

Dissertation der  
Fakultät für Biologie der  
Ludwig-Maximilians-Universität  
München

**Identifizierung, Validierung und  
Charakterisierung von Tumorantigenen in  
Karzinomen des Kopf-Halsbereichs**

vorgelegt von

Jens Martin Ahlemann

aus

Tübingen

München 17. März 2006

Promotionsgesuch eingereicht am 17. März 2006

Tag der mündlichen Prüfung 28. Juli 2006

Erste Gutachterin

PD Dr. Bettina Kempkes

Zweite Gutachterin

Prof. Dr. Elisabeth Weiß

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Ich habe weder anderweitig versucht, eine Dissertation einzureichen oder eine Doktorprüfung durchzuführen, noch habe ich diese Dissertation oder Teile derselben einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

Jens Martin Ahlemann

München 17. März 2006

Teile dieser Arbeit wurden publiziert:

**Ahlemann, M.**, Zeidler, R., Lang, S., Brigitte Mack, B., Münz, M. and Gires, O. (2006) Carcinoma Associated eIF3i Over-Expression Facilitates mTOR-dependent Growth Transformation. *Molecular Carcinogenesis*, accepted

**Ahlemann, M.**, Schmitt, B., Stieber, P., Gires, O., Lang, S. and Zeidler, R. (2006) Evaluation of CK8-specific autoantibodies as a biomarker for carcinoma of distinct localizations. *Anticancer research*, **26**, 783-790.

\*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*, **323**, 156-162.

\*Gires, O., \*Munz, M., \*Schaffrik, M., Kieu, C., Rauch, J., **Ahlemann, M.**, Eberle, D., Mack, B., Wollenberg, B., Lang, S., Hofmann, T., Hammerschmidt, W. and Zeidler, R. (2004) Profile identification of disease-associated humoral antigens using AMIDA, a novel proteomics-based technology. *Cell Mol Life Sci*, **61**, 1198-1207.

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

*für meine Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>I</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>IV</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>VI</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1 TUMORE DES KOPF-HALSBEREICHS .....	2
1.1.1 <i>Epidemiologie</i> .....	2
1.1.2 <i>Diagnose und Prognose</i> .....	2
1.2 BIOMARKER FÜR TUMORE .....	3
1.2.1 <i>Klassen von Biomarkern</i> .....	4
1.2.2 <i>Biomarker bei Früherkennung und Therapiestrategien</i> .....	6
1.2.3 <i>Entwicklung von Biomarkern</i> .....	7
1.3 KARZINOGENESE .....	8
1.4 INTERAKTION VON IMMUNSYSTEM UND TUMOR .....	10
1.4.1 <i>Immunsystem: Freund oder Feind</i> .....	10
1.4.2 <i>Tumorantigene</i> .....	13
1.5 STRATEGIEN ZUR IDENTIFIZIERUNG VON TUMORANTIGENEN.....	15
1.5.1 <i>Verwendung der zellulären Antwort zur Identifizierung von Tumorantigenen</i> .....	16
1.5.2 <i>Verwendung der humoralen Antwort zur Identifizierung von Tumorantigenen</i> .....	16
1.5.3 <i>Strategien zur Tumorantigenidentifizierung im Vergleich</i> .....	17
1.6 ZIELSETZUNG.....	18
<b>2 MATERIAL</b> .....	<b>19</b>
2.1 REAGENZIEEN, VERBRAUCHSMATERIALEN UND GERÄTE.....	19
2.1.1 <i>Reagenzien</i> .....	19
2.1.2 <i>Verbrauchsmaterialien</i> .....	22
2.1.3 <i>Geräte</i> .....	23
2.1.4 <i>Dienstleistungen</i> .....	24
2.2 ANTIKÖRPER .....	24
2.3 BAKTERIEN .....	25
2.4 PLASMIDE.....	25
2.5 ZELLINIEN .....	27
2.6 OLIGONUKLEOTIDE .....	27

<b>3</b>	<b>METHODEN</b> .....	<b>19</b>
3.1	ZELLKULTUR .....	29
3.1.1	<i>Kultivierung permanenter Zelllinien</i> .....	29
3.1.2	<i>Aufbewahrung von Zelllinien</i> .....	29
3.1.3	<i>Zellzahlbestimmung</i> .....	30
3.1.4	<i>Transfektion</i> .....	30
3.1.5	<i>MTT-Assay</i> .....	30
3.1.6	<i>FACS-Analysen</i> .....	31
3.1.7	<i>Koloniebildungsexperimente</i> .....	31
3.2	BAKTERIENKULTUR.....	31
3.2.1	<i>Vermehrung und Aufbewahrung</i> .....	31
3.2.2	<i>Transformation</i> .....	32
3.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....	32
3.3.1	<i>Allgemein verbreitetet Techniken</i> .....	32
3.3.2	<i>RNA-Isolierung</i> .....	32
3.3.3	<i>Reverse Transkription</i> .....	33
3.3.4	<i>Polymerasekettenreaktion (PCR)</i> .....	33
3.4	IMMUNPRÄZIPITATION.....	34
3.4.1	<i>Analytische Immunpräzipitation</i> .....	34
3.4.2	<i>Präparative Immunpräzipitation für die zewidimensionale Gelelektrophorese</i> .....	34
3.5	ZWEIDIMENSIONALE POLYACRYLAMIDGELEKTROPHORESE .....	35
3.5.1	<i>Isolelektrische Fokussierung</i> .....	35
3.5.2	<i>Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelktrophorese</i> .....	36
3.5.3	<i>Silberfärbung</i> .....	36
3.6	PROTEIN-ANALYSE ÜBER MALDI-TOF .....	37
3.6.1	<i>Tryptischer Verdau</i> .....	37
3.6.2	<i>Konzentrierung des tryptischen Verdaus / Kristallisierung auf Anker-Metallplatten</i> .....	38
3.6.3	<i>MALDI-ToF Analyse</i> .....	38
3.7	IMMUNOBLOT .....	39
3.8	IMMUNHISTOCHEMISCHE SCHNITTFÄRBUNG .....	39
3.9	REKOMBINANTE PROTEINEXPRESSION .....	40
3.9.1	<i>Expression</i> .....	40
3.9.2	<i>Aufreinigung</i> .....	40
3.10	QUANTIFIZIERUNG HUMORALER IMMUNANTWORTEN .....	41
3.10.1	<i>Quantifizierung der humoralen Immunantwort gegen e-FABP</i> .....	41
3.10.2	<i>Quantifizierung der humoralen Immunantwort gegen CK8</i> .....	42
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>43</b>
4.1	IDENTIFIZIERUNG POTENTIELLER NEUER TUMORANTIGENE IN PLATTENEPIHELKARZINOMEN DES KOPF-HALSBEREICHS.....	43
4.1.1	<i>Entwicklung einer allogenen proteinbiochemischen Technologie zur Isolierung und Identifizierung von Tumorantigenen</i> .....	43

4.1.2	<i>Isolierung und Identifizierung potentieller Tumorantigene in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halsbereichs</i> .....	49
4.2	VALIDIERUNG DER ALLOGENEN AMIDA-TECHNOLOGIE .....	50
4.2.1	<i>In vivo Expression identifizierter potentieller Tumorantigene</i> .....	51
4.2.2	<i>Validierung der humoralen Antwort bei Patienten mit Karzinomen des Hals-Kopfbereiches gegen das AMIDA-Antigen e-FABP</i> .....	54
4.3	EVALUIERUNG DER HUMORALEN ANTWORT GEGEN DAS AMIDA-ANTIGEN CK8 ALS KLINISCHER BIOMARKER FÜR PLATTENEPIHELKARZINOME .....	56
4.4	FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DES ALLO-AMIDA ANTIGENS eIF3S2 .....	64
4.4.1	<i>Suppression der eIF3S2 Expression mittels siRNA</i> .....	65
4.4.2	<i>Einfluss der eIF3S2 Repression auf Metabolismus und Proliferation</i> .....	67
4.4.3	<i>Einfluss der eIF3S2 Repression auf die Zellgröße</i> .....	69
4.4.4	<i>eIF3S2 Repression verhindert die Koloniebildung von HeLa Zellen in Suspension</i> .....	70
4.4.5	<i>Rekombinante Überexpression eIF3S2</i> .....	71
4.4.6	<i>Einfluss der eIF3S2 Überexpression auf Proliferation und Metabolismus</i> .....	73
4.4.7	<i>eIF3S2 Überexpression verkürzt die G1-Phase des Zellzyklus</i> .....	75
4.4.8	<i>eIF3S2 Überexpression beeinflusst die Zellgröße</i> .....	77
4.4.9	<i>eIF3S2 Überexpression erlaubt NIH3T3 Zellen Adhärenz unabhängiges Wachstum</i> .....	78
4.4.10	<i>Lokalisierung von eIF3S2</i> .....	79
4.4.11	<i>Phosphorylierung eIF3S2</i> .....	83
4.4.12	<i>Identifikation eIF3S2-regulierter Proteine mittels zwei-dimensionaler Gelelektrophorese</i> .....	87
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>89</b>
5.1	ENTWICKLUNG DER ALLO-AMIDA TECHNOLOGIE ZUR IDENTIFIZIERUNG VON TUMORANTIGENEN .....	90
5.2	VALIDIERUNG IDENTIFIZIERTER ANTIGENE .....	92
5.3	DIE HUMORALE ANTWORT GEGEN TUMORANTIGENE ALS BIOMARKER .....	95
5.4	CHARAKTERISIERUNG DES TUMORANTIGENS eIF3S2 .....	97
5.4.1	<i>Verbindung von Metabolismus, Zellgröße und Proliferation mit Proteintranslation</i> .....	98
5.4.2	<i>eIF3S2 Überexpression erlaubt adhäsionsfreies Wachstum</i> .....	101
5.4.3	<i>Regulation von eIF3S2 durch mTOR</i> .....	102
5.4.4	<i>Deregulation der Translation - Quantität versus Qualität</i> .....	104
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>106</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>108</b>
	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>118</b>
	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>122</b>

# Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1.1 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER ANWENDUNGSMÖGLICHKEITEN VON BIOMARKEN IM KLINISCHEN TUMORMANAGEMENT .....	4
ABBILDUNG 1.2 ENTWICKLUNG DER ÜBERLEBENSRATE BEI MAMMAKARZINOMEN IN ABHÄNGIGKEIT DER AUSBREITUNG DES TUMORS BEI ERSTDIAGNOSE IN DEN LETZTEN 25 JAHREN.....	6
ABBILDUNG 1.3 PHASEN DER BIOMARKERENTWICKLUNG.....	7
ABBILDUNG 4.1 FLUSSDIAGRAMM DER ALLOGENEN AMIDA-TECHNOLOGIEN.....	44
ABBILDUNG 4.2 REDUKTION DER PROTEINKOMPLEXITÄT DURCH AMIDA.....	45
ABBILDUNG 4.3 VERGLEICH DER IMMUNOPRÄZIPITATE MIT SERUMANTIKÖRPERN GESUNDER SPENDER UND TUMORPATIENTEN.....	46
ABBILDUNG 4.4 AUSSCHNITTE AUS SILBERGEFÄRBTEN 2D-POLYACRYLAMIDGELN.....	47
ABBILDUNG 4.5 REPRÄSENTATIVES BEISPIEL EINES MALDI-TOF MASSENSPEKTRUMS UND EINER DATENBANKSUCHE. IN DER OBEREN ABBILDUNG IST DAS MALDI-TOF MASSENSPEKTRUM VON HUMANEM E-FABP GEZEIGT.....	48
ABBILDUNG 4.6 ÜBERSICHT IMMUNHISTOCHEMISCHER FÄRBUNGEN VERSCHIEDENER IDENTIFIZIERTER TAS IN GESUNDEM GEWEBE, TUMORGEWEBE UND METASTASEN.....	51
ABBILDUNG 4.7 EIF3S2 EXPRESSION IN GESUNDEM EPITHEL UND TUMORGEWEBE.....	53
ABBILDUNG 4.8 REPRODUZIERBARKEIT DES BIOPLEX-VERFAHRENS ZUR BESTIMMUNG DER SERUMREAKTIVITÄT .....	54
ABBILDUNG 4.9 MESSUNG DER SERUMREAKTIVITÄT GEGEN DAS ALLO-AMIDA ANTIGEN E-FABP GESUNDER PROBANDEN UND PATIENTEN MIT KARZINOMEN DES KOPF-HALSBEREICHS .....	56
ABBILDUNG 4.10 CK8-SERUMREAKTIVITÄT KORRELIERT NICHT MIT DEM ALTER.....	59
ABBILDUNG 4.11 VERTEILUNG DER CK8-SERUMREAKTIVITÄT FÜR SEREN WEIBLICHER, MÄNNLICHER UND ALLER SPENDER.....	59
ABBILDUNG 4.12 VERTEILUNG DER CK8-SERUMREAKTIVITÄT BEI GESUNDEN PROBANDEN (N=59), PATIENTEN MIT BENIGNEN ERKRANKUNGEN (N=353) UND KARZINOM PATIENTEN (N=337).....	61
ABBILDUNG 4.13 VERTEILUNG DER CK8-SERUMREAKTIVITÄT BEI GESUNDEN PROBANDEN (N=59), PATIENTEN MIT BENIGNEN GYNÄKOLOGISCHEN ERKRANKUNGEN (N=50), BENIGNEN ERKRANKUNGEN DES UROGENITALTRAKTES (N=50), ZERVIXKARZINOM (N=23), LEBERKARZINOM (N=30), PANKREASKARZINOM (N=30) UND BRONCHIALKARZINOM (N=33).....	63
ABBILDUNG 4.14 BINDUNGSSTELLEN DER siRNAs INNERHALB DER EIF3S2 MRNA.....	65
ABBILDUNG 4.15 AUSTESTUNG DREIER VERSCHIEDENER siRNAs GEGEN EIF3S2.....	66
ABBILDUNG 4.16 KINETIK DER siRNA-VERMITTELTEN EIF3S2 SUPPRESSION.....	66

ABBILDUNG 4.17 VERMINDERTE METABOLISCHE AKTIVITÄT NACH EIF3S2 REPRESSION.....	67
ABBILDUNG 4.18 VERMINDERTE ZELLZAHL NACH EIF3S2-REPRIMIERUNG.....	68
ABBILDUNG 4.19 EIF3S2-REPRESSION VERKLEINERT DIE ZELLGRÖßE.....	69
ABBILDUNG 4.20 EIF3S2 REPRESSION VERHINDERT KOLONIEBILDUNG VON HeLA ZELLEN IN MC-MEDIUM.....	71
ABBILDUNG 4.21 RT-PCR ANALYSE DER EKTOPISCHEN EIF3S2 ÜBEREXPRESSION IN NIH3T3 UND HeLA ZELLEN.....	72
ABBILDUNG 4.22 IMMUNOBLOT ANALYSE DER EKTOPISCHEN EIF3S2 ÜBEREXPRESSION IN NIH3T3 UND HeLA ZELLEN.....	72
ABBILDUNG 4.23 EIF3S2 ÜBEREXPRESSION ERHÖHT DIE PROLIFERATION IN MURINEN NIH3T3 FIBROBLASTEN UND HUMANEN HeLA ZELLEN.....	73
ABBILDUNG 4.24 EIF3S2 ÜBEREXPRESSION ERHÖHT DEN METABOLISMUS IN NIH3T3 ZELLEN.....	74
ABBILDUNG 4.25 EIF3S2 ÜBEREXPRESSION VERKÜRZT DIE G1 PHASE.....	76
ABBILDUNG 4.26 EIF3S2 ÜBEREXPRESSION FÜHRT ZU EINER ZUNAHME DER ZELLGRÖßE.....	77
ABBILDUNG 4.27 EIF3S2 ÜBEREXPRESSION FÜHRT IN NIH3T3 ZELLEN ZU ADHÄRENZ-UNABHÄNGIGEM WACHSTUM.....	79
ABBILDUNG 4.28 EXPRESSION VON TYP II TGF $\beta$ -REZEPTOR IN FADU UND HeLA ZELLEN.....	79
ABBILDUNG 4.29 EKTOPISCHE EXPRESSION VON C- ODER N-TERMINAL eYFP FUSIONIERTEM EIF3S2 IN HeLA ZELLEN.....	80
ABBILDUNG 4.30 EXPRESSION VON eYFP-EIF3S2 FUSIONSPROTEINEN NACH TRANSIENTER TRANSFEKTION IN HeLA ZELLEN.....	81
ABBILDUNG 4.31 BESTIMMUNG DER SUBZELLULÄREN EIF3S2 LOKALISATION IN DER KONFOKALEN LASER SCANNING FLUORESCENZMIKROSKOPIE.....	82
ABBILDUNG 4.32 EINFLUSS DER KINASEINHIBITOREN LY294002 UND RAPAMYCIN AUF DIE KOLONIEBILDUNG EIF3S2-ÜBEREXPRIMIERENDER NIH3T3 ZELLEN IN MC-MEDIUM.....	84
ABBILDUNG 4.33 EINFLUSS DER KINASEINHIBITOREN LY294002 UND RAPAMYCIN AUF DIE KOLONIEBILDUNG VON EIF3S2-HA ÜBEREXPRIMIERENDEN NIH3T3 ZELLEN IN MC-MEDIUM.....	85
ABBILDUNG 4.34 RAPAMYCIN INHIBIERT EIF3S2 PHOSPHORYLIERUNG AN SERINRESTEN.....	87
ABBILDUNG 4.35 VERGLEICH VON NIH3T3 ZELLEN MIT EIF3S2-ÜBEREXPRIMIERENDEN NIH3T3 ZELLEN IN DER 2D-PAGE.....	88
ABBILDUNG 5.1 ALIGNMENT DES EIF3S2 C-TERMINUS MIT TOS MOTIVEN DER mTOR SUBSTRATE S6KINASE 1 UND 4EBP.....	103

# Tabellenverzeichnis

TABELLE 1.1 TUMORANTIGENKLASSEN .....	14
TABELLE 2.1 REAGENZIEN.....	19
TABELLE 2.2 VERBRAUCHSMATERIALEN.....	22
TABELLE 2.3 GERÄTE.....	23
TABELLE 2.4 ANTIKÖRPER.....	24
TABELLE 2.5 PLASMIDE .....	26
TABELLE 2.6 ZELLINIEN .....	27
TABELLE 2.7 OLIGONUKLEOTIDE .....	27
TABELLE 3.1 LAUFBEDINGUNGEN DER IEF FÜR IPG-STREIFEN VON 24 CM LÄNGE.....	35
TABELLE 3.2 SILBERFÄRBEPROTOKOLL.....	36
TABELLE 4.1 IN EINEM ALLOGENEN AMIDA-SCREEN IDENTIFIZIERTE POTENTIELLE TUMORANTIGENE. ...	50
TABELLE 4.2 E-FABP-EXPRESSION IN GESUNDEM RACHENEPITHEL, KARZINOMEN DES OBEREN KOPF- HALSBEREICHES UND DEREN METASTASEN.....	52
TABELLE 4.3 ZUSAMMENSETZUNG DES ZUR EVALUIERUNG VON CK8-SERUMREAKTIVITÄT ALS BIOMARKER UNTERSUCHTEN SERUMKOLLEKTIVES.....	58
TABELLE 4.4 CK8-SERUMREAKTIVITÄT DER GESUNDEN GRUPPE UND DER VERSCHIEDENEN GRUPPEN MIT BENIGNEN ERKRANKUNGEN UND KARZINOMEN .....	60
TABELLE 4.5 SPEZIFITÄT UND SENSITIVITÄT DER CK8-SERUMREAKTIVITÄT ALS BIOMARKER FÜR GRUPPEN MIT ERKRANKUNGEN DISTINKTER LOKALISATION. ....	62

# 1 Einleitung

Jährlich erkranken weltweit mehr als zehn Millionen Menschen an Krebs, mehr als sieben Millionen Menschen sterben daran. Vermutlich wird bis zum Jahr 2020 die Zahl der Neuerkrankungen auf jährlich über 15 Millionen ansteigen (Boutayeb und Boutayeb, 2005). Weltweit ist Krebs für 12% aller Todesfälle verantwortlich, und in den westlichen Industrienationen ist Krebs mit 25% nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache. In Deutschland wird derzeit jeder Dritte im Verlauf seines Lebens mit der Diagnose Krebs konfrontiert. Aufgrund der enormen Erfolge, die bei der Behandlung und Vorbeugung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen erreicht wurden, und des Anstieges der durchschnittlichen Lebenserwartung, ist davon auszugehen, dass Krebs zukünftig zur häufigsten Todesursache in den entwickelten Ländern zählen wird. Verhaltene Schätzungen der Weltgesundheitsbehörde gehen davon aus, dass in den nächsten zwanzig Jahren die krebsbedingten Todesfälle auf über zehn Millionen pro Jahr ansteigen werden (Broschüre, Robert-Koch-Institut 2004; Krebs-Informationsdienst KID, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, 2004).

Da die Ursache der Krebsentstehung äußerst komplex ist und nahezu jeder Tumor ein individuelles Problem darstellt, erweist sich die Tumorbekämpfung als besonders schwierig. Deshalb gelang es, trotz intensiver Krebsforschung in den letzten Jahrzehnten und zahlreichen Fortschritten in Diagnose- und Therapiestrategien, nur in einigen Krebsentitäten, die Mortalität merklich zu senken. Eine Verbesserung der Prognose bei Krebserkrankungen verspricht zukünftig insbesondere durch eine frühe und differenzierte Diagnose und eine darauf aufbauende individuelle und gezielte Therapie erreicht werden zu können.

## 1.1 Tumore des Kopf-Halsbereichs

### 1.1.1 Epidemiologie

Als Karzinome bezeichnet man Tumore epithelialen Ursprungs, zu denen auch die Plattenepithelkarzinome des Kopf-Halsbereichs gehören. Etwa 95% aller bösartigen Wucherungen im Kopf-Halsbereich zählen zu dieser Tumorart (Gath und Brakenhoff, 1999). Die häufigsten Karzinome der oberen Atemwege sind Wucherungen in der Mundhöhle, in den Nasenhöhlräumen, des Kehlkopfes (Larynx), des Pharynx mit Oro-, Hypo- und Laryngopharynx oder der Speiseröhre (Ösophagus). Mit jährlich über 500.000 Fällen weltweit zählen Karzinome in diesem Bereich zu den häufigsten Krebsentitäten. Weltweit stehen sie an sechster, bei Männern sogar an fünfter Stelle der Tumornewerkrankungen (American Academy of Otolaryngology, [www.entnet.org/healthinfo/tabacco/cancer.cfm](http://www.entnet.org/healthinfo/tabacco/cancer.cfm), 2005).

### 1.1.2 Diagnose und Prognose

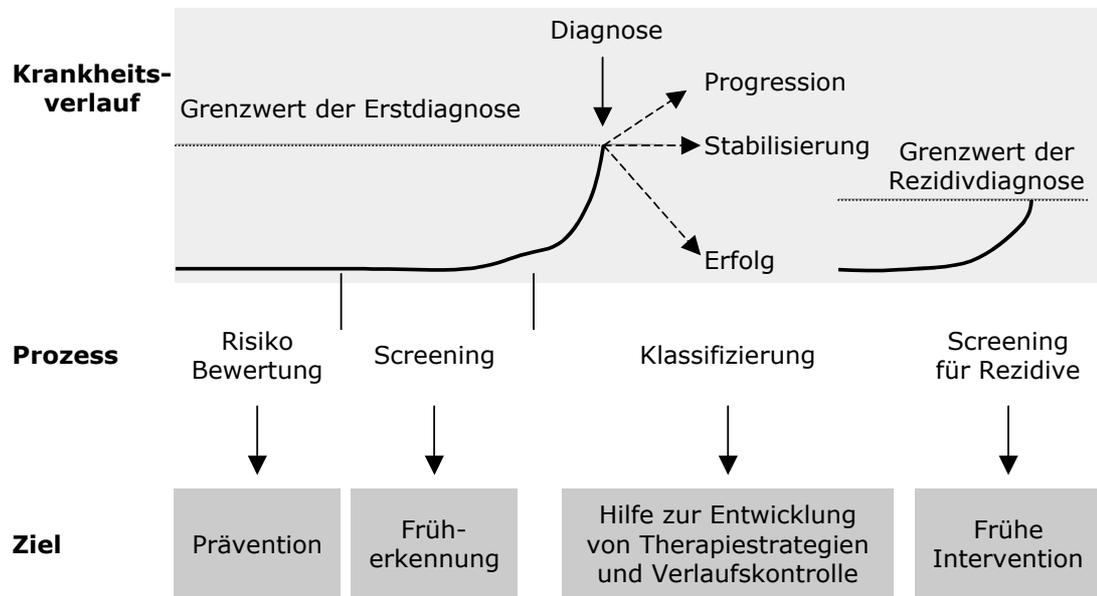
Tumore werden aufgrund ihrer Größe und des Vorhandenseins von Metastasen in verschiedene *TNM*-Stadien eingeteilt. Die *TNM*-Klassifikation des American Joint Committee on Cancer (AJCC) basiert nahezu ausschließlich auf anatomischen Kriterien. *T* steht dabei für den Primärtumor und wird nach Größe und Invasivität in die Stadien T1, für einen kleinen Tumor ohne Umgebungsinfiltration, bis T4, für einen ausgedehnten Tumor mit Umgebungsinfiltration, unterteilt. *N* steht für den Befall lokoregionärer Lymphknoten und wird analog in die Stadien N0 bis N3 gegliedert. *M* steht für Fernmetastasen. Sind Metastasen in anderen Organen vorhanden, wird dies mit M1 bezeichnet, andernfalls wird M0 angegeben. Die Prognose von malignen Erkrankungen des Kopf-Halsbereichs steht mit dem Tumorstadium und dem Ausmaß der lokoregionären und generalisierten Metastasierung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung in direktem Zusammenhang. Wichtigster prognostischer Faktor bei Karzinomen der oberen Atemwege ist die lymphogene Metastasierung. Für Patienten mit dem Stadium T1N0M0 bei Erstdiagnose errechnet sich eine Überlebensrate von 85%. Eine einzige Lymphknotenmetastase (LKM) reduziert die Überlebensrate um mindestens 50% (Enepekides et al., 1999). Bei Patienten mit Tumoren von großer lokaler Ausdehnung und zusätzlichem Befall von Lymphknoten ist die Überlebensrate noch geringer, sie liegt bei nur noch 30% (Lang et al., 2002).

Da es keine ausreichenden Vorsorgeuntersuchungen für Risikogruppen gibt, werden die meisten Karzinome im Hals-Rachenraum erst aufgrund von Symptomen wie Schluckbeschwerden, Atemnot und Heiserkeit in späten Stadien diagnostiziert. Etwa zwei Drittel der Patienten besitzen bei ihrer Erstdiagnose Tumore in den weit vorgeschrittenen Stadien T3 und T4 (Vernham und Crowther, 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 mit einer äußerst schlechten Prognose führen (Ferlito et al., 2001). Lokoregionäre Lymphknoten werden routinemäßig histologisch auf disseminierte Tumorzellen überprüft. Intensive Studien (Ferlito et al., 2001; Rinaldo et al., 2004) ergaben jedoch, dass bis zu 80% aller als tumornegativ (N0) 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 schwer detektierbar und bilden aufgrund der schnellen Progression dieses Karzinomtyps früh Rezidive und neue Metastasen. Deshalb hat sich die 5-Jahres-Überlebensrate trotz zahlreicher Entwicklungen in Chirurgie, Strahlen- und Chemotherapie für Karzinome dieser Entität nicht verbessert. Mit einer durchschnittlich nur 50%igen 5-Jahres-Überlebensrate gehören Karzinome im Hals-Rachenraum heute zu den Tumoren mit der schlechtesten Prognose (Gath und Brakenhoff, 1999; Spitz, 1994); American Academy of Otolaryngology, [www.entnet.org/healthinfo/tobacco/cancer.cfm](http://www.entnet.org/healthinfo/tobacco/cancer.cfm), 2005).

## 1.2 Biomarker für Tumore

Biomarker oder molekulare Marker sind Substanzen, die mit einem Risiko für oder der Anwesenheit einer Krankheit korrelieren. Ihre quantitative und qualitative Analyse kann dazu beitragen, eine Aussage über das Risiko der Entstehung, Existenz oder auch Progression einer Erkrankung zu treffen. Außerdem können sie helfen, Therapiestrategien festzulegen und den Therapieverlauf zu kontrollieren (*Monitoring*). Auch nach erfolgreicher Therapie sind Biomarker zur Früherkennung von möglichen Rezidiven geeignet. Sie bergen daher das Potential, den Therapieerfolg bei

Tumorerkrankungen nachhaltig zu verbessern (Ludwig und Weinstein, 2005). Abbildung 1.1 zeigt schematisch die Anwendungsmöglichkeiten von Biomarkern in den verschiedenen Stadien des klinischen Tumormanagements.



**Abbildung 1.1** Schematische Darstellung der Anwendungsmöglichkeiten von Biomarkern im klinischen Tumormanagement (nach Ludwig und Weinstein, 2005).

Die Güte von Biomarkern wird durch ihre Spezifität und Sensitivität definiert. Die Spezifität gibt den Anteil der negativ getesteten Nichterkrankten und die Sensitivität den Anteil der positiv getesteten Erkrankten an.

## 1.2.1 Klassen von Biomarkern

Molekulare Biomarker unterteilt man entsprechend ihrer chemischen Beschaffenheit in drei Klassen: DNA-, RNA- und Protein-Biomarker (Sidransky, 2002).

### 1.2.1.1 DNA-Biomarker

Die ersten Biomarker, die für Krebs evaluiert wurden, waren die Konzentration freier DNA im Blut und im Blut zirkulierende Tumorzellen (Leon et al., 1977; Sidransky, 2002). Weiterhin korreliert virale DNA mit verschiedenen Tumorentitäten. Neben der DNA des Epstein-Barr-Virus in Nasopharynxkarzinomen (Goldenberg et al., 2001) ist hier als bekanntestes Beispiel die Korrelation von HPV (Humanes Papillomavirus) mit Zervixkarzinomen anzuführen (Rock et al., 2000).

