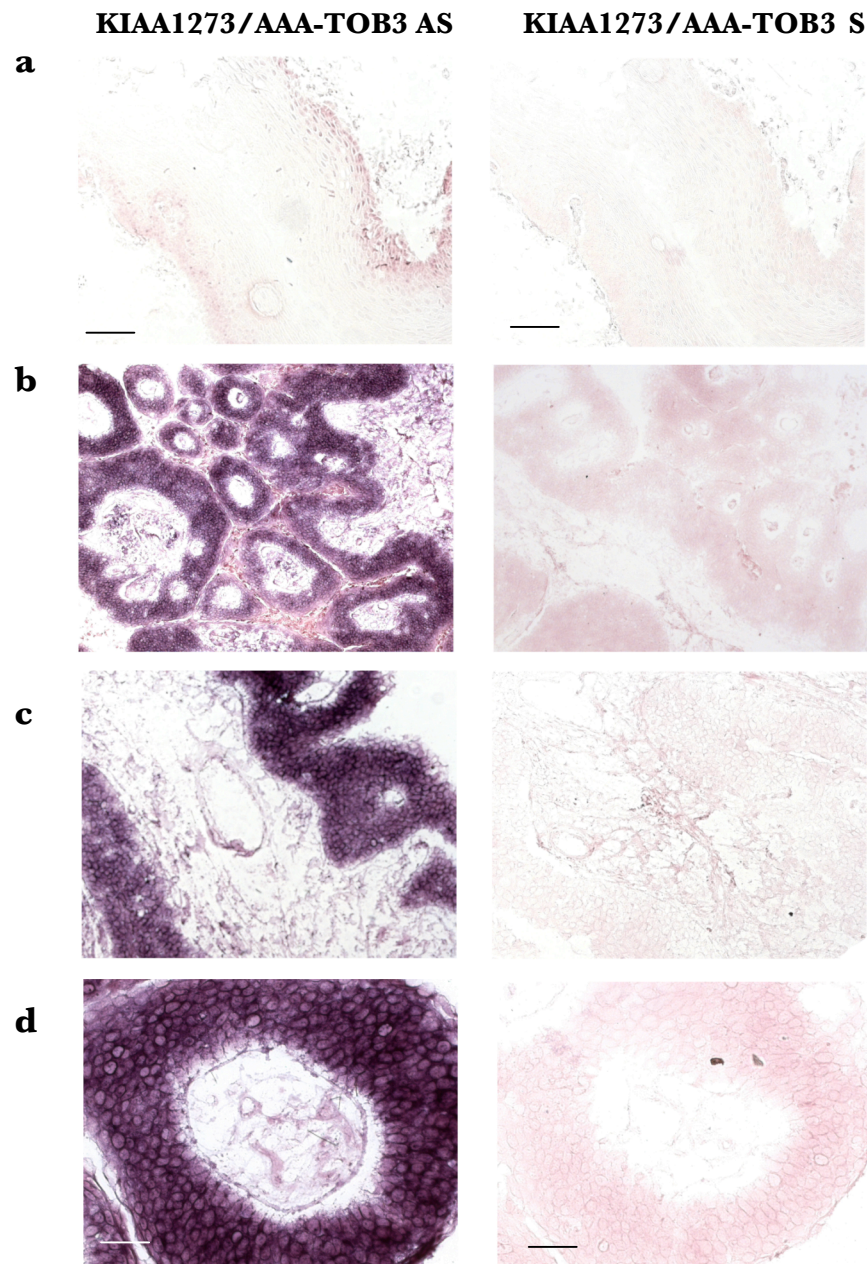


Abb. 4.17: Expressionsmuster von AAA-TOB3- und KIAA1273-Transkripten in gesundem Rachenepithel und primären HR-Karzinomen. Gefrierschnitte von gesundem Rachenepithel (a) und Karzinombiopsien (b-d) wurden mit einer Antisense-Sonde, die spezifisch für die gemeinsame Nukleotidsequenz ist (AAA-TOB3 AS), und einer entsprechenden Sense-Sonde (AAA-TOB3 S) analysiert. Die AAA-TOB3 AS Sonde führte beim gesunden Epithel nur zu einer schwachen Färbung in der Basalzellschicht. Die Biopsien der primären Karzinome wiesen hingegen eine sehr starke und spezifische Färbung auf (linke Reihe). Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten. Die Kontrollsonde AAA-TOB3 S ergab nur eine Hintergrundfärbung (rechte Reihe). Balken: a-c 40 μm ; d 80 μm .

Vier der fünf getesteten Biopsien ergaben eine eindeutige Überexpression von KIAA1273 bzw. AAA-TOB3 in den Tumorzellen, wobei sich drei Proben als stark positiv herausstellten. Alle fünf gesunden Kontrollbiopsien (gesundes Rachenepithel) färbten sich hingegen nur schwach an (Tabelle 4.2). Interessanterweise war die Expression in gesundem Epithel ausschließlich in Zellen der Basalzellschicht zu erkennen. In allen stärker differenzierten Epithelschichten konnte keine KIAA1273- bzw. AAA-TOB3-Expression nachgewiesen werden (Abb. 4.17). *In situ* Experimente mit verschiedenen spezifischen Sonden für KIAA1273 bzw. AAA-TOB3 ergaben hohe Hintergrundsignale und waren daher nicht auswertbar. Eine eindeutige Differenzierung zwischen beiden Transkripten war somit nicht möglich.

Tabelle 4.2: AAA-TOB3- und KIAA1273-Expression in primären HRKs und gesundem Rachenepithel.

Gewebe	Färbeintensität		
	+	++	+++
Primäre HR-Karzinome	1/5 (20%)	1/5 (20%)	3/5 (60%)
Gesundes rachenepithel	5/5 (100%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)

Expression: keine (0); schwach (+); moderat (++); stark (+++).

4.2 Charakterisierung von AAA-TOB3 und KIAA1273

4.2.1 Der Genlokus ATAD3B

Das *aaa-tob3*-Gen lokalisiert auf dem humanen Chromosom 1 (1p36.33; www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/LocusLink/) und wurde kürzlich in *atad3b*, ATPase Familie AAA Domäne enthaltendes Protein **3B**, umbenannt. Wie in Abb. 4.18a dargestellt, wird AAA-TOB3 von 16 Exons kodiert. Interessanterweise wird hier KIAA1273 als Synonym für AAA-TOB3 aufgeführt, obwohl laut Mascot-Search-Datenbank beide Proteine unterschiedliche N-Termini besitzen. Zur Einfachheit werden jedoch weiterhin die alten Bezeichnungen, AAA-TOB3 und KIAA1273, verwendet.

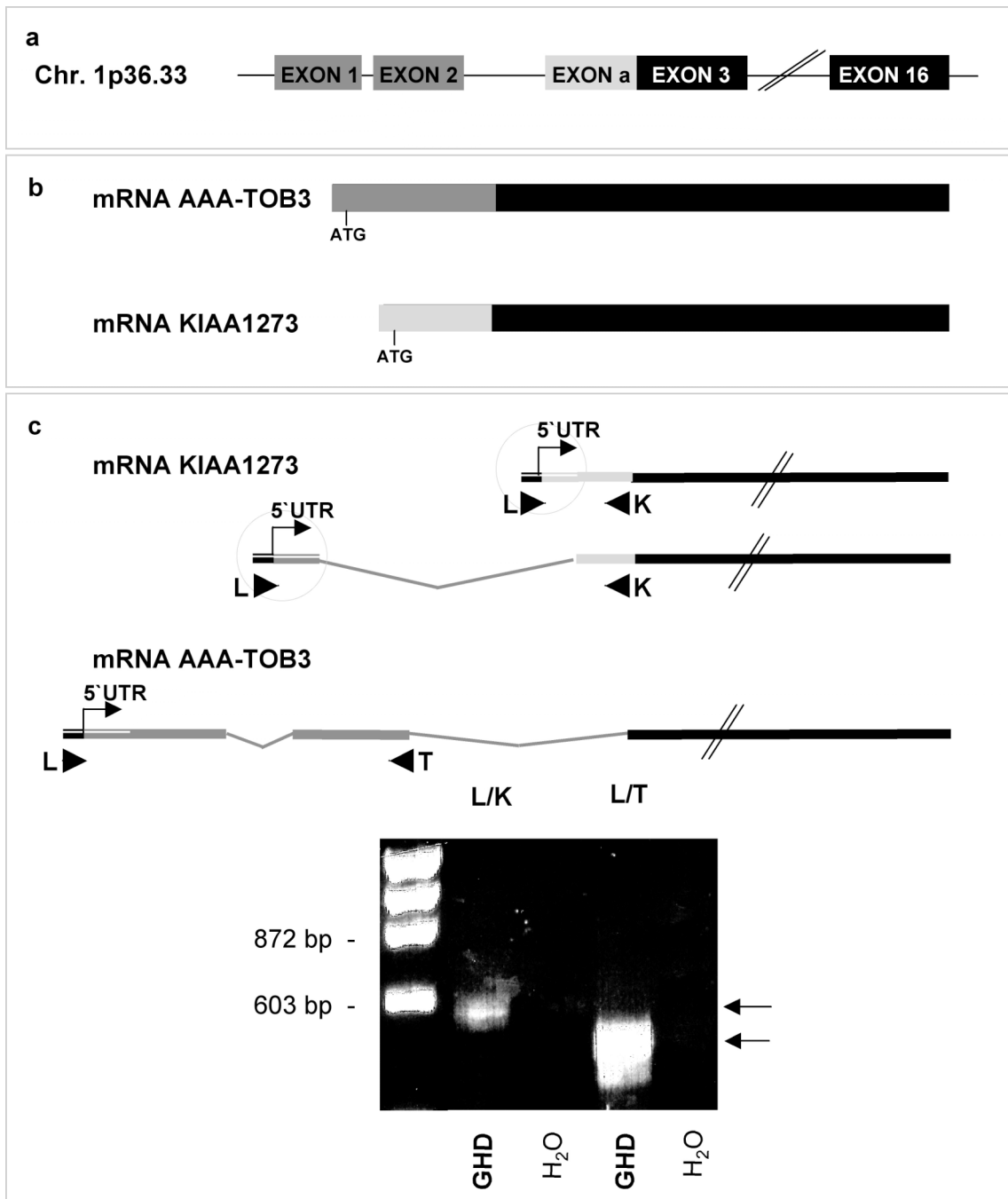


Abb. 4.18: Struktur des Genlokus ATAD3B. (a) AAA-TOB3 wird von 16 Exons kodiert (Exon 1-16). Die 5'-Verlängerung von Exon3 (EXONa) ergibt die mRNA von KIAA1273 (b). Die mRNA von KIAA1273 kann durch einen eigenen Transkriptionsstart oder durch alternatives Spleißen gebildet werden (c, oben). Mit Primern gegen den Linker (L) und genspezifischen Primern (K und T) wurden die 5'-UTRs von KIAA1273 (L/K) und AAA-TOB3 (L/T) mittels RT-PCR amplifiziert (c, unten).

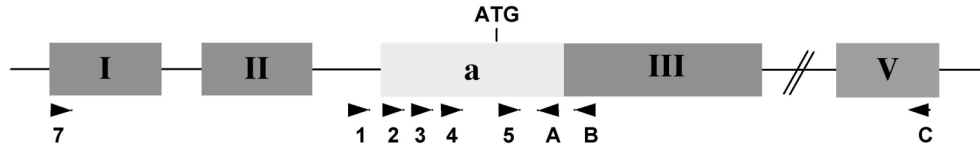
Durch Sequenzvergleich des EST-Klons für KIAA1273 (BC009938) mit dem kompletten humanen Genom, konnte folgende Anordnung gefunden werden: Die für den KIAA1273 spezifischen N-Terminus kodierende Sequenz (Exon a) befindet sich im Intron 2 des *aaa-tob3* Gens und geht als offenes Leseraster in das Exon 3 von *aaa-tob3* über (Abb. 4.18a und b). Dieses 5'-verlängerte Exon würde mit restlichen Exons von AAA-TOB3 ein 68 kDa Protein ergeben, das der theoretischen Größe von KIAA1273 entspricht (Abb. 4.18b). Daher wurde im Folgenden überprüft, ob dieses Transkript durch alternatives Spleißen oder durch die Verwendung eines alternativen Transkriptionsstarts gebildet wird.

5'-RACE

Unter Verwendung einer erweiterten 5'-RACE-Technik wurden 5'-RACE-Experimente durchgeführt, welche die Klonierung einer 5'-Vollängen cDNA-Bank ermöglichen. RNAs, die eine 5'-Methylguanosin-Kappe besitzen und somit vollständig sind, werden selektiv mit einem Linker versehen. Die Amplifizierung und Sequenzierung der 5'-UTR (untranslatierte Regionen) gibt Aufschluss über den Transkriptionsstart (Abb. 4.18c).

Die Amplifizierung des 5'-Endes der KIAA1273-mRNA mit Hilfe eines Primers, der in der kodierenden Sequenz des alternativen Exons bindet (K), und einem linker-spezifischen Primers (L), lieferte ein PCR-Amplifikat von ca. 600 bp (Abb. 4.18c). Die Kontroll-RT-PCR mit einem Primer, der im Exon 2 von *aaa-tob3* bindet (T), ergab ein Amplifikat von ca. 500 bp (Abb. 18c). Beide Banden wurden aus dem Agarosegel isoliert, kloniert und sequenziert. Für KIAA1273 wurden insgesamt fünf Klone sequenziert, die zwei unterschiedliche Transkriptionsstarts (TSS) lieferten. Vier cDNA-Klone lieferten einen TSS, der 316 ± 1 bp aufwärts des Translationsstarts lokalisiert ist. Ein Klon ergab einen TSS, der sich noch weitere 53 bp aufwärts befindet (Abb. 4.19a). Alle identifizierten TSS sind in Abb. 4.19a mit einem Stern gekennzeichnet. Die Sequenzierung der AAA-TOB3-Klone aus der Kontroll-RT-PCR (K/T) führte zur Identifikation von drei TSS. Diese befinden sich 66 bp, 93 bp und 124 bp stromaufwärts des Translationsstarts von AAA-TOB3 (Abb. 4.20a).

a



KIAA1273

```

...TTTTATTTTGAGACAGAGTGTCACTCTGTCCCCCAGTCTGGCGTGCAATGGTTTGATCTCGGCTCACTGC
                1                                ▼
AACCTCCACCTCCCGGTTC AACCTCCTGCCTCAGCCTTCGAGCAGCTGGGACTACAGGAGCCCTGCCACCAC
                2                *
ATCTGGCGAATTTTTGTATTTTAGTAGAGAAGGGGGTTCAGCATGTTGTCCAGTTGGTCTTGAACTCTGA
                * * * * *                4
CCTCAGGTGATCCAGCCACTTTGCCTCACAAGTGCTGGGATTATAGGCAAGAGCGATGGCGCCCGGCCCAC
TCAGCAGGATTCTAGAAATGGGCACGAGCTCTGCCCTCATCACTGTCCAAAAGTGAGCACCTGCCTGGAGCTG
CCCAGAAACAGCCTTGTGGGGTGGGGTGGTGTCTGACCTCCCTCCCGGGGGCCTTCGCAGGCTTCTCTGCT
GGTGCTTCTGTGCCTGTGGGTCTGGATTCTCCAGGGCCTGATCCTGGGTGCAGATGCAGCTGGAAGCCCTGA
                                          5
ACCTGCTGCACACACTAGTCTGGGCACGGAGTCTCTGCCGTGCCGGAGCTGTGCAGACACAGGAGCGGCTGTCT
AGGCAGTGCCAGCCCTGAGCAAGTGCCAGCTGGTGAGTGCTGTGCTCTGCAGGAGTATGAGGCCGCCGTGGAG
                                          A
CAGCTCAAGAGCGAGCAGATCCGGGCGCAGGCTGAGGAGAGGAGGAAGACCCTGAGCGAGGAGACCCGGCAGC
                                          B
ACCAGGCCAGGGCCCAGTATCAAGACAAGCTGGC...
    
```

b

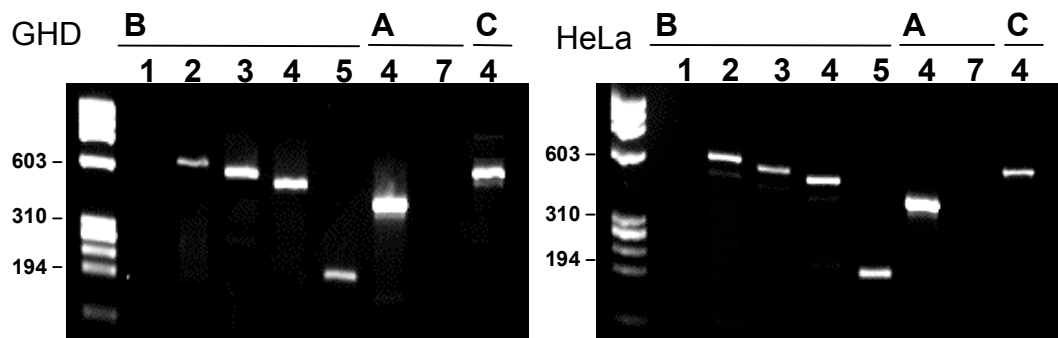


Abb. 4.19: Transkriptionsstarts (TSS) von KIAA1273. (a) Die identifizierten Starts sind mit Sternchen (*) gekennzeichnet und wurden mittels RT-PCR in zwei Karzinomzelllinien bestätigt (b). Der TSS des EST-Klons (BC009938) ist mit einem Pfeil markiert.

Bestätigung der 5'-RACE mittels RT-PCR

Zur Bestätigung der 5'-RACE-Experimente wurden RT-PCRs in zwei Karzinomzelllinien, GHD (Hypopharynx) und HeLa (Zervix), durchgeführt. Um falsch positive Amplifikationsprodukte, hervorgerufen durch Kontaminationen mit genomischer DNA, auszuschließen, wurde die RNA vor der cDNA Synthese mit DNase I behandelt und auf die Abwesenheit von DNA-Verunreinigungen überprüft. Die Bindestellen der verwendeten Primer und die Ergebnisse der RT-PCRs sind in Abb. 4.19b und 4.20b dargestellt. Die Primerpaare 3/B, 4/B und 5/B bzw. 7/B, 8/B und 9/B lieferten PCR-Produkte der erwarteten Größe und bestätigten somit die identifizierten TSSs. Die Primerpaare 6/B und 7/A ergaben erwartungsgemäß kein Produkt. Das Amplifikat des Primerpaares 4/C belegte zusätzlich die Existenz einer KIAA1273-spezifischen mRNA und die Abwesenheit von genomischer DNA. Das Primerpaar 2/B führte überraschenderweise zu einem Amplifikat, das auf einen noch weiter aufwärts liegenden dritten TSS von KIAA1273 schließen lässt. Dieser konnte aber auch durch eine erneute Durchführung der 5'-RACE nicht identifiziert werden. Da das Primerpaar 1/B kein PCR-Produkt ergab, muss dieser Transkriptionsstart im Bereich von - 370 bis - 460 lokalisieren. Der TSS des KIAA1273-EST-Klons (BC009938) ist in Abb. 4.19a mit einem Pfeil gekennzeichnet. Der erste TSS (66 bp) von AAA-TOB3 wird durch zahlreiche EST-Klone bestätigt (Bsp. BC002542) und ist in Abb. 20a mit einem Pfeil gekennzeichnet. Zwei der identifizierten TSS (93 bp, 124 bp) liegen weiter stromaufwärts als alle bisher bekannten EST-Klone und scheinen seltener benutzt zu werden.

Die RT-PCR-Ergebnisse bestätigten dass das Exon 1 nicht an das KIAA1273-spezifische Exon a gespleisst wird, sondern durch einen eigenen Promoter initiiert wird.

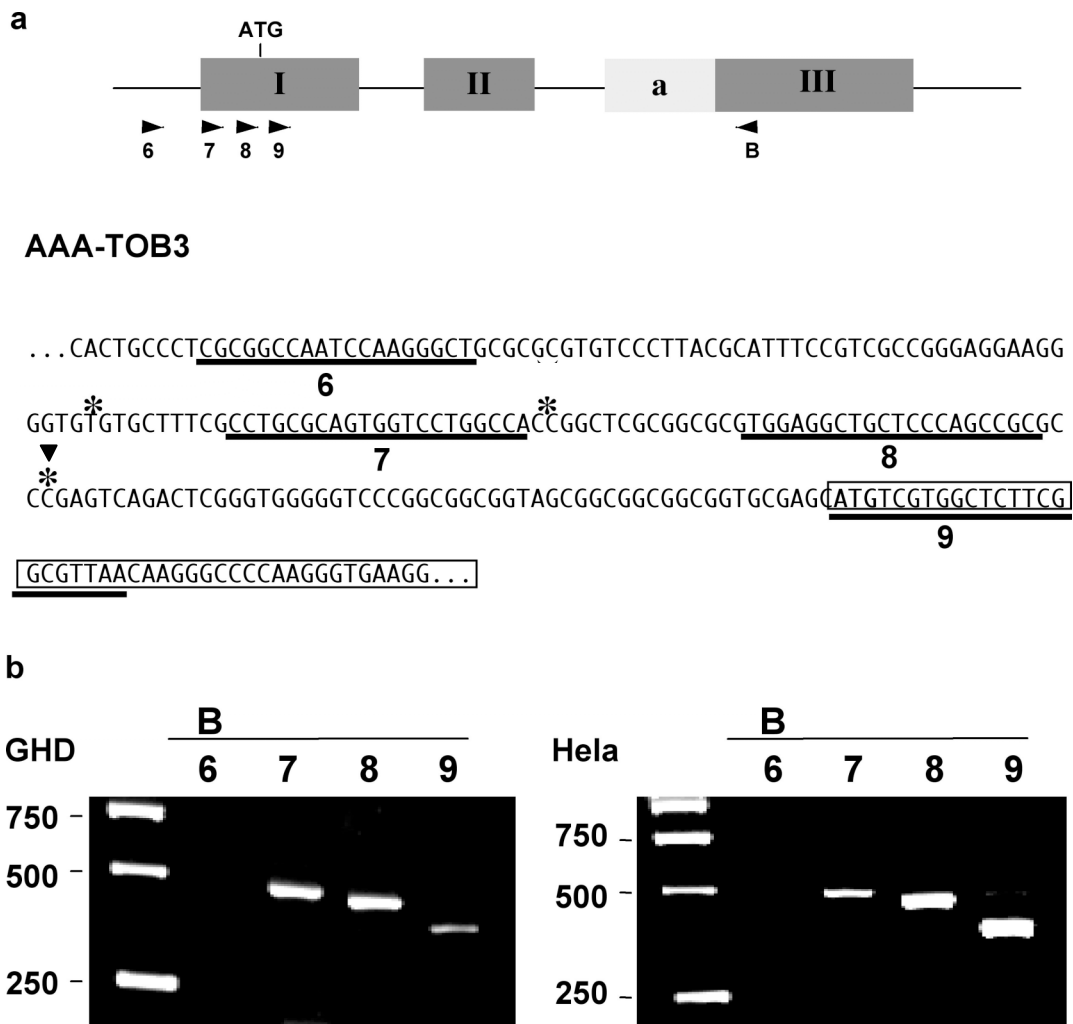


Abb. 4.20: Transkriptionsstarts von AAA-TOB3. (a) Die identifizierten Starts sind mit Sternchen (*) gekennzeichnet und wurden mittels RT-PCR in zwei Karzinomzelllinien bestätigt (b). Der TSS, der durch zahlreiche EST-Klone (z.B. BC002542) bestätigt wird, ist mit einem Pfeil markiert.

4.2.2 Homologe Proteine von AAA-TOB3 und KIAA1273

Homologe Proteine von AAA-TOB3 sind in allen höheren Eukaryonten zu finden (Abb. 4.21), wobei für keines dieser Homologe bisher eine eindeutige Funktion nachgewiesen werden konnte. KIAA1273 besitzt keine entsprechenden Homologen in anderen Spezies und scheint nur in humanen Zellen exprimiert zu werden. KIAA 1273 und alle AAA-TOB3-Homologe verfügen, neben einer potenziellen Transmembrandomäne, jeweils über eine putative AAA-ATPase-Domäne und zwei *coiled-coil* Elemente. Die 200 AmS umspannende AAA-Domäne gehört zu der Walker-Typ P-Loop A/GTPase-Familie und ist durch Walker A und B Motive und einer hoch konservierten Region, *second region of homology* (SRH) genannt, charakterisiert (Abb. 4.21 und 4.22).

homoS.	1	-----MSWLFGVNK-----GPKGEGAGPPPLPPAQPGEAGGGDRGLGD
musM.	1	-----MSWLFGIK-----GPKGEGTGPPLPLPPAQPGEAGGGDRGAGD
Dros.M.	1	-----MSWLGGRNRQPPDQTAGFSEGGGAADPEGRTAGKSGDSQLSR
C.eleg.	1	MSRKICFASNFTKMSWLFGVQKN-----ATPQIPDDFQAGAAPPGGPQQPGQQQR
homoS.	40	RPAPKDKWSNFDPTGLERAACAARELEHSRYAKEALNLAQMGEQTLQLEQQSKLKEYEAA
musM.	39	RPSPKDKWSNFDPTGLERAACAARELEHSRHAKEALSQAQMGEQTLQLEQQSKLKEYEAA
Dros.M.	46	AERKAMEAYRFDSALERAADAAKTLERSKHAREALELSKMQEATROTLEYNTKVKKEYEAH
C.eleg.	52	QEENSKMAYSFDSALERAACAARDLEKFPNAKEALELSRMQEVTRQKEVENETKKIEAQ
coiled coil		
homoS.	100	VEQLKSEQTRAAEERRKTLSEETRQHARAQYQDKLARQRYEDQLKQQRLNEENLRKQ
musM.	99	VEQLKSEQIRVQAEERRKTLTEETRQHARAQYQDKLARQRYEDQLKQQQLNEENLRKQ
Dros.M.	106	TEQAKVEQKRIDHEERRKTLTEETQQQQRAQYQDQLSRKRYEDQLLQQQRVQEENLRKQ
C.eleg.	112	LANKKSEHIRVAEEERRKTLGEETKHAHSRAEYQDQLARKRAEEELAMKARMQEESLRKQ
homoS.	160	EESVQKQEAARRATVEREMELRHKNEMLRVEEARARAKAARENADIIREQIRLKASEHR
musM.	159	EESVQKQEAARRATVEREMELRHKNEMLRVEAEARARAKADRENADIIREQIRLKAAEHR
Dros.M.	166	EESVQRQEAARRQTIETHEEMKEKNRKLLEHEERAKARVDRENRDINLEKIRLKAQEH
C.eleg.	172	EESVKKQEQLRQTIETHEELALKHKYELEKIDAEERARAKAARDNRDVLNLEQMKLHEEENR
TMD		
homoS.	220	QTVLESIRTAGTLFGEFRAFVTDKDKVTATVAGLTLLAVGVYSAKNATAVTGRFIEARL
musM.	219	QTVLESIRTAGTLFGEFRAFVTDWDKVTATVAGLTLLAVGVYSAKNATSVAGRYIEARL
Dros.M.	226	TTVLEGIKTAGTVIGAGAEAMLTDWDKVLTAAGGLSLLALGVYTAGGATVVSRYVEARI
C.eleg.	232	KTVTEKIKTSGELIGSGLNQFLNDKTKIAAAVGGLTALAVGWYIAKRGTVTARYIESRL
homoS.	280	GKPSLVRETSRITVLEALRHPIQVSRRLSRPQDMLLEGVVLSPSLEARVRDIAIATRNTK
musM.	279	GKPSLVRETSRISVLEALRHPIQVSRRLVSRPQDALEGVILSPSLEARVRDIAIATRNTK
Dros.M.	286	GKPTLVGETSRFAFLDALKNPLHYLRRAKPTDALQGVVLPKLEERLRDIAIATKNTK
C.eleg.	292	GKPSLVRETSRITPLEVLRKHPKSVQMMTRQKQDPLNGVVLPPALERRLDIAITTSNTK
WALKER A		
homoS.	340	KNRGLYRHILLYGGPGTGKTLFAKKLALHSGMDYAIMTGGDVAPMGREGVTAMHKFDWA
musM.	339	KNKSLYRNVLMYGPPGTGKTLFAKKLALHSGMDYAIMTGGDVAPMGREGVTAMHKVFDWA
Dros.M.	346	INKGMYRNVLHGGPPGTGKTLFAKKLAHSGMDYAIMTGGDVAPMGREGVTAIHKVFDWS
C.eleg.	352	RNNGLFRNVMFYGGPGTGKTLFAKSLAQHSGDYAVLTGGDTAPLGRDGVSAIHKVFDWA
WALKER B		
homoS.	400	NTSRRGLLLFVDEADAFLRKRATEELSKDLRATLNAFLYHMGQHSNKFMLVLAASNLPEQF
musM.	399	STSRRGLLLFVDEADAFLRKRATEKISEDLRATLNAFLHRTGQHSKFMVLAASNQPEQF
Dros.M.	406	HTSRRGLLLFVDEADAFLRKRSEKISEDLRAALNAFLYRTSEQNPKFMLVLAASNLPEQF
C.eleg.	412	SKSRKGLIVFVDEADAFLOKRSKNGMSEDTRAALNAFLFRTEQSRKFMVLAASNQPEQF
SRH		
homoS.	460	DCAINSRIDVMVHFDLPQEEERERLVRMHFDNCLVKPATEGKR--RLKLAQFDYGRKCSSE
musM.	459	DWAINDRIDEMVCFALPQEEERERLVRMYFDKYVLKPATEGKQ--RLKLAQFDYGRKCSSE
Dros.M.	466	DYAINDRIDEMVEFTLPGEEERERLRLRYFDKYVLPAAAAGAK--RFKLDTFDYGRKCSK
C.eleg.	472	DWAINDRFDQLVEFTLPGMEERERILLQYFNEHIVTPATSGSRSQRLKLDNFDWVAKCNE
coiled coil		
homoS.	518	VARLTEGMSGREIAQLAVSWQATAYASKDGVLTEAMMDACVQDAVQQYRQKMRWLKAEGP
musM.	517	VAQLTEGMSGREIAQLAVAWQAMAYSESDGVLTEAMMDARVQDAVQQHQQKMQWLKVERP
Dros.M.	524	MAALCEGMSGREISKLVSWQAAVYASEDGLLTKMVLDRCYSAQQHKQKMAWLSQIER
C.eleg.	532	VAKKTSGMSGREISKLVGWQASAYASETGVLTEAIVDRNTADAMVQHEHKMEWLEKEQL
homoS.	578	GRGVEHPLSGVQGETLTSWSLATDPSYPCLAGPCTFRICSWMGTLCPGPLSPRMSCGGG
musM.	577	DSQTNKPPHPSLLSC-----
Dros.M.	584	ADPKSITGTAAAPPLTLTAKKL-----
C.eleg.	592	KARNQEVKFGITLTKRETAV-----
homoS.	638	RPF CPPGHPLL
musM.		-----
Dros.M.		-----
C.eleg.		-----

Abb. 4.21: Vergleich der Aminosäuresequenzen homologer Proteine von AAA-TOB3 in höheren Eukaryonten. TMD: Transmembrandomäne; SRH: *second region of homology*.

Die SRH-Region ist spezifisch für die AAA-Domäne und unterscheidet sie von anderen Walker-Typ A/GTPasen. Die Mitglieder der AAA-Familie sind an einer Vielzahl sehr unterschiedlichen zellulären Prozessen, wie Proteolyse (proteosomale ATPasen, Cdc48, FtsH und andere AAA-Proteasen), Membranfusion (Sec18/NSF oder Cdc48/p97), Mikrotubulieabbau (Katanin) und Endosomenbiogenese (Vps4/SKD1) beteiligt. Allen Mitgliedern gemeinsam ist die energieabhängige konformationelle Änderung von Substratproteinen. Die Domänenarchitektur von AAA-Proteinen besteht aus einem sehr variablen N-Terminus als primäre Substratbindestelle und ein oder zwei AAA-Domänen. Verschiedene Vertreter der AAA-Familie besitzen je nach Funktion des Proteins weitere strukturelle Elemente, die N- oder C-terminal von der AAA-Domäne liegen. Die AAA-Familie wird aufgrund ihrer Domänenarchitektur phylogenetisch in fünf Klassen unterteilt: Metalloproteasen, proteosomale ATPasen, „Meiotische“ Proteine und Subklassen mit zwei AAA-Domänen (Lupas und Martin, 2002). KIAA1273 und alle direkten AAA-TOB3-Homologe lassen sich nicht eindeutig einer dieser Subklassen zuordnen. Berücksichtigt man homologe Proteine in verschiedenen Spezies, die funktionell bereits charakterisiert sind, zeigen AAA-TOB3 und KIAA1273 jedoch eine Sequenzähnlichkeit zu zwei Klassen: der FtsH-Familie (*Filamentation temperature sensitive Homologe*) und den 26S regulatorischen Untergruppen (Abb. 4.23). Erstere gehört zu den mitochondrialen Metalloproteasen, die zweite Gruppe zu den proteosomalen ATPasen. Mitglieder der FtsH-Familie besitzen, neben der allgemeinen AAA-Domäne, ein oder zwei Transmembrandomänen und ein Zink-Bindemotiv, C-terminal des AAA-Moduls (Konsensussequenz: HEXGH) gelegen. Die 26S Untereinheit verfügen weder über Transmembrandomänen, noch über eine Proteinaseaktivität.

YME1-L	1	-MFSLSSTVQEFQVTVPLSHLINAFHTPEKNTSVSLSGVSVSQNQHARDVVPEHEAPSSECMF
26S	1	-----
TOB3	1	MSWLFQVNGKEFKGEGAGPPPPLPPAQEFGAEGGGDRGLGDRPAPKDKWSNFDPTGLERAAK
YME1-L	60	SDFLTCLNIVSIGGKGI FEGYRSMFM E PAKRMK KSLDTTDNWHIRPEPFSLSIPPSLNDLR
26S	1	-----MADPRDKALQ
TOB3	61	AARELEHSRYAKEALNLAQMQEQTLLQLEQQSKLKEYEAAVEQLKSEQIRACAEERKRTLS
YME1-L	120	DLGLSEELKIGQIDQLVENLLPGFCKGKNISSHWHTSHVSAQSFFENKYGNLDIFSTLRSS
26S	11	DYRKKLLEFKKIDGRIKELR-----
TOB3	121	ETRQHQRARAYQDKLARQR-----Y
YME1-L	180	CLYRHHSRALQSICSDLYWPFVFOISRGFKTLKSRTFRLOSTSERLAETONLAPSFVKGF
26S	31	-----EQLKELTKQYEKSENDLKALQSVG-----
TOB3	142	EDQLKQQRLLNEENLRKQEEVQKQCEAMRRATVEREMELREKNEMLRVETEAR-ARAKAE
		<u>TMD</u>
YME1-L	240	LLRDRGSDVESLIDKLMKTKNIPBAHQDAFKTGFAGF LKAQALTQKTNDSLRRFRLLIFV
26S	55	-----QIVGEVLKQLTEEFVVKATNGPRYVVGCRRLDKSKLKPQTRVALDMTTLTIMR
TOB3	201	RENADITREQIRLKASEHRQTVLESIRTAGTLFGEGFRAFVTDRDKVTATVAGITLLAVG
YME1-L	300	LLLFGLYGLIKNPFLSVFRFTTGLDSAVDPVQMKNVTEHVKGVVEAKOELQEVVEF-L
26S	110	YLPREVDPVLYN-----MSHEDPGNVSYSEITGGISEQIRELREVIELPL
TOB3	261	VYSAKNATAVTRGFIEARLGKPS-LVRETSRITVLEALRHPTQVSRRLLSRPQVLEIGVV
		<u>WALKER A</u>
YME1-L	359	KNPQKFTILGGKLPKG-----LLLVGPPGTGKTLARAVAGEADVPFYYASGS
26S	154	TNPELFORVGIIPPKG-----CLLYGPPGTGKTLARAVASQLDCNFLKVVSS
TOB3	320	LSPSLEARVRDIATATRNKKNRGLYRHLLLYGPPGTGKTLFAKKLALHSGMDAINTGG
		<u>WALKER B</u>
YME1-L	407	EFDEMFVGVGASRIRNLFREAFANAP-CVIFIDEIDSVGGKRIES--PMHPYSROTINQL
26S	202	SIVDKYIGESARLIREMFNYARDHQE-CIIFMDEIDATGGRRFSEGTSADREIQRITMEL
TOB3	380	DVAPMGR-EGVTAMHKLFDWANTSRRGLLIFMDEADAFLRKRATE--EISKDIRATLNAF
		<u>SRH</u>
YME1-L	464	LAEMDGFKNPNEGVIITIGATNFPALDNALIRPGRFDMQVTVPRPDVKGRTEILKWLNKI
26S	261	LNQMDGFDTLHRVVKMIMATNRPDTLDPALLRPGRLDRKTHIDLPNEQARLDILKTHAGPI
TOB3	437	LYHMG--QHSNKFMLVLANLPEQEDCAIN--SRIDVMVHFDLPQOEERERLVRLHFDNC
YME1-L	524	KFDQSVDPETIARGTVGFSGAELENLVNQAAKAAVVGKEMVTMKELEFSKDKILMGPFR
26S	321	TKHGEIDYEAIVKLSDGFNGADLRNVCTEAGMFAIRADHDFVVQEDFMKAVRKVADS-KK
TOB3	493	VLKPATGKRRKLKAQFDYGRKCEVARLTEGMSGRETAQLAVSWQATAYASKDGVLTEA
		<u>Zn²⁺</u>
YME1-L	584	RSVEIDNKNKITAYHESGHAI IAYYTKDAMPINKATIMPRGPTLGHVSLLPENDRWNET
26S	380	LESKLDYKPV-----
TOB3	553	MMDACVQDAVQQYR-----
YME1-L	644	RAQLLAQMDVSMGGRVAEELIFGTDHITTGASSDFDNAKIAKRMVTKFGMSEKGVMTY
26S		-----
TOB3	567	--QKMRWKAEGPGRGVEHPSEVQGETLTSWSLATDPSYPCLAGPCTFRICSWVGTG--
YME1-L	704	SDTKLSEFETQSAIEQEIRILLRDSYERAKHILKTHAKEHKNLAEALLTYETLDAKEIQI
26S		-----
TOB3	623	LCPCPLSEFRMSCGGRRPFCPPGHPILL-----
YME1-L	764	VLEGKKLEVR
26S		-----
TOB3		-----

Abb. 4.22: Vergleich der Aminosäuresequenzen von humanem AAA-TOB3 mit den entfernt verwandten Proteinen YME1-L (*H.sapiens*) und 26S regulatory Subunit (*H.sapiens*). TMD: Transmembrandomäne; SRH: *second region of homology*.

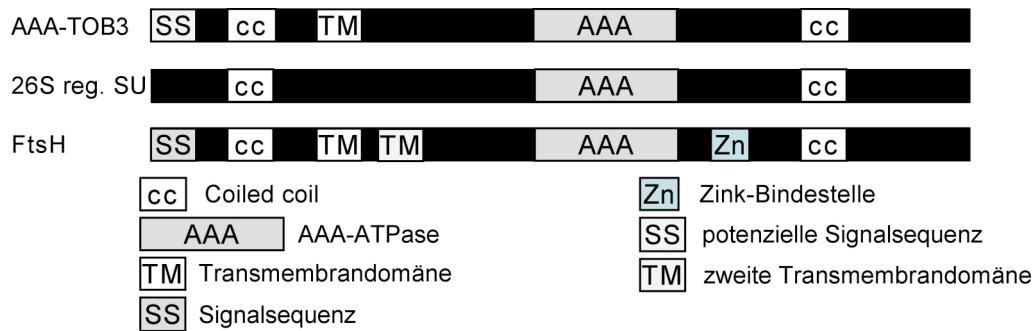


Abb. 4.23: Schematisch dargestellte Domänenarchitektur von AAA-TOB3 im Vergleich zu Vertretern der FtsH-Familie bzw. den 26S regulatorischen Untereinheiten.

4.2.3 c-Myc Regulation von AAA-TOB3 und KIAA1273

Bei der näheren Untersuchung der *atad3b*-Genstruktur fiel auf, dass sich im Intron 1 von AAA-TOB3 eine kanonische E-Box (5'-CACGTG-3') als potenzielle Bindestelle für den protoonkogenen Transkriptionsfaktor c-Myc befindet (Abb. 4.24). Weitere E-Boxen konnten nicht gefunden werden. Es ist bekannt, dass AAA-TOB3 ein c-Myc-Zielgen (Zeller *et al.*, 2003) ist. Deshalb drängte sich die Frage auf, ob KIAA 1273 ebenfalls durch c-Myc reguliert wird.

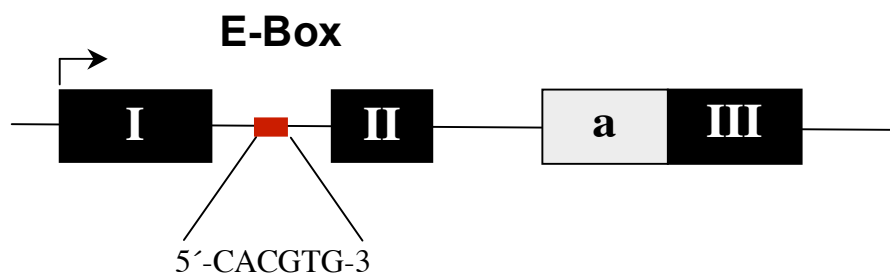


Abb. 4.24: Schematische Lage der kanonischen E-BOX im Intron 1 des *atad3b*-Genlokus.

Die mögliche Regulation von KIAA1273 durch c-Myc wurde in dem Zellsystem P493-6 überprüft. Die Zelllinie P493-6 ist eine Burkitt Lymphom-ähnliche Zelllinie, in der die c-Myc-Expression unter der Kontrolle eines tetrazyklinabhängigen Promoters steht (*tet-off* System; Pajic *et al.*, 2000). C-Myc wird in Abwesenheit von Tetrazyklin im Kulturmedium überexprimiert, in Anwesenheit von Tetrazyklin ist c-Myc reprimiert und nur noch eine minimale endogene Menge von c-Myc vorhanden. P493-6 exprimiert sowohl KIAA1273 als auch AAA-TOB3 (Abb. 4.25), somit konnte der Einfluss der konditionalen c-Myc-Expression auf die Expression von AAA-TOB3 und KIAA1273 untersucht werden. Hierbei wurde zu verschiedenen-

en Zeitpunkten die Gesamt-RNA der Zellen isoliert und die Mengen der c-Myc-, AAA-TOB3- und KIAA1273-Transkripte mittels *real-time* RT-PCR relativ quantifiziert. Alle Werte wurden auf die Anzahl der Transkripte von CD19 normalisiert. CD19 ist ein Marker für B-Zellen, der nicht von c-Myc reguliert wird.

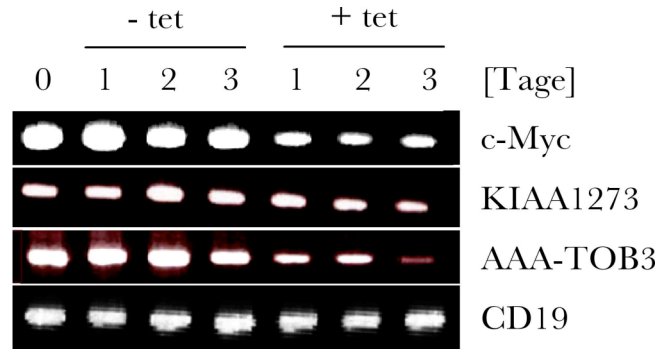


Abb. 4.25: Abhängigkeit der AAA-TOB3- bzw. KIAA1273-Expression von c-Myc. P493-6 Zellen wurden drei Tage in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von Tetrazyklin im Kulturmedium inkubiert und täglich Proben entnommen. Die RT-PCR-Experimente wurden mit spezifischen Primern für c-Myc, KIAA1273, AAA-TOB3 und CD19 durchgeführt.

In Abb. 4.26 sind die Reprimierungs- bzw. Induktionskinetiken der c-Myc-, AAA-TOB3- bzw. KIAA1273-Transkripte dargestellt. Die Messwerte sind über zwei unabhängige Experimente gemittelt. In Anwesenheit von Tetrazyklin wird c-Myc innerhalb von 24 Stunden im Mittel um den Faktor 14 reduziert. AAA-TOB3 und KIAA1273 werden in diesem Zeitraum im Mittel um den Faktor 12 bzw. 8 reprimiert. Auffällig ist, dass sich die Transkriptmengen von KIAA1273 und AAA-TOB3 in gleichem Maße, allerdings im Vergleich zu c-Myc um ca. 2 Stunden versetzt erniedrigen (Abb. 4.26a). Nach insgesamt drei Tagen wurde Tetrazyklin aus dem Kulturmedium entfernt. Dies führte zu einer Induktion von c-Myc um den Faktor 21 innerhalb von 12 Stunden. AAA-TOB3 und KIAA1273 wurden um 1-2 h versetzt induziert, wobei AAA-TOB3 eine um den Faktor 3 stärkere Induktion erfuhr (92-fach) als KIAA1273 (34-fach, Abb. 4.26b).