Den größten Teil der derzeit untersuchten DNA-Marker stellen Veränderungen der DNA in der Tumorzelle dar. Mutationen in Onko-, Tumorsuppressorgen und Genen des DNA-Reparatursystems der Zelle können als Marker dienen. So können Mutationen im K-RAS Onkogen zur Vorhersage der Metastasierung in verschiedenen Tumorentitäten genutzt werden (Brennan et al., 1995). Mutationen im Gen des Tumorsuppressors p53 kommen in über 50% aller sporadisch auftretenden Tumore vor (Levine, 1997; Nigro et al., 1989). Weiterhin spielt die epigenetische Regulation der Transkription durch Histondeacetylierung, lysinspezifischen Hypermethylierungen und Methylierungen von CpG-Motiven in der Promotorregion von Tumorsuppressoren eine Rolle. So wurde beispielsweise gezeigt, dass Unterschiede in der CpG-Methylierung geeignet sind, um benigne Prostatahyperplasien und Prostatakarzinome zu unterscheiden (Esteller et al., 2001; Jeronimo et al., 2001).

#### **1.2.1.2 RNA-Biomarker**

Während die meisten DNA-Biomarker unabhängig voneinander entdeckt und betrachtet werden, geschieht die Identifizierung bei den meisten RNA-Biomarkern durch Hochdurchsatzverfahren wie SAGE (*serial analysis of gene expression*), *differential display* und Transkriptom-Arrays (Mischel et al., 2004; Velculescu et al., 1995). Obwohl zumeist die verschiedenen RNA-Biomarker anschließend einzeln mittels quantitativer *real-time* RT-PCR validiert werden, scheint es derzeit, dass die besten Ergebnisse durch multiple RNA-Biomarker erzielt werden können. So ist es möglich, anhand von mRNA-Expressionsmustern in primären Mammakarzinombiopsien festzustellen, ob der Primärtumor das Potential aufweist, Knochen- und/oder Brustkrebsmetastasen zu bilden (Minn et al., 2005; Robison et al., 2004).

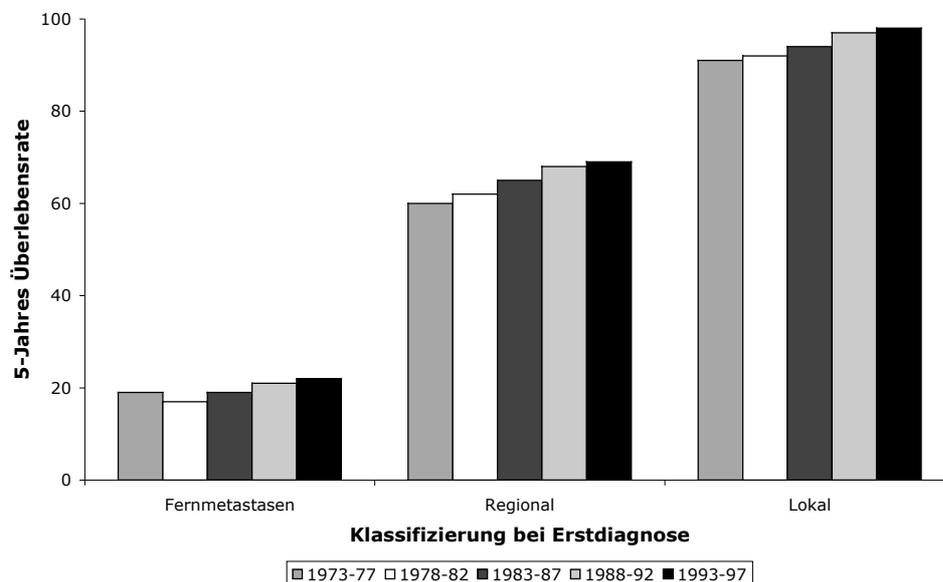
#### **1.2.1.3 Protein-Biomarker**

Protein-Biomarker stellen gegenwärtig den überwiegenden Anteil an Biomarkern dar, die im klinischen Einsatz sind. Lediglich drei der momentan 24 von der *Food and Drug Administration* (FDA) anerkannten Biomarker sind keine Proteine. Über zwei Drittel der Proteinmarker sind im Serum zirkulierende oder im Urin nachweisbare Marker und somit klinisch leicht und nichtinvasiv zugänglich. So wird PSA (*prostate-specific antigen*) zum *Screening* von Prostatakarzinomen verwendet, Zytokeratine dienen zur Bestimmung der Prognose und HER2/NEU zur Therapieentscheidung bei Brustkrebspatientinnen, CEA (*carcinoembryonic antigen*) wird routinemäßig zur

Therapiekontrolle von Kolonkarzinomen verwendet. Insbesondere Proteinmarker für die Früherkennung weisen noch erhebliche Mängel bezüglich Spezifität und Sensitivität auf. Ähnlich wie bei RNA-Markern wird auch für Protein-Biomarker die Zukunft in der Verwendung von mehreren oder so genannten Musterbasierenden Markern gesehen. Technologisch basiert diese zukunftsorientierte Methode auf Techniken wie der 2D-PAGE (zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese) oder SELDI-ToF (*surface enhanced laser desorption ionization time of flight*) Massenspektroskopie, mit deren Hilfe man in der Lage ist, krankheitsspezifische Muster in Seren zu erkennen (Soltys et al., 2004; Wulfkuhle et al., 2003).

### 1.2.2 Biomarker bei Früherkennung und Therapiestrategien

Wie zuvor dargelegt, hat sich die Überlebensrate von Karzinompatienten in den letzten 20 Jahren trotz Fortschritten in der Therapie nicht deutlich verbessert. Immer noch ist die Ausbreitung des Tumors bei Erstdiagnose maßgeblich für die Prognose (Etzioni et al., 2003). Abbildung 1.2 illustriert dies am Beispiel des Mammakarzinoms.



**Abbildung 1.2** Entwicklung der Überlebensrate bei Mammakarzinomen in Abhängigkeit der Ausbreitung des Tumors bei Erstdiagnose in den letzten 25 Jahren. (Quelle: *Surveillance, Epidemiology, and End Results* (SEER)).

Ein ähnliches Bild ergibt sich auch für Kolon-, Lungen- und Karzinome des Kopf-Halsbereichs. Daher sind Biomarker, die in der Lage sind, frühzeitig und somit lokal begrenzte und nicht metastasierte Tumore zu identifizieren, von besonderer Bedeutung. Mit ihrer Hilfe könnte die Überlebensrate für Tumorerkrankungen insgesamt deutlich verbessert werden. Für Patienten mit Karzinomen im Kopf-Halsbereich würde dies eine Verbesserung in der 5-Jahres-Überlebensrate von derzeit etwa 50% auf ungefähr 85% bedeuten (siehe 1.1.2).

### 1.2.3 Entwicklung von Biomarkern

Pepe *et al.* haben die Entwicklung von Biomarkern in fünf Phasen gegliedert. Diese formalisierte Einteilung ist relativ neu und bis *dato* sind noch keine Normen etabliert, die den erfolgreichen Abschluss einer Phase definieren (Pepe *et al.*, 2001). Diese Einteilung findet in der Literatur stetig zunehmende Verbreitung und ist gut geeignet, um den idealen Ablauf der Biomarkerentwicklung zu zeigen. Die Phasen und die mit ihnen verbundenen Zielsetzungen sind in Abbildung 1.3 zusammengefasst.

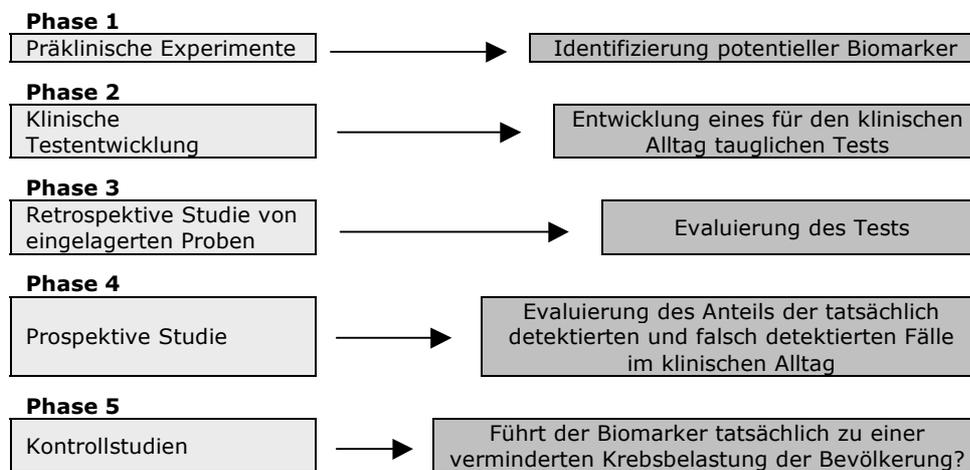


Abbildung 1.3 Phasen der Biomarkerentwicklung.

### 1.3 Karzinogenese

Die Karzinogenese ist ein komplexer Prozess, der auch nach dem heutigen Stand des Wissens nicht vollständig geklärt ist. Sie kann in drei Phasen unterteilt werden, die Initiationsphase, Latenzperiode und die klinische Manifestationsphase. In der Initiationsphase treten Mutationen und irreversible Transformationen auf. Mutationen können erblich sein oder durch exogene Noxen wie UV- oder radioaktive Strahlung, kanzerogene Stoffe wie Asbest oder Genuss schädlicher Substanzen wie z.B. Nikotin initiiert werden. In der Latenzperiode, die 15 bis 20 Jahre andauern kann, kommt es zur Proliferation initiiertter Zellen, weshalb dann auch von der Promotionsphase gesprochen wird. In dieser Phase kommt es zur Bildung von lokal begrenzten Primärtumoren, die aber noch symptomlos sind. Wird der Tumor durch seine Größe und/oder Streuung apparent, ist die Phase der klinischen Manifestation erreicht.

Die Defekte in Krebszellen betreffen die Regulationsmechanismen von Zellproliferation und Homöostase; die Entwicklung der Tumore wird durch einen Wachstumsvorteil, der sich entsprechend der Darwinschen Evolutionstheorie verhält, gefördert (Foulds, 1954; Nowell, 1976). Auf molekularer Ebene betrachtet ist eine einzelne genetische Veränderung für die Transformation einer gesunden humanen Zelle nicht ausreichend (Hahn et al., 1999). Es kommt im Verlauf der Tumorentstehung zu einer Anhäufung chromosomaler Aberrationen und Mutationen, die letztendlich zur Transformation der Zelle führen. Es handelt sich daher um einen Prozess, der in mehreren Schritten abläuft. Hanahan und Weinberg (2000) fassten das derzeitige Verständnis der Transformation einer gesunden in eine maligne Zelle in einem Konzept zusammen, das sechs essentielle Voraussetzungen zur Aufrechterhaltung der unbegrenzten Proliferation einer transformierten Zelle identifiziert.

- Induktion von autokrinen Wachstumssignalen
- Resistenz gegen Apoptose
- Verlust der Sensitivität gegenüber wachstumsinhibitorischen Signalen
- Eine verstärkte Angiogenese
- Gewebe-Invasion und Metastasierung
- Uneingeschränktes replikatives Potential

Dabei ist die Reihenfolge, in der die Eigenschaften während des Transformationsprozesses erworben werden, grundsätzlich unerheblich und auch die molekularen Grundlagen, die der Zelle die aufgeführten Eigenschaften verleihen, können von Tumor zu Tumor unterschiedlich sein.

Drei Klassen von Genen spielen dabei eine entscheidende Rolle, (i) Proto-Onkogene, (ii) Tumorsuppressorgene und (iii) DNA-Reparaturgene (Vogelstein et al., 2000).

Die beiden ersten Genfamilien regulieren in gesunden Zellen ein kontrolliertes Wachstum und die Apoptose. Eine Mutation oder deregulierte Expression resultiert im Fall der Proto-Onkogene häufig in einer Verstärkung ihrer Funktion, also einer Förderung von Wachstum. Der Transkriptionsfaktor c-Myc, der epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor (EGF-R) und der Her2-neu-Rezeptor sind klassische Beispiele für Proto-Onkogene.

Mutationen der Tumorsuppressor- und DNA-Reparaturgene dagegen resultieren oft in dem Verlust ihrer Funktion und somit z.B. im Verlust der Fähigkeit, Zellwachstum zu beschränken oder Apoptose zu induzieren (Hanahan und Weinberg, 2000). Prominenteste Beispiele für Tumorsuppressorgene sind das Retinoblastoma Tumorsuppressorprotein (Rb) und p53.

Die dritte Gruppe sind Gene, die für die DNA-Reparaturmechanismen essentiell sind. Diese Gene kontrollieren, über die Detektion von DNA-Schäden und die Einleitung oder Ausführung einer entsprechenden Reparatur, die Mutationsrate im Genom. Daher führen Mutationen dieser Gene zu genomischer Instabilität und erhöhter Mutationsrate, wovon auch Proto-Onkogene und Tumorsuppressorgene betroffen sind. Die Inaktivierung von Sensoren solcher DNA-Schäden, wie beispielsweise des Ataxia-telangiectasia mutierten (ATM) Proteins, kann dazu führen, dass Restriktionspunkte im Zellzyklus ohne Beseitigung des Schadens durchlaufen werden (Rotman und Shiloh, 1999).

Zusammengefasst liegt die Gemeinsamkeit der soeben beschriebenen Genfamilien letztlich in ihrem Einfluss auf den Zellzyklus. Mutationen dieser Gene resultieren in einem unkontrollierten und unbegrenzten Durchlaufen des Zellzyklus.

## 1.4 Interaktion von Immunsystem und Tumor

Ein komplexer mehrzelliger Organismus wie der Mensch bietet Viren, einzelligen und mehrzelligen Mikroorganismen vielfältige Lebensräume. Zur Abwehr solcher Pathogene hat sich in der Evolution das Immunsystem entwickelt. Mit seiner angeborenen und adaptiven Immunantwort beschützt es den Körper vor verschiedenen Erkrankungen. Bei der angeborenen Immunität werden körperfremde Oberflächenstrukturen, wie z.B. Lipopolysaccharide, erkannt, durch Phagozyten aufgenommen und die Erreger zerstört. Zu der Klasse der Phagozyten zählen Makrophagen und dendritische Zellen, die in der Lage sind, zu antigenpräsentierenden Zellen (APCs) zu differenzieren und Fragmente der aufgenommenen Fremdproteine auf Oberflächenrezeptoren, dem *major histocompatibility complex* (MHC), zu präsentieren. Dies stellt die Verbindung zur adaptiven Immunität dar, die sich gegen spezifische Antigene richtet. Die adaptive Immunität unterteilt sich in eine humorale und zelluläre Antwort. Bei der humoralen Antwort bilden sich aus naiven B-Zellen, unter Hilfe von T-Helferzellen, antikörpersezernierende Zellen (Plasmazellen). Antikörper binden spezifisch jene Antigene, deren Fragmente zuvor von APCs in lymphoiden Organen, wie z.B. dem Lymphknoten, präsentiert wurden. Dadurch kommt es entweder direkt zu einer Neutralisierung (z.B. bakterielle Toxine) oder Markierung des Antigens oder auch des Mikroorganismus für Phagozyten (Opsonisierung).

Die zelluläre Antwort wird von antigenspezifischen T-Zellen vermittelt. Sie verfügen über einen T-Zellrezeptor, der ihre Spezifität definiert. Der T-Zellrezeptor bindet spezifisch MHC-Peptid-Komplexe auf körpereigenen Zellen. MHC-I-Peptid-Komplexe werden von allen körpereigenen Zellen präsentiert. Die erkannten Zellen können durch eine Untergruppe, den zytotoxischen T-Zellen, getötet und für den Körper unschädlich gemacht werden. Wie auch bei der Entwicklung der humoralen Antwort ist eine Präsentation der entsprechenden Antigene durch professionelle APCs im Lymphknoten Voraussetzung für die Bildung aktivierter T-Zellen.

### 1.4.1 Immunsystem: Freund oder Feind?

Eine Verbindung von Immunsystem und Tumor wurde bereits 1863 von Virchow postuliert, der Krebsentstehung in entzündetem Gewebe beobachtete. Viele Tumore entstehen in chronisch entzündetem oder dauerhaft viral oder bakteriell befallenem Gewebe. So gehen nahezu alle Karzinome des Ösophagus auf eine chronische

Entzündung durch regelmäßig rückfließende Magensäure zurück (Shankaran et al., 2001). Infektionen der Leber mit Hepatitis-B- und/oder -C-Viren oder des Magens mit *Helicobacter pylori* sind ursächlich für die Bildung von hepatozellulärem Karzinom bzw. Magenkarzinom zu bestimmen (Ernst und Gold, 2000; Kuper et al., 2000; Shacter und Weitzman, 2002).

Wie bereits erläutert, sind mehrere Veränderungen notwendig, um eine gesunde Zelle in eine Tumorzelle zu transformieren (Hanahan und Weinberg, 2000). Im Rahmen der Entzündungsreaktion werden reaktive Sauerstoffspezies von infiltrierenden Leukozyten freigesetzt, die zu dauerhaften DNA-Schädigungen wie Punkt- und Deletionsmutationen führen (Maeda und Akaike, 1998). Die Entzündungsreaktion fördert somit bereits in der Initiationsphase die Tumorentstehung. Während der Entzündungsreaktion wird die Proliferation des Gewebes durch proinflammatorische und wachstumsfördernde Signale begünstigt. Mit dem Abklingen der Entzündungsreaktion und der damit einhergehenden Abnahme an Wachstumssignalen beendet das gesunde Gewebe die Proliferation. Transformierte Zellen hingegen proliferieren nun auch ohne diese Signale bzw. übernehmen die Produktion von Signalstoffen selbst oder induzieren in benachbarten Zellen deren Produktion. So gesehen, verhalten sich Tumore wie Entzündungen, die nicht aufhören zu heilen (Coussens und Werb, 2002; Dvorak, 1986).

Obwohl durch den angeborenen Teil des Immunsystems vermittelte Entzündungsreaktionen die Tumorbildung fördern, spekulierte bereits Paul Ehrlich (1909), dass das Immunsystem in der Lage ist, Tumore frühzeitig zu erkennen und so eine den Körper überwältigende Menge von Tumorbildungen zu verhindern (Klein, 1966; Old und Boyse, 1964). Aufgrund der Entdeckung, dass chemisch oder viral induzierte Tumore zur Immunisierung syngener Mäuse geeignet sind, formulierten Burnet und Thomas 1957 die Hypothese der „Immunüberwachung“:

*“It is by no means inconceivable that small accumulations of tumour cells may develop and because of their possession of new antigenic potentialities provoke an effective immunological reaction with regression of the tumour and no clinical hint of existence.”*

(Burnet, 1957)

Doch erst Mitte der 90er Jahre konnte die Hypothese, dass eine adaptive Immunantwort der Tumorbildung entgegenwirkt, durch verschiedene Mausmodelle bewiesen werden. So zeigten Mäuse mit gestörter IFN- $\gamma$ -Produktion eine stärkere Tumoranfälligkeit als Vergleichsmäuse mit intakter Produktion (Dighe et al., 1994; Kaplan et al., 1998).

RAG-2<sup>-/-</sup>-Mäuse sind aufgrund der defekten Rekombination der lymphozytären Rezeptorgene nicht in der Lage, natürliche Killerzellen, T- oder B-Zellen auszubilden. MCA (Methylcholanthrene, induziert Tumore) behandelte immundefiziente RAG-2<sup>-/-</sup>-Mäuse bilden wesentlich öfter Sarkome als immunkompetente Mäuse (Shankaran et al., 2001). Wenn also das Immunsystem in der Lage ist, Tumore zu erkennen und zu bekämpfen, warum kommt es trotzdem zur Tumorbildung in immunkompetenten Organismen? Da das Immunsystem die Fähigkeit besitzt, Tumore spezifisch zu erkennen, entwickeln Tumore, die unter dem Einfluss eines intakten Immunsystems entstehen, Mechanismen der Erkennung zu entgehen, z.B. durch eine Störung der MHC-Klasse-I-Antigen-Prozessierungsmaschinerie. Auch findet während der Tumorentstehung durch das Immunsystem eine Selektion solcher Tumorzellen statt, die immunogene Proteine, die erkannt werden, nicht exprimieren (Khong und Restifo, 2002). Diese These wurde durch Transplantationsexperimente, bei denen chemisch induzierte Tumore aus immuninkompetenten RAG-2<sup>-/-</sup>-Mäusen in immunkompetente RAG-2<sup>+/+</sup>-Mäuse und umgekehrt transplantiert wurden, untermauert. Mehr als 50% der aus immuninkompetenten Mäusen stammenden Tumore wurden von immunkompetenten Mäusen erkannt und beseitigt, hingegen wuchsen alle Tumore aus immunkompetenten Mäusen in immuninkompetenten Mäusen an (Shankaran et al., 2001).

Auch wenn sie nicht immer zur Eliminierung des Tumors führt, geschieht eine Erkennung des Tumors durch das Immunsystem sowohl durch den zellulären als auch durch den humoralen Arm des Immunsystems. Diese beruht neben der Erkennung von tumorassoziierten viralen Proteinen und veränderten Proteinstrukturen auch auf der Erkennung von unverändertem Protein durch das Immunsystem (Spiotto et al., 2003). Es stellt sich die Frage, wie es trotz strikter Sicherungsmechanismen zur Ausbildung einer spezifischen Immunreaktion gegen körpereigene Proteine kommen kann?

APCs migrieren aus Tumorgewebe in sekundäre Lymphorgane, wo sie auf naive T-Zellen treffen (Fu und Chaplin, 1999). Durch die Wechselwirkung von APC und T-Zellen kann es bezüglich eines Antigenes zu drei verschiedenen Immunitätszuständen kommen. Entweder zur (i) Ignoranz, d.h. das Antigen wird von keiner T-Zelle erkannt, (ii) Toleranz, d.h. das Antigen wird erkannt, aber es kann keine Immunreaktion ausgebildet werden, oder (iii) zur Immunreaktion, d.h. das Antigen wird erkannt und eine Immunreaktion ausgelöst. Da nicht alle körpereigenen Proteine im Thymus

präsentiert werden, ist die negative Selektion der zentralen Immuntoleranz bezüglich autoreaktiver T-Zellen nicht vollständig. Autoreaktive T-Zellen, die noch nicht anergisch sind (periphere Immuntoleranz), können somit durch autoantigen-präsentierende APCs aktiviert werden. Um Proteine des Tumors als Antigen zu präsentieren, müssen diese vom Tumor in ausreichender Menge exprimiert werden (Spiotto et al., 2002). Weiterhin muss im Tumorgewebe die Umgebung gegeben sein, die eine Reifung von dendritischen Zellen zu APCs fördert (Probst et al., 2003). Beladene und reife APCs können dann in die Lymphknoten migrieren und dort die Autoimmunreaktion gegen Tumorproteine auslösen. Somit kann nahezu jedes vom Tumor exprimierte Protein im entsprechenden Kontext zu einem Autoantigen, also Tumorantigen, werden (Spiotto et al., 2003).

#### **1.4.2 Tumorantigene**

Wie dargelegt, werden körpereigene oder virale Proteine, die in der Tumorzelle exprimiert werden und die im Verlauf der Erkrankung eine Immunreaktion beim Patienten auslösen, als Tumorantigene (TA) bezeichnet. TAs sind von besonderem Interesse für die Diagnostik und Immuntherapie, wenn ihre Expression bei einer Vielzahl von Patienten auftritt. Ist ihre Expression hingegen auf einzelne Patienten beschränkt, können sie nur in einem für den jeweiligen Patienten angepassten Ansatz Anwendung finden. Man unterscheidet mehrere Klassen von Tumorantigenen entsprechend den Ursachen, die zu ihrer Erkennung durch das Immunsystem im Verlaufe der Tumorerkrankung führen (Tabelle 1.1).

#### **Tumorspezifische Antigene**

Entsprechend ihrem Expressionsverhalten in gesunden und Tumorzellen werden Tumorantigene in ‚assoziert‘ und ‚spezifisch‘ eingeteilt. Tumorspezifische Antigene werden nahezu ausschließlich in Tumorzellen und nicht in gesunden Zellen exprimiert. Demzufolge sind sie ideale Ziele für therapeutische Ansätze. Sie können zur Erkennung der Tumorzelle im Rahmen einer Immuntherapie oder aber als Ziel für niedermolekulare Verbindungen oder *Antisense*-Therapie dienen, soweit das Antigen eine essentielle Funktion in der Tumorzelle hat. Tumorspezifische Antigene sind virale Antigene, Translokalisations- und *Cancer-Testis* Antigene (CTA), oder sie können auf tumorspezifische Mutationen zurückgeführt werden.

Tabelle 1.1 Tumorantigenklassen

Klasse	Ursache der Immunogenität	Beispiel	Referenz
<b>Tumorspezifische Antigene</b>			
Mutation	Tumorspezifische Punktmutationen, Leserastermutationen	P53, CDK4	(Mandrizzato et al., 1997; Scanlan et al., 2002)
Viral	Virusproteine, spezifisch im Tumor exprimiert	HPV E6 und E7	(Cornelison, 2000)
Cancer-Testis (CT)	Nur in Tumoren und immunprivilegiertem Gewebe exprimiert	MAGE-A, NY-ESO-1, CEA	(Jager et al., 1998; Kawakami et al., 1994; van der Bruggen et al., 1991)
Translokation	Tumorspezifische Translokation, die zur Bildung eines neuartigen Proteins führt	BCR-ABL	(Berke et al., 2000)
Spleiß-Variante	Tumorspezifische Spleiß-Variante	cTAGE, gp100	(Kawakami et al., 1994; Usener et al., 2003)
Posttranslationale Modifikation	Tumorspezifische posttranslationale Modifikation	Cytochrome C	(Mamula et al., 1999)
<b>Tumorassoziierte Antigene</b>			
Amplifizierung	Durch Genamplifizierung verursachte tumorspezifische Überexpression im Vergleich zu gesundem Gewebe	HER2/neu, PSA	(Hynes und Stern, 1994)
Differenzierung	Expriert in Tumoren und normal differenzierten Zellen	Tyrosinase, PSA, SCC	(Balzar et al., 1999; Brichard et al., 1993)

*CTAs* sind *per definitionem* Proteine, die in Tumoren und Testis und/oder Ovar (Gewebe der Keimbahn) und nicht mehr als zwei somatischen Normalgeweben exprimiert werden (Simpson et al., 2005). Ihre Genexpression wird wahrscheinlich über CpG-Inseln im Promoterbereich reguliert. In gesunden, somatischen Zellen sind diese methyliert und die Genexpression stark supprimiert. In Tumorzellen kommt es hingegen häufig zu Demethylierungen und somit zur Expression dieser Gene. Ob diese für die Karzinogenese essentiell ist oder nur eine Begleiterscheinung darstellt, ist Gegenstand derzeitiger Forschung (Simpson et al., 2005). Ein Nachteil der *CTAs* ist, dass sie nur in wenigen Tumoren exprimiert werden. Sie sind daher nur nach individueller Bewertung eines jeden Patienten zur Therapie geeignet. Gleiches gilt für die übrigen tumorspezifischen Antigene, ausgenommen Translokationen, die aufgrund ihrer unregelmäßigen Expression kaum als Biomarker geeignet sind.

## Tumorassoziierte Antigene

Tumorassoziierte Antigene werden, im Gegensatz zu tumorspezifischen Antigenen, auch von gesunden Zellen exprimiert. Bei ihnen handelt es sich um Differenzierungs- oder Amplifizierungsantigene. Letztere werden z.B. aufgrund einer Vervielfältigung des Gens im Tumor stärker exprimiert als im gesunden Vergleichsgewebe. Tyrosinase, ein Differenzierungsantigen, ist ein Protein, das für die Produktion von Melanin notwendig ist. Es wird sowohl in gesunden Melanozyten als auch in Melanomzellen exprimiert. Tumorassoziierte Antigene werden von den Tumoren der meisten Patienten gebildet, sind aber nicht tumorspezifisch. Ihre Verwendung als Zielstruktur für Therapien kann daher zu erheblichen Nebenwirkungen im gesunden Gewebe führen. Jedoch haben sie ein großes Potential als Biomarker, weil sie in Tumoren eines Großteils der Patienten exprimiert und zum Teil sezerniert werden (z.B. CEA oder PSA).

## Tumorantigene bei Karzinomen des Kopf-Halsbereichs

Neben p53, EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*), CEA (*carcinoembryonic antigen*), SCC (*squamous cell carcinoma antigen*) und SCART-1 sind bei Karzinomen der oberen Atemwege kaum tumorassoziierte bzw. tumorspezifische Antigene verzeichnet (Shichijo et al., 1998). Diese bereits bekannten Tumorantigene sind aufgrund ihrer geringen Spezifität und Sensitivität nicht als diagnostische und prognostische Marker für Karzinome des Kopf-Halsbereichs geeignet (Soltys et al., 2004), obschon EpCAM bei anderen Entitäten (Mammakarzinom) einen prognostischen Faktor darstellt (Spizzo et al., 2004).

## 1.5 Strategien zur Identifizierung von Tumorantigenen

Die mögliche Verwendung von Tumorantigenen als Biomarker in der Diagnostik und als Zielstrukturen für therapeutische Ansätze hat ein reges Interesse an ihnen geweckt. Die derzeitigen Strategien zur Identifizierung von Tumorantigenen basieren sowohl auf der zellulären Immunantwort des Patienten gegen den Tumor, also auf CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> TA-spezifischen T-Zellen, als auch auf der humoralen Antwort im Tumorpatienten, entsprechend auf TA-spezifischen Serumantikörpern.