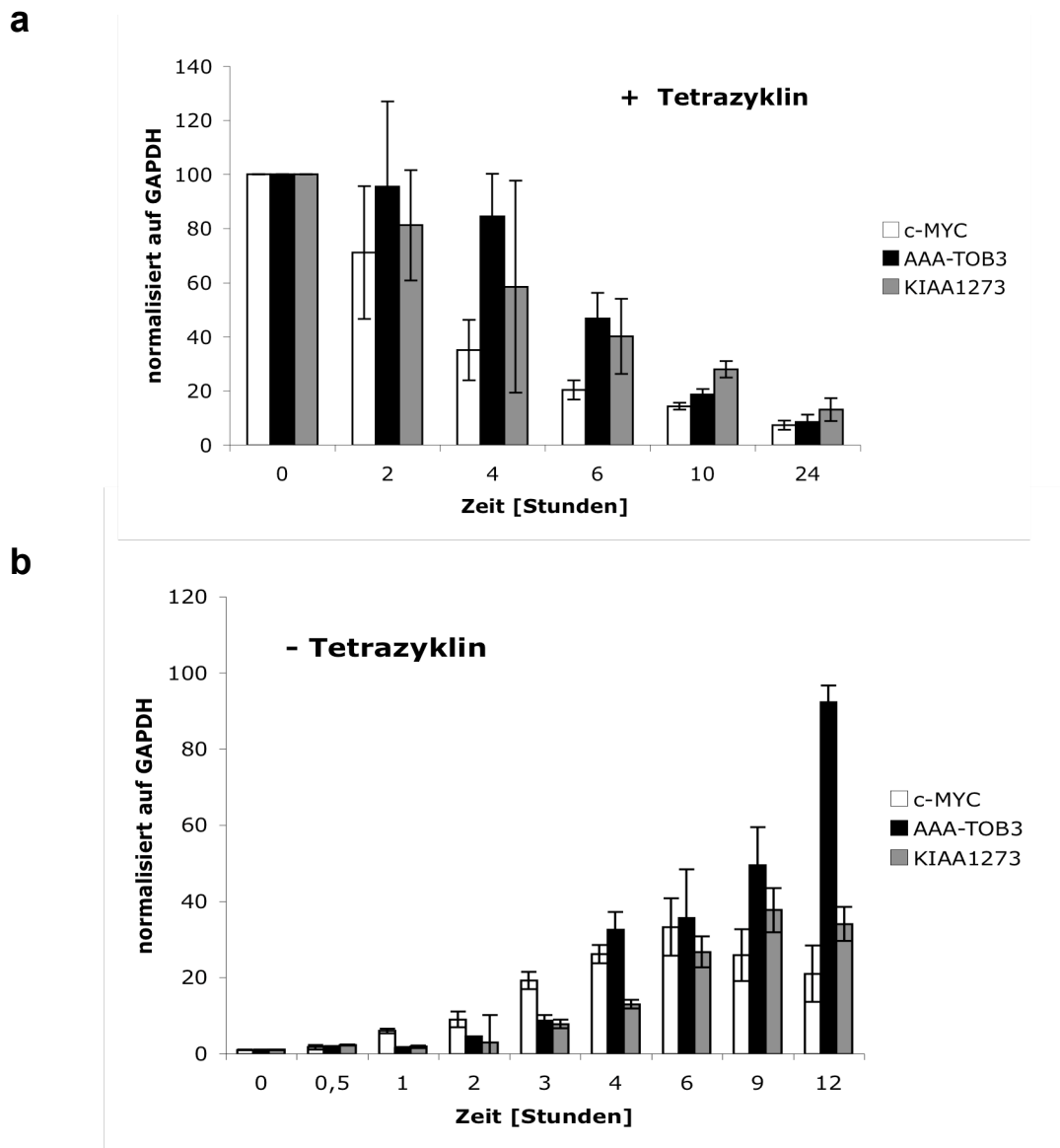


Abb. 4.26: C-Myc abhängige Induktion und Repression von AAA-TOB3 und KIAA1273. Die Expression von c-Myc wurde in der Zelllinie P493-6 durch Zugabe (a) bzw. Entfernen (b) von Tetrazyklin reprimiert bzw. induziert. Die Genexpression von c-Myc, AAA-TOB3 und KIAA1273 wurde mittels *real-time* RT-PCR relativ quantifiziert. Alle Daten wurden auf die CD19-Expression normiert. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Experimenten.

4.2.4 Subzelluläre Lokalisation von AAA-TOB3 und KIAA1273

Die subzelluläre Lokalisation von AAA-TOB3 und KIAA1273 ist bis *dato* in der Literatur nicht eindeutig belegt. Auf einer Homepage der Arbeitsgruppe S. Pillai (2001: unveröffentlichte Daten, zu finden auf <http://mghra.partner.org/narratives/S.Pillai.htm>) wurde beschrieben, dass AAA-TOB3 im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert und möglicherweise bei der Proteinsekretion eine Rolle spielt.

Dreger *et al.* (2001) identifizierte KIAA1273 neben vielen weiteren unbekanntenen Proteinen bei der Auftrennung von Proteinen aus der nukleären Membran mittels 2D-PAGE. Die Kernlokalisierung war in dieser Veröffentlichung allerdings nicht weiter überprüft worden. Da Cruz *et al.* (2003) isolierten das murine Homolog von AAA-TOB3 aus der inneren Mitochondrienmembran von Leberzellen. Suchprogramme zur Identifizierung von Leadersequenzen ergaben allerdings nur für KIAA 1273, nicht aber für AAA-TOB3, eine eindeutige Signalsequenz. Hierbei handelte es sich um ein mitochondriales Signalpeptid, das exakt die Sequenz der zusätzlichen potenziellen Transmembrandomäne am N-Terminus von KIAA1273 umfasst und mit einer potenziellen Schnittstelle zwischen Alanin und Glyzin an Stelle 25/26 der AmS-Sequenz (**CRA-GA**) endet (Abb. 4.15).

Um die subzelluläre Lokalisation der beiden Proteine eindeutig definieren zu können, wurden beide Proteine C-terminal mit YFP fusioniert. Die Produkte wurden unter der Kontrolle des CMV-Promoters in zwei humanen Karzinomzelllinien (HeLa und GHD) und in der murinen Fibroblastenzelllinie NIH3T3 transient exprimiert (Abb. 4.27 und Daten nicht gezeigt). 24 h nach Transfektion wurden die lebenden Zellen im konfokalen Mikroskop analysiert. Die Färbung des ERs mit Texas-Red konjugierten Weizenkeim Agglutinin (TR-WKA) führte weder für AAA-TOB3-YFP noch für KIAA1273-YFP zu einer Überlagerung beider Farbstoffe. Auch die Färbung der Kerne mit Hoechst 33342 zeigte, dass KIAA1273 nicht in der Kernmembran lokalisiert (Abb. 4.27a). Im Gegensatz dazu, konnte eine Lokalisation beider Proteine in Mitochondrien, die mittels MitoTracker-Red gefärbt wurden, nachgewiesen werden (Abb. 4.27b). Als Negativkontrolle wurde nur YFP in allen drei Zelllinien transient exprimiert, was eine homogene Färbung des Zytoplasmas und Zellkerns ergab, wobei die Mitochondrien ausgespart blieben (Abb. 4.27c).

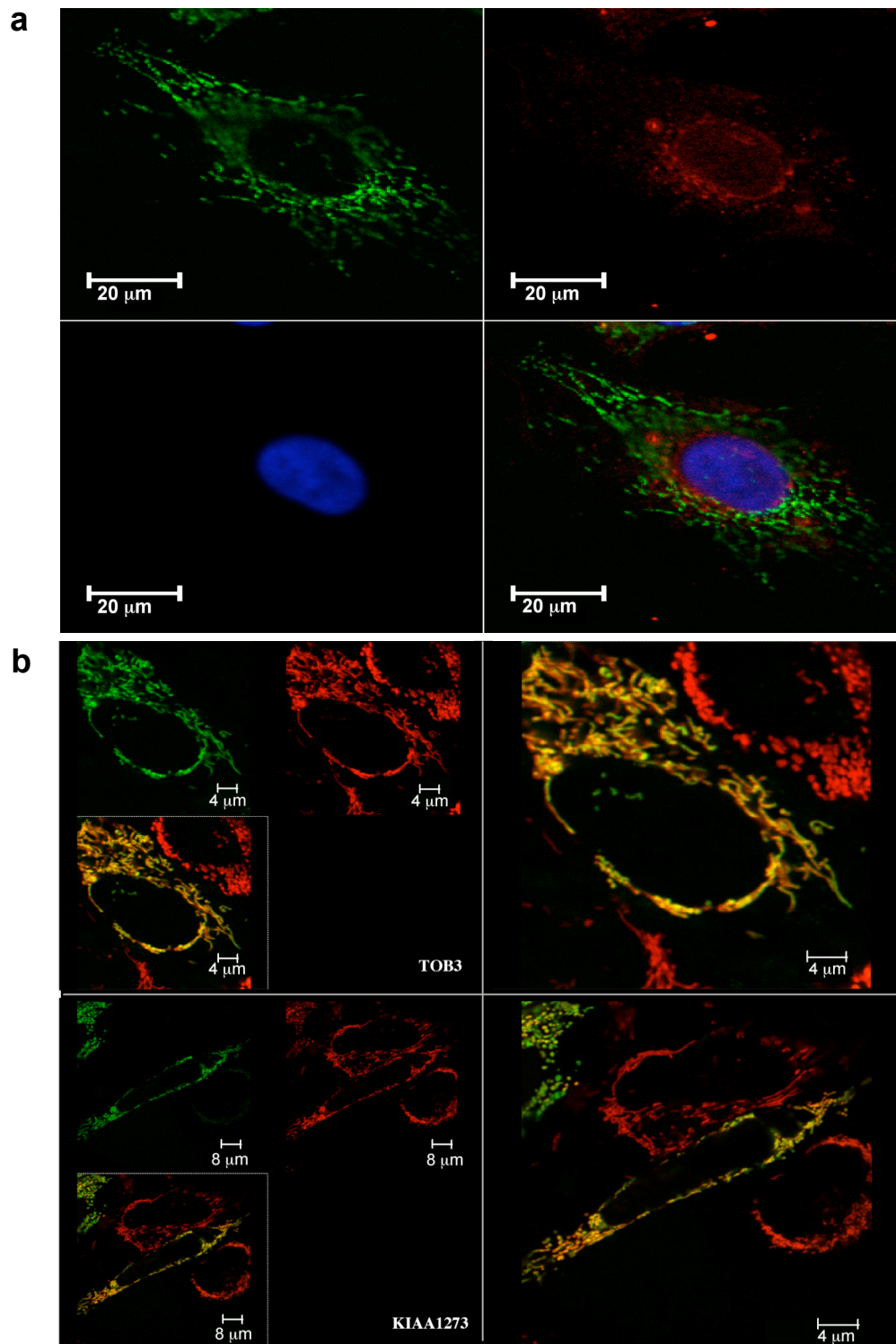


Abb. 4.27: Fortsetzung Seite 84.

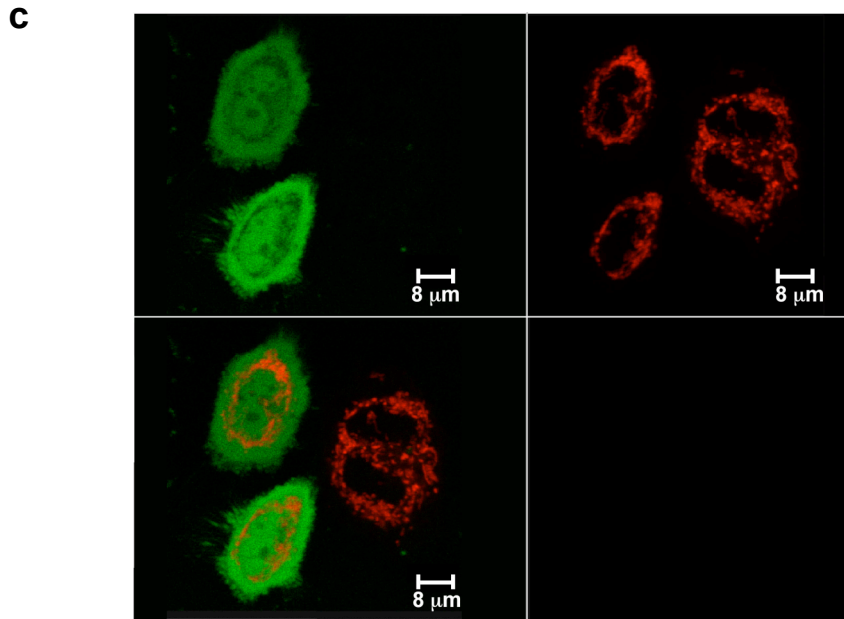


Abb. 4.27: Subzelluläre Lokalisation von AAA-TOB3 und KIAA1273. AAA-TOB3 und KIAA1273 wurden C-terminal mit YFP fusioniert und transient in HeLa exprimiert. (a) Gezeigt ist die Expression von AAA-TOB3-YFP (grün). Das ER wurde mit TR-WKA (rot) und der Zellkern mit Höchst 33342 (blau) gefärbt. (b) Gezeigt ist die Expression von AAA-TOB3-YFP (grün, obere Bilder) und KIAA1273-YFP (grün, untere Bilder). Die Mitochondrien wurden mit MitoTracker-Red gefärbt (rot). (c) Als Negativkontrolle wurde nur YFP transient exprimiert. YFP zeigte eine homogene Lokalisation im Zytoplasma und im Zellkern. Die Mitochondrien (rot) blieben ausgespart. Lebende Zellen wurden im konfokalen Mikroskop analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel aus drei unabhängigen Experimenten.

4.2.5 Zelluläre Systeme zur funktionellen Untersuchung von AAA-TOB und KIAA1273

4.2.5.1 Transiente und konstitutive Überexpression von AAA-TOB3 und KIAA1273 in Karzinomzelllinien

Zur funktionellen Analyse von AAA-TOB3 und KIAA1273 wurden Zellsysteme etabliert, die beide Proteine als C-terminale HA-Fusionsproteine überexprimieren. Der HA-Tag erlaubte eine eindeutige Detektion der beiden Proteine. Hierbei wurden die entsprechenden Konstrukte in den Expressionsvektor 141pCAG-SIP kloniert und die Genprodukte durch zwei starke Promotoren, SV40 (*simian virus 40*) und CMV (*Cytomegalovirus*) in GHD und HeLa transient überexprimiert. Zusätzlich wurden stabile Linien etabliert, deren konstitutive und starke KIAA1273-HA- bzw. AAA-TOB3-HA-Überexpression durch eine IRES-Kassette, bestehend aus den Fusionsproteinen und einem Puromycin-Resistenzgen, gewährleistet wurde. Zur

Detektion endogener AAA-TOB3- und KIAA1273-Proteine wurden polyklonale Antikörper hergestellt (BIOGENES), die sich gegen spezifische Peptide im N-Terminus des jeweiligen Proteins richten (Abb. 4.28a). Die Expression von KIAA1273 und AAA-TOB3 wurde in Zellysaten stabiler GHD-Transfektanten mittels Immunblot untersucht (Abb. 4.28b).

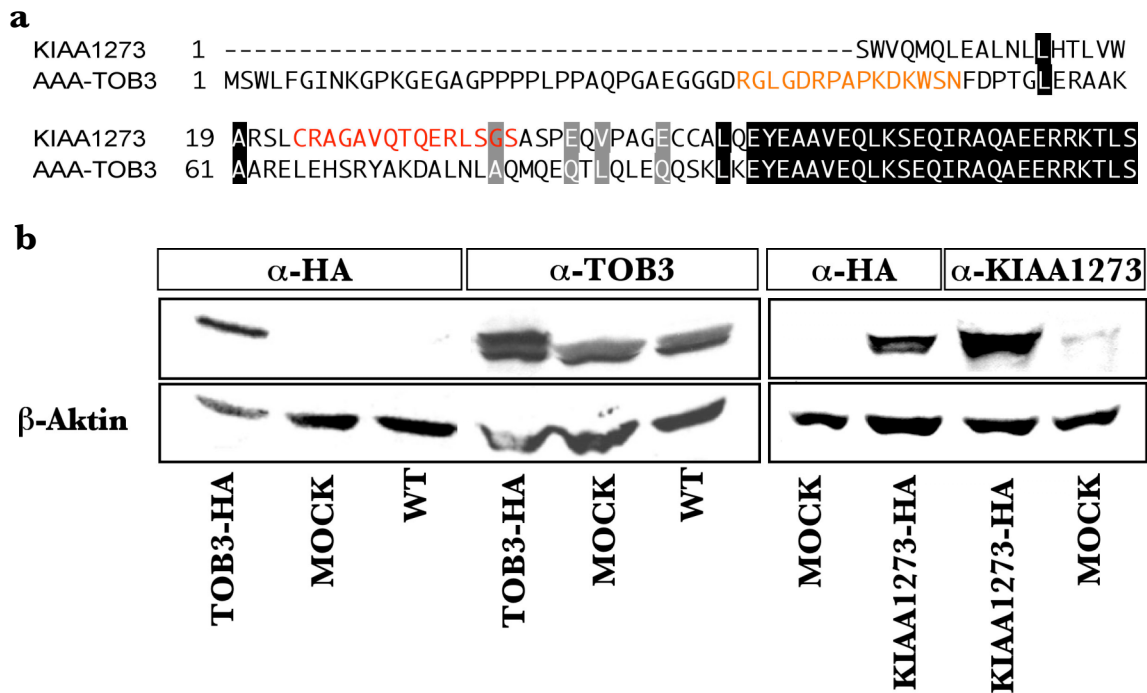


Abb. 4.28: Konstitutive Überexpression von AAA-TOB3 und KIAA1273 in GHD. (a) Kaninchen wurden, mit rot bzw. orange gekennzeichneten Peptiden, immunisiert. So konnte jeweils ein polyklonales Antikörperserum gewonnen werden (BIOGENES). (b) Immunblot zum Nachweis der Expression der AAA-TOB3-HA bzw. KIAA1273-HA Konstrukte in transfizierten stabilen GHD-Zelllinien. Die Proteine stabiler Transfektanten wurden in einem 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und mit HA-spezifischen bzw. spezifischen Antikörpern gegen AAA-TOB3 und KIAA1273 detektiert. MOCK: Leervektor-Kontrolle; WT: GHD-Wildtyp.

Da Cruz *et al.* (2003) beschrieben das murine Homolog von AAA-TOB3 (mTOB3) als pro-apoptisches Protein. Sie transfizierten mTOB3 als C-terminal fusioniertes FLAG-Konstrukt transient in HeLa-Zellen und beobachteten 48 Stunden nach Transfektion einen Verlust der Lebensfähigkeit. Als Index für die Lebensfähigkeit wurde die Luziferaseaktivität eines zusätzlich transfizierten pCI-Luc-Konstrukts bestimmt. Als Kontrolle wurde nur das pCI-Luc-Konstrukt transfiziert. Die Zugabe von zVAD, einem panCaspase-Inhibitor, konnte diesen Effekt um 60% reduzieren. Daher definierten diese Autoren AAA-TOB3 als pro-apoptisch. Um zu prüfen, ob

humanes AAA-TOB3 bzw. KIAA1273 ebenfalls Apoptose induziert, wurden beide Proteine transient als C-terminale HA-Konstrukte in HeLa und GHD transfiziert und anschließend die Zellvitalität bestimmt. Dies erfolgte mit Hilfe des MTT-Assays, der die metabolische Aktivität einer Zellpopulation quantifiziert. Als Kontrolle wurde der Leervektor (MOCK) transfiziert. 48 h nach der Transfektion konnte in Abhängigkeit von der transfizierten DNA-Menge zwar eine geringe Reduktion der Zellvitalität festgestellt werden, diese war jedoch unabhängig davon, welche DNA, i.e. HA-Fusionskonstrukt oder MOCK-Kontrolle, transfiziert wurde (Daten nicht gezeigt).