### 1.5.1 Verwendung der zellulären Antwort zur Identifizierung von Tumorantigenen

#### Klassische Strategie

Die klassische Strategie verwendet tumorinfiltrierende Lymphozyten (TILs) oder periphere Blutlymphozyten (PBLs) aus Patienten und testet ihre Reaktivität gegen Zielzellen des gleichen HLA-Typs, welche transfiziert sind mit einer cDNA-Expressionsbank aus Tumoren. Ursprünglich wurde diese Strategie zur Identifizierung CD8<sup>+</sup> zytotoxischer T-Zellen entwickelt, nach der Modifizierung kann sie nun auch zur Identifizierung von CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen verwendet werden (Paschen et al., 2004).

#### „Rückwärts gerichtete Immunologie“

Der Vergleich von gesundem und Tumorgewebe hat eine Vielzahl tumorspezifisch überexprimierter Proteine und somit potentieller Amplifizierungs- und Differenzierungsantigene identifiziert. Weiterhin hat die Isolierung MHC/HLA Klasse-I assoziierter Peptide von Tumorzellen und deren Vergleich mit Literatur und Datenbanken eine Vielzahl prozessierter und MHC/HLA Klasse-I präsentierter Tumorzellproteine identifiziert (Singh-Jasuja et al., 2004). Auch als humorale TAs identifizierte Proteine stellen potentielle T-Zellspezifische Antigene dar. Um die Immunogenität dieser potentiellen T-Zellspezifischen TAs zu untersuchen, werden dendritische Zellen mit vorhergesagten immunogenen Peptiden oder dem ganzen Antigen beladen und *in vitro* zur Selektion von TA-spezifischen T-Zellen *ex vivo* verwendet. Diese Strategie führte z.B. zur Identifizierung von Telomerase und Survivin als Tumorantigene (Schmitz et al., 2000; Vonderheide et al., 1999).

### 1.5.2 Verwendung der humoralen Antwort zur Identifizierung von Tumorantigenen

#### SEREX

Die SEREX-Methode (*serological screening of recombinant cDNA expression libraries*) wurde von Sahin *et al.* (1995) zur Analyse der B-Zellantwort in Tumorpatienten entwickelt. Hierbei wird eine aus Tumorzellen erstellte cDNA-Bank in  $\lambda$  Phagen-Vektoren kloniert und damit anschließend *E.coli* Bakterien infiziert. Diese werden auf Reaktivität mit Serumantikörpern von Tumorpatienten untersucht,

spezifisch erkannte Phagen werden isoliert, die exprimierte Tumor-cDNA kloniert, sequenziert und so ein potentiell TA identifiziert. Diese Methode führte unter anderem zur Identifizierung des *CTA* NY-ESO-1 und der Tyrosinase als TA (Chen et al., 1997).

## **PROTEOMEX**

Die Kombination der konventionellen zweidimensionalen Gelelektrophorese (2D-Gelelektrophorese) mit dem serologischen Ansatz der SEREX-Methode hat zur Entwicklung der PROTEOMEX (Kombination von *Proteomics* und SEREX)-Methode geführt. Bei dieser Methode werden Proteine eines Tumorlysates mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und diese mit Serumantikörpern von Tumorpatienten inkubiert. Gebundene Serumantikörper werden detektiert und anschließend die der Detektion zugrunde liegenden Proteine massenspektroskopisch identifiziert (Seliger und Kellner, 2002). Diese Methode führte zur Identifizierung verschiedener Hitzeschock- und Zytoskelettproteinen bei Patienten mit Nierenzellkarzinomen (Kellner et al., 2002; Lichtenfels et al., 2002).

### **1.5.3 Strategien zur Tumorantigenidentifizierung im Vergleich**

Der klassische Ansatz zur Identifizierung T-Zell-spezifischer TA beruht auf der sehr zeitaufwendigen Generierung von T-Zellklonen und der Verfügbarkeit von geeigneten Tumorzelllinien für ihre Analyse. Diese Limitierung konnte zwar durch die „rückwärts gerichtete Immunologie“ überwunden werden, aber auch dieser Ansatz ist aufgrund der *in-vitro*-Generierung von APCs aus dendritischen Zellen und anschließender Generierung von spezifischen T-Zellen und deren Analyse ein sehr langwieriges und aufwendiges Verfahren.

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-Fragmente. Mit SEREX ist es allerdings nicht möglich, Tumorantigene zu identifizieren, die durch posttranslationale Modifikationen hervorgerufen werden. Außerdem ist diese Technik sehr aufwendig, da pro Screen mindestens  $1 \times 10^6$  Klone getestet werden müssen, um eine ausreichende Menge an verschiedenen Antigenfragmenten zur Verfügung zu haben. Dies entspricht ca. 40 bis 200 Kolonienfilter, die mittels Immunoblot gescreent werden müssen. SEREX ist für ein schnelles und gleichzeitiges Screening verschiedener Patienten daher

ungeeignet (Seliger und Kellner, 2002). Der große Vorteil von PROTEOMEX gegenüber SEREX ist die Möglichkeit, Antigene zu detektieren, die aufgrund von posttranslationalen Modifikationen immunogen wirken. Ein Beispiel hierfür ist die N-Glykosylierungsisoform von Annexin I (Brichory et al., 2001). 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 verschiedene Proteinspezies, wenn man alle posttranskriptionellen und -translationalen Modifizierungen mit einbezieht. Eine klassische 2D-Gelelektrophorese erlaubt es nur, einen Bruchteil, maximal ca. 3.000 der abundantesten Proteine (Kopienzahl  $\geq 10.000$ ), eindeutig aufzutrennen (Klade et al., 2001).

## 1.6 Zielsetzung

Diese Arbeit hat die Identifizierung, Validierung und Charakterisierung neuer Tumorantigene des Kopf-Halsbereichs zum Thema. Daraus leiteten sich drei Ziele ab. Erstes Ziel war die Entwicklung einer allogenen Technik zur Identifizierung neuer Tumorantigene. Diese Technik sollte lediglich Patientenblut als Primärmaterial benötigen, um eine einfache Integration in den klinischen Alltag zu ermöglichen. Dabei sollten die Nachteile von SEREX und PROTEOMEX umgangen, deren Vorteile jedoch implementiert werden. Grundlage dieser Methode sollte eine Immunopräzipitation mit nachgeschalteter 2D-Gelelektrophorese sein. Mit dieser Technik sollten potentielle TAs für Karzinome des Kopf-Hals-Bereiches identifiziert werden. Hieraus leitet sich das zweite Ziel dieser Arbeit ab, die Validierung der zuvor identifizierten Antigene. Die Expression ausgewählter TAs sollte *in vivo* und ihr Potential in der Diagnostik untersucht werden. Weiterhin sollte auch die Verwendung der humoralen Antwort gegen TAs als Biomarker untersucht werden. Das dritte Ziel der Arbeit bestand darin, den Beitrag eines zuvor identifizierten und validierten Antigens zur Karzinogenese molekularbiologisch zu untersuchen.

## 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.

#### 2.1.1 Reagenzien

Tabelle 2.1 Reagenzien

Artikel	Bezugsquelle
ABC Kit Vectastain	Vector, Burlingame (USA)
Acrylamid, Protogel ultra pure	Schröder Diagnostics, Stuttgart
Agarose	Roche, Mannheim
Ammoniumbikarbonat	Sigma, Taufkirchen
Anorganische Salze, Säuren, Basen	Merck, Darmstadt
Antibiotika (Tetracyclin, Ampicillin, Chloramphenicol, Kanamycin)	Sigma, Taufkirchen
Bacto-Agar	Gibco BRL, Karlsruhe
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
5-Bromo-chloro-3-indolyl Phosphat (BCIP)	Roche, Mannheim
Coomassie R350	Serva, Heidelberg

<b>Artikel</b>	<b>Bezugsquelle</b>
2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB)	Sigma, Taufkirchen
Denhardt´s Lösung	Sigma, Taufkirchen
DEPC	Merck, Darmstadt
Dextransulfat	Sigma, Taufkirchen
DMEM	Seromed/Biochrom, Berlin
2,5-Dihydroxybenzoesäure	Sigma, Taufkirchen
Dithioerythritol (DTE)	Sigma, Taufkirchen
DNA-modifizierende Enzyme	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
DNA QiaShredder	Qiagen, Hilden
ECL Westernblotting System	Amersham, Freiburg
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]- carbodiimidhydrochlorid (EDC)	Sigma, Taufkirchen
Formamid (deionisiert)	Sigma, Taufkirchen
Fötales Kälberserum (FKS)	Seromed/Biochrom, Berlin
Glyzin	Sigma, Taufkirchen
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche, Mannheim
High Pure RNA Isolation Kit	Roche, Mannheim
2-Hydroxy-5-Methoxy-Benzoesäure	Sigma, Taufkirchen
n-Hydroxysulfosuccinimid (S-NHS)	Sigma, Taufkirchen
Imidazol	Sigma, Taufkirchen
Immunoblotblocklösung, Roti-Block	Roth, Karlsruhe
Iodacetamid	Sigma, Taufkirchen
IPG Buffer	Amersham, Freiburg
Isopropyl $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma, Taufkirchen
Maleinsäure	Sigma, Taufkirchen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Taufkirchen
Nitroblau Tetrazolium (NBT)	Roche, Mannheim

<b>Artikel</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Nickel Nitrilotriacetat (Ni-NTA)	Qiagen, Hilden
Nukleotide (dNTPs)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Organische Lösungsmittel, Alkohole	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS-Tabletten	Gibco BRL, Karlsruhe
Peptidfragmentstandard für MALDI-ToF	Sigma, Taufkirchen
Plasmidpräparation „Jetstar“	Genomed, Bad Oeynhausen
Polyvinylalkohol (PVA)	Sigma, Taufkirchen
Proteinase K	Dako, Glostrup (DK)
Protein G Sepharose „4 Fast Flow“	Amersham, Freiburg
Proteingrößenstandard „Benchmark“	Invitrogen, Karlsruhe
NucleoSpin Extract II	Machery+Nagel
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Reverse Transcription System	Promega, Madison (USA)
Taq-Polymerase, PCR-Reagenzien	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Thiazolylblau-Tetrazolium Bromid	Sigma, Taufkirchen
Transfektionsreagenz „MATra-A“	IBA, Göttingen
Triethanolamin	Merck, Darmstadt
TriPure	Roche, Mannheim
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, (Tris)	Merck, Darmstadt
Triton-X 100	Sigma, Taufkirchen
Trizma Base	Sigma, Taufkirchen
Trypsin, Zellkultur	Seromed/Biochrom, Berlin
Trypsin, Porcine, Seq.Grade Modified	Promega, Madison (USA)
Tween	Serva, Heidelberg
Zytokeratin 8 (rekombinant)	Progen, Heidelberg

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.2 Verbrauchsmaterialien

<b>Artikel</b>	<b>Bezugsquelle</b>
3 MM Whatman-Papier	Bender & Hobein, München
Einmalpipetten	Costar, New York (USA)
Immobilon-P Membran	Millipore, Bedford (USA)
IPG-Strips	Amersham, Freiburg
Kanülen	BD, Heidelberg
Micro Bio-Spin Chromatographiesäulen	Bio-Rad, München
Multiscreen-BV Filterplatten	Millipore, Bedford (USA)
Objektträger „Superfrost“	Nunc, Wiesbaden
Pipettenspitzen	Gilson, Bad Camberg
Röhrchen, steril, Zellkultur	Falcon/BD Le Pont de Claix (F);
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	Falcon/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)
Zentrifugationssäulchen	MoBiTec, Göttingen

### 2.1.3 Geräte

Tabelle 2.3 Geräte

<b>Artikel</b>	<b>Bezugsquelle</b>
2D-Elektrophoresekammern: 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 EIX800	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 <sub>2</sub> -begast	Heraeus, München
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-Kühllagereinrichtung	Messer Cryotherm, Kirchen/Sieg

Artikel	Bezugsquelle
Thermocycler UNO	Biometra, Göttingen
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
UV-Mikrophotometer „GeneQuant Pro“	Pharmacia, Erlangen
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg; Sorvall, Bad Homberg

### 2.1.4 Dienstleistungen

- DNA-Sequenzierungen: Sequiserve, Vaterstetten
- Oligonukleotidsynthese: Metabion, Martinsried
- siRNA Design und Synthese: Eurogentec, Philadelphia (USA)

## 2.2 Antikörper

Tabelle 2.4 Antikörper

Antikörper (Klon)	Spezie/Isotyp (Konjugat)	Bezugsquelle, Kat. Nr.
$\alpha$ -Aktin	Ziege/IgG	Santa Cruz, Kalifornien (USA), sc-1616
$\alpha$ -CK8 (1E8)	Maus/IgG2a	Hess, Heidelberg, MMS-162P
$\alpha$ -Cortactin	Maus/ IgG1	Biomol, Hamburg, 05-180
$\alpha$ -c-myc	Maus/IgG1	Santa-Cruz, Kalifornien (USA), sc-40
$\alpha$ -DIG, AP	Schaf/F(ab)2	Roche, Mannheim 1093274
$\alpha$ -e-FABP	Kaninchen/IgG	Zur Verfügung gestellt von Dr. Siegenthaler (Masouye et al., 1997)
$\alpha$ -eIF3S2	Huhn/ IgG	Biomol, Hamburg, E8949-31

Antikörper (Klon)	Spezie/Isotyp (Konjugat)	Bezugsquelle, Kat. Nr.
$\alpha$ -Grb2	Maus/IgG2	BD, Heidelberg, 610 112
$\alpha$ -HA (3F10)	Ratte/IgG1	Roche, Mannheim, 1867423
$\alpha$ -Hsp27	Maus/ IgG1	Dianova, Hamburg, 05952
$\alpha$ -Human	IgG, PE Ziege/F(ab)2	Dianova, Hamburg, 109- 116-098
$\alpha$ -Maus	IgG, PE Ziege/F(ab)2	Dianova, Hamburg, 115- 116-071
$\alpha$ -Maus	IgG, HRP Kaninchen/IgG	Dako, Glostrup (DK), P0260
$\alpha$ -Maus	IgG, Biotin Ziege/IgG	Vector, Burlingame (USA), BA-2020
$\alpha$ -Ziege	IgG, HRP Kaninchen/IgG	Dako, Glostrup (DK), P0449
$\alpha$ -Ratte	IgG, Biotin Ziege/IgG	Vector, Burlingame (USA), BA-9400

### 2.3 Bakterien

- *E.Coli* DH5 $\alpha$  bezogen von Gibco BRL (Eggenstein): F-, F80dlacZDM15, D(lacZYA-argF), U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk-, mk+), supE44, 1-, thi-1, gryA96, relA1
- *E.coli* Rosetta (DE3) bezogen von Novagen: F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm lacY1 (DE3) pRARE (CmR)

### 2.4 Plasmide

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

gestellt. Die mit einem Asterisk gekennzeichneten Plasmide wurden in dieser Arbeit kloniert.

**Tabelle 2.5 Plasmide**

<b>Plasmid</b>	<b>Beschreibung</b>
pDrive	Klonierungsvektor, T7/Sp6, Ampicillin-/Kanamycinresistenz, Qiagen, Hilden
pETM30	Prokaryotischer Expressionsvektor zur Expression von GST-Fusionsproteinen, GST, Kanamycinresistenz, EMBL
pETM30::Stop*	pETM30 mit Stop-Codon nach GST zur Expression von GST
IMAGp998N219599	RZPD Klon, cDNA e-FABP
pETM30::e-FABP*	e-FABP cDNA in pETM30 zur Expression von GST-e-FABP Fusionsprotein
IRALp962M061	RZPD Klon, cDNA eIF3S2 aus humaner Muskelrhabdomyosarcomzelllinie
pEYFP-C1	Eukaryotischer Expressionsvektor zur Expression von eYFP Fusionsproteinen, CMV Promotor, YFP, G418-Resistenz, BD Clontech, Heidelberg
pEYFP-C1::eIF3S2*	eIF3S2 cDNA in pEYFP-C1
pEYFP-N1	Eukaryotischer Expressionsvektor zur Expression von eYFP Fusionsproteinen, CMV Promotor, YFP, G418-Resistenz, BD Clontech, Heidelberg
pEYFP-N1::eIF3S2*	eIF3S2 cDNA in pEYFP-N1

<b>Plasmid</b>	<b>Beschreibung</b>
141pCAG-3SIP	CMV und SV40 Promotor, IRES, Puromycinresistenz; freundlicherweise von Dr. T. Schröder zur Verfügung gestellt
141pCAG::eIF3S2*	eIF3S2 cDNA in 141pCAG-3SIP
141pCAG::HA-eIF3S2*	HA-eIF3S2 cDNA in 141pCAG-3SIP
141pCAG::eIF3S2-HA*	eIF3S2-HA cDNA in 141pCAG-3SIP

## 2.5 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden folgende Zelllinien verwendet:

Tabelle 2.6 Zelllinien

<b>Zelllinie</b>	<b>Ursprung</b>	<b>Referenz</b>
ANT-1	Hypopharynx-Karzinom	in unserem Labor etabliert
FaDu	Hypopharynx-Karzinom	ATCC HTB-43
HEK293	embryonale Niere	ATCC CRL-1573
HeLa	Zervix-Karzinom	ATCC CCL-2
PCI-1	Hypopharynx-Karzinom	Pittsburgh Cancer Institute, USA

## 2.6 Oligonukleotide

Tabelle 2.7 Oligonukleotide

<b>Nr.</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Verwendung</b>
1a	5'-TGTCGTCTCTGGGACTGTGAAAC-3'	RT-PCR eIF3S2
1b	5'-ACATTCACCAACACCTCTCCAGAC-3'	RT-PCR eIF3S2

---

<b>Nr.</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Verwendung</b>
2a	5'-TGTCGCTCTTGAAGTCAGAGGAGA-3'	RT-PCR GAPDH
2b	5'-AGAACATCATCCCTGCCTCTACTG-3'	RT-PCR GAPDH
3a	5'-AGATCTCGAGCTATGAAGCCGATCCTACTGCAG-3'	eIF3S2-eYFP Fusion
3b	5'-CCGCGGTACCGTAGCCTCAAACCTCAAATTCAAAGTA-3'	eYFP-eIF3S2 Fusion
4a	5'-AATTTGAGTTTGAGGCTATGTACCCATACGATGTTCC AGATTACGCTTAA-3'	eIF3S2-HA Fusion
4b	5'-ATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAAGCCGA TCCTACTGCAG-3'	HA-eIF3S2 Fusion

---

# 3 Methoden

## 3.1 Zellkultur

### 3.1.1 Kultivierung permanenter Zelllinien

Alle Zelllinien 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% CO<sub>2</sub> 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 g für 5 bis 10 min und 20°C.

### 3.1.2 Aufbewahrung von Zelllinien

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

Zur Reaktivierung 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.

- *Einfriermedium*: DMEM, 10% FKS, 10% DMSO

### 3.1.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellen wurden in einer Neubauer-Kammer ausgezählt. Um tote von lebenden Zellen zu unterscheiden, wurde ein Volumen Zellsuspension mit einem Volumen einer 0,2%-igen Trypanblaulösung (in PBS) gemischt. Tote Zellen nehmen den Farbstoff auf und erscheinen im Mikroskop blau.

### 3.1.4 Transfektion

Die Transfektion der Zellen mit Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des MATra-Reagenz (IBA) durchgeführt. Die Zellen wurden über Nacht in 6-Loch-Platten bis zu einer Dichte von ca. 70% kultiviert. Die Transfektion erfolgte in serumfreiem Medium nach Angaben des Herstellers. Stabile Transfektanten wurden durch anschließende Behandlung mit Puromycin bis zu einer maximalen Konzentration von 2 ng/L selektiert.

Nach Transfektionen mit siRNAs wurden die Zellen trypsiniert und zur weiteren Kultivierung in Petrischalen (9 cm Durchmesser) ausplattiert.

### 3.1.5 MTT-Assay

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, 1983). Durch die enzymatische Umsetzung entsteht ein Formazan-Produkt, das durch Messung der optischen Dichte quantifiziert wird. Je  $3 \times 10^3$  Zellen wurden in 96-Loch-Platten ausgesät. Die Messung des Nullwertes erfolgte bei adhärenenten Zellen. Zur Messung der MTT-Konversion wurde den Zellen je 10  $\mu\text{l}$ /Loch MTT-Reagenz zugegeben. Nach vierstündiger Inkubation bei 37°C wurden die gebildeten Farbkristalle in 200  $\mu\text{l}$ /Loch eines 24:1 Isopropanol und 1 M HCl komplett lysiert und anschließend die optische Dichte (OD) bei 540 nm in einem ELISA-Gerät gemessen und um den Wert bei 630 nm korrigiert. Zum Vergleich verschiedener Experimente wurden die gemessenen OD-Werte stets auf den am ersten Tag einer Zeitreihe gemessenen Werts standardisiert.

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

### 3.1.6 FACS-Analysen

#### Bestimmung der Zellgröße

Adhärente Zellen wurden trypsiniert, abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und anschließend in FACS-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden dann in einem FACSCalibur Durchflusszytometer analysiert.

- *FACS-Puffer*: PBS + 2% FKS

#### Analyse von Propidiumiodid gefärbten Zellen

Propidiumiodid interkaliert in DNA. Interkaliertes Propidiumiodid fluoresziert und dient als Maß für den DNA-Gehalt der Zelle. Zur Bestimmung des DNA-Gehaltes wurden  $5 \times 10^5$  bis  $10^6$  trypsinierte Zellen zweimal in PBS gewaschen, in Permeabilisierungspuffer resuspendiert und für 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal bei 4°C in PBS gewaschen und für 10 bis 15 min auf Eis in 0,5 ml Färbepuffer inkubiert. Die Zellen wurden mit FACS-Puffer verdünnt und in einem FACSCalibur Durchflusszytometer analysiert.

- *Permeabilisierungspuffer*: 20% PBS und 80% Ethanol
- *Färbepuffer*: 10 µg/ml DNase freie RNase; 50 µg/ml Propidiumiodid; 2mM EDTA in PBS
- *FACS-Puffer*: PBS + 2% FKS

### 3.1.7 Koloniebildungsexperimente

1 bis  $3 \times 10^4$  Zellen wurden in 1,3% Methylcellulose/10% FCS/DMEM auf einer Schicht aus 0,4% Agarose/10% FCS/DMEM in 6-Loch-Platten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Koloniebildung wurde mit Hilfe eines Lichtmikroskops verfolgt. Die Koloniebildung wurde nach sieben bis zehn Tagen durch Auszählen der gewachsenen Kolonien in drei zufällig ausgewählten Blickfeldern und anschließender Mittelwertberechnung quantifiziert. Weiterhin wurden repräsentative Blickfelder fotografiert.

## 3.2 Bakterienkultur

### 3.2.1 Vermehrung und Aufbewahrung

Bakterien wurden als Suspensionskultur in Luria Broth Medium (LB) oder zur Vereinzelung von Kolonien auf LB-Agar-Platten kultiviert. Bei einer Selektion auf

Resistenz gegen Antibiotika wurde dem LB-Medium das Antibiotikum aus einem 1.000fachen Stock zugegeben. Zur Lagerung von Bakterien über längere Zeiträume wurde eine dichtgewachsene Bakterienflüssigkultur mit 15% Glycerin in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

- *LB-Medium*: 1 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 1 % NaCl, pH 7,2
- *Bacto-Agar-Platten*: 1,25 % Bacto-Agar, LB-Medium
- *Endkonzentrationen der Antibiotika*: Ampicillin 100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; Chloramphenicol 34  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; Kanamycin 30  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

### 3.2.2 Transformation

Die Herstellung transformationskompetenter *E.coli*-Stämme erfolgte durch Inkubation einer *E.coli* in TFB-Puffer auf Eis (Hannahan et al., 1985). Zu einem Aliquot (200  $\mu\text{l}$ ) der kompetenten Bakterien wurden ca. 50 ng eines Ligationsansatzes bzw. 1 ng Plasmid-DNA pipettiert und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschockschritt bei  $42^{\circ}\text{C}$  für 1 min. Nach Zugabe von 800  $\mu\text{l}$  LB-Medium und einer 30-minütigen Anzucht bei  $37^{\circ}\text{C}$  wurde die Zellsuspension auf Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

- *TFB-Puffer*: 10 mM K-Mes, pH 6.2, 50 mM  $\text{CaCl}_2$ , 45 mM  $\text{MnCl}_2$ , 100 mM RbCl

## 3.3 Molekularbiologische Methoden

### 3.3.1 Allgemein verbreitete Techniken

Die Anwendung allgemein verbreiteter Techniken, die im Umgang mit Nukleinsäuren benutzt werden, wie z.B. Agarose-Gelelektrophorese, Nukleinsäureextraktion aus diesen, Konzentrationsbestimmung im Spektralphotometer, enzymatische Restriktionshydrolyse, Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase, Auffüllen von 5'-überhängender DNA-Enden, Präparation von Plasmid-DNA über Affinitätsmatrices, Ligation freier DNA-Enden etc. erfolgte in Anlehnung an Standardprotokolle (Sambrook et al., 1989) oder entsprechend den Herstellerangaben.

### 3.3.2 RNA-Isolierung

Die Gewebeproben von Karzinompatienten und gesunden Probanden wurden routinemäßig während der Operation entnommen, sofort in Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Proben wurden zur RNA-Isolierung auf Eis aufgetaut und

in FACS-Röhrchen mit TriPure überführt. Die Proben wurden mit Hilfe eines Ultrathorax zerkleinert. Dabei wurden, durch das in TriPure enthaltene Phenol und Guanidinthiocyanat, Proteine, also auch RNasen, denaturiert. Anschließend wurde das Lysat in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Jeweils 1 ml Zelllysate wurde mit 200 µl Chloroform versetzt, gevortext und nach 10 min Inkubation bei RT zentrifugiert (15 min, 13.000 g, 4°C). Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und mit 500 µl Isopropanol versetzt, gevortext und zur Präzipitation der RNA mindestens eine Stunde bei -80°C inkubiert. Danach wurde 30 min zentrifugiert (13.000 g, 4°C), der Überstand abgenommen und das Pellet mit 75% Ethanol gewaschen, getrocknet und in RNase-freiem Wasser gelöst. Nach der Präparation wurde die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

Zur Isolation von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zelllinien wurde das RNA-Kit verwendet, wobei in allen Punkten den Angaben des Herstellers (Roche, Mannheim) gefolgt wurde.

### 3.3.3 Reverse Transkription

Zur reversen Transkription von RNA in komplementäre DNA (cDNA) wurde stets 1 µg RNA eingesetzt. Die reverse Transkription erfolgte unter Verwendung von Zufalls-oligonukleotiden. Die Durchführung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers (Promega). Die so erhaltene cDNA wurde bei -20°C gelagert oder direkt für die PCR verwendet.

### 3.3.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Alle PCR-Reaktionen wurden in einem Reaktionsvolumen von 20 µl mit 1U Taq, je 10 pmol des *sense* und des *antisense* Primers (synthetisiert von Metabion), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP Mix, PCR-Reaktionspuffer (alles MBI Fermentas) und 10-50 ng cDNA durchgeführt. Die Amplifizierung erfolgte in 25 Zyklen mit jeweils einer 30 sec Denaturierungsphase bei 95°C, 30 sec Bindungsphase bei 55 bis 60°C und einer Elongationsphase bei 72°C für 30 sec.

## 3.4 Immunpräzipitation

### 3.4.1 Analytische Immunpräzipitation

Trypsinierte und in PBS gewaschene Zellen wurden in Lysispuffer suspendiert und 10 bis 30 min bei 4°C inkubiert. Das Lysat wurde für 5 min bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert und der Proteingehalt des Überstandes mittels des BCA-Kits (Pierce) bestimmt. Protein G-Sepharose (30 µl pro Ansatz) wurde in PBS gewaschen, in 400 µl PBS resuspendiert und 1 bis 3 µg Antikörper zugegeben. Der Ansatz wurde 30 min bei Raumtemperatur unter Rotation inkubiert, dann in ein Zentrifugationssäulchen (MoBiTec) überführt und einmal mit PBS gewaschen. Für die Immunpräzipitation wurden zwischen 200 und 400 µg Protein in 400 µl Lysispuffer zugegeben und bei 4°C über Nacht unter Rotation inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit Lysispuffer erfolgte die Elution mit 20 µl Lämmli-Puffer für 5 min bei 95°C. Das Eluat wurde direkt für Immunoblots verwendet oder bei -20°C gelagert.

- *Lysispuffer*: 1% Triton und Proteaseinhibitor Cocktail (Roche) in PBS
- *Lämmli-Puffer*: 140mM TrisHCl pH7; 30% Glycerin; 4% SDS; 16% Beta-Mercaptoethanol; 0,1% Bromphenolblau

### 3.4.2 Präparative Immunpräzipitation für die zweidimensionale Gelelektrophorese

Zellysate wurden wie für die analytische Immunpräzipitation hergestellt. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 500 g und Raumtemperatur durchgeführt, soweit nicht anders angegeben. Für die präparative Immunpräzipitation wurden 500 µl Protein G Sepharose (Amersham) mit 20 mg gereinigten Antikörpern inkubiert. Die Sepharose wurde einmal mit PBS, einmal mit 200mM Triethanolamin (pH 8,2) gewaschen, in *Crosslink*-Puffer resuspendiert und für 45 min bei RT unter Rotation inkubiert. Die Reaktion wurde durch einmaliges Waschen mit 100 mM Ethanolamin gestoppt und die Sepharose mit TBS und Lysispuffer gewaschen. Die mit Antikörpern gekoppelte Sepharose wurde über Nacht bei 4°C mit dem Lysat von 10<sup>8</sup> Karzinomzellen unter Rotation inkubiert. Die Sepharose wurde zweimal mit Lysispuffer, einmal mit 50mM Tris pH 7,4 gewaschen und anschließend in 470 µl 2D-Lysispuffer ohne DTE resuspendiert, um eine Reduktion der Disulfidbrücken zwischen leichten und schweren Ketten der Antikörper zu verhindern. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Sepharosematrix für 5 min bei 7.000 g abzentrifugiert. Der

Überstand wurde in ein neues 1,5ml Eppendorf-Gefäß überführt und mit 1% DTE versetzt. Die Eluate wurden direkt für die isoelektrische Fokussierung verwendet oder bei -80°C gelagert.