Aus diesem Grund wurden im Folgenden unterschiedliche Konzentrationen von AAA-TOB3-HA- bzw. KIAA1273-HA-Konstrukten in HeLa und GHD transfiziert, die stets auf eine gleiche Gesamtmenge von DNA mit der MOCK-Kontrolle angeglichen wurden. Es wurden 4×10^3 Zellen ausplattiert und nach 16-24 h mit insgesamt 50 ng bzw. 100 ng DNA transfiziert. Die Zellvitalität wurde vor und 24 h bzw. 48 h nach der Transfektion gemessen. Alle Werte wurden auf die Vitalität der Zellpopulation vor der Transfektion bezogen und im Verhältnis zur MOCK-Kontrolle dargestellt. In Abb. 4.29 und Abb. 4.30 sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

a

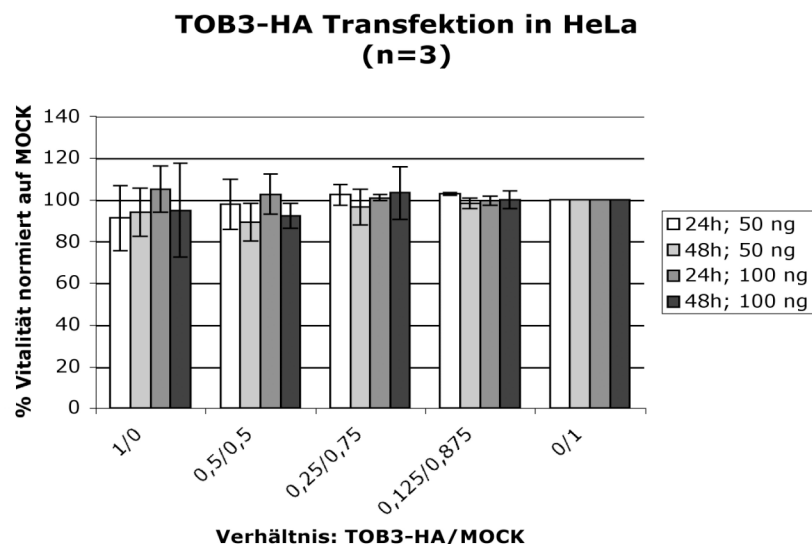


Abb. 4.29: Fortsetzung Seite 87

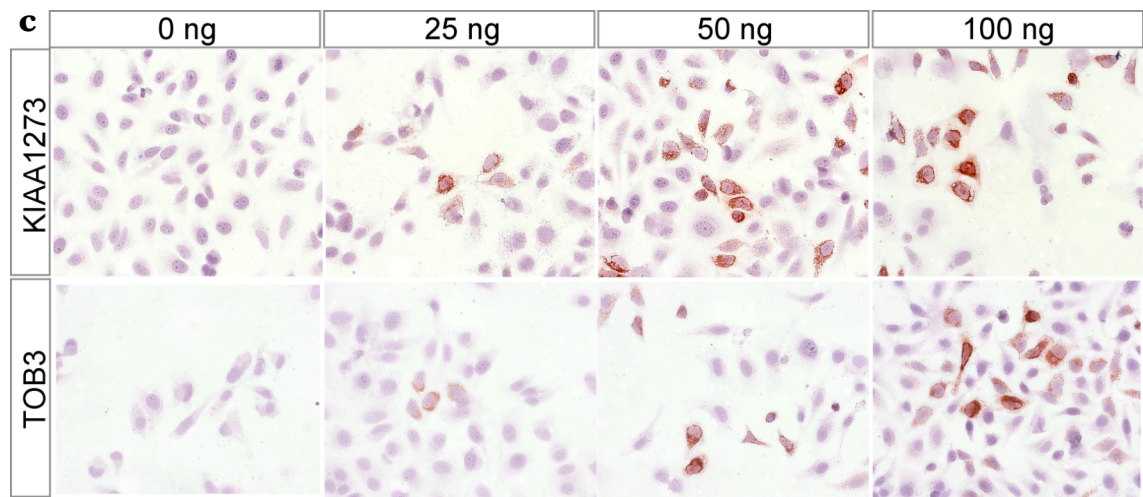
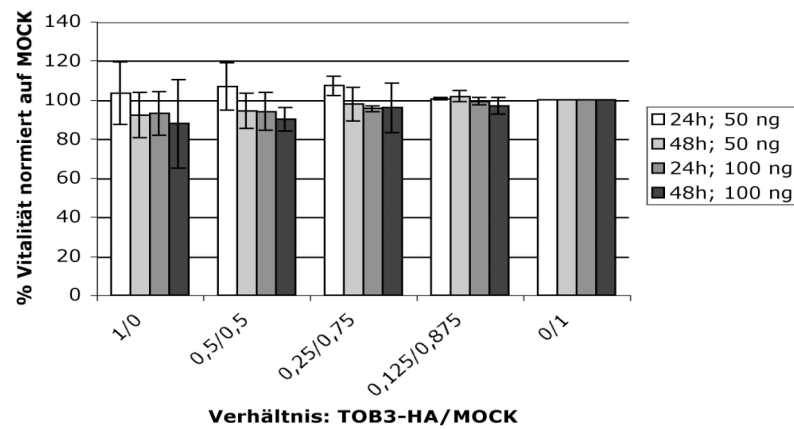
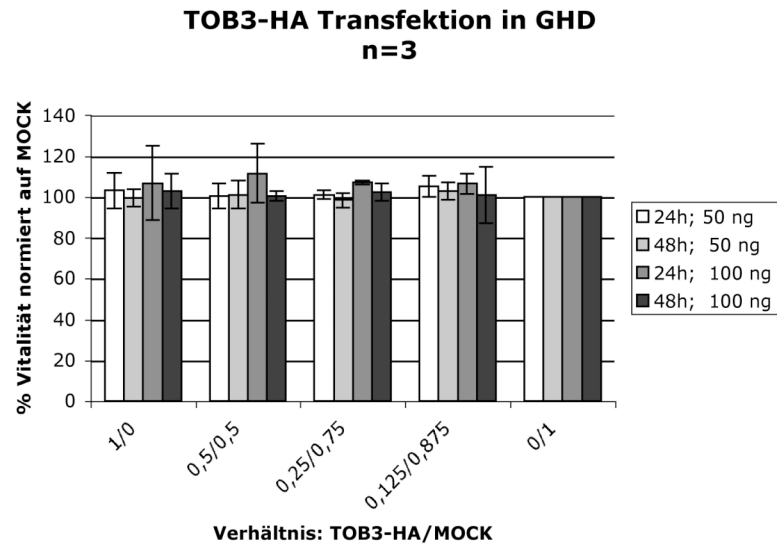
b**KIAA1273-HA Transfektion in HeLa
(n=3)**

Abb. 4.29: Einfluss der Expression von KIAA1273 bzw. AAA-TOB3 auf die Vitalität von HeLa-Zellen . Die Vitalität von HeLa-Zellen wurde 24 h und 48 h nach Transfektion mit AAA-TOB3-HA (a) bzw. KIAA1273-HA (b) Konstrukten und MOCK-Kontrollen mittels MTT-Assay bestimmt. gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten (c) Die Überexpression der Fusionsproteine wurde mittels Immunzytochemie mit einem α -HA-Antikörper und POX-konjugiertem Sekundärantikörper überprüft (braun). Die Zellkerne wurden mit Hämalaun (violett) gegengefärbt.

a



b

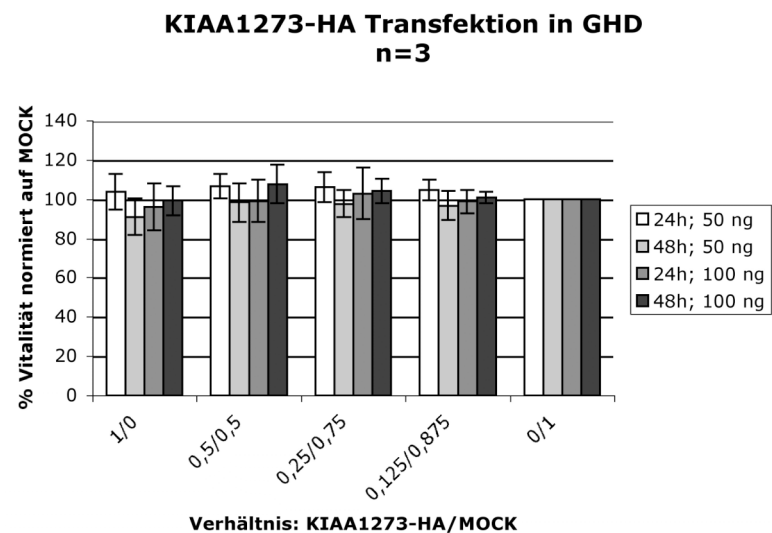


Abb. 4.30: Vitalität von GHD-Zellen nach Transfektion mit AAA-TOB3-HA bzw. KIAA1273-HA. Die Vitalität von GHD-Zellen wurde 24 h und 48 h nach Transfektion mit AAA-TOB3-HA- (a) bzw. KIAA1273-HA-Konstrukten (b) und MOCK-Kontrollen mittels MTT-Assay bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Standardabweichungen wurden von insgesamt 18 Messwerten berechnet. Die Überexpression von KIAA1273 und AAA-TOB3 wurden immunzytochemisch mit einem α -HA Antikörper überprüft (Abb. 4.29c). Zwischen den verschiedenen Transfektanten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Zellvitalität. Das Auszählen HA-positiver Zellen, 48 h nach Transfektion, ergab für beide Zelllinien eine Transfektionseffizienz von ca. 40% (Transfektion von 100 ng bzw. 50 ng Fusionskonstrukt). Da stets die Vitalität der gesamten Zellpopulation gemessen

wurde, könnten die verbleibenden 60% nicht-transfizierter Zellen allerdings eine so hohe Vitalität besitzen, dass sie einen möglichen pro-apoptotischen Effekt der AAA-TOB3- bzw. KIAA1273-überexprimierenden Zellen überlagern. Um dies ausschließen zu können, wurden in einem zweiten Ansatz C-terminale YFP-Fusionskonstrukte von AAA-TOB3 und KIAA1273 transient in GHD und HeLa transfiziert (Transfektionseffizienz ebenfalls 40%) und die Zellen 48 h nach Transfektion mit Annexin-V bzw. PI gefärbt (Abb. 4.31). Annexin-V bindet an Phosphatidylserine, die in apoptotischen Zellen von der inneren Zytoplasmamembran auf die Zelloberfläche externalisiert werden. Als Kontrolle wurden die Zellen nur mit YFP bzw. nur mit dem Transfektionsreagenz transfiziert und in gleicher Weise behandelt. Anschließend wurden pro Experiment in sechs Gesichtsfelder alle KIAA1273-YFP, AAA-TOB3-YFP bzw. YFP-positiven Zellen ausgezählt und davon der Anteil der Annexin-V-positiven Zellen bestimmt (Vergrößerung: 40-fach, Abb. 4.31). Der Anteil PI-positiver Zellen wurde parallel in gleicher Weise ermittelt. Insgesamt wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt. Die Apoptoseraten der KIAA1273 bzw. AAA-TOB3-überexprimierenden Zellen zeigten im Vergleich zu den Kontrollen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (Abb. 4.32).

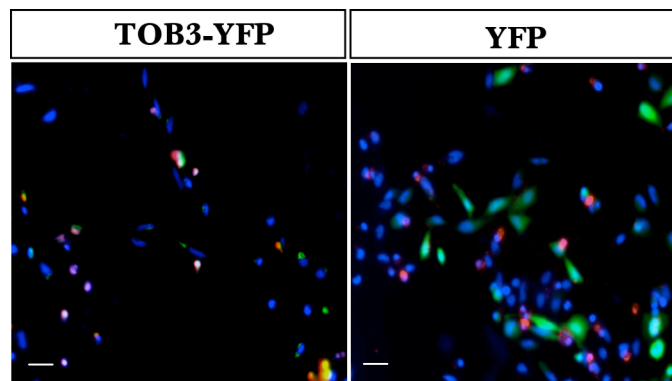


Abb. 4.31: Repräsentative Annexin-V-Färbung. GHD-Zellen wurden transient mit einem TOB3-YFP Fusionskonstrukt (links, grün) transfiziert und 48 h nach Transfektion mit Annexin-V (rot) gefärbt. Als Kontrolle wurden GHD-Zellen mit dem Leervektor (nur YFP) transfiziert (rechts, grün). Es ergab sich eine grüne Färbung der Mitochondrien (TOB3-YFP) bzw. des Zytoplasmas (nur YFP). Die Zellkerne wurden mit Höchst 33342 gegengefärbt. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel der ausgezählten Gesichtsfelder. Balken: 10 μ m

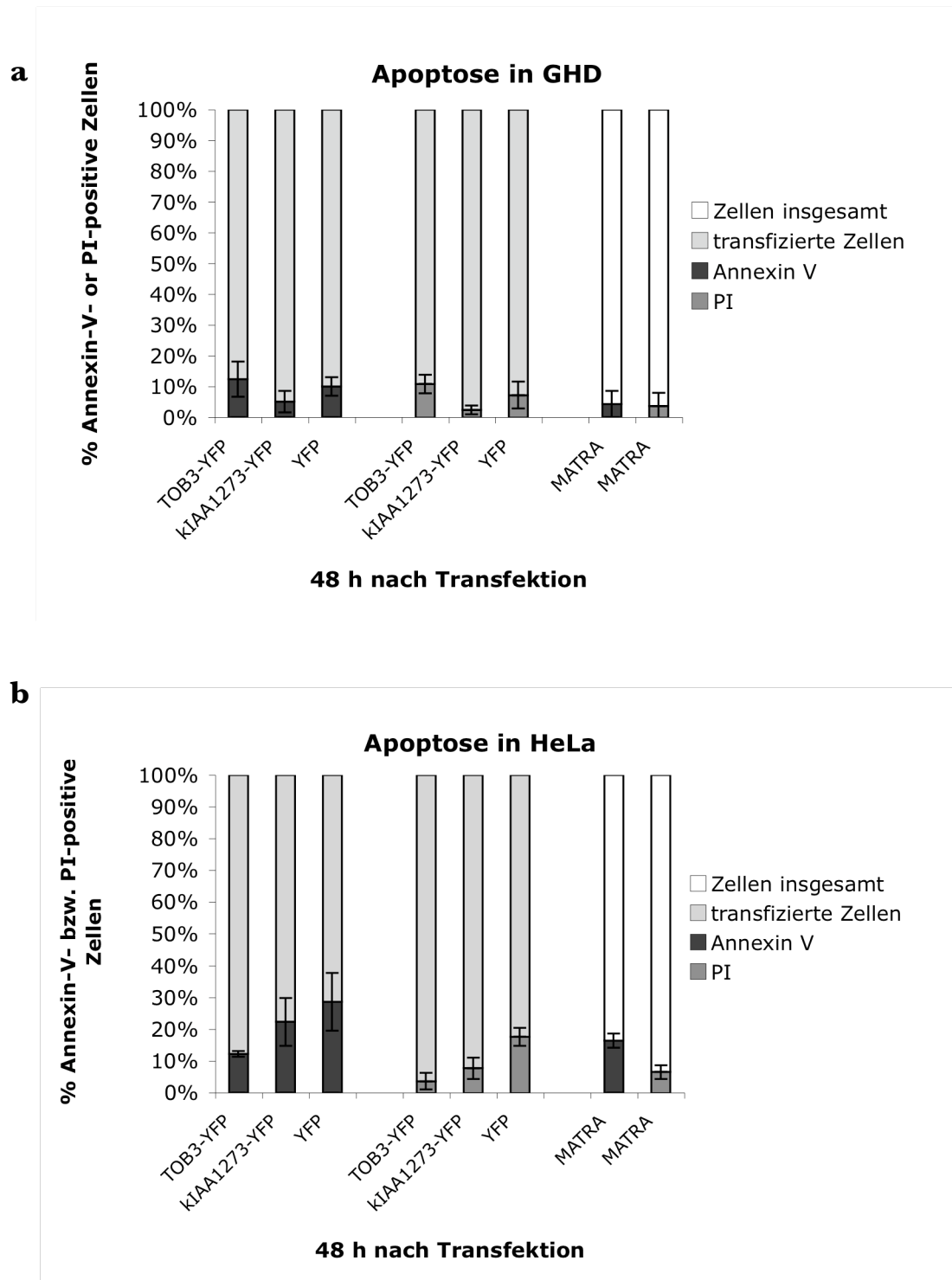


Abb. 4.32: Prozentualer Anteil der Annexin-V- bzw. PI-positiven und AAA-TOB3-YFP bzw. KIAA1273-YFP überexprimierender GHD-Zellen (a) und HeLa-Zellen (b). Beide Zelllinien wurden transient mit einem AAA-TOB3-YFP bzw. KIAA1273-YFP-exprimierenden Konstrukt transfiziert und 48 h nach der Transfektion mit Annexin-V oder PI gefärbt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Annexin-V- bzw. PI-positiven Zellen relativ zur Gesamtheit der transfizierten Zellen. Als Kontrolle wurden GHD-Zellen und HeLa-Zellen nur mit YFP transfiziert. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 12 ausgezählten Gesichtsfeldern in zwei unabhängigen Experimenten.

Zusätzlich wurde die Vitalität von konstitutiv AAA-TOB3-HA bzw. KIAA1273-HA-überexprimierenden GHD-Zellen untersucht (Abb. 4.33 und Abb. 4.28). Die konstitutive Überexpression der beiden Proteine wurde bei mehreren Zellgenerationen über einen Zeitraum von 3 Wochen mittels Immunblot überprüft (Daten nicht gezeigt). Die Zellvitalität wurde hierbei über einen Zeitraum von vier Tagen in Gegenwart von 10% bzw. 1% FKS mittels MTT bestimmt. Als Negativkontrolle wurden stabile GHD-Zelllinien verwendet, die nur den entsprechenden Leervektor (MOCK) exprimierten. Abb. 4.33 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Auch hier konnte im Vergleich zu der MOCK-Kontrolle keine Reduktion der Zellaktivität festgestellt werden. So waren die Messwerte in Gegenwart von 10% FKS identisch, in Gegenwart von 1% FKS zeigten AAA-TOB3-überexprimierende sogar tendenziell eine gesteigerte Zellvitalität. Diese Steigerung war jedoch nicht signifikant.

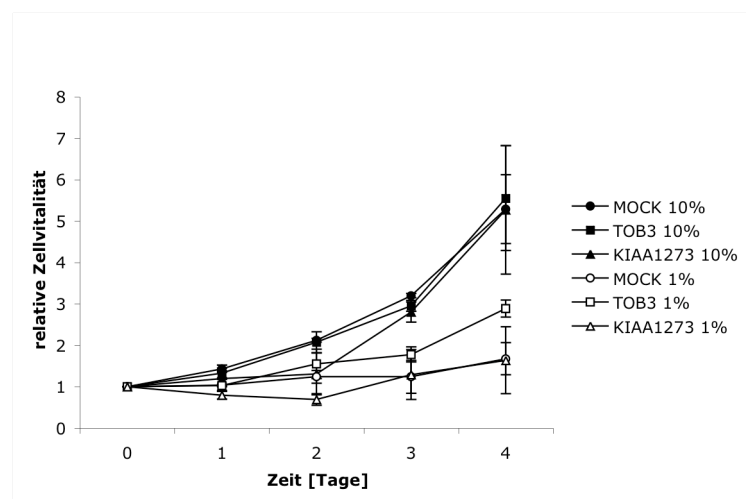


Abb. 4.33: Effekte der konstitutiven AAA-TOB3-HA bzw. KIAA1273-HA- Überexpression auf die Zellvitalität. GHD-Zellen, die nach Puromycinselektion stabil AAA-TOB3-HA bzw. KIAA1273-HA exprimierten wurden über einen Zeitraum von vier Tagen in Gegenwart von 10% bzw. 1% FKS bezüglich ihrer Zellvitalität mittels MTT-Assay analysiert. Alle Werte sind auf die Zellaktivität an Tag 0 bezogen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen ergaben sich aus drei unabhängigen Experimenten.

Zusammenfassend führte weder die transiente noch die konstitutive Überexpression von humanem AAA-TOB3 oder KIAA1273 zu einer Induktion von Apoptose in den Karzinomzelllinien GHD und HeLa.

4.2.5.2 Transiente Repression von AAA-TOB3 und KIAA1273 in Karzinomzelllinien

Für funktionelle Analysen von unbekanntem Proteinen ist es von Vorteil, neben Überexpressionssystemen, auch geeignete Systeme zur Inhibition der Proteinexpression zur Verfügung zu haben. Deshalb wurde die Expression von AAA-TOB3 und KIAA1273 transient mit Hilfe von siRNA-Oligonukleotiden in der Zelllinie GHD reprimiert. Insgesamt wurden drei siRNAs, die unterschiedlichen Regionen der gemeinsamen Sequenzbereiche vom KIAA1273 und AAA-TOB3 entsprechen, auf ihre Effizienz, die Bildung der jeweiligen mRNA zu hemmen, getestet (Abb. 4.34).



Abb. 4.34: Sequenzregionen der siRNAs. AAA-TOB3: III, bp 494-513; II bp 761-780; I, bp 1129-1148; KIAA1273: III, bp 368-387; II bp 635-654; I, bp 1003-1022; bp: Basenpaar

Dazu wurden GHD-Zellen in separaten Ansätzen transient mit den drei siRNAs (je 2,8 µg/ 3000) Zellen transfiziert und die Gesamt-RNA 24 h, 48 h und 72 h nach Transfektion isoliert. Die Repression von KIAA1273 und AAA-TOB3 wurde mittels *real-time* RT-PCR relativ quantifiziert (Abb. 4.35), wobei alle Werte auf GAPDH bezogen wurden. Als Kontrolle wurden die Zellen nur mit dem Transfektionsreagenz behandelt. Abb. 4.35 zeigt die Repression der Transkriptmengen von AAA-TOB3 und KIAA1273 relativ zu den Kontrollzellen. Die Mittelwerte und Fehlerbalken ergaben sich aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. 24 h nach der Transfektion mit den siRNAs konnte AAA-TOB3 im Mittel auf 23% (I), 27% (II) bzw. 33% (III) und KIAA1273 auf 73% (I), 80% (II) bzw. 83% (III) reprimiert werden. Die stärkste Reduktion wurde mit allen siRNAs nach 48 h erreicht. Hier waren die mRNA-Mengen im Falle von AAA-TOB3 im Mittel auf 18% (I), 14% (II) bzw. 22% (III) und im Falle von KIAA1273 auf 47% (I), 50% (II) bzw. 74% (III) reprimiert. Nach 72 h kam es wieder zu einem Anstieg der beiden Transkripte. Für alle weiteren Analysen wurde stets die siRNA I verwendet.

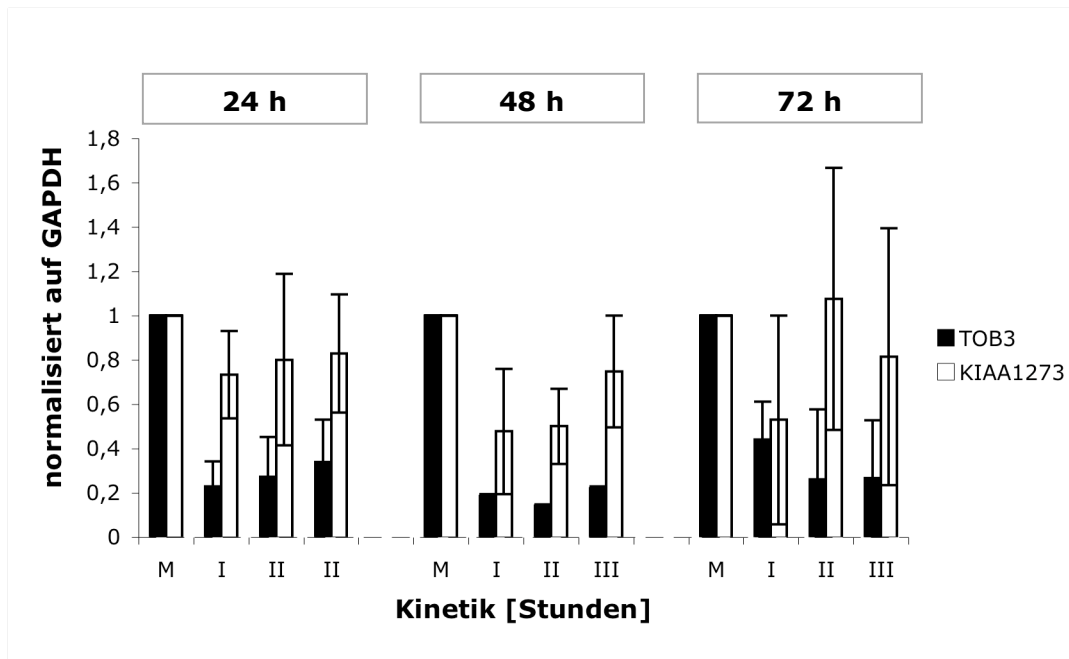
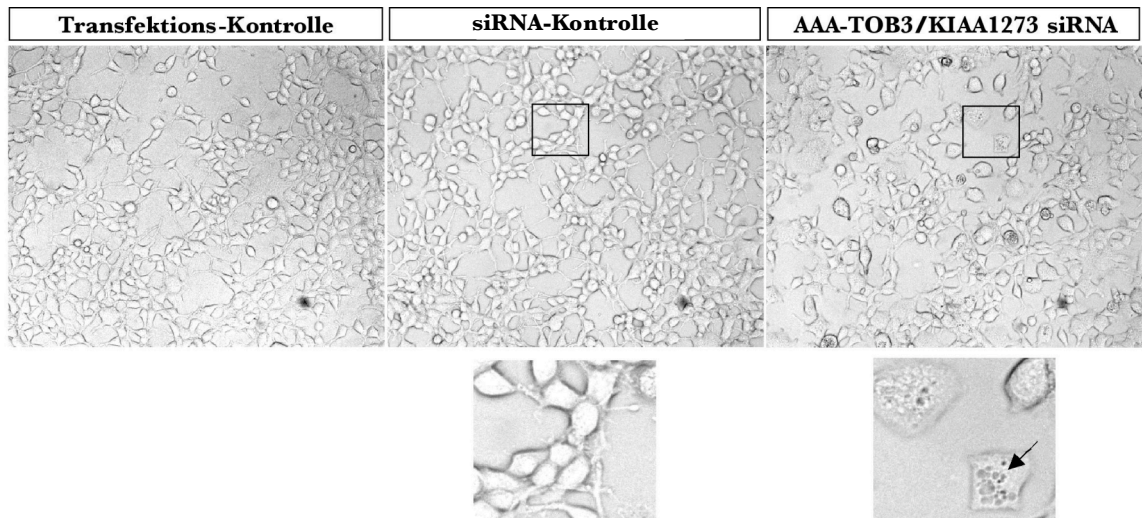
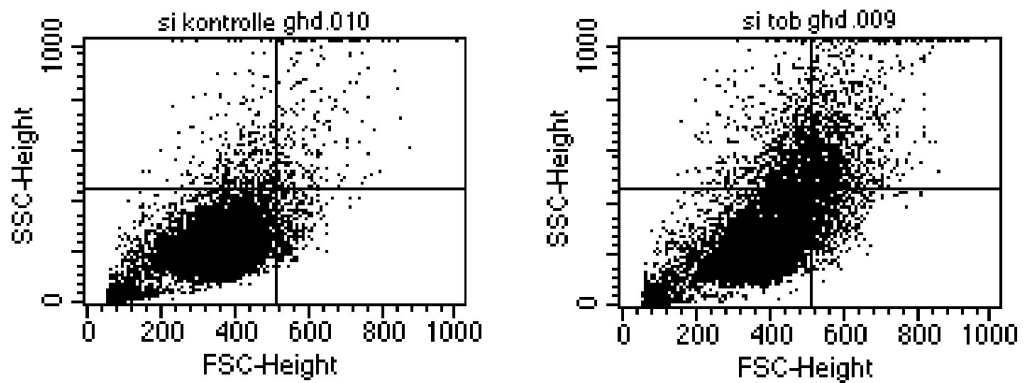


Abb. 4.35: Relative Quantifizierung der Repression von AAA-TOB3 bzw. KIAA1273 RNA mittels siRNA. Drei siRNAs, die verschiedenen Regionen der identischen Sequenzbereiche von KIAA1273 und AAA-TOB3 entsprechen, wurden transient in GHD-Zellen transfiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die relativen Mengen der AAA-TOB3- und KIAA1273-Transkripte mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Alle Werte wurden auf GAPDH und die entsprechende Kontrolle normiert. Gezeigt sind die Mittelwerte und maximalen Fehler von zwei unabhängigen Experimenten. M: Transfektions-Kontrolle, I: siRNA I, II: siRNA II, III: siRNA III.