- *Crosslink-Puffer*: 200mM Triethanolamin, 100 mM Dimethylpimelimidat, pH 8,2
- *TBS*: 50mM Tris;150mM NaCl, pH 7,4
- *Lysispuffer*: 1% Triton und Proteaseinhibitor Cocktail (Roche) in TBS
- *2D-Lysispuffer*: 9M Harnstoff, 4% CHAPS, 2,5mM EDTA, 1% DTE

## 3.5 Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese

### 3.5.1 Isoelektrische Fokussierung

Zur isoelektrischen Fokussierung von Proteinen wurden pH-Gradientengelstreifen (IPG: immobilisierter pH Gradient) mit einer Länge von 24 cm und einem pH-Bereich von 4 bis 7 benutzt. Jede Probe wurde mit IPG-Puffer und Bromphenolblau (BPB) versetzt (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 einen Zeitraum von 30 h bei 20 °C und maximal 50 µA/Streifen. Die üblicherweise erhaltene Gesamtvoltstundenzahl betrug 70 kVh bei 24 cm Streifen. Nach der Fokussierung wurden die IPG-Streifen entweder bei -80°C eingefroren oder die zweite Dimension (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese) durchgeführt.

**Tabelle 3.1 Laufbedingungen der IEF für IPG-Streifen von 24 cm Länge.**

Stufen	Spannung (V)	Dauer (h)
Rehydrierung	0	0,25
1	30	8
2	50	4
3	200	2
4	500	2
5	2.000	2
6	4.000	2
7	8.000	1
8	8.000	19

- *Resolving-Puffer*: 1.5 mM Tris (pH 8.8), 0.4% SDS, 1.5 mM NaN<sub>3</sub>; (zwei Wochen bei 4°C haltbar)
- *Bromphenolblaupuffer*: 3 mM Bromphenolblau in Resolving Puffer

### 3.5.2 Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese

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 auf 10 bis 15%ige SDS-Polyacrylamidgele aufgelegt, mit 0,5% Agarose (in Equilibrierungspuffer) fixiert und die Proteine nach ihrem Molekulargewicht in einer Ettan Dalt Elektrophoreseanlage (Amersham) aufgetrennt. Zuerst wurde für 30 min eine Spannung entsprechend einer Leistung von 3W/Gel angelegt. Anschließend wurde bei 18 W/Gel für 2 bis 5 h der Lauf fortgesetzt, bis die Bromphenolblaufront aus dem Gel ausgelaufen war.

- *Equilibrierungspuffer*: 6 M Harnstoff, 3.3 M Glycerin, 70 mM SDS, 3,3% Resolvingpuffer (2 Wochen haltbar)
- *SDS-Laufpuffer*: 1.92 M Glyzin, 0.25 M Tris, 1% SDS, pH 8.3

### 3.5.3 Silberfärbung

Die Detektion der Proteine erfolgte im Anschluss an die zweidimensionale Gelelektrophorese mit einer Silberfärbung. Die verwendete Färbemethode wurde in Anlehnung an (Shevchenko et al., 1996) so gewählt, dass sie mit der nachfolgenden massenspektroskopischen Analyse von Proteinen kompatibel ist. Die einzelnen Schritte sind in Tabelle 3.2 aufgeführt.

Tabelle 3.2 Silberfärbeprotokoll

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

- *Fixierlösung*: 40% Ethanol; 10% Essigsäure

- *Sensitivierungslösung*: 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

### 3.6 Protein-Analyse über MALDI-ToF

Ausgewählte Proteinspots wurden aus silbergefärbten 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 *peptide mass fingerprints* (PMF) wurden zur Identifizierung des jeweiligen Proteins mit *PMF*-Proteindatenbanken verglichen.

#### 3.6.1 Tryptischer Verdau

Der tryptische Verdau der Gelstücke erfolgte mit dem Montage In-Gel Digest 96 Kit (Millipore, USA) nach einem veränderten Protokoll. Das Absaugen von Flüssigkeiten geschah hier mit Hilfe einer Vakuumanlage, so dass maximal 96 Proben parallel verarbeitet werden konnten. Dazu wurden die Gelstücke, welche die gewünschten Proteinspots enthielten, klein geschnitten und in 96-Loch-MultiScreen-Platten (Millipore, USA) überführt. Die Gelstücke wurden mit 100 µl Wasser (Millipore) zweimal 10 bis 30 min bei RT gewaschen. Um das Silber auszuwaschen, wurden die Spots mit 100 µl Entfärber versetzt und so lange im Schüttler inkubiert, bis keine Färbung mehr sichtbar war (5 bis 10 min). Anschließend wurde dreimal mit Millipore-Wasser nachgewaschen. Die Gelstücke wurden dann zweimal abwechselnd 10 bis 15 min mit 50% Acetonitril bzw. 50 mM Ammoniumbicarbonat (frisch angesetzt) gewaschen. Anschließend wurden die Gelstücke in 30 µl 50mM Ammoniumbicarbonat und Trypsin (Endkonzentration 100 ng/µl) aufgenommen und über Nacht bei 30°C verdaut. Um ein Verdunsten der Lösungen zu verhindern, wurden die 96-Loch-MultiScreen-Platten mit einer Klebefolie abgedichtet. Nach dem tryptischen Verdau wurde der Überstand mittels Vakuum in eine 96-Loch-Platte überführt und die verbliebenen Gelstücke zweimal mit 100 µl Extraktionslösung für 30 min bei RT inkubiert. Die Überstände wurden abgenommen, mit dem ersten vereinigt und in 1,5ml Eppendorf-Gefäße überführt. Die vereinigten Überstände wurden in flüssigem

Stickstoff schockgefroren und lyophilisiert (SpeedVac, 45min, RT). Anschließend wurde das Lyophilisat bei -20°C gelagert.

- *Entfärber*: 30 mM Kaliumhexacyanoferrat und 100 mM Natriumthiosulfat im Verhältnis 1:1 vermischt (frisch angesetzt) in Millipore-Wasser
- *Extraktionslösung*: 75% Acetonitril, 50mM Ammoniumbicarbonat in Millipore-Wasser

### 3.6.2 Konzentrierung des tryptischen Verdaus/Kristallisierung auf Anker-Metallplatten

Die Anker-Metallplatte wurde vor jeder Messung mit 50% Methanol gesäubert und luftgetrocknet. Die Lyophilisate des tryptischen Verdaus wurden in 10 µl Waschlösung aufgenommen und in einem Ultraschallbad gelöst. Die Konzentrierung und Entsalzung des tryptischen Verdaus erfolgte mit Hilfe von ZipTips (ZipTip µ-C18, Millipore, USA) nach eigenem Protokoll. Nach Vorbehandlung der ZipTips mit Equilibrierungslösung (3 x 10µl) und Waschlösung (1 x 10µl) erfolgte die Bindung der tryptischen Peptide an die Säule. Die Entsalzung erfolgte mit Waschlösung (3x10µl). Die Peptide wurden anschließend mit 2 µl Elutionslösung aus der Säule gespült und à 1 µl auf die Anker-Metallplatte (AnchorChip Durchmesser: 600 µm) pipettiert. Nach der Kristallisation erfolgte die Messung in einem MALDI-ToF Massenspektrometer (Reflex III).

- *Waschlösung*: 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) in Millipore-Wasser
- *Equilibrierungslösung*: 50% Acetonitril in Millipore-Wasser
- *Elutionslösung*: Gesättigte α-Cyano-4-Hydroxymizinsäure (CHCA) in 50% Acetonitril 0,1% Trifluoressigsäure in Millipore-Wasser

### 3.6.3 MALDI-ToF-Analyse

Zur Analyse der aufgetragenen Peptidfragmente wurde die Anker-Metallplatte in das Massenspektrometer (MALDI-ToF) eingeführt. Anschließend wurden die in der CHCA-Matrix kokristallisierten Peptidfragmente im Hochvakuum 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 *peptide mass fingerprint* Proteindatenbanken verglichen (<http://www.matrix-science.com>).

### 3.7 Immunoblot

Proteinlysate wurden in 10 bis 15%igen SDS-Polyacrylamidgelen in einer vertikalen Elektrophorese aufgetrennt (Laufbedingungen: 180 V; 30 mA/Gel) und anschließend auf eine Immobilon-PVDF Transfermembran (Millipore) übertragen (Westernblot; 100 V; 500 mA; 0,75 bis 1h). Durch 20-minütige Inkubation der Membran in Blockpuffer wurden unspezifische Bindungen von Antikörpern unterbunden. Die Detektion der Proteine erfolgte mit spezifischen Primärantikörpern bzw. Antisera (1:100 bis 1:5.000 in Waschpuffer) und Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpern (1:1.000 - 1:5.000) nachgewiesen.

- *10 x Laufpuffer*: 250 mM Tris, 2 M Glyzin, 1% SDS
- *10 x Blotting-Puffer*: 250 mM Tris, 1,26 M Glyzin
- *Waschpuffer*: Phosphatgepufferte Saline (PBS) + 0,2 % Tween
- *Blockpuffer*: Roti-Block (ROTH), 1:10 in Aqua dest.

### 3.8 Immunhistochemische Schnitffärbung

Die Gewebeproben 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 µm 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 Ziegen Serum 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 dem 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 erfahrenen Experimentatoren unabhängig voneinander bestimmt.

### 3.9 Rekombinante Proteinexpression

Die kodierende Sequenz der zu exprimierenden Proteine wurde in den prokaryotischen Expressionsvektor pETM30 (EMBL) kloniert, so dass das Protein als N-terminales GST Fusionsprotein exprimiert wurde. Weiterhin enthielt das Fusionsprotein N-terminal vom GST eine 6xHis-Markierung, *i.e.* sechs aufeinander folgende Histidine. Die Expression des Fusionsproteins wird durch den Lac-Operator kontrolliert. Der Lac-Repressor bindet in Abwesenheit von Liganden an diesen und reprimiert die Transkription des Konstruktes. Durch Zugabe eines geeigneten Liganden, wie IPTG, löst sich der Lac-Repressor vom Operator und die Transkription erfolgt. Das translatierte Protein kann mittels der chelatierenden Eigenschaft der 6xHis-Markierung aufgereinigt werden. Als Affinitätsmatrix wurde Ni-NTA verwendet. NTA bindet  $\text{Ni}^{2+}$ -Kationen über vier der sechs möglichen koordinativen Bindungsstellen. Zwei koordinative Bindungsstellen des  $\text{Ni}^{2+}$  bleiben frei. An diese können 6xHis markierte Proteine binden und so über Ni-NTA aufgereinigt werden. Die Elution erfolgt mit Imidazol, welches als hoch affiner Ligand das 6xHis markierte Protein von der Ni-NTA verdrängt.

#### 3.9.1 Expression

Für die Expression von rekombinanten Proteinen wurden 200 bis 300 ml LB-Medium mit 1% einer Vorkultur (Über-Nachtkultur) angeimpft. Zur Expression wurde der *E.coli*-Stamm Rosetta (DE3) verwendet. Nachdem die Kultur bei 37°C unter Schütteln bis zu einer  $\text{OD}_{590}$  von 0,4 angewachsen war, wurde die Expression mit 1mM IPTG induziert. Die Kultur wurde für 5 bis 20 h weiterkultiviert, die Bakterien durch Zentrifugation (15 min, Raumtemperatur, 4.500 g) geerntet und direkt aufgeschlossen oder bei -20°C gelagert.

#### 3.9.2 Aufreinigung

Das Bakterienpellet wurde in Aufschluss-Puffer (10% des Kulturvolumens; 2 bis 3 ml) resuspendiert und mit zwei 30-sekündigen Ultraschallbehandlungen (40%, Stufe 5 bis 7, auf Eis) aufgeschlossen. Die Suspension wurde 15 min bei 4°C und 13.000 g

abzentrifugiert. Der Überstand wurde für die Aufreinigung des rekombinanten Proteins eingesetzt, das Pellet verworfen.

Die Aufreinigung erfolgte über die 6xHis-Markierung der rekombinanten Proteine. NiNTA-Agarose wurde mehrmals mit *Aqua dest.* gewaschen und 200 µl in eine Micro-Bio-Spin-Zentrifugationssäule (Bio-Rad) gegeben, mit Lysispuffer equilibriert und 800 µl des Lysats zugegeben. Die Bindung der rekombinanten Proteine an die NiNTA-Agarose erfolgte 10 min bei Raumtemperatur unter Rotation. Anschließend wurden die Proteine dreimal mit 800 µl Wasch-Puffer gewaschen. Zur Elution wurde die Agarose für 10 min bei Raumtemperatur in 200 µl Elutions-Puffer unter Rotation inkubiert. Das Eluat wurde mit 1 Volumen Glycerin versetzt und so bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

- *Aufschluss-Puffer*: 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 200mM NaCl, 5 mM Imidazol, Roche Proteaseinhibitor Cocktail (EDTA frei), pH 8
- *Wasch-Puffer*: 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 200mM NaCl, 20 mM Imidazol, Roche Proteaseinhibitor Cocktail (EDTA frei), pH 8
- *Elutions-Puffer*: 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 200mM NaCl, 300 mM Imidazol, Roche Proteaseinhibitor Cocktail (EDTA frei), pH 8

### 3.10 Quantifizierung humoraler Immunantworten

#### 3.10.1 Quantifizierung der humoralen Immunantwort gegen e-FABP

Glutathion gekoppelte *Beadlyte* Polyesterolkügelchen (Biomol) wurden entweder mit GST oder mit GST-e-FABP Fusionsprotein bis zur Sättigung entsprechend dem Protokoll des Herstellers beladen, mehrfach mit Wasch-Puffer gewaschen und dann mit 100 µl einer 1:100 Verdünnung (in Bioplex-Serumdiluenten) von Serum 1 h bei RT inkubiert, erneut gewaschen und weitere 30 min bei RT mit einem antihuman Phycoerythrin (PE)-gekoppelten Sekundärantikörper behandelt. Die Menge an gebundenen 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 50 gemessenen Kügelchen angegeben. Um unspezifische Bindungen von Antikörpern an die Matrix, das Glutathion oder den GST-Anteil des GST-e-FABP-Fusionsproteins zu berücksichtigen, wurde die spezifische e-FABP Serumreaktivität als Differenz zwischen dem MFI des Fusionsproteins (GST-e-FABP) und dem MFI von GST allein berechnet.

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.

- *Waschpuffer*: PBS, 0,1% Tween

### **3.10.2 Quantifizierung der humoralen Immunantwort 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 Kopplungskits auf fluoreszenzgefärbte 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 antihuman 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. Als Negativkontrolle wurde BSA (Bovine Serum Albumin) beladene Matrix verwendet. Als Positivkontrolle und Standard wurden bei jeder Messung fünf Seren mit bekannten Reaktivitäten gemessen. Zusätzlich wurde eine Standardkurve mit verschiedenen Verdünnungen eines Maus-anti-CK8-Antikörpers und PE-konjugiertem Zweitantikörper bestimmt. Die statistische Auswertung der erhaltenen Messwerte erfolgte wie für die Auswertung der humoralen Immunantwort gegen e-FABP.

## 4 Ergebnisse

Eine Möglichkeit des Immunsystems, Pathogene und körpereigene, transformierte Zellen zu bekämpfen ist die humorale Antwort. Seren von Tumorpatienten enthalten daher Antikörper, welche spezifisch für Tumorantigene (TA) sind.

Zu Beginn dieser Doktorarbeit wurde eine proteinbiochemische Methode in unserem Labor verwendet, welche die Identifizierung potentieller TAs ermöglicht. Diese Technologie basierte auf der Immunopräzipitation von TAs aus Tumorbiopsien von Karzinompatienten durch autologe Serumantikörper. Die so isolierten Antigene wurden zweidimensional aufgetrennt und massenspektroskopisch analysiert. Dieses patentierte Verfahren wurde als autologe AMIDA-Technologie (*auto-antibody mediated identification of antigens*) beschrieben (Gires et al., 2004).

### 4.1 Identifizierung potentieller neuer Tumorantigene in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halsbereichs

#### 4.1.1 Entwicklung einer allogenen proteinbiochemischen Technologie zur Isolierung und Identifizierung von Tumorantigenen

Die autologe AMIDA Technologie ist durch die Verfügbarkeit ausreichender Mengen an Biopsiematerial limitiert. Außerdem birgt die heterogene Zusammensetzung des Tumorgewebes das Risiko, nicht Tumorzell-spezifische Antigene mit den Serumantikörpern des Patienten zu präzipitieren. Weiterhin ist die Beschaffung von Tumorbiopsien mit erheblichem organisatorischem Aufwand im klinischen Alltag verbunden und nicht bei jedem Patienten durchführbar. Die AMIDA Technologie sollte aus diesen Gründen auf die Verwendung von Blut als alleiniges Primärmaterial von Patienten beschränkt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die AMIDA Technologie in Zusammenarbeit mit Herrn Jens Rauch entsprechend weiterentwickelt. Sie erlaubt nun, TAs von Karzinomen mit Hilfe spezifischer Antikörper zu isolieren und zu identifizieren, ohne auf Tumorbiopsien angewiesen zu sein. Als beispielhafte Entität wurden Karzinome des Kopf-Halsbereichs ausgewählt.

Es wurde eine allogene Variante der AMIDA-Technologie entwickelt, die sich etablierter Tumorzelllinien als Proteinquelle bedient. Diese Proteinquelle ist unabhängig vom Tumor des Patienten und dessen klinischer Behandlung verfügbar. Es handelt sich ferner um eine homogene Proteinquelle. Die Verwendung dieser allogenen Proteinquelle erforderte die Einführung strikter Kontrollen, um allogene Reaktionen zwischen Serumantikörpern eines Patienten und Proteinen der Zelllinien zu erkennen. Serumantikörper gesunder Probanden wurden zur Immunopräzipitation verwendet, um allogene Reaktionen, also solche, die nicht auf TA- spezifische Antikörper im Blut von Karzinompatienten zurückzuführen sind, zu identifizieren. Das allogene AMIDA-Verfahren ist in Abbildung 4.1 schematisch dargestellt und wird im Folgenden genauer beschrieben.

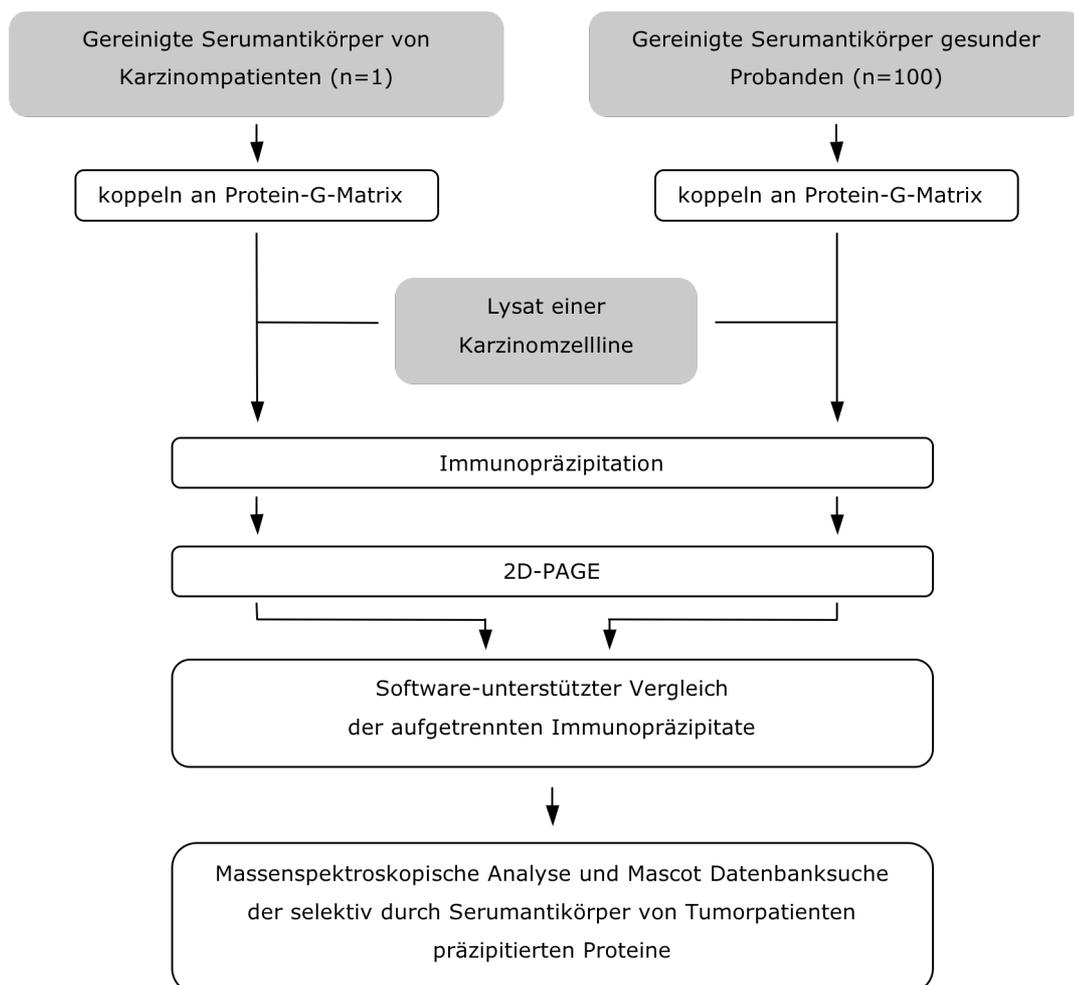


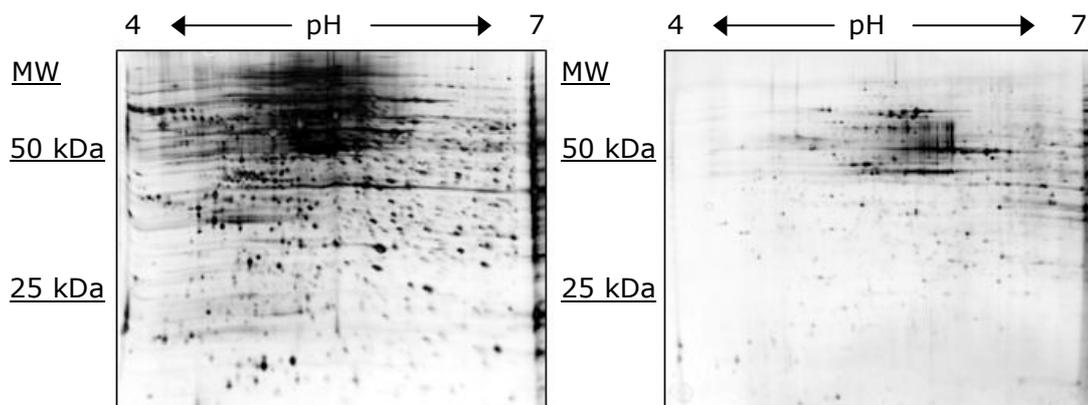
Abbildung 4.1 Flussdiagramm der allogenen AMIDA-Technologie

#### 4.1.1.1 Immunopräzipitation

Antikörper wurden aus Seren von Tumorpatienten, die an einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Halsbereich litten, mittels Protein G-Sepharosesäulen isoliert und anschließend zur Immunopräzipitation (IP) verwendet. Ein Pool gereinigter Antikörper von gesunden Spendern, welcher als Kontrolle diente, wurde kommerziell erworben. Die gereinigten Antikörper wurden kovalent (*Crosslink*) an eine Protein-G-Matrix gekoppelt und die so immobilisierten Antikörper zur IP von Antigenen verwendet. Als Proteinquelle wurden Gesamtlysate aus  $10^8$  Zellen der HNO-Karzinomzelllinien FaDu oder PCI-1 verwendet.

#### 4.1.1.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese

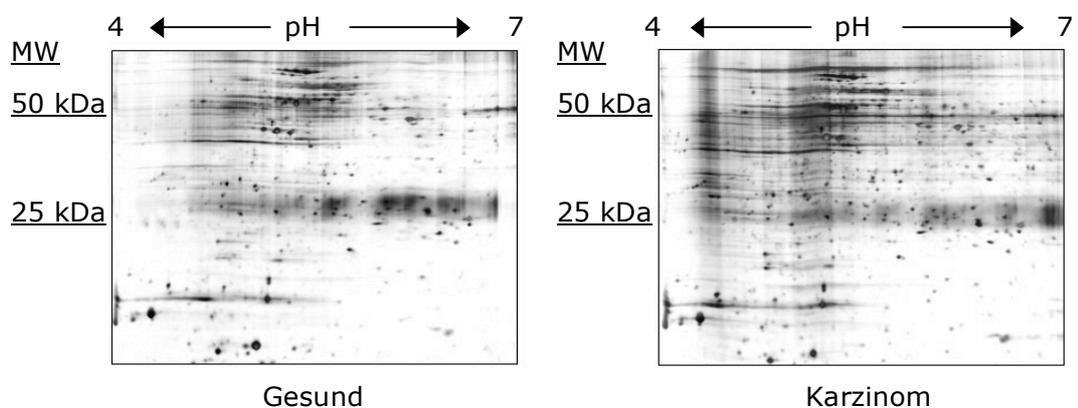
Die präzipitierten Antigene wurden in einer ersten Dimension (isoelektrische Fokussierung (IEF)) über einen pH-Gradienten (pH 4-7) entsprechend ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt. In einer zweiten Dimension wurden die präzipitierten Antigene in einer denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Gele wurden zur Visualisierung der Proteine mit Silbernitrat gefärbt. Die IP der Antigene reduziert die Komplexizität des in der 2D-PAGE aufzutrennenden Proteingemisches deutlich (siehe Abb.4.2). So wurden in einer 2D-PAGE eines Gesamtzelllysates in etwa 1500 distinkte Spots beobachtet, ein gleiches Gesamtlysat mit vorheriger IP zeigte in der 2D-PAGE nur noch 650 Spots (Abbildung 4.2).



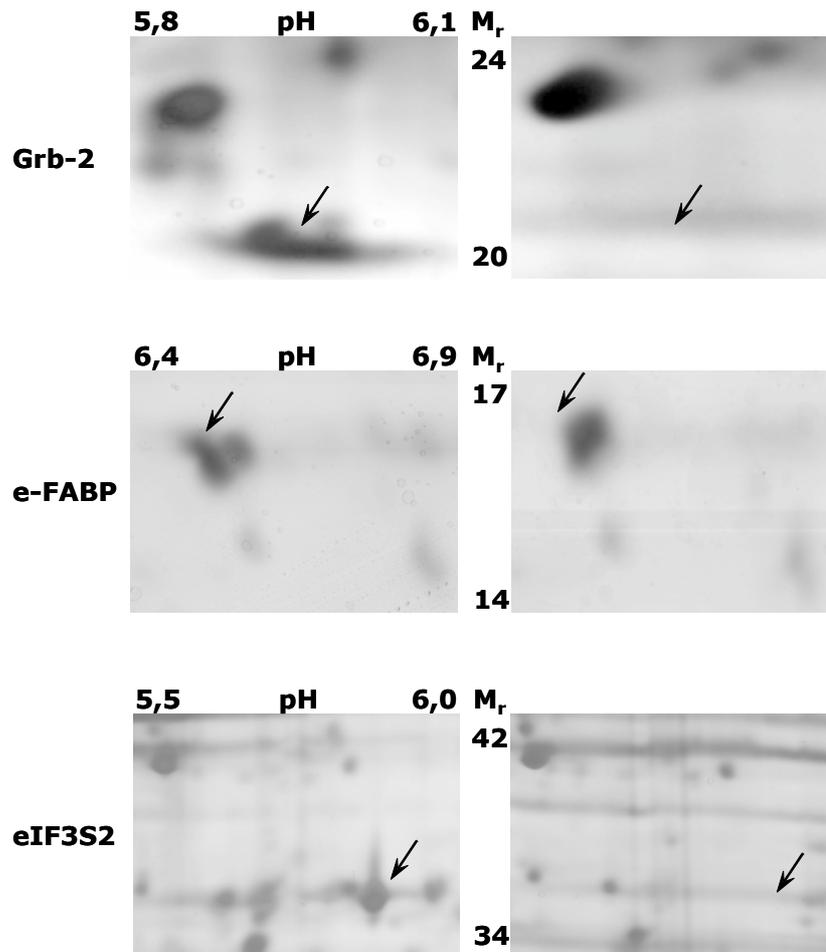
**Abbildung 4.2 Reduktion der Proteinkomplexität durch AMIDA.** Gezeigt ist ein Gesamtzelllysat der Zelllinie FaDu, das zweidimensional in einem 11%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt wurde (A) und im Vergleich dazu ein Immunpräzipitat (B) aus einem Gesamtzelllysat, das gleichermaßen aufgetrennt wurde.

#### 4.1.1.3 Identifizierung Tumorserum-selektiv präzipitierter Antigene

Um tumorspezifische bzw. -assoziierte Antigene von natürlichen Autoantigenen und allogenen Reaktion unterscheiden zu können, wurden als Kontrolle Immunopräzipitationen mit Antikörpern gesunder Spender durchgeführt und ebenfalls in der zweidimensionalen Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Der Vergleich von Immunopräzipitaten mit Antikörpern gesunder Spender und Tumorpatienten zeigte geringe Unterschiede in den Mustern der präzipitierten Proteine. Beim Vergleich der jeweiligen Proteinmuster konnten in der Übersicht kaum Unterschiede zwischen den aufgetrennten Immunopräzipitaten festgestellt werden (Abbildung 4.3). Jedoch bei detailliertem Vergleich der Proteinmuster wurden signifikante Unterschiede festgestellt. Dabei wurden solche Spots, die nur durch die Immunopräzipitation von Proteinen mit Serumantikörpern von Tumorpatienten beobachtet wurden, als potentielle tumorspezifische bzw. -assoziierte Antigene gewertet (Abbildung 4.4).