Im Folgenden wurden GHD-Zellen, deren AAA-TOB3- bzw. KIAA1273-Transkripte durch siRNA transient reprimiert waren, zellmorphologisch und bezüglich ihres Proliferationsverhaltens untersucht. Als Kontrolle wurden GHD-Zellen entweder mit einer Kontroll-siRNA transfiziert, die keiner kodierenden Sequenz im humanen Genom entspricht, oder nur mit dem Transfektionsreagenz behandelt (Transfektionskontrolle). Drei Tage nach der Transfektion mit spezifischer siRNA konnte im Vergleich zu den Kontrollzellen eine deutliche Veränderung der Zellgröße und -granularität festgestellt werden (Abb. 4.36). FACS-Messungen zeigten eine Zunahme der FSC-Streuung (Zellgröße) um den Faktor +3.8 (Kontrolle, UR +LR: 4.8; siRNA I, UR +LR: 16.9) und der SSC-Streuung (Zellgranularität) um den Faktor +3.5 (Kontrolle, UL +UR: 5.5; siRNA I, UL +UR: 21.07, Abb. 4.36b). Außerdem zeigten die AAA-TOB3- und KIAA1273-reprimierten Zellen eine starke Vakuolisierung im Zytoplasma (Abb. 4.36a, vergrößerte Ausschnitte).

a**b**Histogrammstatistik

File: si kontrolle ghd.010

Quad	Events	%Gated
UL	335	3.35
UR	216	2.16
LL	9179	91.79
LR	270	2.70

Histogrammstatistik

File: si tob ghd.009

Quad	Events	%Gated
UL	1024	10.24
UR	1083	10.83
LL	7288	72.88
LR	605	6.05

Abb. 4.36: Zellmorphologische Veränderungen von GHD-Zellen nach der Reprimierung von AAA-TOB3 bzw. KIAA1273. GHD-Zellen wurden transient mit der siRNA I oder einer Kontroll-siRNA transfiziert (a, b) bzw. nur mit dem Transfektionsreagenz behandelt (a). Drei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen mikroskopisch (a) bzw. im Durchflusszytometer bezüglich ihrer Größe (FSC) und ihrer Granularität (SSC) analysiert (b). Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus zwei unabhängigen Ansätzen. UL, UR, LL und LR bezeichnen die einzelnen Quadranten der Dotplots. UL: oben links; UR: oben rechts; LL: unten links; LR: unten rechts (b).

Die Wachstumskurven der transfizierten Zellen wurden in drei unabhängigen Experimenten durch Auszählen vitaler Zellen (Trypanblauausschluss-Methode) über einen Zeitraum von vier Tagen nach Transfektion bestimmt. Alle Werte wurden auf die Zellzahl am Tag 0 bezogen. Interessanterweise konnte in der KIAA1273/AAA-TOB3-reprimierten Zellpopulation bereits zwei Tage nach der Transfektion von spezifischer siRNA eine verminderte Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle (Transfektion mit Kontroll-siRNA) beobachtet werden (Abb. 4.37). Vier Tage nach der Transfektion von spezifischer siRNA war die Zellzahl um den Faktor 2,5 gesunken.

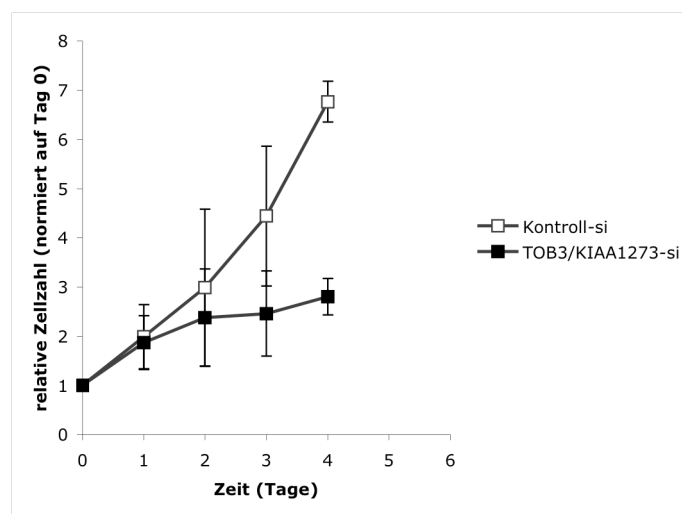


Abb. 4.37: Verminderte Zellzahl nach AAA-TOB3- und KIAA1273-Reprimierung. GHD-Zellen wurden transient mit siRNA I im 6-Loch-Format transfiziert und die Zellzahl über einen Zeitraum von 4 Tagen bestimmt. Die Zellzahl wurde jeweils auf Tag 0 normiert. Als Kontrolle wurde eine nonsense siRNA transfiziert. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Im Folgenden wurde geprüft, ob die reduzierte Zellzahl nach der TOB3/KIAA1273-Reprimierung durch eine verstärkte Apoptose oder Nekrose hervorgerufen wurde. Dazu wurde der Anteil an fragmentierter DNA nach PI-Färbung im Durchflusszytometer gemessen (Sub-G1-DNA-Anteil) bzw. die Zellen mittels Annexin-V und PI gefärbt und durch Auszählen quantifiziert. Drei Tage nach der Transfektion konnte in den KIAA1273/TOB3-reprimierten Zellen im Vergleich zu der siRNA-Kontrolle eine deutlich gesteigerte Fragmentierung der DNA festgestellt werden (Abb. 4.38a). Zudem konnte in den KIAA1273/TOB3-reprimierten Proben ab dem Tag 3 stets mehr Annexin-V-positiven Zellen als in den Kontrollproben beobachtet werden (Abb. 4.38b). Vier Tage nach der Transfektion waren in den TOB3/

KIAA1273 reprimierten Zellen etwa 30% der Population Annexin-V- und etwa 35% der Zellen PI positiv. Beide Experimente belegen eine vermehrte Apoptose als Folge der TOB3 und KIAA1273-Reprimierung.

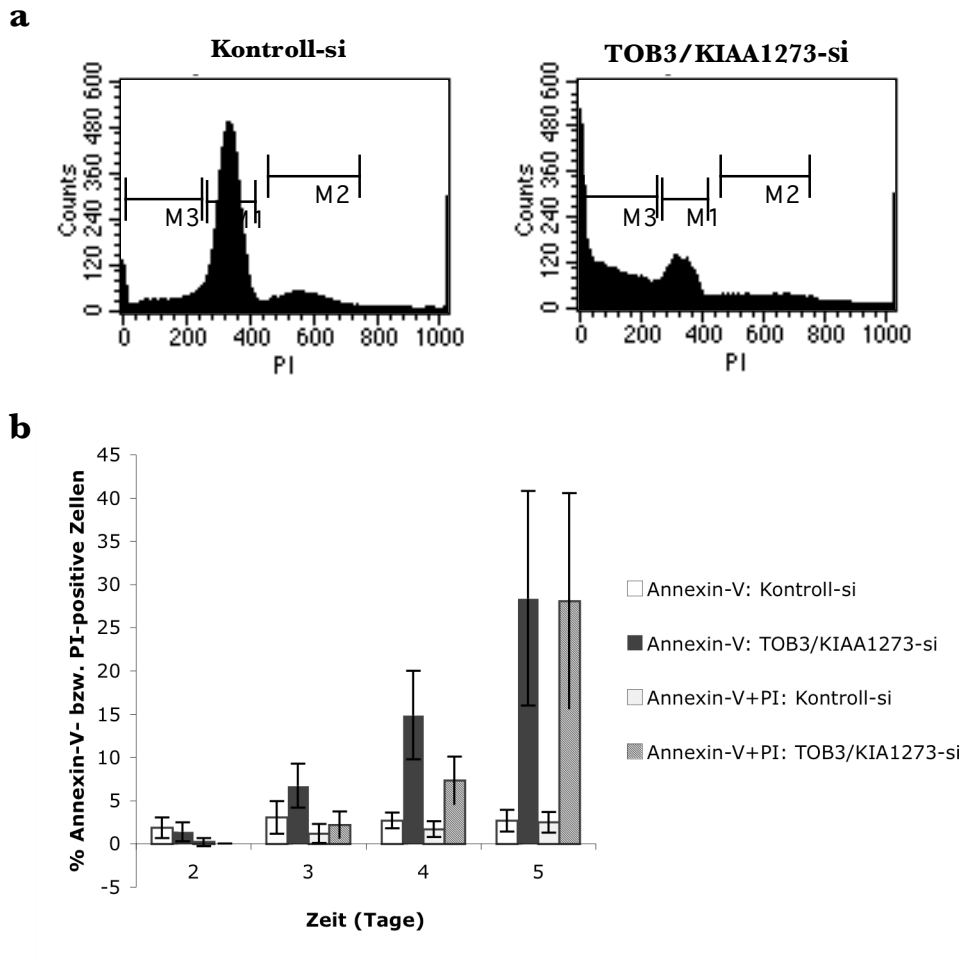


Abb. 4.38: Einfluss der AAA-TOB3- und KIAA1273-Reprimierung auf die Apoptose-rate. (a) GHD-Zellen wurden im 6-Loch-Format transient mit der siRNA I transfiziert, drei Tage nach der Transfektion fixiert und PI gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Als Kontrolle wurde eine nonsense-siRNA transfiziert. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten. (b) GHD-Zellen wurden im 96-Loch-Format transient mit der siRNA I transfiziert und die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion Annexin-V und PI gefärbt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Annexin-V- bzw. PI-positiven Zellen relativ zur Gesamtheit der transfizierten Zellen. Als Kontrolle wurde eine nonsense-siRNA transfiziert. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 12 ausgezählten Gesichtsfeldern in zwei unabhängigen Experimenten.

Die weitere Analyse dieses interessanten Phänotyps und fortführende funktionelle Studien sind Gegenstand laufender Projekte.

5 Diskussion

Die wichtigsten Voraussetzungen, um eine Verbesserung der Prognose bei malignen Erkrankungen zu erreichen, sind eine zuverlässige Vorsorgeuntersuchung bei Risikogruppen und die sichere Diagnose von okkulten Tumorzellen in Tumorgrenzarealen, benachbarten Geweben und Lymphknoten. Bis jetzt stehen jedoch mit wenigen Ausnahmen, wie z.B. PSA bei der Frühdiagnose des Prostatakarzinoms, nur sehr selten solch dringend notwendige Biomarker zur Verfügung.

Die systematische Suche nach validen Biomarkern ist noch ein junges Forschungsgebiet, deren Erfolge für die klinische Entwicklung jedoch von enormer Relevanz sind. Serologische Screening-Verfahren, wie SEREX (Chen *et al.*, 1997) oder PROTEOMEX (Klade *et al.*, 2001) bestätigten die vielfache Existenz von tumorspezifischen und -assoziierten Antigenen (TAs) und führten zu einem verbesserten Verständnis der Tumorummunologie. Tumorspezifische und -assoziierte Antigene sind (wie unter 1.4 eingehend beschrieben) molekulare Marker mit einem immensen Potenzial. Bis *dato* wurde aber die Mehrzahl der Tumorantigene aus malignen Melanomen bzw. dem Nierenzellkarzinom isoliert und identifiziert. Bei Karzinomen der oberen Atemwege sind bisher kaum Tumorantigene beschrieben worden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, neue Tumorantigene im Bereich der HR-Karzinome zu identifizieren, validieren und zu charakterisieren.

5.1 Entwicklung einer neuen „*Target Identification*“-Technologie: AMIDA (Autoantibody Mediated Identification of Antigens)

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit waren zwei Methoden zur Identifizierung unbekannter Tumorantigene verfügbar, die auf der humoralen Antwort von Tumorpatienten beruhen, SEREX und PROTEOMEX. SEREX basiert im Wesentlichen auf der Generierung von cDNA-Banken aus primären Tumorbiopsien, der anschließenden prokaryotischen Expression dieser Klone und der Detektion potenzieller

Tumorantigene mit autologen Serumantikörpern. PROTEOMEX stützt sich auf die Auftrennung des Proteoms von primären Tumoren mittels 2D-Gelelektrophorese und der anschließenden Detektion von Tumorantigenen mit autologen Serumantikörpern in einem Immunblot-Verfahren. Beide Techniken bieten, wie unter 1.4 eingehend beschrieben, viele Vorteile, bergen aber auch erhebliche Limitationen. Keines der Verfahren erlaubt die Kombination einer schnellen, sensitiven und breiten Identifizierung von Tumorantigenen.

Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit eine neue Technik entwickelt, die eine schnelle und breite Identifikation von Antigenen erlaubt, es aber zusätzlich ermöglicht, post-translationale Modifikation zu detektieren. Diese neue Technik wurde AMIDA (*Autoantibody Mediated Identification of Antigens*) benannt und basiert auf der Immunpräzipitation von Antigenen aus primären Tumorbiopsien mittels immobilisierter autologer Serumantikörper. Diese Präzipitate werden anschließend in einer 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt, interessante Antigene im Massenspektrometer (MALDI-ToF) analysiert und durch Datenbankvergleiche identifiziert.

Bei PROTEOMEX werden erst die Tumorproteine in einer 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend die Antigene selektiert. Da eine klassische 2D-Gelelektrophorese jedoch nur eine begrenzte Anzahl der abundantesten Proteinen (maximal 3000) auftrennen kann, können hierbei nur Antigene aus dieser limitierten Menge untersucht werden. Die bei AMIDA durchgeführte Selektion der Antigene mittels Immunpräzipitation vor der 2D-Auftrennung resultiert in einer Reduktion der Komplexität des Proteingemisches und umgeht somit diese Restriktion. Dies wird vor allem durch eine hohe Anzahl identifizierter, potenzieller Tumorantigene aus einer verhältnismäßig geringen Anzahl von AMIDA-Screens bestätigt. So konnten aus Probenmaterial von sechs HRK-Patienten insgesamt 27 verschiedene potenzielle Tumorantigene isoliert werden. Ein weiterer Vorteil der AMIDA-Technik ist die hohe Reproduzierbarkeit. Unter Verwendung einer HRK-Zelllinie, die aus einem HRK-Patienten etabliert wurde, und des zugehörigen autologen Serums, konnten in wiederholten AMIDA-Durchgängen reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden.

Eine Limitation von AMIDA im Vergleich zu PROTEOMEX könnte eine geringere Sensitivität bei der Antigen-detektion sein. Bei PROTEOMEX werden die

Antigene mittels Immunblots detektiert. Immunblots sind in der Regel 100-1000fach sensitiver als eine Silberfärbung, wie sie bei AMIDA verwendet wird. Die präzipitierten Antigene können jedoch auch bei AMIDA nach der 2D-Auftrennung, anstatt mit einer Silberfärbung, alternativ mittels Immunblot mit autologen Serumantikörpern detektiert werden. Dies wäre ein zukünftiger Ansatz, die Sensitivität der AMIDA-Technik zu erhöhen.

Um bei einem AMIDA-Screen zwischen natürlichen und tumorspezifischen bzw. -assoziierten Autoantigenen unterscheiden zu können, wurden parallel natürliche Autoantigene aus Leukozytenlysaten mit autologen Serumantikörpern des Tumorpatienten präzipitiert, aufgetrennt und mit den Antigenen der Tumorprobe verglichen. Alle Antigene, die ausschließlich mit der Tumorprobe präzipitierten, wurden als potenziell tumorspezifisch bzw. -assoziiert betrachtet und daher isoliert und identifiziert. Autologe tumorspezifische Antikörper sollten in gesunden Leukozyten keine tumorspezifischen Antigene, z.B. Spleißvarianten, Mutanten oder *CT*-Antigen erkennen, da diese dort nicht existieren. Tumorassoziierte Antigene, die auch von Leukozyten exprimiert werden, können jedoch ebenfalls mit den Kontrollen präzipitiert werden. Sind diese TAs in Tumoren allerdings stark überexprimiert, sollten sie aufgrund der stark unterschiedlichen Expressionsmengen ebenfalls nur mit den Tumorproben komplexiert werden. Hierfür spricht, dass viele, der mit AMIDA isolierten, TAs tatsächlich in Tumoren stark überexprimiert sind. Bei Antigenen, die sowohl mit der Tumorprobe als auch mit der Kontrolle präzipitiert werden, handelt es sich vermutlich um Autoantigene, die von natürlichen Autoantikörpern (NAA) erkannt werden und in allen Individuen von Geburt an gefunden werden. Bekannte Autoantigene sind z.B. CD4, MHC Klasse I Moleküle oder autologe Blutgruppen-Antigene. Die Funktion der NAAs ist bislang noch ungeklärt, es gibt jedoch Vermutungen, dass sie in die Entsorgung von seneszenten Metaboliten und Zellen, wie Erythrozyten, involviert sind oder durch Kreuzreaktivitäten zwischen pathogenen und autologen Epitopen hervorgerufen werden (Lacroix-Desmazes *et al.*, 1998). Als Kontrollen wurden bei AMIDA Leukozyten verwendet, da die ideale Kontrolle, Epithelien von gesunder autologer Rachenschleimhaut, aus ethischen Gründen nicht zur Verfügung stand.

Interessanterweise wurden von einigen der identifizierten potenziellen AMIDA-TAs, z.B. Zytokeratin 8 (CK8), Tubulin oder GRP78, verschiedene Varianten mit jeweils

gleichem Molekulargewicht, aber unterschiedlichen isoelektrischen Punkten präzipitiert. Hierbei könnte es sich um post-translationale Modifikationen handeln, die mit spezifischen Serumantikörpern präzipitiert wurden. CK8 ist ein Intermediärfilament, dessen Organisation und Löslichkeit hauptsächlich durch Phosphorylierungen reguliert wird (Coulombe *et al.*, 2002). In Leberzirrhosen und bei chronischen, nichtzirrhatischen Hepatitis C Virusinfektionen ist CK8 häufig hyperphosphoryliert (Toivola *et al.*, 2004). Gharib *et al.* (2002) beschrieben mehrere Isoformen von CK8 in Lungenadenokarzinomen. Zwei CK8-Varianten, die mittels AMIDA isoliert wurden, zeigten ein ähnliches Migrationsverhalten wie die von Gharib *et al.* beschriebenen Isoformen. Antigene, die aufgrund post-translationaler Modifikationen immunogen werden, können nicht mit Verfahren identifiziert werden, die heterogene Expressionssysteme verwenden, wie z.B. SEREX. So sind aber z.B. aberrant glykosylierte Proteine sehr häufig spezifisch für Tumorzellen, wie z.B. EpCAM, PSA oder Mucin-1 (Pauli *et al.*, 2003; Peracaula *et al.*, 2003; Hounsell *et al.*, 1997; Burchell *et al.*, 1989). In Tabelle 5.1 sind die Vorteile und Limitationen der drei derzeit verfügbaren Techniken zur autologen Antikörperdetektion gegenübergestellt.

Außerdem konnten mittels AMIDA potenzielle Tumorantigene mit Transmembrandomänen (TMD) identifiziert werden (TOB3/KIAA1273). Stark hydrophobe Proteine mit mehreren TMDs wurden aufgrund der Begrenzungen der 2D-Technik jedoch nicht identifiziert. Da diese aber für Therapieansätze mit monoklonalen Antikörpern sehr interessant sind, ist es erstrebenswert AMIDA dahingehend zu optimieren. Ein Ansatz stellt die Präzipitation von TAs aus Membranfraktionen mit Serumantikörpern und die Auftrennung der Antigene mittels HPLC dar. HPLC-Fractionen können anschließend separat in einer eindimensionalen Gelelektrophorese aufgetrennt werden und ausgeschnitten und analysiert werden. In einem allogenen Ansatz der AMIDA-Technologie können natürliche Autoantigene mit Hilfe von gesunden IgGs präzipitiert und gleichermaßen behandelt werden. Die Differenzierung aus beiden Immunpräzipitationen stellt potenzielle TAs.