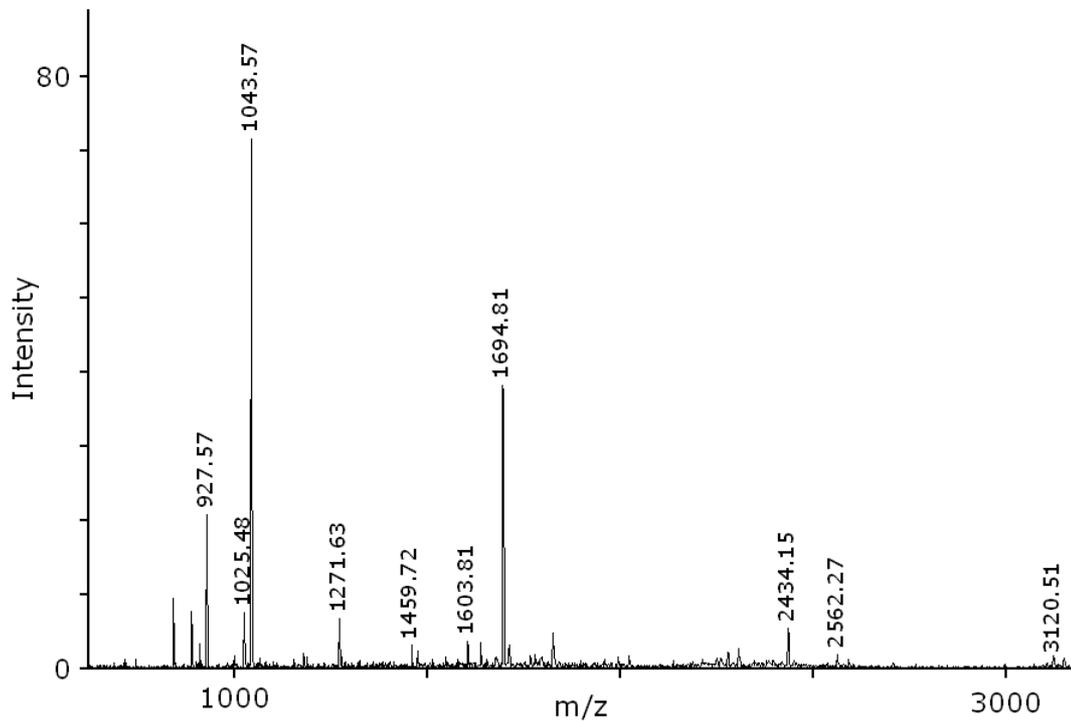
**Abbildung 4.3 Vergleich der Immunopräzipitate mit Serumantikörpern gesunder Spender und Tumorpatienten.** Links gezeigt, ein silbergefärbtes Gel einer 2D-PAGE eines Immunopräzipitates mit Serumantikörpern gesunder Probanden und rechts mit Serumantikörpern eines Karzinompatienten.



**Abbildung 4.4** Ausschnitte aus silbergefärbten 2D-Polyacrylamidgelen. Links dargestellt sind Immunopräzipitate gewonnen mit Serumantikörpern von Tumorpatienten, rechts im Vergleich Immunopräzipitate gewonnen mit Serumantikörpern gesunder Spender.

#### 4.1.1.4 MALDI-ToF-Analysen

Proteine, welche ausschließlich von Antikörpern aus Karzinompatienten präzipitiert wurden, wurden ausgeschnitten, im Gel entfärbt, tryptisch verdaut und die erhaltenen Peptide mittels MALDI-ToF Massenspektrometrie (Bruker Reflex III) analysiert. Abbildung 4.5 zeigt ein solches typisches Massenspektrum. Die Identifizierung des jeweiligen Proteins mit Hilfe des *peptide mass fingerprints* aus den Massenspektren erfolgte über einen Datenbankvergleich (<http://www.matrixscience.com>). Im Durchschnitt konnten 40% aller ausgeschnittenen Proteinspots von silbergefärbten Gelen identifiziert werden. Ein Beispiel für eine solche Datensuche zeigt Abbildung 4.5.

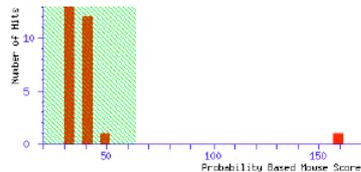


### (MATRIX) Mascot Search Results

User : Martin Ahlemann  
 Email : martin.ahlemann@med.uni-muenchen.de  
 Search title : PCI-7  
 Database : MSDB 20050701 (2081917 sequences: 677709849 residues)  
 Taxonomy : Homo sapiens (human) (135923 sequences)  
 Timestamp : 3 Nov 2005 at 08:35:49 GMT  
 Top Score : 159 for **1B56**, fatty acid binding protein - human

#### Probability Based Mowse Score

Ions score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event.  
 Protein scores greater than 64 are significant ( $p < 0.05$ ).



#### Concise Protein Summary Report

Format As  [Help](#)

Significance threshold  $p <$

Max. number of hits

1.	<a href="#">1B56</a>	Mass: 15295	Score: 159	Expect: 1.7e-11	Queries matched: 11
	fatty acid binding protein - human				
	<a href="#">FABPE HUMAN</a>	Mass: 15366	Score: 158	Expect: 2.2e-11	Queries matched: 11
	Fatty acid-binding protein, epidermal (E-FABP) (Psoriasis-associated fatty acid-binding protein homolog) (PA-FABP).- H				
	<a href="#">F56326</a>	Mass: 15497	Score: 157	Expect: 2.7e-11	Queries matched: 11
	fatty acid binding protein homolog - human				
	<a href="#">CAD48674</a>	Mass: 15486	Score: 57	Expect: 0.27	Queries matched: 5
	Sequence 9 from Patent WO0229058.- Homo sapiens (Human).				
	<a href="#">O5T164 HUMAN</a>	Mass: 7545	Score: 38	Expect: 19	Queries matched: 3
	Ret finger protein-like 3 antisense.- Homo sapiens (Human).				
	<a href="#">Q9BY20 HUMAN</a>	Mass: 32040	Score: 35	Expect: 40	Queries matched: 4
	Beta-2 adrenergic receptor (Fragment).- Homo sapiens (Human).				
	<a href="#">CAE98354</a>	Mass: 8795	Score: 33	Expect: 68	Queries matched: 3
	AX884240 NID: - Homo sapiens				

Abbildung 4.5 Repräsentatives Beispiel eines MALDI-ToF Massenspektrums und einer Datenbanksuche. In der oberen Abbildung ist das MALDI-ToF Massenspektrum von humanem e-FABP gezeigt. Die untere Abbildung zeigt das Ergebnis der Datenbanksuche mit diesem Massenspektrum (*peptide mass fingerprint*).

### 4.1.2 Isolierung und Identifizierung potentieller Tumorantigene in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halsbereichs

Das allogene AMIDA-Verfahren wurde mit insgesamt acht Seren von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halsbereichs durchgeführt. Antikörper aller Patienten wurden zur Immunopräzipitation von Antigenen aus FaDu Zelllysaten verwendet. Bei fünf Patienten war die zur Verfügung stehende Menge Antikörper ausreichend, um zusätzlich Immunopräzipitationen von Antigenen aus PCI-1 Zelllysaten durchzuführen. Der Software-gestützte Vergleich der aufgetrennten Immunopräzipitate mit den Kontrollpräzipitaten führte zur Identifizierung von durchschnittlich fünf Proteinen, die selektiv in Immunopräzipitaten mit Antikörpern von Tumorpatienten beobachtet wurden. Von den ca. 70 ausgeschnittenen Proteinen konnten 27 mit einer signifikanten *Mowse Score* ( $p \leq 0,05$ ) identifiziert werden. Bei vieren handelte es sich um schwere oder leichte Kette von Immunglobulinen. Diese wurden als technische Artefakte betrachtet und nicht als potentielle Tumorantigene. Insgesamt wurden zwölf verschiedene Proteine als potentielle Tumorantigene identifiziert. Einige potentielle TAs wurden durch mehrere Tumorseren isoliert und einige wurden mit den gleichen Antikörpern aus FaDu und PCI Zelllysaten präzipitiert. Tabelle 4.1 faßt die identifizierten potentiellen TAs zusammen. Weiterhin sind die Datenbank-Eingangsnummern, die Identifizierungswerte (pI und MW in der 2D-PAGE und Score sowie Peptidabdeckung in der massenspektroskopischen Identifizierung) aufgeführt.

Die identifizierten Proteine unterteilen sich entsprechend ihrer zellulären Funktion in

- (1) die Gruppe der Kernproteine mit hnRNP H (*heterogenous ribonuclear protein H*) und PSP1 (*paraspeckle protein 1*),
- (2) die Gruppe der Proteine die insbesondere im Metabolismus eine Rolle spielen, namentlich e-FABP (*epidermal fatty acid binding protein*), Cytidineaminase und eIF3S2 (*eukaryotic initiation factor 3 subunit 2*),
- (3) die Gruppe der Chaperone mit Hsp27 (*heat shock protein 27*) und Grp78 (*glucose regulated protein*),
- (4) die Gruppe der Proteine des Zytoskeletts mit TPMsk3 (*tropomyosin slow skeletal 3*), Profilin II, Cortactin und Tubulin  $\beta$ ,

(5) und Grb2 (growth factor receptor-bound protein-2), involviert in die Signaltransduktion.

**Tabelle 4.1** In einem allogenen AMIDA-Screen identifizierte potentielle Tumorantigene. (n/t – gefundene Fälle/ total untersuchte Fälle)

	Mascot Suchergebnis	SwissProt Eingangs- nummer	Score	Sequenz- abdeckung (%)	theor. MW (kDa)	exp. MW (kDa)	theor. PI (pH)	exp. PI (pI)	Frequenz	
									FaDu n/t	PCI n/t
1	e-FABP	Q01469	125	70	15,3	16	6,54	6,5	2/8	3/5
2	Cytidineaminase	P32320	86	61	16,6	17	6,55	6,3	0/8	1/5
3	eIF3S2	Q13347	168	50	36,9	36	5,38	5,6	2/8	0/5
4	PSP1, $\alpha$	Q8WXF1	186	26	58,8	50	6,26	6,3	3/8	0/5
5	hnRNP H	P31943	107	25	49,5	23	5,89	6,8	2/8	0/5
6	TPM3sk2	Q8TCG3	67	28	28,8	27	4,72	4,8	1/8	0/5
7	Profilin II	P35080	108	41	15,0	16	6,75	5,6	1/8	0/5
8	Cortactin	Q14247	96	17	61,8	66	5,24	5,6	1/8	0/5
9	Tubulin beta 1	P07437	132	33	49,3	38	4,75	5,5	1/8	1/5
10	Grp78	Q9UK02	79	18	72,1	70	5,03	5,0	1/8	0/5
11	Hsp27	P04792	165	42	22,4	24	7,80	6,9	1/8	1/5
12	Grb2	P29354	122	51	21,5	22	7,19	6,0	2/8	0/5

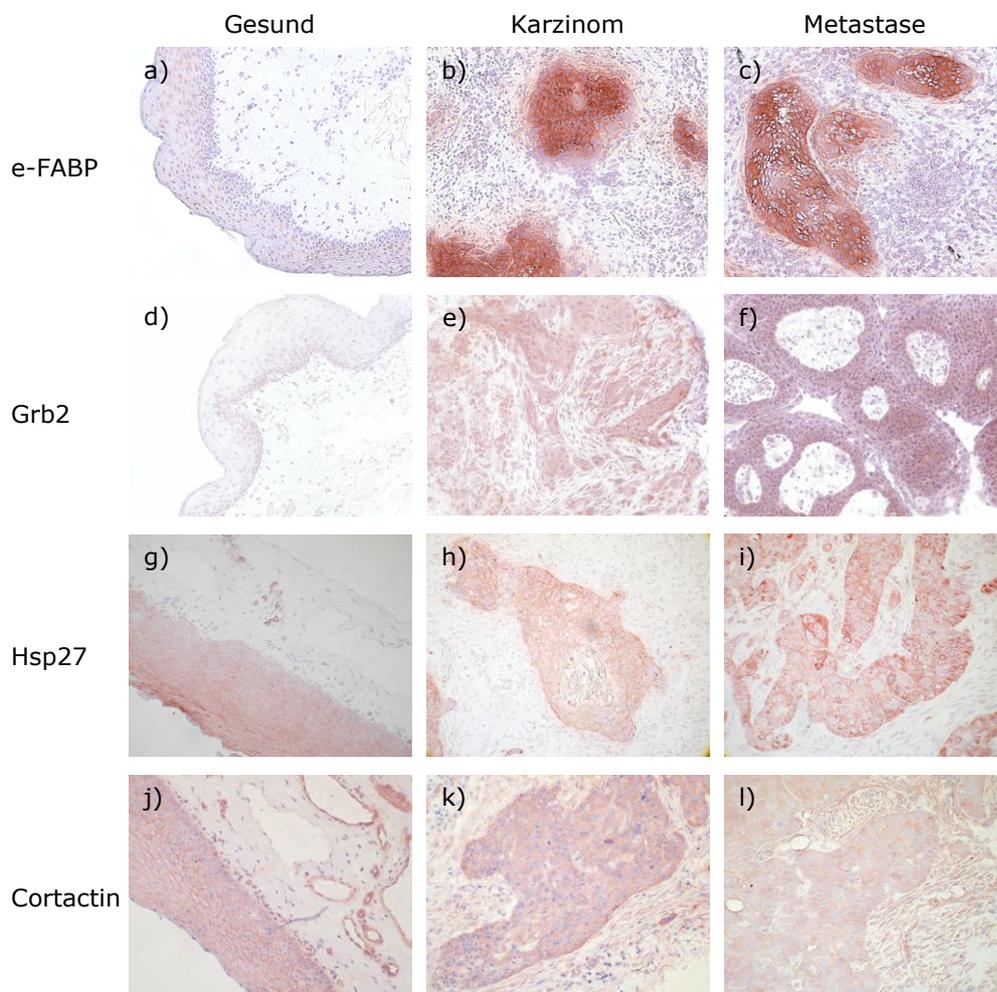
## 4.2 Validierung der allogenen AMIDA-Technologie

Potentielle Tumorantigene werden durch die allogene AMIDA-Technologie aufgrund spezifischer Serumreaktivitäten im Blut von Karzinompatienten isoliert. Da die allogene AMIDA-Technologie ein Zelllinienlysat als Proteinquelle verwendet, ist die tumorspezifische bzw. -assoziierte Expression der identifizierten TAs in Karzinomen *in vivo* zu beweisen. Dies ist einer der beiden wichtigen Aspekte der Validierung dieser neuen Technologie. Der zweite wichtige Aspekt besteht darin, zu untersuchen, ob die Serumreaktivität gegen die identifizierten TAs in einer größeren Patientenzahl vorliegt.

Dies wäre ein erster Schritt hin zur Verwendung einer spezifischen humoralen Immunantwort gegen ein identifiziertes TA als Biomarker.

#### 4.2.1 In vivo Expression identifizierter potentieller Tumorantigene

Die Expression verschiedener identifizierter TAs wurde in Tumorgewebe von Kopf-Halskarzinomen und im gesunden Rachenepithel untersucht. Dabei wurden, sofern ein geeigneter Antikörper verfügbar war, immunhistochemische Färbungen von Gefrierschnitten verschiedener Tumorbiopsien, Metastasen und gesunder Rachenepithelien angefertigt. Abbildung 4.6 zeigt exemplarisch Beispiele für die immunhistochemischen Färbungen mit verschiedenen Primärantikörpern.



**Abbildung 4.6 Übersicht immunhistochemischer Färbungen verschiedener identifizierter TAs in gesundem Gewebe, Tumorgewebe und Metastasen.** Gezeigt sind Färbungen mit e-FABP spezifischem Antikörper (a-c), Grb2 spezifischem Antikörper (d-f), Hsp27 spezifischem Antikörper (g-i) und Cortactin spezifischem Antikörper (j-l) von gesunder Schleimhaut (a, d, g, j), primärem Tumor (b, e, h, k) und Metastasen (c, f, i, l).

E-FABP, Grb2, Hsp27 und Cortactin konnten in Tumorzellen von Primärtumoren und in metastasierende Tumorzellen von Lymphknoten angefärbt werden. Somit werden diese aus einer Karzinomzelllinie isolierten TAs auch *in vivo* von Tumorzellen exprimiert. Im Falle von e-FABP und Grb2 beschränkte sich die Expression auf die Tumorzellen. Lediglich die Zellen der Basalzellschicht gesunder Schleimhaut wiesen ebenfalls eine e-FABP spezifische Färbung auf. Die Antikörper gegen Hsp27 und Cortactin hingegen färbten neben den Tumorzellen alle Zellen des Epithels der gesunden Schleimhaut, der Gefäße und Nerven. Cortactin wird weiterhin von Fibroblasten und infiltrierenden Lymphozyten exprimiert.

#### 4.2.1.1 e-FABP als Tumormarker in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halsbereichs

Bisher war wenig über die Expression von e-FABP bei Karzinomen der oberen Atemwege bekannt. Da mit einem e-FABP-spezifischen Antikörper Tumorzellen im Tumorgewebe und in Metastasen besonders deutlich gefärbt wurden, wurde die Expression im Tumorgewebe und gesundem Rachenepithel bei einer größeren Anzahl von Präparaten untersucht. Dazu wurden Gefrierschnitte von verschiedenen Tumorbiopsien (n=13) und gesundem Rachenepithel (n=3) immunhistochemisch gefärbt. Es zeigte sich, dass in 69% aller untersuchten Karzinome des Pharynx und Larynx und in 100% der untersuchten Metastasen e-FABP stark bis sehr stark exprimiert ist (Tabelle 4.2). Alle gesunden Rachenepithelien zeigten hingegen nur eine schwache e-FABP Expression in der Basalzellschicht (Abbildung 4.6). Es wurde somit eine tumorassoziierte e-FABP Überexpression beobachtet.

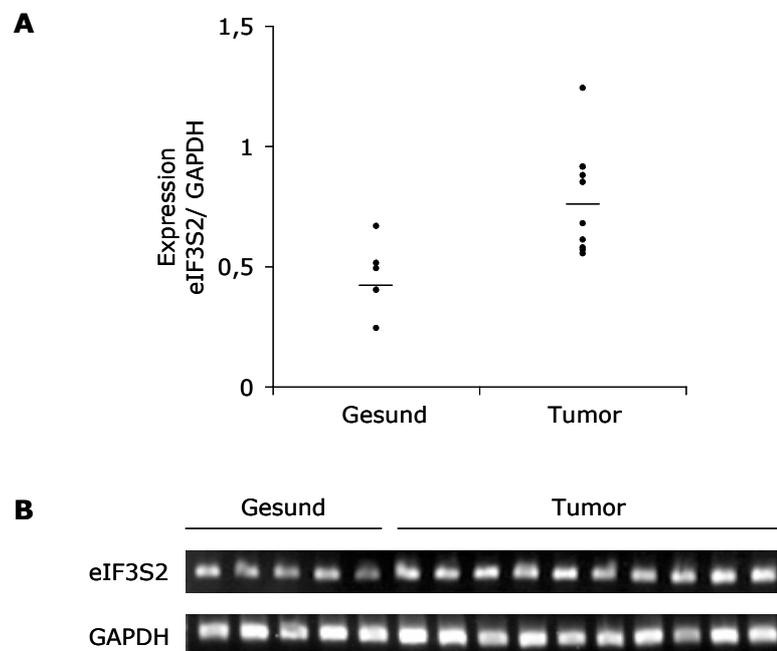
**Tabelle 4.2 e-FABP-Expression in gesundem Rachenepithel, Karzinomen des oberen Kopf-Halsbereichs und deren Metastasen.**

Lokalisation	Expressionsmuster			
	-	+	++	+++
<b>Pharynx</b>	0/11 (0 %)	4/11 (36 %)	2/11 (18 %)	5/11 (46 %)
<b>Larynx</b>	0/2 (0 %)	0/2 (0 %)	1/2 (50 %)	1/2 (50 %)
<b>Metastase</b>	0/5 (0 %)	0/5 (0 %)	1/5 (20 %)	4/5 (80 %)
<b>Gesunde Schleimhaut</b>	0/3 (0 %)	3/3 (100 %)	0/3 (0 %)	0/3 (0 %)

+++ starke Expression; ++ moderate Expression; + schwache Expression; - keine Expression

#### 4.2.1.2 eIF3S2 Expression in Tumorgewebe und gesundem Rachenepithel

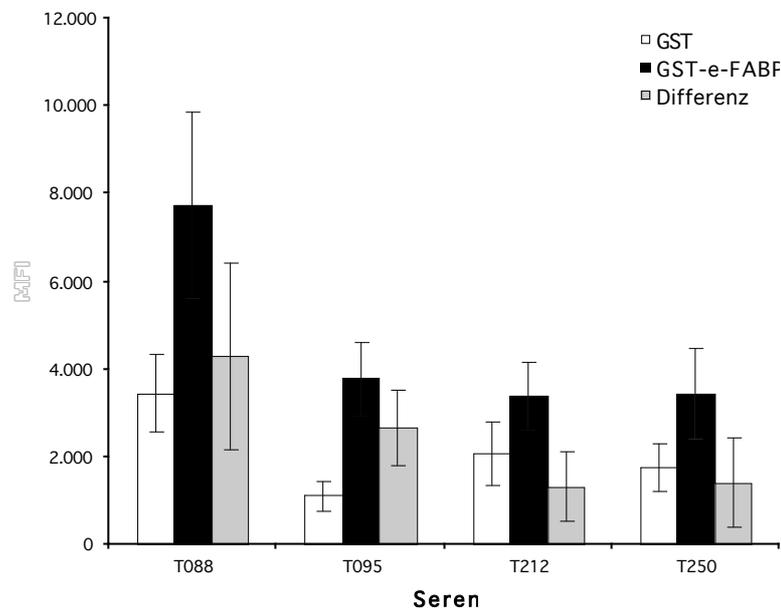
Während dieser Doktorarbeit wurde die Überexpression des *eukaryotic Initiationfactor 3 Subunit 2* (eIF3S2) bei hepatozellulären Karzinomen im Vergleich zu angrenzendem gesundem Gewebe beschrieben (Huang et al., 2004). Bis *dato* war jedoch nichts zur Expression von eIF3S2 in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halsbereichs bekannt. Da der kommerziell verfügbare Antikörper gegen eIF3S2 nicht für die Immunhistochemie verwendbar war, wurde auf die molekularbiologische Methode der Reversen-Transkriptase PCR zurückgegriffen. Tumorgewebe wurde makroskopisch von Nicht-Tumorgewebe befreit und daraus die RNA isoliert. Als Kontrolle diente RNA aus gesunder Schleimhaut. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben und als Matrize für eine GAPDH- und eIF3S2-spezifische PCR eingesetzt. Die PCR-Amplifikate wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und semiquantitativ gemessen. Die eIF3S2 Expression wurde im Verhältnis zu GAPDH bestimmt (Abbildung 4.7). Der Vergleich von fünf gesunden Schleimhäuten mit zehn Tumorgewebsproben zeigte, dass eIF3S2 im Tumorgewebe (Expression im Mittel 0,76 eIF3S2/ GAPDH) signifikant stärker ( $p \leq 0,05$ ) als im gesunden Epithel (Expression im Mittel 0,46 eIF3S2/ GAPDH) war.



**Abbildung 4.7 eIF3S2 Expression in gesundem Epithel und Tumorgewebe.** RNA wurde aus gesunden Schleimhäuten und Tumorbiopsien isoliert und eIF3S2 und GAPDH mRNA semiquantitativ bestimmt (B). Das Verhältnis von eIF3S2 zu GAPDH wurde berechnet und zwischen gesunden Schleimhäuten und Tumoren verglichen (A).

### 4.2.2 Validierung der humoralen Antwort bei Patienten mit Karzinomen des Kopf-Halsbereichs gegen das AMIDA-Antigen e-FABP

Ein Teil der AMIDA Antigene wurde mit Serumantikörpern von 2 oder 3 Patienten isoliert. So wurde e-FABP mit 3 von 8 untersuchten Seren isoliert (Tabelle 4.1). Im Folgenden wurde untersucht, ob die Serumreaktivität gegen e-FABP sich auch zur Unterscheidung größerer Gruppen gesunder Probanden und Karzinompatienten eignet und somit die Validität der allogenen AMIDA-Technologie bestätigt.



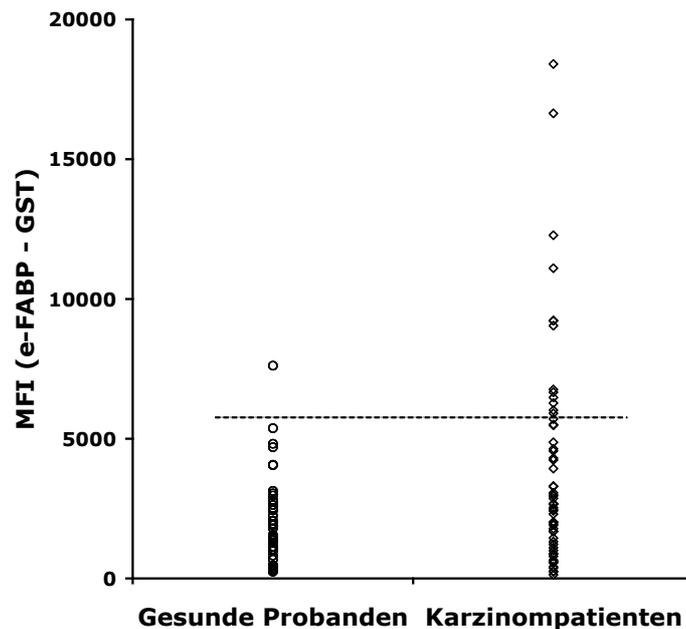
**Abbildung 4.8** Reproduzierbarkeit des Bioplex-Verfahrens zur Bestimmung der Serumreaktivität

Hierfür wurde eine modifizierte ELISA Technologie etabliert. E-FABP wurde mit einem His/GST-tag fusioniert, rekombinant in *E.coli* exprimiert und über den His-tag aufgereinigt. Parallel wurde zur Bestimmung unspezifischer Serumreaktivitäten GST alleine exprimiert und aufgereinigt. Die Serumreaktivitäten gegen das Fusionsprotein GST-e-FABP und GST wurden im Bioplex-Verfahren gemessen. Dazu wurde das Fusionsprotein oder GST nicht-kovalent an Glutathion-Polyesterol-Kügelchen mit Eigenfluoreszenz gebunden, mit 1:100 verdünntem Serum inkubiert und gebundene humane Antikörper mit PE-markiertem Sekundärantikörper im Bioplexgerät (Bio-Rad)

detektiert. Die Serumreaktivität wurde als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) angegeben. Zuerst wurde die Reproduzierbarkeit des Verfahrens getestet. Hierzu wurde die Serumreaktivität von vier Tumorseren gegen GST-e-FABP und GST in sieben unabhängigen Messungen bestimmt (Abbildung 4.8). Die Differenz zwischen GST-e-FABP Fusionsprotein und GST wurde berechnet und als Maß für die e-FABP spezifische Serumreaktivität gewählt. Es zeigte sich, dass das System Werte mit akzeptabler Standardabweichung zwischen den einzelnen Messungen eines jeden Serums lieferte. Die Reproduzierbarkeit war somit gegeben und das System zur Bestimmung von Serumreaktivitäten gegen e-FABP geeignet.

In dem so etablierten System wurden Seren von gesunden Probanden (n=48) und von Patienten mit Karzinomen des oberen Kopf-Halsbereichs (n=59) auf ihre Serumreaktivität gegen e-FABP untersucht. Die Serumreaktivität wurde als die Differenz aus der Serumreaktivität gegen GST-e-FABP und GST berechnet. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte zweier unabhängiger Experimente. Die Serumreaktivitäten der verglichenen Gruppen sind in Abbildung 4.9 dargestellt. Seren wurden als positiv, also mit einer spezifischen e-FABP Reaktivität beschrieben, wenn sie den Schwellenwert überschritten. Dieser wurde entsprechend der Konvention für Biomarker bei 95%iger Spezifität gesetzt, *i.e.* 5% falsch positive Ereignisse wurden in der Kontrollgruppe der gesunden Probanden erlaubt. Entsprechend zeigte nur eins der 48 Seren gesunder Probanden, jedoch 12 von 59 Seren der Karzinompatienten eine e-FABP Reaktivität. Dies entspricht einer 20%igen Serumreaktivität in der Gruppe der Karzinompatienten.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine erhöhte Frequenz von e-FABP Serumreaktivitäten in der Gruppe von Karzinompatienten im Vergleich zur Gruppe der gesunden Probanden beobachtet wurde.



**Abbildung 4.9** Messung der Serumreaktivität gegen das allo-AMIDA Antigen e-FABP gesunder Probanden und Patienten mit Karzinomen des Kopf-Halsbereichs. Rekombinantes GST-e-FABP oder GST wurden auf Glutathion-Polysterol-Kügelchen gekoppelt, mit 1:100 verdünnten humanen Seren inkubiert, gewaschen und gebundene humane Immunglobuline im BioPlex bestimmt. Die dargestellten Werte für die einzelnen Seren sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Messungen. Die gestrichelte Linie zeigt den Schwellenwert für eine Spezifität von 95%.