Zusammenfassend, erweitert AMIDA das Spektrum der bestehenden Techniken zur Identifizierung diagnostisch und therapeutisch interessanter Antigene. Dies betrifft nicht nur maligne Erkrankungen, sondern alle Krankheiten, die eine veränderte humorale Immunantwort mit sich bringen, z.B. Autoimmunerkrankungen oder In-

fektionen mit Pathogenen. Am Beispiel der Lyme-Erkrankung, auch Borreliose genannt, konnte dies in unserem Labor bereits bestätigt werden (O. Gires, persönliche Mitteilung). Nach einer Infektion verschiedener Mausstämmen mit *Borrelia burgdorferi* (*B.b.*) konnten mit Seren dieser Mäuse pathogenspezifische Antigene aus *B.b.* Lysaten präzipitiert und identifiziert werden. Somit kann AMIDA ebenfalls in einem xenogenen Ansatz durchgeführt werden.

Tabelle 5.1: Vergleich von SEREX, PROTEOMEX und AMIDA

Punkt	SEREX	PROTEOMEX	AMIDA
verwendete Proteinquelle	mRNA Extraktion; Konstruktion einer cDNA-Bank in λ -Phagen	Proteinextraktion aus Zelllinien oder Primärtumoren	Proteinextraktion aus Zelllinien oder Primärtumoren
gescreente Proteine	komplette cDNA-Bank	in einer klassischen 2D aufgetrennte Proteine (≤ 3000)	komplettes Zellysat
Eigenschaften der Antigene	rekombinant in lytischen Plaques durch <i>E.coli</i> exprimierte β -gal-fusionierte Proteine, nativ	natürliche, post-translational modif. Proteine, harnstoffdenaturiert	natürliche, post-translational modifizierte Proteine, nativ
Detektion	Immunblot	2D-Immunblot	Immunpräzipitation, Silberfärbung, 2D-Immunblot möglich
Spezifitätskontrollen	-	2D-Immunblot mit gesundem Gewebe	IP mit gesundem Gewebe
Isolierung und Identifizierung der TAs	Abgleich mit Kolonie, DNA-Sequenzierung	Abgleich mit Silbergel, Massenspektrometrie	Massenspektrometrie
Sensitivität	abhängig von Anzahl der Plaques, theoretisch nicht limitiert	mind. 10.000 Kopien pro Zelle bei Komplettylat*	limitiert durch Silberfärbung, durch IP theoretisch <10.000 Kopien pro Zelle

*Klade *et al.*, 2001

5.2 AMIDA-Antigene als Biomarker und Ziele für die Immuntherapie

Elf der isolierten AMIDA-TAs sind bereits in der Literatur im Zusammenhang mit Tumoren oder als Antigene, die in Autoimmunerkrankungen involviert sind, beschrieben worden. Beispiel hierfür sind GRP78/BIP-spezifische Antikörper im Serum von Prostatakrebspatienten, die mit fortgeschrittener Tumorprogression und geringerer Überlebensrate korrelierten (Mintz *et al.*, 2003). Als weiteres Beispiel konnten Campa *et al.* eine Überexpression von Cyclophilin A im kleinzelligen Lungenkarzinom nachweisen (2003). Zytokeratin 8 (CK8) ist ebenfalls in einigen Tumorentitäten, z.B. Mammakarzinom (Korsching *et al.*, 2002), oder dem Adenokarzinom (Gharib *et al.*, 2002) überexprimiert, wurde aber bisher kaum mit HRK assoziiert. Aus diesem Grund wurde CK8 in der vorliegenden Arbeit detaillierter untersucht.

CK8 in Karzinomen der oberen Atemwege

CK8 wurde mittels AMIDA aus Membranfraktionen isoliert und identifiziert, was auf eine ungewöhnliche Lokalisation dieses üblicherweise zytoplasmatischen Proteins hinwies. Eine CK8-Oberflächenexpression wurde bis *dato* nur auf Mammakarzinomzellen und gesunden Hepatozyten beschrieben (Hembrough *et al.*, 1995 und 1996), von anderen Autoren allerdings sehr kontrovers diskutiert (Riopel *et al.*, 1993). Eingehende Untersuchungen in dieser Arbeit zeigten ebenfalls eine aberrante CK8-Lokalisation auf der Zelloberfläche aller getesteten primären HR-Karzinomen und der Mehrzahl der untersuchten Karzinomzelllinien verschiedenen Ursprungs. Färbeartefakte konnten durch Versiegeln der Zelloberfläche ausgeschlossen werden. Weitere Studien zur Expression von CK8 in gesunden humanen Geweben zeigten außerdem, dass CK8 tatsächlich nur auf der Plasmamembran von Hepatozyten zu finden ist (Gires *et al.*, 2005). Diese Tatsache und die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse machen CK8 zu einem äußerst interessanten Zielmolekül für eine Therapie mit monoklonalen Antikörpern und gaben dazu Anlass, die Wirksamkeit CK8-spezifischer AK in einem *in vivo*-Modell zu analysieren. Hierzu wurden HRK-Zellen, die eine starke Oberflächenexpression von CK8 aufweisen, SCID-Mäusen subkutan implantiert. Nach Ausbildung eines Tumors wurden radioaktivmarkierte CK8-AK intravenös injiziert und die Biodistribution der CK8-Antikörper im gesunden Gewe-

be und im Tumor bestimmt. Hierbei konnte eine Anreicherung der Antikörper im Tumor festgestellt werden (persönliche Mitteilung: M. Andratschke).

Neben CK8 wurden weitere lösliche Proteine z.B. Vimentin, Keratin 6d, Nebulin oder bisher unbekannte Proteine, die keine hydrophoben Regionen aufweisen, aus Membranfraktionen isoliert. Ob es sich hierbei auch um eine aberrante Membranlokalisation dieser Proteine handelt, ist noch unklar.

Zudem stellte sich heraus, dass AK gegen CK8 im Blut als viel versprechende, zirkulierende Biomarker in HRK genutzt werden könnten. So konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass Patienten mit HR-Karzinomen gegenüber gesunden Probanden signifikant höhere Konzentrationen an CK8-spezifischen AK aufweisen. Über alle untersuchten Patienten mit HRK-Erkrankungen ergab sich im Vergleich zu gesunden Probanden bei einer Spezifität von 95% eine Sensitivität von 70%. Vergleicht man diese Werte mit bisher routinemäßig eingesetzten Biomarkern, wie PSA beim Prostatakarzinom (Spezifität/Sensitivität: 95%/45-65%, je nach Test und Hersteller), besitzen Antikörper gegen CK8 ein hohes Potenzial als zirkulierende Biomarker. Besonders interessant ist, dass die durchschnittlich höchsten Konzentrationen an CK8-spezifischen AK bei Patienten in frühen Tumorstadien zu finden waren, was die Bedeutung für die Frühdiagnose hervorhebt. Die möglichst frühe Erkennung von Tumoren ist eine der wichtigsten Voraussetzungen für die Verbesserung der Prognose. Die besten Beispiele dafür sind PSA in Kombination mit verbesserten Untersuchungsmethoden beim Prostatakarzinom und die Mammographie. Der Einsatz einer routinemäßigen Vorsorgeuntersuchung führte bei diesen Tumor-entitäten zu einer deutlichen Verbesserung der Prognose. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse sind die Grundvoraussetzung für eine umfassende klinische Untersuchung der humoralen Antwort gegen CK8. Daher wird in unserem Labor in Zusammenarbeit mit Fr. PD Dr. P. Stieber (Klinische Chemie, Großhadern) derzeit eine Studie durchgeführt, in der die Serumkonzentrationen von CK8-spezifischen Antikörpern bei einer großen Anzahl an Probanden (n=800) bestimmt wird. Diese doppelt-blinde Studie beinhaltet neben gesunden Testpersonen und Probanden mit Tumoren verschiedenen Ursprungs, auch Probanden mit verschiedenen benignen Erkrankungen, wie Infekte, Autoimmunerkrankungen bzw. Hyperplasien.

Ein einzelner Biomarker besitzt jedoch kaum eine ausreichende Sensitivität und Spezifität für einen routinemäßigen Einsatz in der Frühdiagnose. Deshalb ist es ein

Ziel, durch die Kombination verschiedener Marker diese Faktoren zu optimieren. In unserem Labor wird derzeit neben CK8 die humorale Antwort gegen weitere AMIDA-TAs im Multiplex-Verfahren getestet. Hierbei erlaubt das Bioplex-System die gleichzeitige Messung der AK-Konzentrationen im Blut gegen verschiedene Antigene.

Eine Ursache für die gesteigerte humorale Antwort gegen CK8 könnte die starke CK8-Überexpression in neoplastischem Rachenepithel sein. Interessanterweise wurde CK8 auch in hyperplastischem Rachenepithel vermehrt gebildet, was die hohen AK-Konzentrationen in den frühen Tumorstadien erklären könnte. Eine zweite Möglichkeit wäre die Anwesenheit von löslichem CK8 im Blut. Zellen des primären Lungenadenokarzinoms sezernieren in vielen Fällen CK8, wie von Fukunaga *et al.* (2002) beschrieben wurde. Sowohl die extreme Überexpression als auch die Anwesenheit von löslichem CK8 könnten zu einer vermehrten Kreuzpräsentation durch reife professionelle antigenpräsentierende Zellen in den Lymphknoten führen, was die Voraussetzung für die Bildung tumorspezifischer Antikörper ist (Spiotto *et al.*, 2003; Van den Eynde *et al.*, 1997). In 23 HRK-Patienten wurde neben der humoralen Antwort gegen CK8, die Expression von CK8 im Tumorgewebe und in Metastasen im Vergleich zu gesundem Rachenepithel untersucht. Es konnte allerdings keine Korrelation zwischen den Mengen von CK8-spezifischen AKs im autologen Serum der HRK-Patienten und der Expressionsintensität von CK8 in den Tumorgeweben festgestellt werden. Ursächlich hierfür könnten immunsupprimierende Effekte sein, die vermehrt in fortgeschrittenen Stadien der HRKs auftreten (Zeidler *et al.*, 2003).

Interessanterweise zeigten alle gestesteten HRK-Metastasen eine extrem hohe CK8-Expression, die ausschließlich auf die Karzinomzellen beschränkt war. Dies macht CK8 zu einem potenten Marker für die Bestimmung von disseminierten okkulten Tumorzellen. Geeignete Marker für okkulte Tumorzellen sind von großer Bedeutung für die Prognose, da bis zu 80% aller lokoregionären Lymphknoten fälschlicherweise als tumornegativ diagnostiziert werden (Rinaldo, *et al.*, 2004; Ferlito *et al.*, 2001), aber die Anwesenheit von Lymphknotenmetastasen Überlebensrate um mindestens 50% reduziert (Enepekides *et al.*, 1999). Von Hembrough *et al.* (1996) durchgeführte Studien ergaben, dass CK8 im Komplex mit CK18 an der Zelloberfläche den Hauptrezeptor für Plasminogen auf Mammakarzinomzellen bildet und für die

Aktivierung von zellassoziiertem Plasminogen zuständig ist. Dies deutet auf eine wichtige Funktion von CK8 bei der Migration von Tumorzellen durch die extrazelluläre Matrix hin. Zudem zeigten Studien in murinen Fibroblastenzellen, dass die Überexpression von CK8 und CK18 zu einer verstärkten Migration und Invasion führt (Chu *et al.*, 1993). Es ist demnach vorstellbar, dass CK8 an Prozessen des „Gewebsremodellings“ und der Invasion aktiv beteiligt ist.

AMIDA-TAs mit unbekannter Funktion

Mit der AMIDA-Technik konnten insgesamt 16 Antigene identifiziert werden, die bis *dato* noch nicht mit malignen Erkrankungen assoziiert waren. Sieben dieser Antigene wurde bislang keine eindeutige Funktion zugewiesen. Dazu gehört eine mutierte Form von Zytokeratin 9, die mit drei verschiedenen Patientenbiopsien präzipitiert werden konnte. Bemerkenswerterweise wurde stets nur diese Form isoliert, was auf spezifische Antikörper gegen diese Punktmutation hinweist. Diese mutierte Form wurde bislang nur mit einer Hyperproliferation von Keratinozyten der Handflächen (*epidermolytic hereditary palmoplantar keratoderma*) in Zusammenhang gebracht (Kobayashi *et al.*, 1996). Ein weiteres Beispiel ist Elongin A2, das im gesunden Individuum spezifisch in Testis exprimiert wird (Aso *et al.*, 2000) und somit ein *Cancer-Testis* Antigen darstellt. In unserem Labor durchgeführte RT-PCRs konnten eine hohe Expression von Elongin A2 in diversen HRK-Zelllinien und primären Tumoren nachweisen. Da in weiteren Studien verschiedene gesunde Gewebe, wie erwartet, keine Expression zeigten (persönliche Mitteilung: G. Hollweck), könnte Elongin A2 ein interessantes Ziel für T-Zell-Therapieansätze sein.

Die Peptide der massenspektrometrischen Analyse eines weiteren AMIDA-TAs konnten zwei Proteinen zugeordnet werden, die sich nur in ihren N-Termini unterscheiden: das hypothetische Protein KIAA1273 und AAA-TOB3 (Abb. 4.13). Zwischen diesen beiden Isoformen konnte nicht differenziert werden, da diese Peptide ausschließlich in deren identischen Bereich lokalisierten. Keine der beiden Isoformen wurde bis zum Zeitpunkt der Identifizierung mit malignen Erkrankungen assoziiert.

In dieser Arbeit durchgeführte *in situ* Hybridisierungsexperimente (ISH) zeigten, dass in 80% der gestesteten primären HR-Karzinome mindestens eines der beiden Genprodukte, KIAA1273 und AAA-TOB3, stark überexprimiert ist. Im gesunden Rach-

enepithel konnte nur eine sehr schwache Expression festgestellt werden, die ausschließlich auf die proliferierende Basalzellschicht begrenzt war. Erste Hinweise (zu finden unter: <http://www.kazusa.or.jp/huge/gfpage/KIAA1273/>) lassen darauf schließen, dass KIAA1273 schwach in gesundem Hirn-, Testis-, Ovar- und Lebergewebe exprimiert wird, was KIAA1273 zu einem interessanten TA macht. Das Expressionsmuster der beiden Isoformen soll mittels Multiple-Tissue-Arrays (MTE) überprüft werden. Außerdem muss noch geklärt werden, welche der beiden Isoformen oder ob beide zusammen in HRK-Zellen vermehrt gebildet werden. Dies war bis *dato* nicht möglich, da die in der vorliegenden Arbeit verwendete ISH-Sonde aufgrund ihrer Sequenz keine Unterscheidung zwischen beiden Genprodukten zuließ und weitere Versuche mit mehreren genproduktspezifischen Sonden bzw. im Rahmen dieser Arbeit generierten isoformspezifischen Antikörper zu keiner eindeutigen Aussage führten. Deshalb sollen in einem nächsten Schritt die Transkriptmengen der beiden Isoformen mit Hilfe einer RT-PCR an LCM-(*Laser-capture-microdissection*)-isolierten Karzinom- und gesunden Gewebeproben quantifiziert werden.

5.3 Funktionelle Charakterisierung von KIAA1273 und AAA-TOB3

Genlokus und Regulation

KIAA1273 ist ein hypothetisches Protein, dessen Existenz nur durch einen EST-Klon belegt wird und bisher nicht näher verifiziert wurde. In dieser Arbeit konnte die Existenz von KIAA1273 auf Transkriptionsebene eindeutig bewiesen und, als Isoform von AAA-TOB3, dem Genlokus *atad3b* zugeordnet werden. Die Genstruktur von KIAA1273 und AAA-TOB3 gab zunächst Anlass zur Hypothese, dass es sich bei KIAA1273 um eine N-terminale Spleißvariante von AAA-TOB3 handelt. In dieser Arbeit durchgeführte 5'-RACE-Experimente widerlegten diese Hypothese, da eindeutig gezeigt werden konnte, dass KIAA1273 von einem eigenen Promoter exprimiert wird und keine Sequenzhomologie zur 5'-UTR von AAA-TOB3 besitzt. Weiterhin konnte anhand der Zelllinie P493-6 gezeigt werden, dass beide Transkripte durch den onkogenen Transkriptionsfaktor c-Myc reguliert werden. In dieser Zelllinie steht die c-Myc-Expression unter der Kontrolle eines tet-regulierbaren

Promoters. Da beide etwa 1 Stunde nach der c-Myc-Expression induziert wurden, kann von einer direkten Regulation durch c-Myc ausgegangen werden. Eine indirekte Regulation über weitere Faktoren ist unwahrscheinlich, da der Zeitraum von einer Stunde für eine zusätzliche Proteinsynthese zu kurz ist. Bisher wurden nur AAA-TOB3 als Zielgen von c-Myc beschrieben (Zeller *et al.*, 2003). C-Myc ist in zentrale Prozesse wie Zellzyklus, Zellmetabolismus und Apoptose involviert und ist in vielen malignen Erkrankungen hochreguliert (Liao *et al.*, 2000; Brabletz *et al.*, 2000; Nagy *et al.*, 2003). In einer Studie von Yu *et al.* (2003) zeigten z. B. über 50% der Nasopharynxkarzinome eine eindeutige Überexpression von c-Myc. Erwähnenswert ist, dass eine erhöhte c-Myc-Expression in HRK mit fortgeschrittenen Tumorstadien und schlechteren Prognosen korreliert (De la Guardia *et al.*, 2001). Die Überexpression von AAA-TOB3 bzw. KIAA1273 in HRK-Tumoren könnte daher möglicherweise ein direkter Effekt der c-Myc-Regulation sein. Interessanterweise wurde AAA-TOB3 dreimal stärker induziert als KIAA1273, was darauf hindeuten könnte, dass AAA-TOB3 in HRKs stärker exprimiert ist als KIAA1273.

AAA-TOB3 - ein pro-apoptotisches Protein?

Da Cruz *et al.* (2003) beschrieben das murine Homolog von AAA-TOB3 kürzlich als neues pro-apoptotisches Protein, das in der inneren Membran von Mitochondrien lokalisiert. Trifft diese Funktion auch auf das humane Protein zu, ist dies mit einer starken Überexpression in Karzinomen schwer zu vereinbaren. In der genannten Studie wurde das murine Homolog von AAA-TOB3 (mTOB3) aus der inneren Mitochondrienmembran isoliert und die subzelluläre Lokalisation mit einem FLAG-Fusionsprotein bestätigt. Die anschließende transiente Überexpression des murinen mTOB3 in HeLa-Zellen führte zu einer Reduktion der Zellviitalität als Folge einer vermehrten Apoptose (Da Cruz *et al.*, 2003).

Das murine und das humane Homolog von AAA-TOB3 sind bezüglich ihrer Aminosäuresequenz zu 62% identisch und zu 72% homolog. Sequenzvergleiche mit bekannten mitochondrialen Signalsequenzen ergaben jedoch nur für KIAA1273 eine mögliche Leadersequenz, die den ersten 25 Aminosäuren des N-Terminus entspricht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte auch für die beiden humanen Isoformen eine mitochondriale Lokalisation in mehreren Zelllinien mit C-terminalen AAA-TOB3 bzw. KIAA1273-eYFP-Fusionsproteinen bestätigt werden. Eine

pro-apoptotische Wirkung konnte hingegen weder für KIAA1273 noch für das humane AAA-TOB3 nachgewiesen werden. Die transiente Überexpression in HeLa- und GHD-Zellen, die bis auf zusätzliche Kontrollen in gleicher Weise wie bei Da Cruz *et al.* durchgeführt wurden, führte zu keiner Veränderungen in der Zellvitalität bzw. der Apoptoserate. Die erfolgte Überexpression wurde hierbei immunhistochemisch überprüft. Zudem wurden nur die AAA-TOB3- bzw. KIAA1273-überexprimierenden Zellen auf ihr Apoptoseverhalten untersucht, so dass ausgeschlossen werden kann, dass untransfizierte und dadurch sehr vitale Zellen apoptotische Effekte überlagern. Auch die konstitutive Überexpression der beiden Proteine in der Zelllinie GHD führte zu keiner verminderten Zellvitalität gegenüber der Kontrollzelllinie. Ganz im Gegenteil verschaffte die Überexpression von AAA-TOB3 den Zellen unter 1% FKS einen leichten Proliferationsvorteil gegenüber der Kontrolle. Diese Ergebnis und die Tatsache, dass nur überexprimierende Zellen auf ihr

Diese konträren Ergebnisse zu den Studien von Da Cruz *et al.* können folgende Ursachen haben. Zum einen könnte das murine Homolog von AAA-TOB3 in humanen Zellen eine unterschiedliche Funktion aufweisen. So könnte es sein, dass das humane Protein eine anti-apoptotische Funktion hat, die durch die Überexpression von einem nicht funktionellen murinen AAA-TOB3 beeinträchtigt wird (dominant-negativer Effekt). Eine weitere Erklärung könnte das Fehlen adäquater Kontrollen in den von Da Cruz *et al.* durchgeführten Experimenten sein, da in der Kontrolltransfektion im Vergleich zu den AAA-TOB3-Zellen nur die halbe Menge an DNA transfiziert wurde. In den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen stets mit der gleichen DNA-Mengen behandelt. Wie in dieser Arbeit ersichtlich wurde, korrelieren steigende Mengen transfizierter DNA mit einer verminderten Zellvitalität. Somit fehlen in der Arbeit von Da Cruz *et al.* möglicherweise einige essentielle Kontrollen, die letztlich zu widersprüchlichen Ergebnissen führen könnten.

Weitere bisher bekannte Daten zu homologen Proteinen von AAA-TOB3 und KIAA1273 in anderen Organismen sprechen ebenfalls gegen eine pro-apoptotische Funktion und deuten eher auf eine pro-proliferative Wirkung hin. So führt die Deletion des homologen Proteins von AAA-TOB3 in *C.elegans* (2K539/ F54B3.3) zu embryonaler Letalität. RNAi Experimente mit *small-interfering* RNAs (siRNAs)

ergaben außerdem eine Reduktion des Zellwachstums bzw. der -proliferation (Kamath *et al.*, 2003; Piano *et al.*, 2002). 2K539/F54B3.3 besitzt zu AAA-TOB3 eine Aminosäureidentität von 53% und -homologie von 71% über das gesamte Protein betrachtet. Die in dieser Arbeit durchgeführte Hemmung der Expression von humanem AAA-TOB3 und KIAA1273 mit siRNA resultierte ebenfalls in einer signifikant verminderten Zellzahl als Folge einer vermehrten Apoptose.

Ein weiteres Homolog von AAA-TOB3 in Hefe, Yme1 (*yeast mitochondrial escape 1*, AmS-Homologie: 28%), spielt eine essentielle Rolle bei der Degradation von nicht-nativer Cytochrom C Oxidase. Die Deletion von Yme1 führt bei Hitzeschock oder oxidativem Stress zu einer reduzierten Aktivität des respiratorischen Kettenkomplexes und zu verlangsamtem Wachstum (Shah *et al.*, 2000). Humane Zellen besitzen allerdings ein direktes Homolog zu Yme-1, das Yme-1-L. Somit ist anzunehmen, dass AAA-TOB3 nicht die identische Funktion von Yme-1 besitzt. Yme1 und Yme1-L gehören zur Familie der FtsH-Metalloproteasen, deren Aufgabe es ist, nicht-native mitochondriale Substratproteine zu erkennen und zu degradieren. Viele dieser Substrate sind Proteine des respiratorischen Systems. Da die mitochondriale Homöostase sehr wichtig für das Zellüberleben ist, führte die Deletion aller bisher bekannter FtsH-Proteine zu einem deutlichen Phänotyp bei oxidativem Stress, erhöhten Temperaturen oder osmotischem Schock (Bota *et al.*, 2001; Atorino *et al.*, 2003).