### 4.3 Evaluierung der humoralen Antwort gegen das AMIDA-Antigen CK8 als klinischer Biomarker für Plattenepithelkarzinome

Tumorantigene werden bei der AMIDA-Technologie aufgrund spezifischer Serumreaktivitäten im Blut von Patienten isoliert. Wie in dieser Arbeit bereits für e-FABP gezeigt, wurde auch eine erhöhte Serumreaktivität gegen das Tumorantigen Zytokeratin 8 (CK8), das mit der autologen AMIDA-Technologie identifiziert wurde, beobachtet. Somit könnten erhöhte Antikörpertiter gegen AMIDA-Antigene zirkulierende Biomarker darstellen.

In ersten Experimenten, die nicht im Rahmen dieser Doktorarbeit stattfanden, konnte gezeigt werden, dass anhand der CK8-Serumreaktivität mit 37%iger Sensitivität bei 95%iger Spezifität Seren von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des oberen Kopf-Halsbereichs (n=60) von Seren gesunder Probanden (n=67) unterschieden werden

können. CK8-Serumreaktivität unterscheidet daher mit höherer Sensitivität als e-FABP-Serumreaktivität (20%ige Sensitivität) gesunde Probanden von Patienten mit Karzinomen des Kopf-Halsbereichs. Weiterhin ist CK8 kommerziell hochrein verfügbar. Daher wurde die Serumreaktivität gegen CK8 zur Evaluierung der Antikörpertiter gegen AMIDA-Antigene als klinische Biomarker wurde deshalb die Serumreaktivität gegen das Tumorantigen CK8 gewählt.

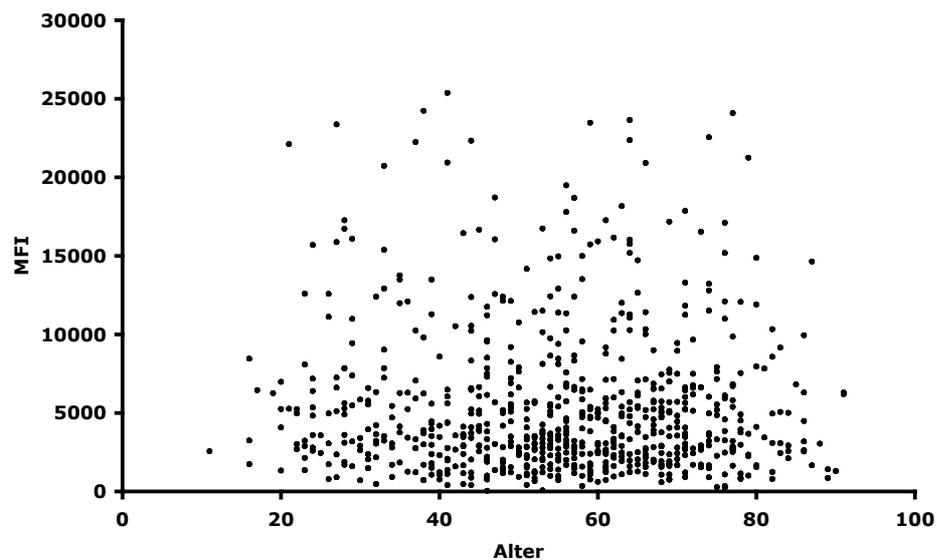
Da die Überexpression von CK8 auch für andere Entitäten beschrieben wurde (Bergqvist et al., 1999; Gharib et al., 2002), war es von Interesse, die CK8-Serumreaktivität bei Patienten mit Karzinomen anderer Lokalisierung zu bestimmen. Für einen klinisch interessanten Biomarker ist die Fähigkeit zur Differenzierung zwischen benignen Erkrankungen und Karzinomen wichtig. Folglich wurde ein großes Serenkollektiv von Patienten mit einer Vielzahl verschiedenster Erkrankungen getestet. Das 749 Seren umfassende Kollektiv unterteilt sich in drei Hauptgruppen: (i) Seren von klinisch gesunden Spendern, (ii) Seren von Patienten mit benignen Erkrankungen und (iii) Seren von Patienten mit Karzinomen. Des Weiteren wurden die Seren der benignen Erkrankungen und der Karzinome entsprechend ihrer Lokalisation in Untergruppen aufgeteilt. Tabelle 4.3 gibt die Zusammensetzung des untersuchten Serenkollektivs wieder.

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 (verblindet) inkubiert und alle gebundenen CK8-spezifischen Serumantikörper mit einem PE-gekoppelten Humanantikörper-spezifischen Antikörper detektiert. Pro Matrix werden somit zwei Fluoreszenzen gemessen: die Fluoreszenz der Matrix und die PE-Fluoreszenz des Detektionsantikörpers. 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.

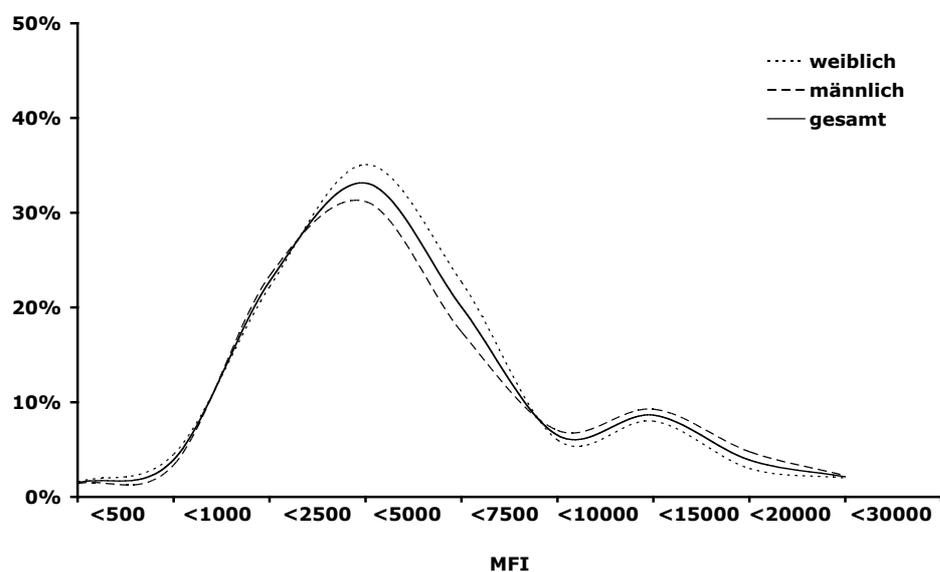
**Tabelle 4.3 Zusammensetzung des zur Evaluierung von CK8-Serumreaktivität als Biomarker untersuchten Serumkollektives.** Die in die Studie eingeschlossenen Patienten wurden gemäß ihrer klinischen Befunde in drei Hauptgruppen (gesund, benigne Erkrankungen und Karzinome) und Untergruppen entsprechend der Lokalisation ihrer Erkrankung unterteilt. (M/W – männlich/ weiblich; SD – Standardabweichung)

<b>Gruppe</b>	<b>Fälle (n)</b>	<b>Geschlecht (M/W)</b>	<b>Alter Mittelwert <math>\pm</math>SD</b>
<b>Gesund</b>	59	32/27	39 $\pm$ 14
<b>Benigne Erkrankungen</b>			
Brust	50	1/49	46 $\pm$ 13
Gynäkologische Erkrankungen	50	1/49	45 $\pm$ 17
Harnwegserkrankungen	50	47/3	56 $\pm$ 14
Benigne Prostathyperplasie	29	29/0	69 $\pm$ 8
Gastrointestinaltrakt	49	20/29	56 $\pm$ 17
Lunge	49	30/19	53 $\pm$ 13
Infektionen	30	11/19	53 $\pm$ 20
Autoimmunerkrankungen	19	7/12	50 $\pm$ 13
Andere	27	16/11	40 $\pm$ 16
Alle benigne Erkrankungen	353	162/191	52 $\pm$ 16
<b>Karzinome</b>			
Mammakarzinom	50	0/50	59 $\pm$ 13
Ovarialkarzinom	50	0/50	59 $\pm$ 15
Zervixkarzinom	23	0/23	47 $\pm$ 14
Harnblasenkarzinom	30	27/3	64 $\pm$ 13
Prostatakarzinom	29	29/0	68 $\pm$ 9
Magenkarzinom	30	13/17	65 $\pm$ 12
Leberkarzinom	30	25/5	62 $\pm$ 11
Pankreaskarzinom	30	16/14	61 $\pm$ 13
Kolonkarzinom	25	14/11	65 $\pm$ 10
Bronchialkarzinom	33	25/8	61 $\pm$ 9
Andere	7	0/7	67 $\pm$ 10
Alle Karzinome	337	149/188	61 $\pm$ 13

Um auszuschließen, dass die gemessenen CK8-Serumreaktivitäten durch andere als krankheitsassoziierte Faktoren beeinflusst werden, wurden die CK8-Serumreaktivität in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht der Patienten überprüft. Obwohl das Durchschnittsalter der drei Hauptgruppen stark variierte (Gesund  $39 \pm 14$  Jahre, Benigne Erkrankungen  $52 \pm 16$  Jahre und Karzinome  $61 \pm 13$  Jahre), hatte dies keinen Einfluss auf die CK8-Serumreaktivität, wie Abbildung 4.10 zeigt. Da sich auch das Verhältnis von männlichen und weiblichen Spendern zwischen den verschiedenen Gruppen unterschieden, wurde untersucht, ob das Geschlecht einen Einfluss auf die CK8-Serumreaktivität hatte. Abbildung 4.11 zeigt, dass dies nicht der Fall ist. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass spezifische Unterschiede auf die beschriebenen klinischen Befunde zurückzuführen sind.



**Abbildung 4.10** CK8-Serumreaktivität korreliert nicht mit dem Alter. CK8-Serumreaktivität gesunder Spender, von Patienten mit benignen Erkrankungen und Karzinomen ist als durchschnittlich Fluoreszenzintensität (MFI) gezeigt.



**Abbildung 4.11** Verteilung der CK8-Serumreaktivität für Seren weiblicher, männlicher und aller Spender. Die CK8-Serumreaktivität ist als durchschnittlich Fluoreszenzintensität (MFI) dargestellt. Es konnte keine Korrelation zwischen Geschlecht und CK8-Serumreaktivität festgestellt werden.

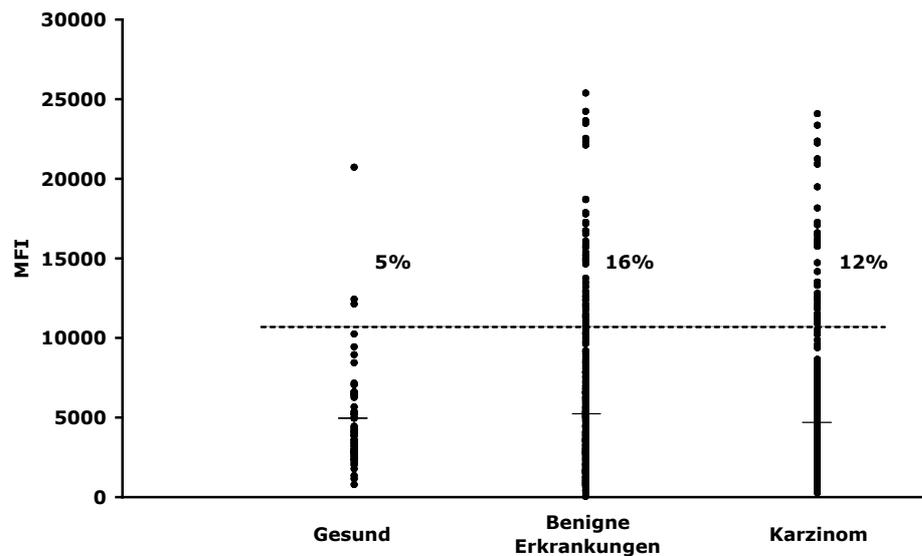
Mittelwert, Standardabweichung und 95% Konfidenzintervall (CI) wurden für die verschiedenen Gruppen berechnet. Der Vergleich der drei Hauptgruppen zeigte, dass es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen gesunden Probanden, Patienten

mit benignen Erkrankungen und Karzinompatienten bezüglich der CK8-Serumreaktivität gab. Dasselbe trifft für die Betrachtung der Mediane der drei Gruppen zu. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst und in Abbildung 4.12 dargestellt.

Obwohl die Standardabweichung und 95% CIs aller Haupt- und Untergruppen überlappen, unterschieden sich die Mittelwerte der Untergruppen mit benignen gynäkologische Erkrankungen und solchen des Urogenitaltraktes sowie mit Zervix-, Leber-, Pankreas- und Bronchialkarzinom vom Mittelwert der gesunden Kontrollgruppe (siehe Abbildung 4.13). Alle Mittelwerte waren deutlich höher (MFI von 6486 bis 8318) als der Mittelwert der gesunden Kontrollgruppe (MFI 4954). Der Mittelwert für Patienten mit Pankreaskarzinomen hingegen lag mit MFI 3362 deutlich darunter.

**Tabelle 4.4 CK8-Serumreaktivität der gesunden Gruppe und der verschiedenen Gruppen mit benignen Erkrankungen und Karzinomen.** (MFI – durchschnittliche Fluoreszenzintensität; SD – Standardabweichung; CI – Konfidenzintervall; BPH – Benigne Prostatahyperplasie).

<b>Gruppe</b>	<b>Mittelwert <math>\pm</math>SD (MFI)</b>	<b>Mittelwert (95% CI) (MFI)</b>	<b>Median (Range) (MFI)</b>
<b>Gesund</b>	4954 $\pm$ 3509	4954 (3942-5658)	3879 (795-20731)
<b>Benigne Erkrankungen</b>			
Brust	4703 $\pm$ 3047	4703 (3892-5578)	3934 (858-14873)
Gynäkologische Erkrankungen	6897 $\pm$ 5375	6897 (5354-8440)	5412 (738-22341)
Harnwegserkrankungen	6691 $\pm$ 5248	6691 (5112-8126)	5246 (412-23651)
Benigne Prostatahyperplasie	5849 $\pm$ 4406	5849 (4143-7554)	5705 (999-17873)
Gastrointestinaltrakt	6017 $\pm$ 5115	6017 (4533-7501)	4517 (417-22117)
Lunge	5817 $\pm$ 4670	4670 (4462-3459)	4797 (69-22546)
Infektionen	5700 $\pm$ 5900	5700 (3459-7941)	3300 (254-24240)
Autoimmunerkrankungen	5774 $\pm$ 3754	5774 (3914-7633)	4491 (47-12377)
Andere	4407 $\pm$ 5005	4407 (2389-6425)	2790 (849-25383)
Alle benigne Erkrankungen	5836 $\pm$ 4877	5836 (5325-6347)	4461 (2330-7593)
<b>Karzinome</b>			
Mammakarzinom	4311 $\pm$ 3168	4311 (3401-5220)	3564 (904-21255)
Ovarialkarzinom	4524 $\pm$ 2560	4524 (3789-5259)	3984 (713-11519)
Zervixkarzinom	8318 $\pm$ 6364	8318 (5504-1132)	6466 (478-23369)
Harnblasenkarzinom	5994 $\pm$ 5380	5994 (3951-8037)	4007 (467-20915)
Prostatakarzinom	3876 $\pm$ 3311	3876 (2595-5158)	2875 (350-16608)
Magenkarzinom	3510 $\pm$ 3095	3510 (2335-4686)	2983 (350-14728)
Leberkarzinom	6468 $\pm$ 5381	6468 (4425-8512)	4894 (762-22367)
Pankreaskarzinom	3362 $\pm$ 2635	3362 (2361-4362)	2498 (912-12068)
Kolonkarzinom	5027 $\pm$ 5319	5027 (2786-7268)	2798 (282-24088)
Bronchialkarzinom	6553 $\pm$ 5074	6553 (4726-8381)	4790 (1528-19493)
Andere	3493 $\pm$ 2448	3493 (1047-5938)	2648 (1202-8659)
Alle Karzinome	5020 $\pm$ 4416	5020 (4547-5494)	3545 (2312-5862)



**Abbildung 4.12** Verteilung der CK8-Serumreaktivität bei gesunden Probanden (n=59), Patienten mit benignen Erkrankungen (n=353) und Karzinom Patienten (n=337). CK8-Serumreaktivität ist als durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) angegeben. Die gepunktete Linie zeigt den Schwellenwert bei einer MFI von 10.250. Seren über dem Schwellenwert wurden als positiv definiert. Der Prozentsatz positiver Seren jeder Gruppe ist angegeben. Balken markieren den Mittelwert jeder Gruppe.

Tumormarker für die Diagnostik sollten eine Spezifität von 95% aufweisen, d.h. lediglich 5% falsch positive Werte in einer gesunden Kontrollgruppe liefern. Dabei sollte die Sensitivität, *i.e.* der Anteil der erkannten Erkrankten, möglichst hoch sein ( $\geq 50\%$ ). Bei 95%iger Spezifität bezüglich der gesunden Kontrollgruppe errechnet sich ein Schwellenwert von MFI 10.250. Seren mit einer MFI über diesem Schwellenwert wurden als positiv gewertet. Die Sensitivität bezüglich der verschiedenen Haupt- und Untergruppen im untersuchten Kollektiv wurden daraus berechnet und sind in Tabelle 4.5 angegeben. CK8-Serumreaktivität war mit 16% bzw. 12% positiven Seren drei bzw. zweimal häufiger in der Gruppe der Patienten mit benignen Erkrankungen bzw. mit Karzinomen im Vergleich zu gesunden Probanden zu beobachten (Tabelle 4.5 und Abbildung 4.12).

**Tabelle 4.5 Spezifität und Sensitivität der CK8-Serumreaktivität als Biomarker für Gruppen mit Erkrankungen distinkter Lokalisation.** Die Sensitivität wurde entsprechend einer 95%igen Spezifität der gesunden Kontrollgruppe bzw. der Gruppe mit benignen Erkrankungen berechnet.

<b>Gruppe</b>	<b>Cut off (MFI)</b>	<b>Sensitivität (%)</b>	<b>Sensitivität (%)</b>
	Bei 95%iger Spezifität vs. gesunden Probanden vs. benigner Erkrankung		
<b>Gesund</b>	10250	-	-
<b>Benigne Erkrankungen</b>			
Brust	10300	6	-
Gynäkologische Erkrankungen	16800	28	-
Harnwegserkrankungen	17200	18	-
Benigne			
Praostathyperplasie	14700	17	-
Gastrointestinaltrakt	16200	16	-
Lunge	15000	14	-
Infektionen	16500	20	-
Autoimmunerkrankungen	12000	17	-
Andere	11500	11	-
Alle benigne Erkrankungen	16000	16	-
<b>Karzinome</b>			
Mammakarzinom	-	4	2 (Benigne Brust)
Ovarialkarzinom	-	4	0 (Benigne Gyn.)
Zervixkarzinom	-	35	12 (Benigne Gyn.)
Harnblasenkarzinom	-	20	3 (Benigne Uro.)
Prostatakarzinom	-	8	3 (BPH)
Magenkarzinom	-	7	0 (Benigne Gastro)
Leberkarzinom	-	20	6 (Benigne Gastro)
Pankreaskarzinom	-	7	0 (Benigne Gastro)
Kolonkarzinom	-	16	4 (Benigne Gastro)
Bronchialkarzinom	-	21	11 (Benigne Lunge)
Andere	-	0	0 (andere benigne)
Alle Karzinome	-	12	5 (alle benigne)

Weiterhin zeigte der Vergleich von Erkrankungen distinkter Lokalisation mit der gesunden Kontrollgruppe, dass die Lokalisation der Erkrankung einen Einfluss auf die CK8-Serumreaktivität hat. Die CK8-Serumreaktivität für die einzelnen Untergruppen reicht in der Gruppe der benignen Erkrankungen von 6% bei Mammaerkrankungen bis hin zu 28% bei gynäkologischen Erkrankungen und in der Gruppe der Karzinome von 4% bei Prostata- bis zu 35% bei Zervixkarzinomen.

Vergleicht man nun die CK8-Serumreaktivitäten der Untergruppen mit benignen Erkrankungen und Karzinomen derselben Lokalisation, so zeigte sich, dass diese für gynäkologisch, urologisch, bronchial und pectoral lokalisierte Erkrankungen korrelierten. Benigne Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes korrelierten zwar mit Leber- und Kolonkarzinomen, nicht jedoch mit Magen- und Pankreaskarzinomen. Für benigne Prostatahyperplasie und Prostatakarzinome konnte keine Korrelation beobachtet werden.

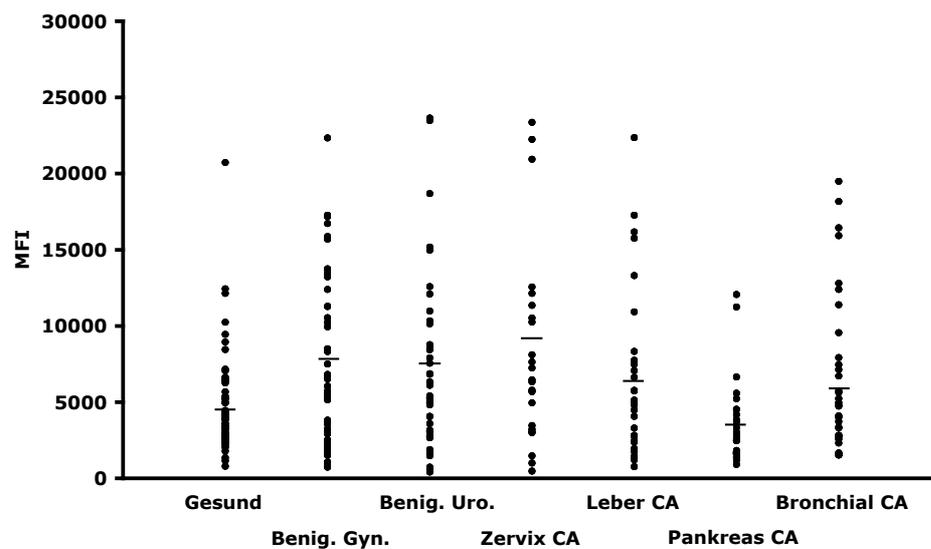


Abbildung 4.13 Verteilung der CK8-Serumreaktivität bei gesunden Probanden (n=59), Patienten mit benignen gynäkologischen Erkrankungen (n=50), benignen Erkrankungen des Urogenitaltraktes (n=50), Zervixkarzinom (n=23), Leberkarzinom (n=30), Pankreaskarzinom (n=30) und Bronchialkarzinom (n=33). CK8-Serumreaktivität ist als durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) angegeben. Die Linien zeigen den Mittelwert der jeweiligen Gruppe an. (CA - Karzinom; benign - benigne Erkrankung; Gyn. - gynäkologisch; Uro. - Urologisch)

Weiterhin sollte untersucht werden, ob Patienten mit benignen Erkrankungen von solchen mit Karzinomen derselben Lokalisation aufgrund ihrer CK8-Serumreaktivität unterschieden werden können. Hierfür wurde der Schwellenwert bei 95%iger Spezifität basierend auf den Gruppen der benignen Erkrankungen berechnet. Dies führt zu einer Erhöhung des Schwellenwertes für alle Untergruppen gegenüber der gesunden Kontrollgruppe. Entsprechend resultiert eine Abnahme in der Sensitivität für die Seren von Patienten mit Karzinomen korrespondierender Lokalisation (Tabelle 4.5). Patienten mit Zervix- oder Bronchialkarzinomen zeigten doppelt so häufig CK8-Serumreaktivität wie Patienten mit benignen gynäkologischen bzw. bronchialen Erkrankungen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass

- CK8-Serumreaktivität bei Patienten mit benignen Erkrankungen verschiedener Lokalisierungen dreimal häufiger als bei gesunden Probanden auftrat,
- CK8-Serumreaktivität bei Patienten mit Karzinomen verschiedener Lokalisierungen zweimal häufiger als bei gesunden Probanden auftrat,

- sowohl bei benignen Erkrankungen als auch bei Karzinomen die CK8-Serumreaktivität von der Lokalisation abhängt,
- und eine Unterscheidung zwischen benignen und Tumorerkrankungen anhand der CK8-Serumreaktivität nicht durchführbar ist.

#### **4.4 Funktionelle Charakterisierung des allo-AMIDA Antigens eIF3S2**

Tumorantigene sind Proteine, die tumorzellspezifisch oder in Tumorzellen im Vergleich zu gesunden Zellen überexprimiert sind. Daher liegt ein Zusammenhang zwischen Tumorassoziierter Expression und den molekularen Ursachen für die Entartung der Zelle nahe. Eines der bekanntesten Beispiele hierfür ist p53, das erstmalig als Protein mit einem Molekulargewicht von 53kDa, welches eine humorale Antwort durch chemische induzierte Tumore in Mäusen auslöst, beschrieben wurde (Black et al., 1963; DeLeo et al., 1979). Die funktionellen Implikationen von p53 in der Karzinogenese sind in der Folge vielfach studiert und beschrieben worden (siehe 1.3)

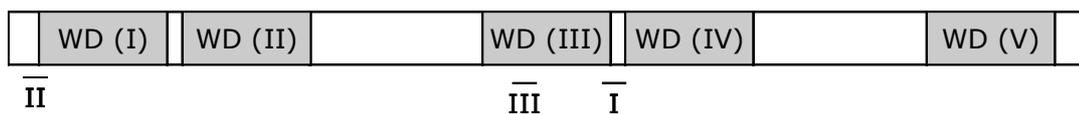
In den nachfolgenden Kapiteln wird eines der im allo-AMIDA Screen identifizierten Tumorantigene hinsichtlich seines Beitrags zur Tumorentwicklung untersucht. Die Expressionsanalyse des eukaryotischen Initiationsfaktors 3 Subuntereinheit 2 (eIF3S2) zeigte eine Überexpression in Tumoren der oberen Atemwege verglichen mit gesunder Schleimhaut derselben Lokalisation (siehe Abbildung 4.7). Auch wurde eine humorale Antwort bei zwei Patienten im Rahmen des durchgeführten allo-AMIDA Screenings beobachtet. Die Überexpression anderer Untereinheiten des eIF3 Komplexes, z.B. eIF3S3 und eIF3S10 wurde bereits für verschiedene Tumorarten beschrieben (Mayeur und Hershey, 2002; Nupponen et al., 1999). Ferner wurde während dieser Doktorarbeit die Überexpression des eIF3S2 für hepatozelluläre Karzinome beschrieben (Huang et al., 2004). Über die molekulare Funktion des eIF3S2 war bis *dato* jedoch wenig bekannt. Daher wurde es als Beispiel ausgewählt, um zu untersuchen, in wie weit die identifizierten Tumorantigene auch eine Rolle in der Tumorentstehung spielen.

Bei eIF3S2 handelt es sich um ein 36 kDa großes Protein, das über 5 WD40 Domänen verfügt (Abbildung 4.14), welche Protein-Proteininteraktion erlauben. eIF3S2 ist eine von mindestens 10 Untereinheiten des eIF3 Komplexes (Asano et al., 1997). Dieser

Komplex spielt eine zentrale Rolle in der Initiation, dem am stärksten regulierten Schritt der Translation.

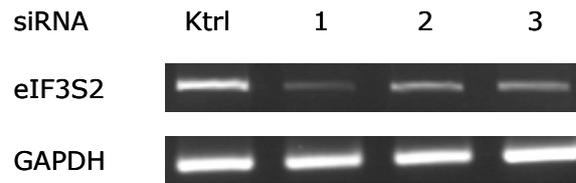
#### 4.4.1 Suppression der eIF3S2 Expression mittels siRNA

Zur funktionellen Analyse unbekannter Proteine ist es von Vorteil, neben Überexpressionssystemen, auch geeignete Systeme zur Inhibition der Proteinexpression zur Verfügung zu haben. Deshalb wurde die Expression von eIF3S2 transient mit Hilfe von siRNA-Oligonukleotiden in den Zelllinien HeLa und PCI-1 reprimiert. Insgesamt wurden drei siRNAs, die in unterschiedlichen Regionen der eIF3S2-mRNA binden (siehe Abbildung 4.14), auf ihre Effizienz, die Bildung der eIF3S2 mRNA-Transkripten zu hemmen, getestet.



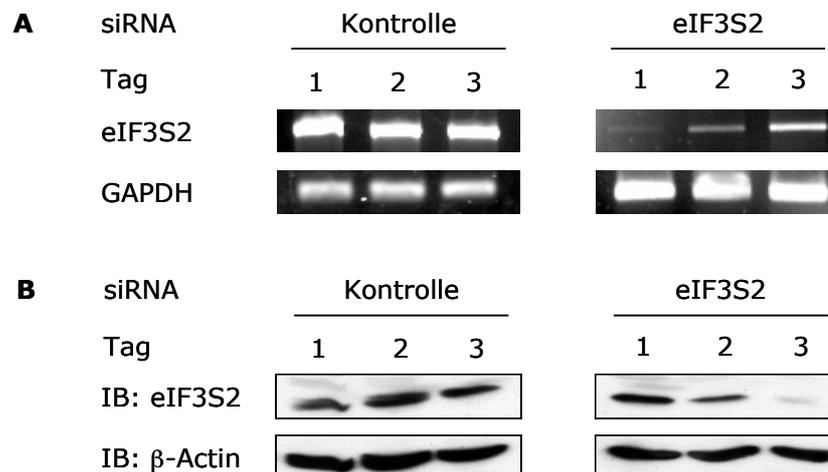
**Abbildung 4.14** Bindungsstellen der siRNAs innerhalb der eIF3S2 mRNA. I bp 663-682; II bp 104-123; III bp 528-547.