Auffällig ist, dass AAA-TOB3 bzw. KIAA1273 zu mehreren Vertretern dieser AAA-Subgruppe eine hohe Sequenzhomologie aufweisen. KIAA1273 und AAA-TOB3 lokalisieren außerdem wie die FtsH-Metalloproteasen in den Mitochondrien, vermutlich in der inneren Membran, verfügen jedoch nicht über ein Zink-Bindemotiv, das für Metalloproteasen essenziell ist. Daher haben KIAA1273 und AAA-TOB3 höchstwahrscheinlich keine Metalloproteaseaktivität. Neben den FtsH-Metalloproteasen zeigen KIAA1273 und AAA-TOB3 zudem in vielen Spezies eine hohe Sequenzhomologie zu einer regulatorischen Untereinheit des 26S Proteasoms (Untereinheit 6 in *H.Sapiens*). Regulatorische Untereinheiten des 26S Proteasoms erkennen nicht-native Membranproteine des ER und führen diese zum Peptidasezentrum des Proteasoms. Sie selbst besitzen keine Proteinaseaktivität.

Alle Vertreter der FtsH-Familie und der 26S regulatorischen Untereinheiten agieren höchstwahrscheinlich als ringförmiges Homo- oder Heterohexamer, die durch die

AAA-Domänen und die N- und C-terminalen *coiled-coil* Elemente stabilisiert werden (Lupas und Martin, 2002). KIAA1273 und AAA-TOB3 besitzen ebenfalls *coiled-coil* Elemente am N- und am C-Terminus, was eine ähnliche Anordnung impliziert.

Somit können mehrere Hypothesen aufgestellt werden: Unter der Annahme, dass AAA-TOB3 und KIAA1273 ähnliche Funktionen wie ihre Homologe besitzen, könnte die Überexpression in Tumoren durch Stresssituationen, wie z.B. oxidativer Stress, hervorgerufen und hierbei für das Zellüberleben relevant sein. So ist erhöhter oxidativer Stress seit den Siebzigerjahren ein häufig beobachtetes Phänomen in Tumoren (Hilemann *et al.*, 2001). KIAA1273 und AAA-TOB3 könnten z.B. mit FtsH-Proteinen Heterodimere bilden und so die Substratspezifität dieser Komplexe erweitern. Dafür sprechen die langen N-Termini als potenzielle Substratbindestellen, wobei beide Isoformen aufgrund der differierenden N-Termini unterschiedliche Substrate binden könnten. Alternativ könnten KIAA1273 und AAA-TOB3 mit löslichen Proteasen interagieren und, ähnlich dem 26S Proteasom, Substrate erkennen und zu den Proteasezentren führen. Außerdem könnten sie eine unabhängige Chaperon-ähnliche Funktion besitzen und für korrekte Konformationsänderungen von Substratproteinen zuständig sein.

In allen drei Szenarien stellt die AAA-TOB3-Familie eine bisher unbekannte mitochondriale Klasse der AAA-Proteine dar, die in malignen Erkrankungen eine wichtige Bedeutung haben könnten.

5.4 Ausblick

Mit der Entwicklung von AMIDA, der Isolierung einer Vielzahl potenzieller Tumorantigene und der eingehenden Validierung von Zytokeratin 8 und AAA-TOB3/KIAA1273 konnte das Ziel dieser Arbeit, neue potenzielle Biomarker für HR-Karzinome zu identifizieren, erfüllt werden. Einzelne Marker sind jedoch für zuverlässige klinische Prognosen nicht ausreichend. Nur die simultane Beurteilung vieler unterschiedlicher Parameter scheint viel versprechend. Somit sind die intensive Validierung weiterer AMIDA-Antigene und die Entwicklung von Systemen, die eine gleichzeitige und schnelle Beurteilung von Markerprofilen von Karzinompatienten und Risikogruppen erlauben, Gegenstand zukünftiger Forschungsarbeiten in

unserem Labor. Die Korrelation dieser Profile mit Tumorgenese und Progression hat die Verbesserung der Prognose bei HRK-Patienten zum Ziel.

KIAA1273 und AAA-TOB3 sind offensichtlich Mitglieder einer neuen mitochondrialen Subfamilie der AAA-Proteine, die bei malignen Erkrankungen stark überexprimiert sind und daher möglicherweise eine wichtige Rolle spielen könnten. Weiterführende Analysen, deren Grundlagen in dieser Arbeit etabliert wurden, müssen klären, ob diese Hypothese wirklich zutrifft und welche Funktionen beide Proteine einnehmen.

So muss geprüft werden, ob beide Isoformen funktionell vergleichbar sind und welches bzw. ob tatsächlich beide Isoformen in Tumoren vermehrt gebildet werden. Eine äußerst interessante Frage ist natürlich, was die exakte Funktion der beiden Isoformen in den Mitochondrien ist bzw. welche Proteingruppen und Signalwege von einer Reprimierung oder Überexpression von AAA-TOB3 bzw. KIAA1273 beeinflusst werden. Dies könnten z.B. cDNA-Arrays beantworten, die das Expressionsmuster nach der Reprimierung bzw. Überexpression abgreifen. Zusätzlich sollte geprüft werden, ob wichtige mitochondriale Vorgänge, wie z.B. Atmung, Fusion oder Separation betroffen sind.

Außerdem könnte z. B. die Auftrennung von KIAA1273- bzw. AAA-TOB3-Komplexen im *Blue-Native*-Gel zur Identifizierung von möglichen Bindungspartnern führen. Hierbei könnte auch die Frage beantwortet werden, ob KIAA1273 und AAA-TOB3 im Homo- oder Heterokomplex agieren und ob humane FtsH-Proteine an diesen Komplexen beteiligt sind.

Diese Ansätze sind Bestandteil weiterführender Untersuchungen in unserem Labor.

6 Zusammenfassung

Maligne Erkrankungen sind die zweithäufigste Todesursache in den industrialisierten Nationen. Trotz intensiver Forschung in den letzten Jahrzehnten haben sich die Prognosen nur bei einigen Tumorentitäten signifikant verbessert. Die Hauptprobleme sind nach wie vor das Fehlen valider Marker für die Frühdiagnose und hohe Rezidivraten, die aufgrund mangelnder Detektion von disseminierten Tumorzellen entstehen. Tumorantigene erlangen eine immer wichtigere Bedeutung, da sie zur Visualisierung von okkulten Tumorzellen und als Zielstrukturen der spezifischen adoptiven Immuntherapie dienen können. Tumorantigene (TAs) bzw. eine gesteigerte humorale Antwort gegen TAs, besitzen außerdem ein großes Potenzial als zirkulierender Biomarker in der Frühdiagnose.

In dieser Arbeit wurde am Beispiel von Karzinomen der oberen Atemwege eine neue Technik zur Identifizierung von TAs entwickelt (AMIDA, *Autoantibody Mediated Identification of Antigens*), welche einige Limitationen der bereits etablierten SEREX- und PROTEOMEX-Technik umgeht. AMIDA ermöglicht es, im Gegensatz zu SEREX, TAs zu identifizieren, die durch post-translationale Modifikationen oder aberrante Lokalisationen immunogen wurden. Diese TAs sind häufig tumorspezifisch und eignen sich hervorragend als Biomarker oder als Zielstrukturen für Therapien. Der Vorteil von AMIDA gegenüber PROTEOMEX ist die Immunpräzipitation von Antigenen aus primären Tumorbiopsien mit autologen Serumantikörpern, vor der Auftrennung in einer 2D-Gelelektrophorese und der anschließenden Identifizierung der TAs im Massenspektrometer. Dadurch können TAs aus dem kompletten Proteom identifiziert werden und nicht nur aus der Proteinauswahl, die in einer klassischen 2D-Gelelektrophorese auftrennbar ist.

AMIDA führte zur Identifizierung von 27 unterschiedlichen, potenziellen Tumorantigenen, wobei sechzehn TAs bis zum Zeitpunkt ihrer Identifizierung nicht mit malignen Erkrankungen und weitere vier nicht mit HRK assoziiert wurden. Hierbei stellte sich Zytokeratin 8 (CK8) als interessanter Marker für okkulte Tumorzellen heraus, da es bereits in hyperplastischem Rachenepithel vermehrt gebildet und in Neoplasien bzw. Metastasen ausschließlich von Tumorzellen stark überexprimiert wird. CK8 ist zudem ein interessantes Zielmolekül für Immuntherapien mit mono-

klonalen Antikörpern, da es auf Karzinomzellen ektopisch an der Zelloberfläche lokalisiert. Darüber hinaus zeigten Patienten mit HR-Karzinomen im Vergleich zu gesunden Probanden bereits in sehr frühen Tumorstadien eine deutlich gesteigerte humorale Antwort gegen CK8, was Serumantikörper gegen CK8 zu einem potenziellen zirkulierenden Biomarker in der Frühdiagnose macht.

Zwei weitere AMIDA-TAs, AAA-TOB3 bzw. das hypothetische Protein KIAA1273, werden ebenfalls in HRK überexprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei AAA-TOB3 und KIAA1273 um zwei Isoformen handelt, die von einem Genlocus kodiert, jedoch von zwei unterschiedlichen Promotoren reguliert werden. Beide Isoformen sind Transmembranproteine, die in Mitochondrien lokalisieren und deren Expression direkt von c-Myc reguliert wird.

Eine frühere Studie von Da Cruz (2003) zeigte, dass das murine Homolog von AAA-TOB3 pro-apoptotische Eigenschaften hat, wenn es in humanen Zellen überexprimiert wird. Dies konnte in dieser Arbeit für die humanen Isoformen nicht belegt werden. Im Gegenteil, die Repression der beiden Proteine führte zu einer vermehrten Apoptose. Dies lässt eher auf eine für das Zellwachstum bzw. die Zellproliferation notwendige Funktion dieser beiden Proteine schließen und könnte die Überexpression in Tumoren erklären.

Literaturverzeichnis

- Arlaud, G.J., Gaboriaud, C., Garnier, G., Circolo, A., Thielens, N.M., Budayova-Spano, M., Fontecilla-Camps, J.C. and Volanakis, J.E. (2002) Structure, function and molecular genetics of human and murine C1r. *Immunobiology*, **205**, 365-382.
- Aso, T., Yamazaki, K., Amimoto, K., Kuroiwa, A., Higashi, H., Matsuda, Y., Kitajima, S. and Hatakeyama, M. (2000) Identification and characterization of Elongin A2, a new member of the Elongin family of transcription elongation factors, specifically expressed in the testis. *J Biol Chem*, **275**, 6546-6552.
- Aubry, M., Marineau, C., Zhang, F.R., Zahed, L., Figlewicz, D., Delattre, O., Thomas, G., de Jong, P.J., Julien, J.P. and Rouleau, G.A. (1992) Cloning of six new genes with zinc finger motifs mapping to short and long arms of human acrocentric chromosome 22 (p and q11.2). *Genomics*, **13**, 641-648.
- Bachvaroff, R.J., Miller, F. and Rapaport, F.T. (1980) Appearance of cytoskeletal components on the surface of leukemia cells and of lymphocytes transformed by mitogens and Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 4979-4983.
- Bakker, A.B., Schreurs, M.W., de Boer, A.J., Kawakami, Y., Rosenberg, S.A., Adema, G.J. and Figdor, C.G. (1994) Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma-derived tumor-infiltrating lymphocytes. *J Exp Med*, **179**, 1005-1009.
- Balzar, M., Winter, M.J., de Boer, C.J. and Litvinov, S.V. (1999) The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med*, **77**, 699-712.
- Baselga, J. (2001) Phase I and II clinical trials of trastuzumab. *Ann Oncol*, **12 Suppl 1**, S49-55.
- Berke, Z., Andersen, M.H., Pedersen, M., Fugger, L., Zeuthen, J. and Haurum, J.S. (2000) Peptides spanning the junctional region of both the abl/bcr and the bcr/abl fusion proteins bind common HLA class I molecules. *Leukemia*, **14**, 419-426.
- Boutayeb, A. and Boutayeb, S. (2005) The burden of non communicable diseases in developing countries. *Int J Equity Health*, **4**, 2.
- Bota, D.A. and Davies, K.J.A. (2001) Protein degradation in mitochondria: implications for oxidative stress, aging and disease: a novel etiological classification of mitochondrial proteolytic disorder. *Mitochondrion*, **1**, 33-49.
- Braakhuis, B.J., Snijders, P.J., Keune, W.J., Meijer, C.J., Ruijter-Schippers, H.J., Leemans, C.R. and Brakenhoff, R.H. (2004) Genetic patterns in head and neck cancers that contain or lack transcriptionally active human papillomavirus. *J Natl Cancer Inst*, **96**, 998-1006.

- Brabletz, T., Herrmann, K., Jung, A., Faller, G. and Kirchner, T. (2000) Expression of nuclear beta-catenin and c-myc is correlated with tumor size but not with proliferative activity of colorectal adenomas. *Am J Pathol*, **156**, 865-870.
- Brennan, J.A., Boyle, J.O., Koch, W.M., Goodman, S.N., Hruban, R.H., Eby, Y.J., Couch, M.J., Forastiere, A.A. and Sidransky, D. (1995) Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*, **332**, 712-717.
- Brichard, V.G., Herman, J., Van Pel, A., Wildmann, C., Gaugler, B., Wolfel, T., Boon, T. and Lethe, B. (1996) A tyrosinase nonapeptide presented by HLA-B44 is recognized on a human melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *Eur J Immunol*, **26**, 224-230.
- Brichory, F. M., Misek D. E., Yim A.M., Krause M.C., Giordano T.J., Beer D.G., Hanash S.M. (2001) An immune response manifested by the common occurrence of annexins I and II autoantibodies and high circulating levels of IL-6 in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9824-9829.
- Burchell, J., Taylor-Papadimitriou, J., Boshell, M., Gendler, S. and Duhig, T. (1989) A short sequence, within the amino acid tandem repeat of a cancer-associated mucin, contains immunodominant epitopes. *Int J Cancer*, **44**, 691-696.
- Campa, M.J., Wang, M.Z., Howard, B., Fitzgerald, M.C. and Patz, E.F., Jr. (2003) Protein expression profiling identifies macrophage migration inhibitory factor and cyclophilin a as potential molecular targets in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, **63**, 1652-1656.
- 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.
- Chikamatsu, K., Eura, M., Nakano, K., Masuyama, K. and Ishikawa, T. (1995) Functional and T cell receptor gene usage analysis of cytotoxic T lymphocytes in fresh tumor-infiltrating lymphocytes from human head and neck cancer. *Jpn J Cancer Res*, **86**, 477-483.
- Chu, Y.W., Runyan, R.B., Oshima, R.G. and Hendrix, M.J. (1993) Expression of complete keratin filaments in mouse L cells augments cell migration and invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 4261-4265.
- Copper, M.P., Jovanovic, A., Nauta, J.J., Braakhuis, B.J., de Vries, N., van der Waal, I. and Snow, G.B. (1995) Role of genetic factors in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, **121**, 157-160.
- Coulombe, P.A. and Omary, M.B. (2002) 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 110-122.
- Da Cruz, S., Xenarios, I., Langridge, J., Vilbois, F., Parone, P.A. and Martinou, J.C. (2003) Proteomic analysis of the mouse liver mitochondrial inner membrane. *J Biol Chem*, **278**, 41566-41571.
- de la Guardia, C., Casiano, C.A., Trinidad-Pinedo, J. and Baez, A. (2001) CENP-F gene amplification and overexpression in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck*, **23**, 104-112.
- De Plaen, E., Lurquin, C., Van Pel, A., Mariame, B., Szikora, J.P., Wolfel, T., Sibille, C., Chomez, P. and Boon, T. (1988) Immunogenic (tum-) variants of

- mouse tumor P815: cloning of the gene of tum- antigen P91A and identification of the tum- mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 2274-2278.
- 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.
- Disis, M.L., Calenoff, E., McLaughlin, G., Murphy, A.E., Chen, W., Groner, B., Jeschke, M., Lydon, N., McGlynn, E., Livingston, R.B. and et al. (1994) Existent T-cell and antibody immunity to HER-2/neu protein in patients with breast cancer. *Cancer Res*, **54**, 16-20.
- Dreger, M., Bengtsson, L., Schoneberg, T., Otto, H. and Hucho, F. (2001) Nuclear envelope proteomics: novel integral membrane proteins of the inner nuclear membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 11943-11948.
- Enepekides, D.J., Sultanem, K., Nguyen, C., Shenouda, G., Black, M.J. and Rochon, L. (1999) Occult cervical metastases: immunoperoxidase analysis of the pathologically negative neck. *Otolaryngol Head Neck Surg*, **120**, 713-717.
- Erickson, R.P., Zwingman, T. and Ao, A. (1993) Gene expression, X-inactivation, and methylation during spermatogenesis: the case of Zfa, Zfx, and Zfy in mice. *Mol Reprod Dev*, **35**, 114-120.
- Falk, K., Rotzschke, O., Deres, K., Metzger, J., Jung, G. and Rammensee, H.G. (1991) Identification of naturally processed viral nonapeptides allows their quantification in infected cells and suggests an allele-specific T cell epitope forecast. *J Exp Med*, **174**, 425-434.
- Ferlito, A., Devaney, K.O., Devaney, S.L. and Rinaldo, A. (2001) What is the incidence of occult metastasis in patients with stage N(0) cancers of the head and neck? *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, **63**, 1-5.
- Foulkes, W.D., Brunet, J.S., Sieh, W., Black, M.J., Shenouda, G. and Narod, S.A. (1996) Familial risks of squamous cell carcinoma of the head and neck: retrospective case-control study. *Bmj*, **313**, 716-721.
- Fukunaga, Y., Bando, S., Fujita, J., Yang, Y., Ueda, Y., Hojo, S., Dohmoto, K., Tojo, Y., Takahara, J. and Ishida, T. (2002) Expression of cytokeratin 8 in lung cancer cell lines and measurement of serum cytokeratin 8 in lung cancer patients. *Lung Cancer*, **38**, 31-38.
- Gath, H.J. and Brakenhoff, R.H. (1999) Minimal residual disease in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev*, **18**, 109-126.
- Gharib, T.G., Chen, G., Wang, H., Huang, C.C., Prescott, M.S., Shedden, K., Misek, D.E., Thomas, D.G., Giordano, T.J., Taylor, J.M., Kardia, S., Yee, J., Orringer, M.B., Hanash, S. and Beer, D.G. (2002) Proteomic analysis of cytokeratin isoforms uncovers association with survival in lung adenocarcinoma. *Neoplasia*, **4**, 440-448.
- Gires, O., Andratschke, M., Schmitt, B., Mack, B. and Schaffrik, M. (2005) Cytokeratin 8 associates with the external leaflet of plasma membranes in tumour cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **328**, 1154-1162.
- Grandis, J.R. and Twardy, D.J. (1993) TGF-alpha and EGFR in head and neck cancer. *J Cell Biochem Suppl*, **17F**, 188-191.
- Hanada, K., Yewdell, J.W. and Yang, J.C. (2004) Immune recognition of a human renal cancer antigen through post-translational protein splicing. *Nature*, **427**, 252-256.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57-70.

- Hembrough, T.A., Li, L. and Gonias, S.L. (1996) Cell-surface cytokeratin 8 is the major plasminogen receptor on breast cancer cells and is required for the accelerated activation of cell-associated plasminogen by tissue-type plasminogen activator. *J Biol Chem*, **271**, 25684-25691.
- Hembrough, T.A., Vasudevan, J., Allietta, M.M., Glass, W.F., 2nd and Gonias, S.L. (1995) A cytokeratin 8-like protein with plasminogen-binding activity is present on the external surfaces of hepatocytes, HepG2 cells and breast carcinoma cell lines. *J Cell Sci*, **108 (Pt 3)**, 1071-1082.
- Hounsell, E.F., Young, M. and Davies, M.J. (1997) Glycoprotein changes in tumours: a renaissance in clinical applications. *Clin Sci (Lond)*, **93**, 287-293.
- Hsu, S.M., Raine, L. and Fanger, H. (1981) The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol*, **75**, 816-821.
- Hynes, N.E. and Stern, D.F. (1994) The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta*, **1198**, 165-184.
- Jager, E., Chen, Y.T., Drijfhout, J.W., Karbach, J., Ringhoffer, M., Jager, D., Arand, M., Wada, H., Noguchi, Y., Stockert, E., Old, L.J. and Knuth, A. (1998) Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *J Exp Med*, **187**, 265-270.
- Kamath, R.S., Fraser, A.G., Dong, Y., Poulin, G., Durbin, R., Gotta, M., Kanapin, A., Le Bot, N., Moreno, S., Sohrmann, M., Welchman, D.P., Zipperlen, P. and Ahringer, J. (2003) Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature*, **421**, 231-237.
- Kawakami, Y., Fujita, T., Matsuzaki, Y., Sakurai, T., Tsukamoto, M., Toda, M. and Sumimoto, H. (2004) Identification of human tumor antigens and its implications for diagnosis and treatment of cancer. *Cancer Sci*, **95**, 784-791.
- Klade, C.S., Voss, T., Krystek, E., Ahorn, H., Zatloukal, K., Pummer, K. and Adolf, G.R. (2001) Identification of tumor antigens in renal cell carcinoma by serological proteome analysis. *Proteomics*, **1**, 890-898.
- Kobayashi, S., Tanaka, T., Matsuyoshi, N. and Imamura, S. (1996) Keratin 9 point mutation in the pedigree of epidermolytic hereditary palmoplantar keratoderma perturbs keratin intermediate filament network formation. *FEBS Lett*, **386**, 149-155.
- Korsching, E., Packeisen, J., Agelopoulos, K., Eisenacher, M., Voss, R., Isola, J., van Diest, P.J., Brandt, B., Boecker, W. and Buerger, H. (2002) Cytogenetic alterations and cytokeratin expression patterns in breast cancer: integrating a new model of breast differentiation into cytogenetic pathways of breast carcinogenesis. *Lab Invest*, **82**, 1525-1533.
- Lacroix-Desmazes, S., Kaveri, S.V., Mouthon, L., Ayoub, A., Malanchere, E., Coutinho, A. and Kazatchkine, M.D. (1998) Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals. *J Immunol Methods*, **216**, 117-137.
- Lang, S., Wollenberg, B., Dellian, M., Steuer-Vogt, M.K., Schwenzler, K., Sautier, W., Chucholowski, M., Eckel, R., Faas, I., Wilmes, E., Ehrenfeld, M., Arnold, W., Kastenbauer, E. and Holzel, D. (2002) [Clinical and epidemiological data of patients with malignomas of the head and neck]. *Laryngorhinootologie*, **81**, 499-508.