Dazu wurden HeLa-Zellen in separaten Ansätzen transient mit den drei siRNAs (je 2.8 µg/ 3000) Zellen transfiziert und die Gesamt-RNA 24 h nach Transfektion isoliert. Die Repression von eIF3S2 wurde mittels RT-PCR relativ zur GAPDH Expression bestimmt. Um unspezifische Effekte auszuschließen, wurden Zellen mit einer Kontroll-siRNA behandelt, welche eine ähnliche Basenzusammensetzung wie die 3 getesteten siRNAs, aber keine bekannte Zielsequenz im humanen Genom hat. Abbildung 4.15 zeigt die Repression der Transkriptmengen von eIF3S2 im Vergleich zu den Kontrollzellen nach 24 h. Alle drei siRNAs senkten die Menge an eIF3S2 mRNA-Transkripten in den transfizierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Die stärkste Reduktion wurde mit siRNA I erreicht, weshalb für alle weiteren Analysen stets die siRNA I verwendet wurde.



**Abbildung 4.15 Austestung dreier verschiedener siRNAs gegen eIF3S2.** HeLa Zellen wurden mit Kontroll-siRNA (Ktrl), eIF3S2-siRNA I, II oder III (1-3) transfiziert und nach 24h Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und als Vorlage für eIF3S2 und GAPDH spezifische PCRs verwendet.

Da die biologische Funktion durch das Protein vermittelt wird, ist es zur funktionellen Analyse des Antigens eIF3S2 von Interesse, seine Translation zu beeinflussen. In einer Kinetik über 3 Tage wurden deshalb die Effekte der siRNA-Behandlung auf die eIF3S2 Proteinexpression bestimmt. Dafür wurden HeLa Zellen mit siRNA I oder Kontroll-siRNA transfiziert und nach 1, 2 und 3 Tagen Gesamt-RNA für RT-PCRs und Proteinlysate für Immunoblots mit einem eIF3S2-spezifischen Antikörper gewonnen. Die Proben wurden auf eIF3S2 mRNA-Transkripte und eIF3S2 Proteinmenge hin untersucht. Als Ladekontrolle wurde auf mRNA-Ebene GAPDH und auf Proteinebene die  $\beta$ -Aktin-Menge bestimmt (Abbildung 4.16).

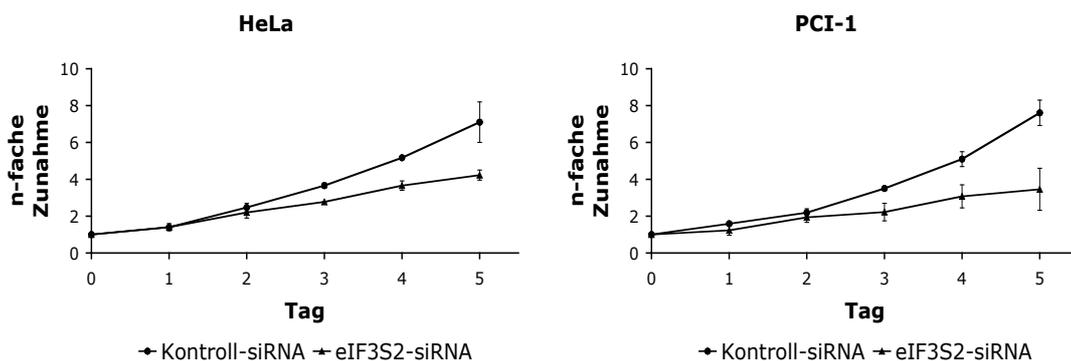


**Abbildung 4.16 Kinetik der siRNA-vermittelten eIF3S2 Suppression.** HeLa Zellen wurden mit eIF3S2-siRNA oder Kontroll-siRNA transfiziert und für 3 Tage kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Menge an eIF3S2- und GAPDH-mRNA-Transkripten mittels spezifischer RT-PCR (A) und die Proteinmenge an eIF3S2 und  $\beta$ -Aktin im Immunoblot (B) mit spezifischen Antikörpern bestimmt.

Es zeigte sich, dass die mRNA Expression am ersten Tag nach der Transfektion am stärksten reprimiert war und anschließend wieder zunahm. Auf Proteinebene hingegen dauerte es ca. 2 Tage bevor eine Repression zu beobachten war. Dies deutet auf eine relativ hohe Halbwertszeit und Stabilität des eIF3S2 Proteins hin. Mit der deutlichen Repression der Proteinexpression ab Tag 2 waren die Voraussetzungen geschaffen, die Auswirkungen der eIF3S2-Suppression in einem *in vitro* Zellsystem zu untersuchen.

#### 4.4.2 Einfluss der eIF3S2 Repression auf Metabolismus und Proliferation

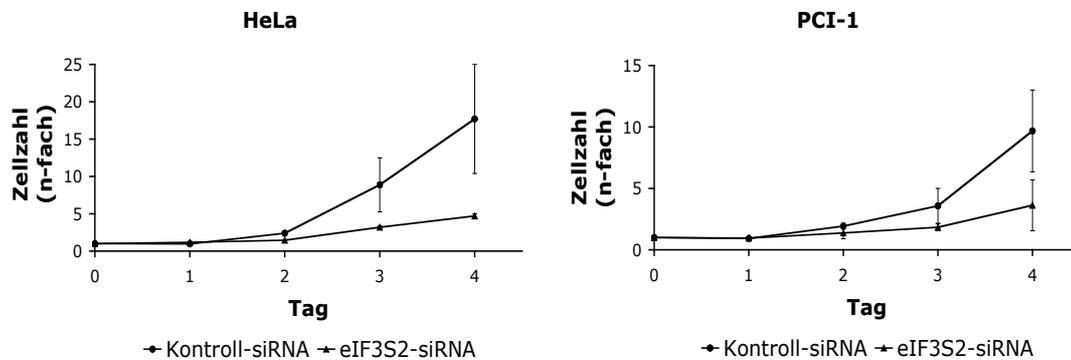
Zuerst wurde die Auswirkung der eIF3S2 Repression auf den Metabolismus und die Proliferation untersucht. Zur Bestimmung der metabolischen Aktivität wurden HeLa und PCI-Zellen nach siRNA-Transfektion bei gleichen Zellzahlen ( $3 \times 10^3$ /Loch in 96-Loch Platten) in 10% FCS DMEM ausplattiert und für 5 Tage kultiviert. An jedem Tag wurde die metabolische Aktivität in einem MTT-Konversionsexperiment bestimmt. Dabei wurden jeweils drei Löcher pro Ansatz (Zelllinie und siRNA) und Tag bestimmt. Alle Werte wurden in Relation zu Tag 0 gesetzt. In Abbildung 4.17 sind die aus zwei unabhängigen MTT-Konversionsexperimenten erhaltenen Mittelwerte in Abhängigkeit von der Kulturdauer dargestellt.



**Abbildung 4.17 Verminderte metabolische Aktivität nach eIF3S2 Repression.** HeLa und PCI-1 Zellen wurden mit eIF3S2-siRNA oder Kontroll-siRNA transfiziert und für 5 Tage kultiviert. An jedem Tag wurde die metabolische Aktivität in einem MTT-Konversionsexperiment bestimmt. Dargestellt ist die Zunahme der metabolischen Aktivität über einen Zeitraum von 5 Tagen, relativ zum Ausgangswert an Tag 0.

In Einklang mit der beobachteten Hemmung der eIF3S2 Expression ab Tag 2, konnte eine schwächere Zunahme des Metabolismus der Zellen, welche mit eIF3S2-siRNA transfiziert wurden, im Vergleich zu solchen, die mit der Kontroll-siRNA transfiziert wurden, beobachtet werden.

Anschließend wurde untersucht, ob der beobachtete metabolische Effekt mit einer geringeren Proliferation der Zellen korreliert. Hierfür wurden Wachstumskinetiken der siRNA-transfizierten PCI-1 oder HeLa Zellen in zwei unabhängigen Experimenten bestimmt. Vitale Zellen wurden über einen Zeitraum von vier Tagen nach siRNA-Transfektion mittels Trypanblauausschluss gezählt. Alle Werte wurden auf die Zellzahl am Tag 0 bezogen, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Interessanterweise konnte in der eIF3S2-reprimierten Zellpopulation bereits zwei Tage nach der Transfektion von eIF3S2-siRNA eine verminderte Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Vier Tage nach der Transfektion von eIF3S2-siRNA war die Zellzahl bei HeLa und PCI-1 Zellen um den Faktor 3,8 bzw. 2,7 vermindert (Abbildung 4.18).

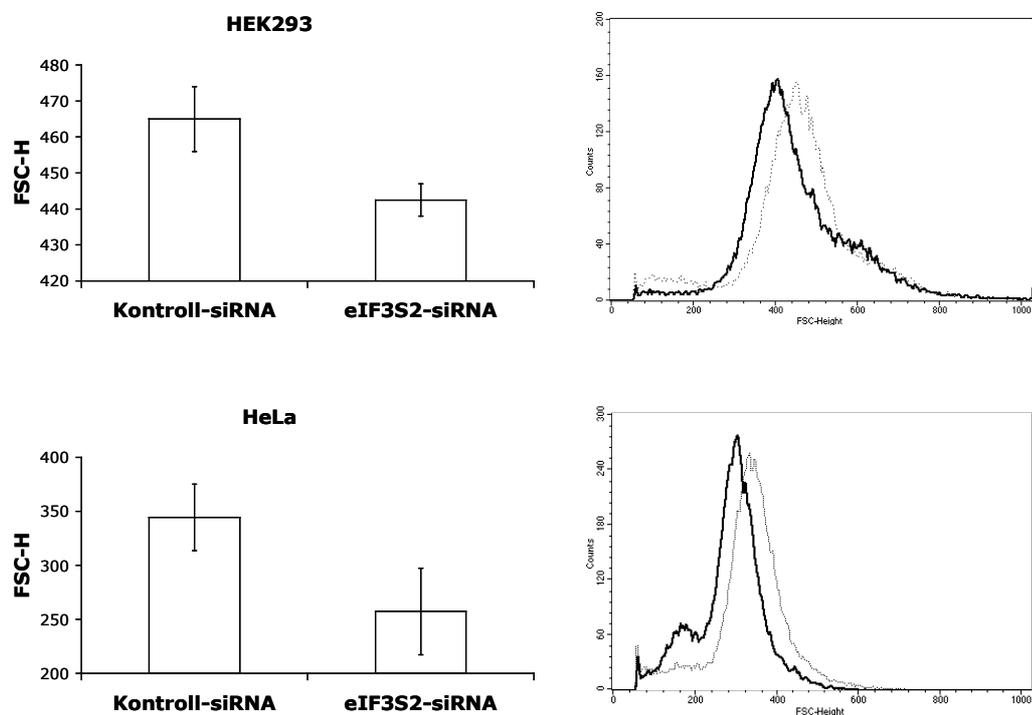


**Abbildung 4.18 Verminderte Zellzahl nach eIF3S2-Reprimierung.** HeLa und PCI-1 Zellen wurden mit eIF3S2-siRNA oder Kontroll-siRNA transfiziert und für 4 Tage kultiviert. An jedem Tag wurde die Zellzahl bestimmt. Dargestellt ist die Zunahme der Zellzahl über einen Zeitraum von 4 Tagen, relativ zum Ausgangswert an Tag 0.

Sowohl die Effekte im MTT als auch in der Proliferation wurden ab Tag 3 besonders deutlich. Dies korreliert mit der ab diesem Tag beobachteten starken Proteinabnahme. Die siRNA vermittelte Repression von eIF3S2 führte somit zu einer spezifischen Verminderung der metabolischen Aktivität und Proliferation der Zellen *in vitro*.

### 4.4.3 Einfluss der eIF3S2 Repression auf die Zellgröße

Damit sich Zellen teilen können, müssen sie verschiedene kritische Restriktionspunkte im Zellzyklus überwinden. Zwei wesentliche Parameter in diesem Zusammenhang sind die Zellgröße und -masse. Eine Zelle kann sich nur dann teilen, wenn sie genug Masse besitzt, so dass aus ihr zwei Tochterzellen hervorgehen können. Da zuvor beobachtet wurde, dass eIF3S2-Reprimierung zu einer geringeren Proliferation, *i.e.* Zellteilung führte, wurde der Einfluss der eIF3S2-siRNA auf die Zellgröße untersucht.



**Abbildung 4.19 eIF3S2-Repression verringert die Zellgröße.** HeLa und HEK293 Zellen wurden mit eIF3S2-siRNA oder Kontroll-siRNA transfiziert und für 3 Tage kultiviert. Links dargestellt, die quantitative Auswertung dreier unabhängiger Experimente, rechts ein repräsentatives Beispiel eines der Auswertung zugrunde liegenden Histogramms (gestrichelte Linie - Kontroll-siRNA, fette Linie - eIF3S2-siRNA).

Als Maß für die Größe einer Zelle kann der Forward-Scatter (FSC-H), gemessen in einem FACS Durchflußzytometer, verwendet werden. HeLa und HEK293 Zellen wurde mit eIF3S2- oder Kontroll-siRNA transfiziert, in Petrischalen umgesetzt, 3 Tage in 10% FCS DMEM kultiviert und im FACS Durchflußzytometer analysiert. Abbildung 4.19

zeigt repräsentative Histogramme der FACS Analysen und die Mittelwerte der statistischen Auswertung je dreier unabhängiger Experimente.

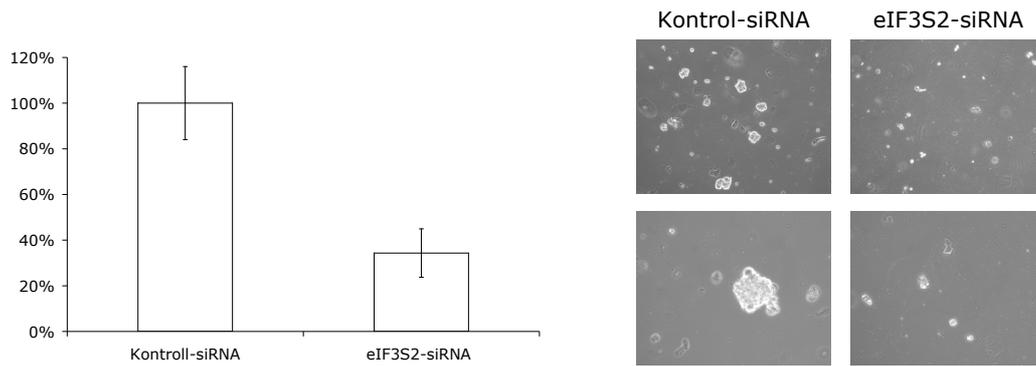
Die Transfektion von HeLa und HEK293 Zellen führte zu einer Verkleinerung der Zellen, die sich sehr gut im Histogramm nachweisen ließ. Der Effekt war reproduzierbar und statistisch signifikant.

#### **4.4.4 eIF3S2 Repression verhindert die Koloniebildung von HeLa Zellen in Suspension**

Neben unkontrolliertem Wachstum, ist die Fähigkeit Metastasen zu bilden eine charakteristische Eigenschaft vieler Karzinome im fortgeschrittenen Stadium. Um vom Primärtumor an eine andere Stelle des Körpers, z.B. Lymphknoten zu gelangen, muss die Tumorzelle sich lösen und in der Lage sein, frei in der Lymphe oder dem Blut zu zirkulieren und währenddessen zu überleben. Jedoch gehen bei Verlust der Adhärenz nicht-transformierte Zellen, wie z.B. Fibroblasten, in Apoptose. Dieser Prozess der Anoikis dient dem humanen Organismus als Schutz. So wird verhindert, dass Zellen, die sich aus ihrem Gewebe gelöst haben in andere Gewebe gelangen und dort wachsen (Frisch und Screaton, 2001). Transformierte Zellen aber haben Mechanismen entwickelt, die Anoikis zu überwinden und sind in der Lage, ohne Adhärenz in Suspension zu wachsen. Experimentell lässt sich dies in Koloniebildungsexperimenten messen.

Um den Einfluss der eIF3S2 Repression auf die Koloniebildung zu studieren, wurden HeLa Zellen mit eIF3S2-siRNA oder Kontroll-siRNA transfiziert und anschließend in 1,3% Methylcellulose/ 10% FCS/ DMEM (MC-Medium) auf 0,4% Agarose 10% FCS/ DMEM ausplattiert, und 7-10 Tage kultiviert. Durch die Methylcellulose wird verhindert, dass sich die Zellen absetzen oder aneinander binden. So wird eine Adhäsion gehemmt und ein Suspensionszustand simuliert (Assoian et al., 1989). Abbildung 4.20 zeigt die quantitative Auswertung dreier unabhängiger Experimente und repräsentative Fotografien von Kontroll- und eIF3S2-behandelten Zellen nach 10-tägiger Kultivierung in MC-Medium.

Es zeigte sich, dass die Behandlung von HeLa Zellen mit eIF3S2-siRNA vor Kultivierung in MC-Medium zu einem Rückgang der Koloniebildung auf weniger als 35% im Vergleich zu Kontroll-siRNA behandelten Zellen führte.



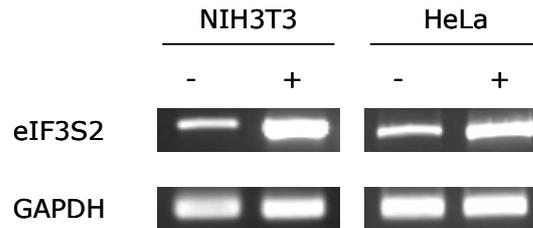
**Abbildung 4.20 eIF3S2 Repression verhindert Koloniebildung von HeLa Zellen in MC-Medium.**

HeLa Zellen wurden mit eIF3S2-siRNA oder Kontroll-siRNA transfiziert und für 7 Tage in MC-Medium kultiviert. Links dargestellt die quantitative Auswertung der Koloniebildung, relativ zur Koloniebildung von Kontroll-siRNA behandelten Zellen und rechts repräsentative Fotografien (obere Reihe 5-fache Vergrößerung, untere Reihe 10-fache Vergrößerung)

Es sei hier darauf hingewiesen, dass es sich bei dem beobachteten Effekt durchaus um einen Sekundäreffekt handeln kann. Die Inhibition des Metabolismus und der Proliferation durch eIF3S2-siRNA könnte die Ursache für die geringere Koloniebildung sein. Daher war es von besonderem Interesse ein System zu entwickeln, welches auf der Überexpression von eIF3S2 beruht. Ein solches System ermöglicht den Umkehrschluss für die durchgeführten siRNA-Experimente zu überprüfen.

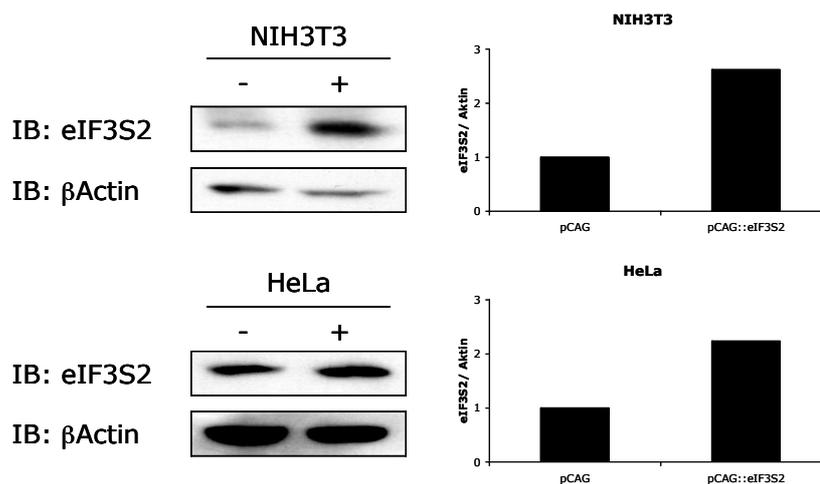
#### 4.4.5 Ektopische Überexpression von eIF3S2

Um die Effekte der eIF3S2-Überexpression in epithelialen Zellen auf molekularer Ebene zu untersuchen, wurden NIH3T3- und HeLa-Zellen mit einem Expressionsplasmid, welches für die gesamte cDNA von eIF3S2 kodiert, stabil transfiziert (141pCAG::eIF3S2). Die hierfür verwendete cDNA stammte aus einer humanen Rhabdomyosarkomzelllinie. Als Kontrolle wurde der entsprechende Leervektor stabil transfiziert (141pCAG). Die Expression von eIF3S2 wurde anschließend in den stabilen Transfektanten analysiert. Mit einer eIF3S2-spezifischen RT-PCR konnte die Transkription der eIF3S2-mRNA in allen Zelllinien nachgewiesen werden. Dabei war die beobachtete Expression in den mit dem Leervektor transfizierten Plasmid im Vergleich zu solchen mit eIF3S2-Expressionsplasmid transfizierten Zellen deutlich geringer (Abbildung 4.21). Die GAPDH spezifische RT-PCR zeigte, dass gleiche Mengen RNA in allen Ansätzen eingesetzt wurden.



**Abbildung 4.21 RT-PCR Analyse der ektopischen eIF3S2 Überexpression in NIH3T3 und HeLa Zellen.** NIH3T3 oder HeLa Zellen wurden mit eIF3S2-Expressionsvektor (+) oder dem Leervektor transfiziert und stabile Transfektanten durch Puromycins Selektion generiert. Total-RNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und die Menge an eIF3S2- und GAPDH- Transkripten in spezifischen PCRs bestimmt.

Die Überexpression von eIF3S2 wurde auf Proteinebene in einem Immunoblot mit spezifischen Antikörpern überprüft. Als Ladekontrolle wurde ein  $\beta$ -Aktin Immunoblot derselben Proben angefertigt. Die Blots wurden mit Hilfe der ImageJ Software (ImageJ 1.32, NIH, USA) densitometrisch ausgewertet. Die eIF3S2 Expression wurde relativ zur  $\beta$ -Aktin Expression angegeben (Abbildung 4.22). Durch die ektopische Überexpression von eIF3S2 wurde die Expression in NIH3T3 Zellen um den Faktor 2,8 und in HeLa Zellen um den Faktor 2,2 angehoben.

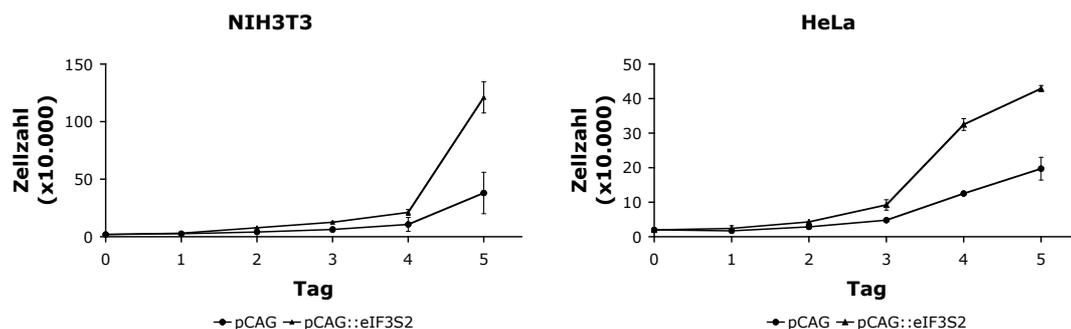


**Abbildung 4.22 Immunoblot Analyse der ektopischen eIF3S2 Überexpression in NIH3T3 und HeLa Zellen.** NIH3T3 Zellen oder HeLa Zellen wurden mit eIF3S2-Expressionsvektor (+) oder dem Leervektor (-) transfiziert und stabile Transfektanten durch Puromycin Selektion generiert. Lysate dieser Transfektanten wurden zur Bestimmung der eIF3S2- und  $\beta$ -Aktin-Proteinmenge in Immunoblots mit spezifischen Antikörpern verwendet. Die densitometrische, quantitative Auswertung ist rechts der Blots dargestellt.

Damit waren die Voraussetzungen geschaffen, die Auswirkungen der eIF3S2-Überexpression in einem *in vitro* Zellsystem zu untersuchen.

#### 4.4.6 Einfluss der eIF3S2 Überexpression auf Proliferation und Metabolismus

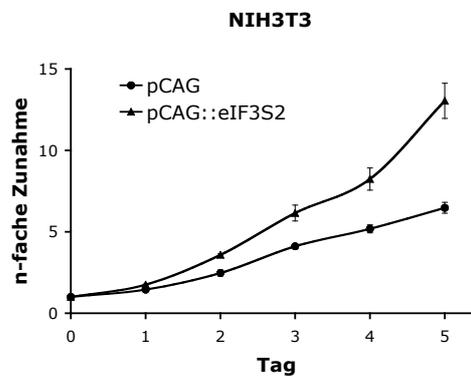
Da die siRNA-vermittelte Repression von eIF3S2 zu einer verminderten Proliferation führte, wurde untersucht, ob auch der Umkehrschluss zutrifft, d.h. eine eIF3S2-Überexpression zu einer erhöhten Proliferationsrate führt. Hierfür wurden Wachstumskinetiken der zuvor beschriebenen stabilen Transfektanten in zwei unabhängigen Experimenten bestimmt. Durch Auszählen vitaler Zellen (Trypanblauausschluss-Methode) über einen Zeitraum von fünf Tagen wurden die einzelnen Werte gewonnen. Alle Werte wurden auf die Zellzahl am Tag 0 bezogen. Interessanterweise konnte in den eIF3S2 überexprimierenden Zellen drei Tage nach Kultivierungsbeginn eine höhere Zellzahl beobachtet werden. Vier Tage nach Kultivierungsbeginn war die Zellzahl der eIF3S2 überexprimierenden NIH3T3 und HeLa im Vergleich zur Kontrollpopulation um den Faktor 3,2 bzw. 2,2 höher (Abbildung 4.23).



**Abbildung 4.23 eIF3S2 Überexpression erhöht die Proliferation in murinen NIH3T3 Fibroblasten und humanen HeLa Zellen.** Gleiche Zellzahlen stabiler Transfektanten von NIH3T3 oder HeLa Zellen mit eIF3S2-Expressionsvektor oder dem Leervektor wurden ausplattiert und für 5 Tag kultiviert. An jedem Tag wurde die Zellzahl bestimmt. Dargestellt ist die Zunahme der Zellzahl mit der Zeit.

eIF3S2 überexprimierende Zellen zeigten eine signifikant erhöhte Proliferationsrate im Vergleich zu Zellen mit Kontrollvektor. Dies konnte sowohl in humanen HeLa Zellen als auch in murinen NIH3T3 Fibroblasten beobachtet werden.

Um auch die Auswirkungen der Überexpression auf den Metabolismus zu untersuchen, wurden stabile Transfektanten von NIH3T3 Zellen mit eIF3S2-Expressionsvektor oder nur dem Leervektor verglichen. Zur Bestimmung der metabolischen Aktivität wurden gleiche Zahlen ( $3 \times 10^3$ /Loch in 96-Loch Platten) der zu vergleichenden Zellen in 10% FCS DMEM ausplattiert und für 5 Tage kultiviert. An jedem Tag wurde die metabolische Aktivität in einem MTT-Konversionsexperiment bestimmt. Dabei wurden jeweils 3 Löcher pro Zelllinie ausgewertet und die Werte zu denen am Tag 0 in Relation gesetzt. In Abbildung 4.24 sind die, aus 2 unabhängigen MTT-Konversionsexperimenten, erhaltenen Mittelwerte in Abhängigkeit von der Kulturdauer dargestellt. Es konnte bereits ab Tag 2 ein deutlich erhöhter Metabolismus der eIF3S2 überexprimierenden NIH3T3 Zellen gegenüber den Kontrollzellen beobachtet werden. eIF3S2 Überexpression führt also auch zu einer Erhöhung des Metabolismus von murinen NIH3T3 Zellen.



**Abbildung 4.24 eIF3S2 Überexpression erhöht den Metabolismus in NIH3T3 Zellen.** Gleiche Zellzahlen stabiler Transfektanten von NIH3T3 Zellen mit eIF3S2-Expressionsvektor oder dem Leervektor wurden ausplattiert und für 5 Tage kultiviert. An jedem Tag wurde die metabolische Aktivität in einem MTT-Konversionsexperiment bestimmt. Dargestellt ist die Zunahme der metabolischen Aktivität mit der Zeit, relativ zum Ausgangswert des Tags 0 (Mittelwert und Standardabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten).