- Lang, S. and Zeidler, R. (2003) Immune restoration in head and neck cancer patients via cyclooxygenase inhibition: an update. *Int J Immunopathol Pharmacol*, **16**, 41-48.
- Langer, T., Kaser, M., Klanner, C. and Leonhard, K. (2001) AAA proteases of mitochondria: quality control of membrane proteins and regulatory functions during mitochondrial biogenesis. *Biochem Soc Trans*, **29**, 431-436.
- Levine, A.J. (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, **88**, 323-331.
- Leyva, J.A., Bianchet, M.A. and Amzel, L.M. (2003) Understanding ATP synthesis: structure and mechanism of the F1-ATPase (Review). *Mol Membr Biol*, **20**, 27-33.
- Liao, D.J. and Dickson, R.B. (2000) c-Myc in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*, **7**, 143-164.
- Liggett, W.H., Jr. and Sidransky, D. (1998) Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *J Clin Oncol*, **16**, 1197-1206.
- Long, G.L., Chandra, T., Woo, S.L., Davie, E.W. and Kurachi, K. (1984) Complete sequence of the cDNA for human alpha 1-antitrypsin and the gene for the S variant. *Biochemistry*, **23**, 4828-4837.
- Lupas, A.N. and Martin, J. (2002) AAA proteins. *Curr Opin Struct Biol*, **12**, 746-753.
- Mamula, M.J., Gee, R.J., Elliott, J.I., Sette, A., Southwood, S., Jones, P.J. and Blier, P.R. (1999) Isoaspartyl post-translational modification triggers autoimmune responses to self-proteins. *J Biol Chem*, **274**, 22321-22327.
- Mandruzzato, S., Brasseur, F., Andry, G., Boon, T. and van der Bruggen, 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., Beauduin, M., Dietrich, P.Y., Russo, V., Kerger, J., Masucci, G., Jager, E., De Greve, J., Atzpodien, J., Brasseur, F., Coulie, P.G., van der Bruggen, P. and Boon, T. (1999) Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int J Cancer*, **80**, 219-230.
- McLaughlin, P. (2001) Rituximab: perspective on single agent experience, and future directions in combination trials. *Crit Rev Oncol Hematol*, **40**, 3-16.
- Meza-Zepeda, L.A., Forus, A., Lygren, B., Dahlberg, A.B., Godager, L.H., South, A.P., Marenholz, I., Lioumi, M., Florenes, V.A., Maelandsmo, G.M., Serra, M., Mischke, D., Nizetic, D., Ragoussis, J., Tarkkanen, M., Nesland, J.M., Knuutila, S. and Myklebost, O. (2002) Positional cloning identifies a novel cyclophilin as a candidate amplified oncogene in 1q21. *Oncogene*, **21**, 2261-2269.
- Mintz, P.J., Kim, J., Do, K.A., Wang, X., Zinner, R.G., Cristofanilli, M., Arap, M.A., Hong, W.K., Troncoso, P., Logothetis, C.J., Pasqualini, R. and Arap, W. (2003) Fingerprinting the circulating repertoire of antibodies from cancer patients. *Nat Biotechnol*, **21**, 57-63.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, **65**, 55-63.

- Nagase, T., Kikuno, R. and Ohara, O. (2001) Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XXI. The complete sequences of 60 new cDNA clones from brain which code for large proteins. *DNA Res*, **8**, 179-187.
- Nagpal, J.K. and Das, B.R. (2003) Oral cancer: reviewing the present understanding of its molecular mechanism and exploring the future directions for its effective management. *Oral Oncol*, **39**, 213-221.
- Nagy, B., Lundan, T., Larramendy, M.L., Aalto, Y., Zhu, Y., Niini, T., Edgren, H., Ferrer, A., Vilpo, J., Elonen, E., Vettenranta, K., Franssila, K. and Knuutila, S. (2003) Abnormal expression of apoptosis-related genes in haematological malignancies: overexpression of MYC is poor prognostic sign in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol*, **120**, 434-441.
- Nguyen, D.C., Parsa, B., Close, A., Magnusson, B., Crowe, D.L. and Sinha, U.K. (2003) Overexpression of cell cycle regulatory proteins correlates with advanced tumor stage in head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Oncol*, **22**, 1285-1290.
- Ogura, T. and Wilkinson, A.J. (2001) AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function. *Genes Cells*, **6**, 575-597.
- Ohguro, H., Ogawa, K., Maeda, T., Maeda, A. and Maruyama, I. (1999) Cancer-associated retinopathy induced by both anti-recoverin and anti-hsc70 antibodies in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **40**, 3160-3167.
- Osoba, D., Slamon, D.J., Burchmore, M. and Murphy, M. (2002) Effects on quality of life of combined trastuzumab and chemotherapy in women with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, **20**, 3106-3113.
- Overwijk, W.W., Theoret, M.R., Finkelstein, S.E., Surman, D.R., de Jong, L.A., Vyth-Dreese, F.A., DelleMijn, T.A., Antony, P.A., Spiess, P.J., Palmer, D.C., Heimann, D.M., Klebanoff, C.A., Yu, Z., Hwang, L.N., Feigenbaum, L., Kruisbeek, A.M., Rosenberg, S.A. and Restifo, N.P. (2003) Tumor regression and autoimmunity after reversal of a functionally tolerant state of self-reactive CD8+ T cells. *J Exp Med*, **198**, 569-580.
- Pajic, A., Spitkovsky, D., Christoph, B., Kempkes, B., Schuhmacher, M., Staeger, M.S., Brielmeier, M., Ellwart, J., Kohlhuber, F., Bornkamm, G.W., Polack, A. and Eick, D. (2000) Cell cycle activation by c-myc in a burkitt lymphoma model cell line. *Int J Cancer*, **87**, 787-793.
- Pauli, C., Munz, M., Kieu, C., Mack, B., Breinl, P., Wollenberg, B., Lang, S., Zeidler, R. and Gires, O. (2003) Tumor-specific glycosylation of the carcinoma-associated epithelial cell adhesion molecule EpCAM in head and neck carcinomas. *Cancer Lett*, **193**, 25-32.
- Peracaula, R., Tabares, G., Royle, L., Harvey, D.J., Dwek, R.A., Rudd, P.M. and de Llorens, R. (2003) Altered glycosylation pattern allows the distinction between prostate-specific antigen (PSA) from normal and tumor origins. *Glycobiology*, **13**, 457-470.
- Perry, S.V. (2001) Vertebrate tropomyosin: distribution, properties and function. *J Muscle Res Cell Motil*, **22**, 5-49.
- Phan, G.Q., Yang, J.C., Sherry, R.M., Hwu, P., Topalian, S.L., Schwartzentruber, D.J., Restifo, N.P., Haworth, L.R., Seipp, C.A., Freezer, L.J., Morton, K.E., Mavroukakis, S.A., Duray, P.H., Steinberg, S.M., Allison, J.P., Davis, T.A. and Rosenberg, S.A. (2003) Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 8372-8377.

- Piano, F., Schetter, A.J., Morton, D.G., Gunsalus, K.C., Reinke, V., Kim, S.K. and Kempfues, K.J. (2002) Gene clustering based on RNAi phenotypes of ovary-enriched genes in *C. elegans*. *Curr Biol*, **12**, 1959-1964.
- Polack, A., Hortnagel, K., Pajic, A., Christoph, B., Baier, B., Falk, M., Mautner, J., Geltinger, C., Bornkamm, G.W. and Kempkes, B. (1996) c-myc activation renders proliferation of Epstein-Barr virus (EBV)-transformed cells independent of EBV nuclear antigen 2 and latent membrane protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 10411-10416.
- Poschl, G. and Seitz, H.K. (2004) Alcohol and cancer. *Alcohol Alcohol*, **39**, 155-165.
- Quon, H., Liu, F.F. and Cummings, B.J. (2001) Potential molecular prognostic markers in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck*, **23**, 147-159.
- Rinaldo, A., Devaney, K.O. and Ferlito, A. (2004) Immunohistochemical studies in the identification of lymph node micrometastases in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, **66**, 38-41.
- Riopel, C.L., Butt, I. and Omary, M.B. (1993) Method of cell handling affects leakiness of cell surface labeling and detection of intracellular keratins. *Cell Motil Cytoskeleton*, **26**, 77-87.
- Rodriguez, T., Altieri, A., Chatenoud, L., Gallus, S., Bosetti, C., Negri, E., Franceschi, S., Levi, F., Talamini, R. and La Vecchia, C. (2004) Risk factors for oral and pharyngeal cancer in young adults. *Oral Oncol*, **40**, 207-213.
- Rosenberg, S.A. (2001) Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature*, **411**, 380-384.
- Ross, C.D., Gomaa, M.A., Gillies, E., Juengel, R. and Medina, J.E. (2000) Tumor grade, microvessel density, and activities of malate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, and hexokinase in squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg*, **122**, 195-200.
- Sartor, M., Steingrimsdottir, H., Elamin, F., Gaken, J., Warnakulasuriya, S., Partridge, M., Thakker, N., Johnson, N.W. and Tavassoli, M. (1999) Role of p16/MTS1, cyclin D1 and RB in primary oral cancer and oral cancer cell lines. *Br J Cancer*, **80**, 79-86.
- Scanlan, M.J., Welt, S., Gordon, C.M., Chen, Y.T., Gure, A.O., Stockert, E., Jungbluth, A.A., Ritter, G., Jager, D., Jager, E., Knuth, A. and Old, L.J. (2002) Cancer-related serological recognition of human colon cancer: identification of potential diagnostic and immunotherapeutic targets. *Cancer Res*, **62**, 4041-4047.
- Schlichtholz, B., Legros, Y., Gillet, D., Gaillard, C., Marty, M., Lane, D., Calvo, F. and Soussi, T. (1992) The immune response to p53 in breast cancer patients is directed against immunodominant epitopes unrelated to the mutational hot spot. *Cancer Res*, **52**, 6380-6384.
- Schneider, C., Newman, R.A., Sutherland, D.R., Asser, U. and Greaves, M.F. (1982) A one-step purification of membrane proteins using a high efficiency immunomatrix. *J Biol Chem*, **257**, 10766-10769.
- Scott, A.M. and Welt, S. (1997) Antibody-based immunological therapies. *Curr Opin Immunol*, **9**, 717-722.
- Seliger, B. and Kellner, R. (2002) Design of proteome-based studies in combination with serology for the identification of biomarkers and novel targets. *Proteomics*, **2**, 1641-1651.

- Shah, Z.H., Hakkaart, G.A., Arku, B., de Jong, L., van der Spek, H., Grivell, L.A. and Jacobs, H.T. (2000) The human homologue of the yeast mitochondrial AAA metalloprotease Yme1p complements a yeast yme1 disruptant. *FEBS Lett*, **478**, 267-270.
- Shin, D.M., Donato, N.J., Perez-Soler, R., Shin, H.J., Wu, J.Y., Zhang, P., Lawhorn, K., Khuri, F.R., Glisson, B.S., Myers, J., Clayman, G., Pfister, D., Falcey, J., Waksal, H., Mendelsohn, J. and Hong, W.K. (2001) Epidermal growth factor receptor-targeted therapy with C225 and cisplatin in patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res*, **7**, 1204-1213.
- Sidransky, D. (2002) Emerging molecular markers of cancer. *Nat Rev Cancer*, **2**, 210-219.
- Sisk, E.A., Soltys, S.G., Zhu, S., Fisher, S.G., Carey, T.E. and Bradford, C.R. (2002) Human papillomavirus and p53 mutational status as prognostic factors in head and neck carcinoma. *Head Neck*, **24**, 841-849.
- Spiotto, M.T., Fu, Y.X. and Schreiber, H. (2003) Tumor immunity meets autoimmunity: antigen levels and dendritic cell maturation. *Curr Opin Immunol*, **15**, 725-730.
- Spiotto, M.T., Yu, P., Rowley, D.A., Nishimura, M.I., Meredith, S.C., Gajewski, T.F., Fu, Y.X. and Schreiber, H. (2002) Increasing tumor antigen expression overcomes "ignorance" to solid tumors via crosspresentation by bone marrow-derived stromal cells. *Immunity*, **17**, 737-747.
- Spitz, M.R. (1994) Epidemiology and risk factors for head and neck cancer. *Semin Oncol*, **21**, 281-288.
- Taylor, D., Koch, W.M., Zahurak, M., Shah, K., Sidransky, D. and Westra, W.H. (1999) Immunohistochemical detection of p53 protein accumulation in head and neck cancer: correlation with p53 gene alterations. *Hum Pathol*, **30**, 1221-1225.
- Toivola, D.M., Ku, N.O., Resurreccion, E.Z., Nelson, D.R., Wright, T.L. and Omary, M.B. (2004) Keratin 8 and 18 hyperphosphorylation is a marker of progression of human liver disease. *Hepatology*, **40**, 459-466.
- Usener, D., Schadendorf, D., Koch, J., Dubel, S. and Eichmuller, S. (2003) cTAGE: a cutaneous T cell lymphoma associated antigen family with tumor-specific splicing. *J Invest Dermatol*, **121**, 198-206.
- Vaidya, M.M., Sawant, S.S., Borges, A.M., Naresh, N.K., Purandare, M.C. and Bhisey, A.N. (2000) Cytokeratin expression in human fetal tongue and buccal mucosa. *J Biosci*, **25**, 235-242.
- Van den Eynde, B.J. and Boon, T. (1997) Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Int J Clin Lab Res*, **27**, 81-86.
- van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A. and Boon, T. (1991) A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, **254**, 1643-1647.
- van Oijen, M.G., van de Craats, J.G. and Slootweg, P.J. (1999) p53 overexpression in oral mucosa in relation to smoking. *J Pathol*, **187**, 469-474.
- Vernham, G.A. and Crowther, J.A. (1994) Head and neck carcinoma--stage at presentation. *Clin Otolaryngol*, **19**, 120-124.
- Vokes, E.E., Weichselbaum, R.R., Lippman, S.M. and Hong, W.K. (1993) Head and neck cancer. *N Engl J Med*, **328**, 184-194.

- Wang, K., Knipfer, M., Huang, Q.Q., van Heerden, A., Hsu, L.C., Gutierrez, G., Quian, X.L. and Stedman, H. (1996) Human skeletal muscle nebulin sequence encodes a blueprint for thin filament architecture. Sequence motifs and affinity profiles of tandem repeats and terminal SH3. *J Biol Chem*, **271**, 4304-4314.
- Witzig, T.E., Gordon, L.I., Cabanillas, F., Czuczman, M.S., Emmanouilides, C., Joyce, R., Pohlman, B.L., Bartlett, N.L., Wiseman, G.A., Padre, N., Grillo-Lopez, A.J., Multani, P. and White, C.A. (2002) Randomized controlled trial of yttrium-90-labeled ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy versus rituximab immunotherapy for patients with relapsed or refractory low-grade, follicular, or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*, **20**, 2453-2463.
- Xue, C., Takahashi, M., Hasunuma, T., Aono, H., Yamamoto, K., Yoshino, S., Sumida, T. and Nishioka, K. (1997) Characterisation of fibroblast-like cells in pannus lesions of patients with rheumatoid arthritis sharing properties of fibroblasts and chondrocytes. *Ann Rheum Dis*, **56**, 262-267.
- Young, M.R. (2004) Trials and tribulations of immunotherapy as a treatment option for patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Immunol Immunother*, **53**, 375-382.
- Yu, Y., Dong, W., Li, X., Yu, E., Zhou, X. and Li, S. (2003) Significance of c-Myc and Bcl-2 protein expression in nasopharyngeal carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, **129**, 1322-1326.
- Zeller, K.I., Jegga, A.G., Aronow, B.J., O'Donnell, K.A. and Dang, C.V. (2003) An integrated database of genes responsive to the Myc oncogenic transcription factor: identification of direct genomic targets. *Genome Biol*, **4**, R69.

Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
a	anti
AAA	ATPase associated with various cellular functions
AK	Antikörper
AMIDA	auto-antibody mediated identification of antigens
APC	antigenpräsentierende Zelle
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
AS	antisens
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BPB	Bromphenolblau
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
CEA	<i>carcinoembryonic antigen</i>
Chr	Chromosom
CK	Zytokeratin
CMV	Cytomegalovirus
CT	Cancer-Testis
CTA	Cancer-Testis Antigene
CTLA-4	zytotoxisches T-Zell assoziiertes Antigen 4
CYP2E1	Cytochrom P450 2E1
d.h.	das heißt
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIG	Digoxigenin
DMEM	<i>Dulbecco 's modified eagle medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTE	Dithioerythriol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBV	Ebstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiaminessigsäure
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	Enzymimmunoassay
EpCAM	<i>epidermal cell adhesion molecule</i>
EST	<i>expressed sequence tag</i>
FACS	<i>fluorescence-aktiviert cell sorter</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fötale Kälberserum
FSC	<i>forward-scatter</i>
FtsH	<i>Filamentation temperatur sensitive Homologe</i>

g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyde-3-phosphat Dehydrogenase
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HNO	Hals-Nasen-Ohren
HPV	Humanes Papillomavirus
HR	Hals-Rachen
HRK	Hals-Rachen-Karzinom
HRP	Meerrettichperoxidase
i.e.	<i>in exemplum</i>
IEF	isoelektische Fokussierung
IEP	isoelektischer Punkt
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP	Immunopräzipitation
IPG	immobilisierter pH Gradient
IRES	interne Ribosomen-Eintrittsstellen
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung
Kat.Nr.	Katalog Nummer
kDa	Kilodalton
KL	komplettes Zelllysat
l	Liter
LB	Luria Broth
LKM	Lymphknotenmetastase
LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
M	Molar
m	milli
mA	Milliamper
mAK	monoklonaler Antikörper
MALDI-ToF	Matrix-unterstütztes Laserdesorptions-/Ionisations-Massenpektrometer (Flugzeitmassenspektrometer)
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i>
mg	Mikrogramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
ml	Mikroliter
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MRD	<i>minimal residual disease</i>
Mw	Molekulargewicht
NAA	natürliche Autoantikörper
ng	Nanogramm
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
Nr.	Nummer
OD	optische Dichte
OP	Operation

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMCs	periphere mononukleäre Leukozyten
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
RACE	<i>rapid analysis of c-terminal ends</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
s	Sekunde
S	sense
SCC	<i>squamous cell carcinoma antigen</i>
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SEREX	<i>serological identification of antigens by recombinant expression cloning</i>
siRNA	<i>small interference RNA</i>
SRH	<i>second region of homology</i>
SSC	<i>sideward-scatter</i>
SV40	<i>simian virus 40</i>
TA	Tumorantigen
TILs	tumorinfiltrierende Lymphozyten
TNM	Tumorstadien, T bezieht sich auf die Tumorgroße, N auf den Lymphknotenbefall und M auf Fernmetastasen
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
TSG	Tumorsuppressorgen
TSS	Transkriptionsstart
U	Unit
u.a.	unter anderem
ÜS	Überstand
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
W	Watt
WHO	Weltgesundheitsorganisation
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
Yme1-L	<i>yeast mitochondrial escape 1-Like</i>
z.B.	zum Beispiel

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die mich während dieser Arbeit unterstützten. Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Dr. Olivier Gires für die interessante Themenstellung, die gute Betreuung, seine ständige Diskussionsbereitschaft, die äußerst motivierende Unterstützung bei allen Fragen und Problemen und die kritische Durchsicht dieser Arbeit. Nicht zu vergessen, für die ungewöhnlichen Einblicke in interessante Kunstrichtungen und Freizeitgestaltungen.

Herrn Prof. Dr. Michael Meisterernst für die freundliche Bereitschaft diese Arbeit als Gutachter zu betreuen.

Frau Brigitte Mack für ihre unschätzbare Unterstützung bei Zellfärbungen jeglicher Art und ihrer unerschütterlichen guten Laune.

Herrn Jens Rauch, Herrn Martin Ahlemann und Herrn Dr. Marcus Münz für die erfolgreiche Teamarbeit und die vielen fruchtbaren Diskussionen.

Frau Dr. med. Suna Schmitz, Frau Dr. med. Michaela Andratschke und Herrn Prof. Dr. med. Stefan Lang für die Bereitstellung von Patientenmaterial.

Der Gruppe Moosmann, Eick, Hammerschmidt, Bohlander, Bornkamm und Meisterernst und vielen anderen GSF-Mitgliedern, insbesondere Herrn Dr. Marcus Conrad, Frau Dr. Heike Beck und Herrn Dr. Rob Chapman für die freundliche Erlaubnis zahlreiche Geräte benutzen zu dürfen, außerdem für diverse Vektoren, Zelllinien, Antikörper und viele wertvolle methodische Tipps und konstruktive Kritik.

Allen Hühnertreffmitgliedern für die aufschlussreichen und äußerst interessanten Informationen.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für das nette und lustige Arbeitsklima, die guten Diskussionen und die große Hilfsbereitschaft, besonders Tanja und Martin für die Zweisamkeit im Kämmerlein, die innovativen Geschäftsideen und die entspannende Musik, Jens und Martin für das gemeinsame Durchschreiten von Höhen und Tiefen, die Motivationshilfen und die kreative Auseinandersetzung mit meinen Extremmomenten, außerdem Markus, Marcus und Andrea für das Ertragen bei Berg-Grenzerfahrungen, die mich stets wieder mit Freude den Laboralltag genießen ließen.

Außerdem bedanke ich mich bei Marcus, Binky, Zecke, allen anderen großen LA- und kleinen WA-Mädels, für das Ertragen meiner Launen und die lustige Zeit außerhalb des Labors. Sowie Rob und Wurschti für das einfühlsame Trösten meiner Mädels in der Not.

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Martina Schaffrik
Geburtsdatum: 23.05.1975
Geburtsort: Landshut
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Wohnort: Untere Weidenstr. 21
81543 München

Schulbildung/Studium:

seit März 2002 Dissertation in der Forschungsabteilung der Hals-, Nasen- und Ohrenklinik des Klinikums Großhadern, München

2000 - 2001 wissenschaftliche Angestellte am Lehrstuhl für Biotechnologie an der Technischen Universität München (Prof. Dr. J. Buchner)

2000 Diplomarbeit am Lehrstuhl für pharmazeutische Chemie der Universität Regensburg (Prof. Dr. A. Buschauer) mit Veröffentlichung eines Teils der Ergebnisse in *J Clin Invest* (2002), Highlight in *Nature Reviews Cancer* (2002)

1994 - 2000 Studium der Chemie an der Universität Regensburg

1994 Schulabschluss mit der allgemeinen Hochschulreife (Abitur)

1985-1994 Gymnasium Seligenthal in Landshut

1981-1985 Grund- und Hauptschule in Landshut