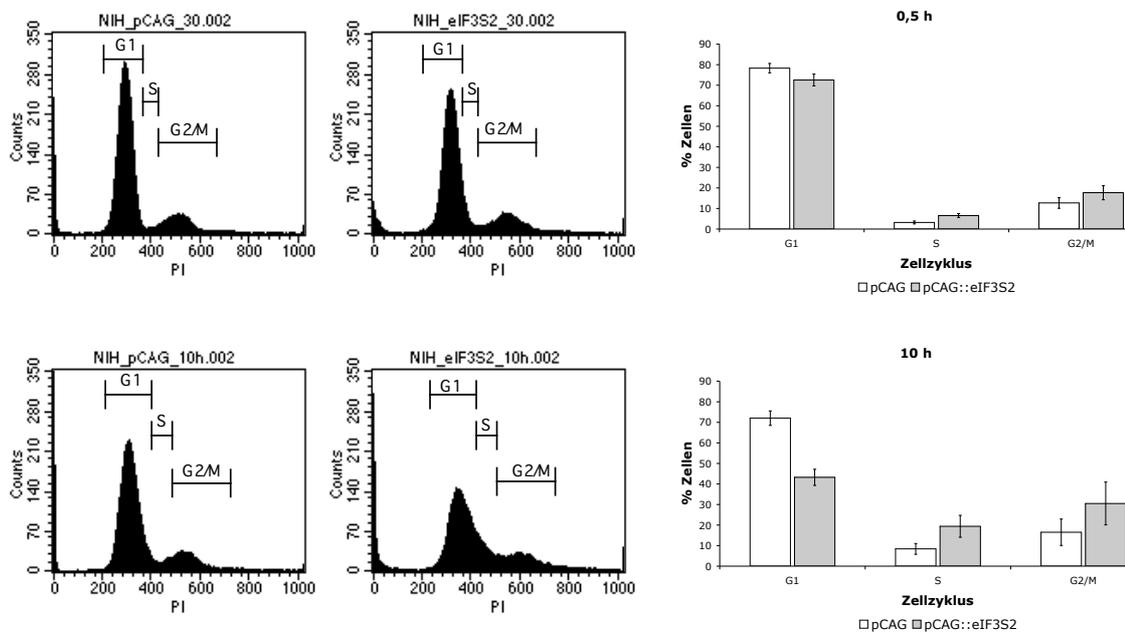
#### 4.4.7 eIF3S2 Überexpression verkürzt die G1-Phase des Zellzyklus

Wie gezeigt, bewirkt eine eIF3S2-Überexpression eine höhere und eine eIF3S2 Repression eine verminderte Proliferationsrate. Eine veränderte Proliferation beruht letztlich auf einem veränderten Durchlaufen des Zellzyklus und/ oder auf Unterschieden in der Apoptoserate. Es stellte sich entsprechend die Frage, ob und wie eIF3S2 Einfluss auf den Zellzyklus nimmt. Um dies auf molekularer Ebene zu untersuchen, war es zuerst notwendig zu bestimmen, ob eIF3S2 speziell eine Phase oder alle Phasen des Zellzyklus gleichermaßen beeinflusst. Der Zellzyklus unterteilt sich in drei Phasen, (i) die G1 Phase, in der die Zelle aufgrund verschiedenster Signale wächst, um eine kritische Größe und Masse für die Zellteilung zu erlangen, (ii) die S Phase, in welcher die DNA repliziert wird und (iii) die G2 Phase in der die Zellteilung vorbereitet wird und in deren letztem Stadium die Mitose, *i.e.* die eigentliche Teilung, stattfindet. Zellen lassen sich aufgrund ihres unterschiedlichen DNA-Gehaltes diesen drei Phasen zuordnen. Zellen in G1/ G0 Phase besitzen einen einfachen (diploiden) und Zellen in der G2-Phase einen doppelten (tetraploiden) Chromosomensatz. Die Zellen in der S-Phase haben diesbezüglich einen intermediären Phänotyp.

Der Farbstoff Propidiumiodid fluoresziert nach Interkalation in DNA. Propidiumiodid gefärbte Zellen können im FACS Durchflußzytometer analysiert und so ihr DNA-Gehalt bestimmt werden. Um den Einfluss einer eIF3S2 Überexpression auf den Zellzyklus zu untersuchen, wurden stabile Transfektanten von NIH3T3 Zellen (eIF3S2 Expressionsvektor (pCAG::eIF3S2) oder Kontrollvektor (pCAG)) für 22h in Mangelmedium kultiviert (0,1% FKS DMEM) und so arretiert. Daraufhin wurde 10% FKS in das Kulturmedium addiert und weiterkultiviert. 30 min und 10h nach Zugabe des FKS wurden Zellen mit Propidiumiodid gefärbt und im FACS Durchflußzytometer analysiert.

Nach 22h Serummangel und 30 min Kultivierung mit 10% FKS war der überwiegende Anteil der Zellpopulation in der G1/G0 Phase, wie in den FACS Histogrammen deutlich zu beobachten war. Die statistische Auswertung der Histogramme bestätigte dies. Im Mittel befanden sich 73% und 78% der eIF3S2 überexprimierenden Zellen bzw. der Kontrollvektor enthaltenden Zellen in G1/G0 Phase, da ihnen aufgrund des Serummangels ein Stimulus zum Zellwachstum und zur Proliferation fehlte (Abbildung 4.25, obere Reihe). Nach 10h Kultivierung mit 10% FKS, veränderte sich die Verteilung der Zellpopulation auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus. Der Anteil

der G1/G0 Zellpopulation nahm sowohl für eIF3S2 überexprimierenden als auch für die Kontrollzellen ab. Der Anteil der S und G2 Zellpopulation hingegen nahm in beiden Fällen zu. Dabei konnte aber ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Transfektanten festgestellt werden. Der Anteil eIF3S2 überexprimierender Zellen in der G1/G0 Phase betrug nur noch 43% der der Kontrollzellen hingegen noch 72%. Entgegengesetzt, war der Anteil eIF3S2 überexprimierender Zellen in der S Phase auf 19%, der der Kontrollzellen hingegen nur auf 8% angestiegen. Gleichermäßen zeigte sich in der G2 Phase eine Zunahme des Anteils der eIF3S2 überexprimierenden Zellen auf 31% (18%), der Anteil der Kontrollzellen hingegen stieg von 13% nur auf 17% an (Abbildung 4.25, untere Reihe).



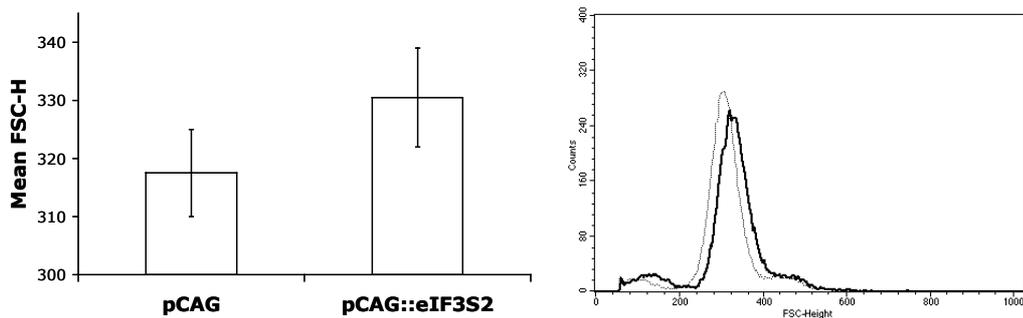
**Abbildung 4.25 eIF3S2 Überexpression verkürzt die G1 Phase.** Stabile Transfektanten von NIH3T3 Fibroblasten (eIF3S2 Expressionsvektor (141pCAG::eIF3S2) oder Kontrollvektor (141pCAG)) wurden durch Serumentzug (0,1% FKS DMEM) über Nacht arretiert. Anschließend wurden 10% FKS zugegeben. 0,5h und 10h nach Zugabe des FKS wurden Zellen mit Propidiumiodid gefärbt und im FACS Durchflußzytometer analysiert. Dargestellt sind repräsentative FACS-Histogramme der Propidiumiodid gefärbten Zellen (links) und die quantitative Auswertung dreier unabhängiger Experimente (rechts) (Obere Reihe nach 0,5h 10% FKS; untere Reihe nach 10h 10% FKS).

Nach Arrest der Zellen in der G1/G0 Phase durch Serumentzug waren eIF3S2 Zellen schneller in der Lage, die Wachstumssignale des zugegebenen FKS umzusetzen. Sie verließen deutlich schneller die G1/G0 Phase als die mit dem Leervektor transfizierten

Zellen. So war nach 10h ein signifikant erhöhter Anteil eIF3S2 überexprimierender Zellen in S und G2 Phase (50%) als solche Zellen, die mit Kontrollvektor transfizierten waren (25%). eIF3S2 Überexpression erlaubte es, externe Wachstumssignale schneller umzusetzen, wodurch die G1/G0 Phase in der das Zellwachstum hauptsächlich stattfindet, schneller verlassen werden kann.

#### 4.4.8 eIF3S2 Überexpression beeinflusst die Zellgröße

eIF3S2 Überexpression fördert die Proliferation von Zellen und führt zu einer schnelleren Umsetzung externer Wachstumssignale. Wie bereits erwähnt, ist das Erlangen einer kritischen Größe und Masse eine der Voraussetzungen zur Zellteilung. Dies wird hauptsächlich durch Wachstum in der G1/G0 Phase erreicht. Deshalb wurde untersucht, ob die eIF3S2 Überexpression mit einer Zunahme der Zellgröße einhergeht. Dies konnte erwartet werden, da bereits gezeigt wurde, dass die siRNA vermittelte eIF3S2 Repression mit einer Abnahme der Zellgröße korreliert.



**Abbildung 4.26 eIF3S2 Überexpression führt zu einer Zunahme der Zellgröße.** Stabile Transfektanten von NIH3T3 Zellen (eIF3S2 Expressionsvektor (141pCAG::eIF3S2) oder Kontrollvektor (141pCAG)) wurden durch Serumangel (0,1% FKS DMEM) über Nacht arretiert. 10h nach Zugabe von 10% FKS wurden Zellen im FACS Durchflußzytometer analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives FACS-Histogramm und die zugehörige quantitative Auswertung mit Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente (141pCAG gestrichelte Linie; 141pCAG::eIF3S2 fette Linie).

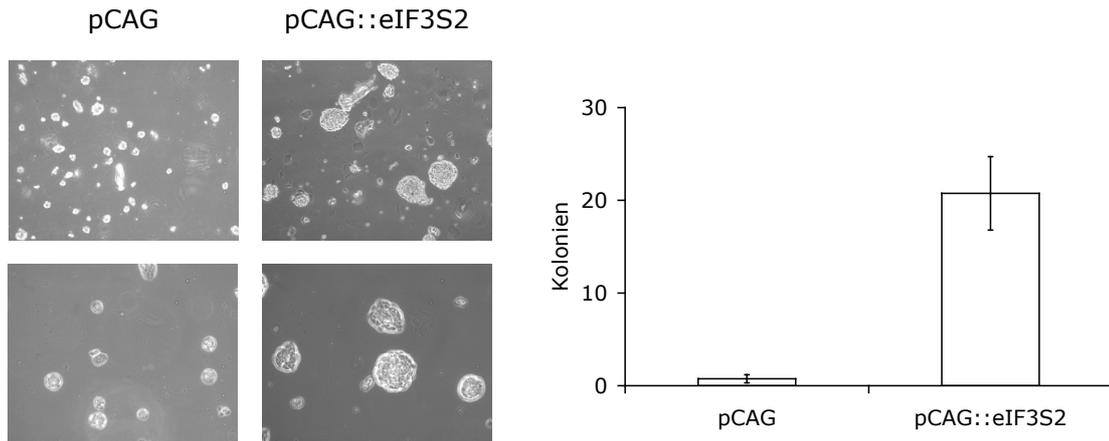
In Anlehnung an die Zellzyklusanalyse wurden Zellen in Mangelserum arretiert, mit 10% FKS stimuliert und nach 10h analysiert. Abbildung 4.26 zeigt ein repräsentatives Histogramm der FACS Analysen und die Mittelwerte der statistischen Auswertung dreier unabhängiger Experimenten. NIH eIF3S2 überexprimierende Zellen zeigten dabei eine Zunahme in der Zellgröße gegenüber NIH3T3 Kontrolltransfektanten.

Demnach geht mit der Zunahme der Zellgröße ein schnelleres Verlassen der G1/G0 Phase einher.

#### **4.4.9 eIF3S2 Überexpression erlaubt NIH3T3 Zellen Adhärenz-unabhängiges Wachstum**

Alle Phänomene, welche durch eIF3S2 Repression beobachtet wurden, konnten bisher in der Umkehr durch eIF3S2 Überexpression bestätigt werden (Proliferation, Metabolismus, Zellgröße). Deshalb wurde untersucht, ob eIF3S2 Überexpression auch zu adhärenzunabhängigem Wachstum, also zur Bildung von Kolonien in MC-Medium führt. Um den Einfluss der eIF3S2 Überexpression auf die Koloniebildung zu studieren, wurde das NIH3T3 Modell gewählt, da NIH3T3-Wildtyp Zellen, im Gegensatz zu HeLa-Wildtyp Zellen, keine Kolonien in MC-Medium bilden. eIF3S2- oder Kontrolltransfektanten der NIH3T3 Linie wurden in MC-Medium auf 0,4% Agarose 10% FCS/ DMEM ausplattiert und 7 - 10 Tage kultiviert. Abbildung 4.27 zeigt die quantitative Auswertung vier unabhängiger Experimente und repräsentative Fotografien von NIH3T3 Transfektanten, nach 10 tägiger Kultivierung in MC-Medium.

NIH3T3 Zellen, welche nur mit dem Kontrollvektor transfiziert waren, bildeten durchschnittlich weniger als eine Kolonie pro ausgezähltem Gesichtsfeld. Zu beobachten waren lediglich kleine Zellaggregate (weniger als 15 Zellen), die jedoch nicht auf eine Proliferation der Zellen zurückzuführen war. Hingegen bildeten NIH3T3 Zellen, welche mit dem eIF3S2-Expressionsvektor transfiziert waren, nach 7 - 10 Tagen durchschnittlich 20 Kolonien pro Gesichtsfeld aus. Daher kann festgestellt werden, dass eIF3S2-überexprimierende Zellen einen Mechanismus entwickelt haben, die Anoikis zu überkommen, und ohne Adhärenz in Suspension zu wachsen.



**Abbildung 4.27 eIF3S2 Überexpression führt in NIH3T3 Zellen zu Adhärenz-unabhängigem Wachstum.** Stabile Transfektanten von NIH3T3 Zellen (eIF3S2 Expressionsvektor (141pCAG::eIF3S2) oder Kontrollvektor (141pCAG)) wurden für 7 bis 10 Tage in MC-Medium kultiviert und dann die Anzahl der Kolonien bestimmt. Dargestellt sind lichtmikroskopische Aufnahmen (obere Reihe 5-fache Vergrößerung; untere Reihe 10-fache Vergrößerung) und die quantitative Auswertung mit Standardabweichung nach 10 Tagen vierer unabhängiger Experimente.

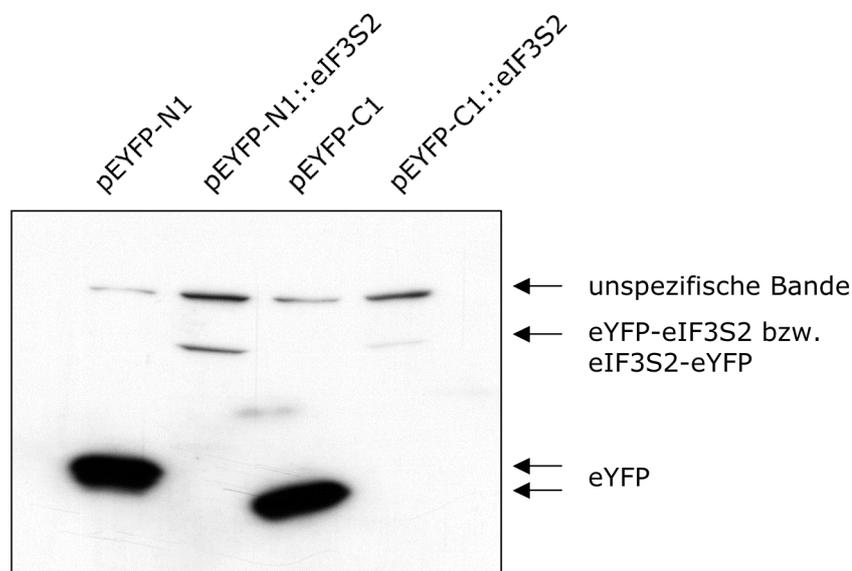
#### 4.4.10 Lokalisierung von eIF3S2

Im Gegensatz zur derzeitigen Beschreibung von eIF3S2 als Bestandteil des eukaryotischen Initiationsfaktors 3, beschrieb die Gruppe um Derynck dieses Protein 1995 als ein Typ II TGF $\beta$ -Rezeptor interagierendes Protein (Chen et al., 1995). Sowohl FaDu Zellen (Hypopharynxkarzinom), aus denen eIF3S2 im Rahmen des allogenen AMIDA-Screenings isoliert wurde, als auch HeLa Zellen (Zervixkarzinom) exprimieren Typ II TGF $\beta$ -Rezeptor (Abbildung 4.28).



**Abbildung 4.28 Expression von Typ II TGF $\beta$ -Rezeptor in FaDu und HeLa Zellen.** Gesamt-RNA wurde aus FaDu und HeLa Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und die Menge an Typ II TGF $\beta$ -Rezeptor- (TGF $\beta$ RII) und GAPDH- Transkripten in spezifischen PCRs bestimmt. Gezeigt ist die Expression von Typ II TGF $\beta$ -Rezeptor mRNA in der Hypopharynxkarzinomzelllinie FaDu und der Zervixkarzinomzelllinie HeLa (Ktrl - Wasserkontrolle der PCR Reaktion).

Als beschriebener intrazellulärer Ligand des Typ II TGF $\beta$ -Rezeptor sollte eIF3S2 vorzugsweise an der Membran lokalisieren. Um dies zu untersuchen, wurde eIF3S2 N- oder C-terminal mit dem *enhanced yellow fluorescence protein* (eYFP) fusioniert (pEYFP-N1::eIF3S2 bzw. pEYFP-C1::eIF3S2). Die Produkte wurden unter der Kontrolle des CMV-Promoters transient exprimiert. HeLa Zellen wurden mit pEYFP-N1, pEYFP-N1::eIF3S2, pEYFP-C1 oder pEYFP-C1::eIF3S2 transfiziert und für 48h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und das gewonnene Proteinlysate für einen Immunoblot gegen eYFP eingesetzt (Abbildung 4.29).



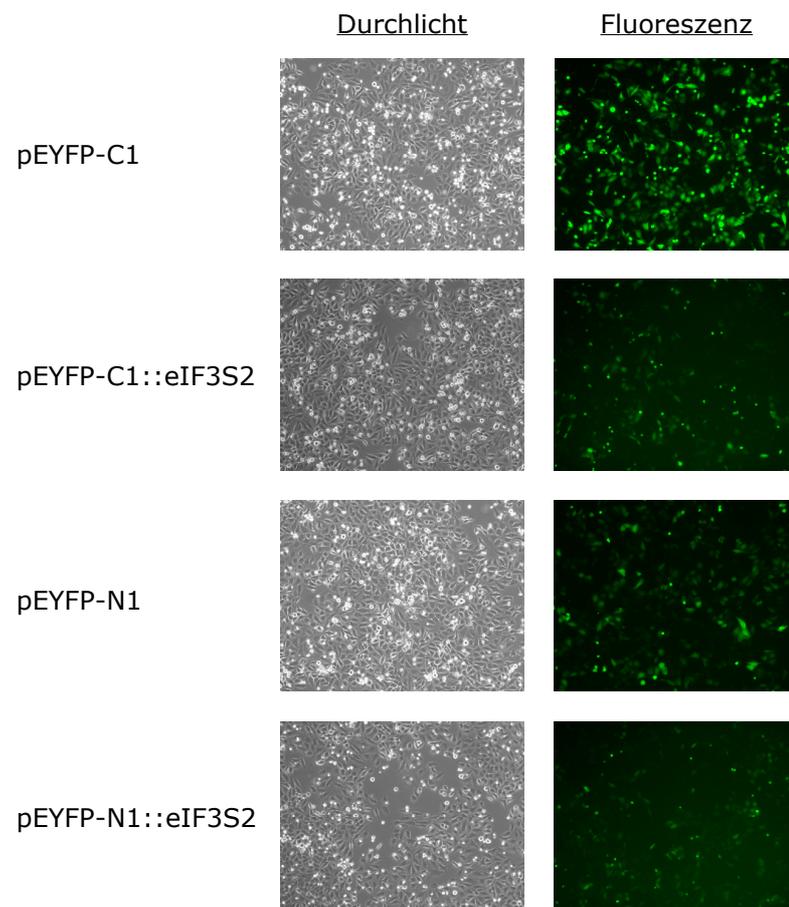
**Abbildung 4.29 Ektopische Expression von C- oder N-terminal eYFP fusioniertem eIF3S2 in HeLa Zellen.** Dargestellt ist ein Immunoblot gegen eYFP von Lysaten transient transfizierter HeLa Zellen mit den Expressionsvektoren pEYFP-N1, pEYFP-N1::eIF3S2, pEYFP-C1 und pEYFP-C1::eIF3S2.

Aus Abbildung 4.29 geht hervor, dass die Fusionsproteine von eYFP und eIF3S2 deutlich schlechter exprimiert werden als eYFP alleine. Die unspezifische Bande dient dabei als Ladekontrolle. Die unterschiedlichen Größen des eYFP, exprimiert von den Vektoren pEYFP-N1 oder -C1, kommen zustande, da im Falle des pEYFP-N1 Expressionsvektors zwischen dem Ende der für eYFP kodierenden Sequenz und dem Stop-Codon noch ein Polypeptid liegt, welches als Verbindungsstück zur Fusion mit dem eIF3S2 N-Terminus verwendet wird.

Da die verwendeten Expressionvektoren Resistenzgene kodieren, wurde versucht, stabile Transfektanten zu erzeugen. Dies gelang für die eYFP-eIF3S2 Fusionsproteine

nicht. Dies deutete auf eine Störung der molekularen Funktion von eIF3S2 durch das 26kDa große eYFP hindeuten.

Die Expression der eYFP und eYFP-eIF3S2 Fusionsproteine wurde im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Dazu wurden HeLa Zellen mit den zuvor verwendeten Vektoren transient transfiziert und nach 48h fluoreszenzmikroskopisch betrachtet. Abbildung 4.30 zeigt repräsentative Fotografien.

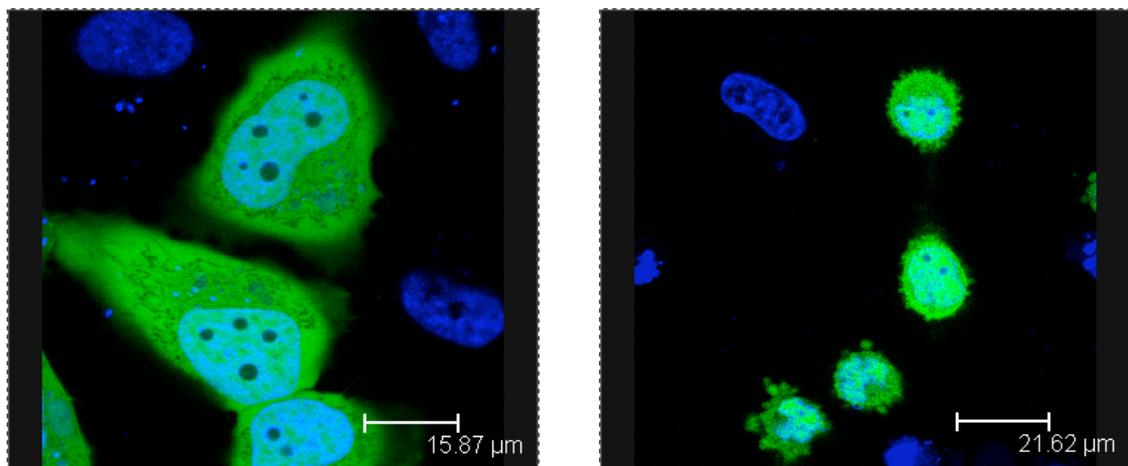


**Abbildung 4.30 Expression von eYFP-eIF3S2 Fusionsproteinen nach transienter Transfektion in HeLa Zellen.** eIF3S2 wurde C- oder N-terminal mit eYFP fusioniert und transient in HeLa Zellen exprimiert. Zur Kontrolle wurde nur eYFP transient exprimiert. eYFP (grün) und die Fusionsproteine eIF3S2-eYFP zeigten gleichermaßen eine homogene Verteilung in der ganzen Zelle. Lebende Zellen wurden im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel aus zwei unabhängigen Experimenten.

Wie auch im Immunoblot zeigte sich, dass die Fusionsproteine deutlich schlechter exprimiert wurden als eYFP alleine. Bei dieser Vergrößerung konnten keine

Unterschiede zwischen der Verteilung der Fusionsproteine und des eYFP alleine in der Zelle beobachtet werden.

Um die subzelluläre Verteilung des eIF3S2 genauer zu betrachten, wurden HeLa Zellen mit dem eIF3S2-Fusionsprotein transient transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde der Zellkern mit Höchst 33342 (blau) gefärbt und lebende Zellen im konfokalen Laser Scanning Mikroskop analysiert, und somit eine deutlich erhöhte Auflösung erzielt (Abbildung 4.31).



**Abbildung 4.31 Bestimmung der subzellulären eIF3S2 Lokalisation in der konfokalen Laser Scanning Fluoreszenzmikroskopie.** Gezeigt ist die Expression von eIF3S2-eYFP (grün) in vitalen HeLa Zellen. Der Zellkern wurde mit Höchst 33342 (blau) gefärbt. eIF3S2-eYFP zeigte eine homogene Verteilung in der ganzen Zelle (links). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass eIF3S2-eYFP exprimierende Zellen schrumpften und Vesikel abschnürten (rechts). Lebende Zellen wurden im konfokalen Mikroskop analysiert.

eIF3S2-eYFP zeigte eine homogene Verteilung in der ganzen Zelle, im Zytoplasma und auch im Zellkern (Abbildung 4.31, links und rechts). Keinesfalls konnte eine ausschließliche Lokalisation an der Membran beobachtet werden, wie es für eine Interaktion mit dem membranständigen Typ II TGF $\beta$ -Rezeptor zu erwarten wäre. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass eIF3S2-eYFP exprimierende Zellen schrumpfen und Vesikel abschnürten (Abbildung 4.31 rechts), typische Zeichen von Apoptose.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eIF3S2-eYFP Fusionsproteine eine homogene Verteilung in der gesamten Zelle zeigen und nicht bevorzugt an der

Membran lokalisieren. Weiterhin ist festzustellen, dass das Fusionsprotein bei anhaltender Expression den Zellen schadet und sie wahrscheinlich in die Apoptose treibt. Dies konnte in der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden und wurde dadurch unterstrichen, dass es wiederholt und in diversen Zelllinien nicht möglich war, das eIF3S2-eYFP Fusionsprotein stabil zu exprimieren.

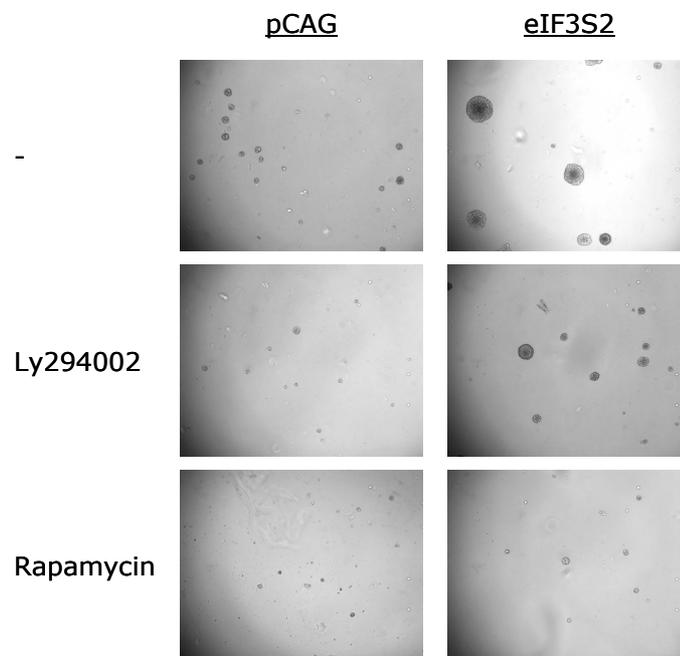
#### 4.4.11 Phosphorylierung eIF3S2

Die fluoreszenzmikroskopischen Analysen der subzellulären Lokalisation gaben keinen Anhalt für eine bevorzugte Lokalisation des eIF3S2 an der Membran. Deshalb wurde davon ausgegangen, dass eIF3S2 seine wesentliche biologische Funktion im eIF3-Komplex ausübt. Analysen von eIF3S2 zeigten, dass es an Serin und Threonin Aminosäuren phosphoryliert wird. Welche der Serin- und Threonin-Reste des eIF3S2 phosphoryliert sind, wurde jedoch nicht näher beschrieben (Chen et al., 1995). Deshalb wurde untersucht, ob die Phosphorylierung einen Einfluss auf die im Rahmen der Überexpression beobachteten Effekte hat.

Die Kinase mTOR (*mammalian target of Rapamycin*) integriert externe Wachstumssignale (Insulin, IGF) und die Nährstoffsituation (Aminosäuren und Energie) der Zelle in die Regulation der Proteintranslation. Dies erfolgt durch die Phosphorylierung bekannter Substrate wie der S6Kinase oder dem 4EBP (*eIF4E binding Protein (eukaryotic initiation factor 4 subunit E)*, (Shamji et al., 2003). Diese Substrate sind, ebenso wie eIF3S2, in die Proteintranslation involviert. Grundlage für das Wachstum ist die makromolekulare Biosynthese, insbesondere die Proteinsynthese. mTOR reguliert das Zellwachstum mittels der Proteinsynthese.

Bei einer eIF3S2 Überexpression wurden eine verstärkte Proliferation, ein stärkerer Metabolismus und ein stärkeres Zellwachstum beobachtet. Im Rahmen der Zellzyklusanalyse wurde festgestellt, dass eIF3S2 überexprimierende Zellen nicht ohne FKS wachsen können. Auch sie arretierten nach 22h FKS Mangel in der G1 Phase. Die Überexpression scheint daher nicht den Zellen zur Unabhängigkeit von externen Wachstumssignalen zu verhelfen, sondern vielmehr diese verstärkt umzusetzen. Es erschien daher möglich, dass die eIF3S2 Phosphorylierung direkt oder mittelbar durch mTOR reguliert wird.

Die Abhängigkeit der Effekte der eIF3S2 Überexpression von mTOR wurde mit Hilfe der Kinaseinhibitoren Rapamycin und LY294002 untersucht. Bei diesen beiden niedermolekularen Verbindungen handelt es sich um Kinaseinhibitoren der mTOR Kinase bzw. der Phosphoinositol-3 Kinase (PI3K). Um ihren Einfluss auf die eIF3S2 vermittelte Koloniebildung zu studieren, wurden eIF3S2 überexprimierende oder Kontrolltransfektanten in MC-Medium ohne Inhibitor, mit Rapamycin (1 ng/ml) oder mit Ly294002 (2,5  $\mu$ M) für 10 Tage kultiviert und in der Lichtmikroskopie analysiert (Abbildung 4.32).

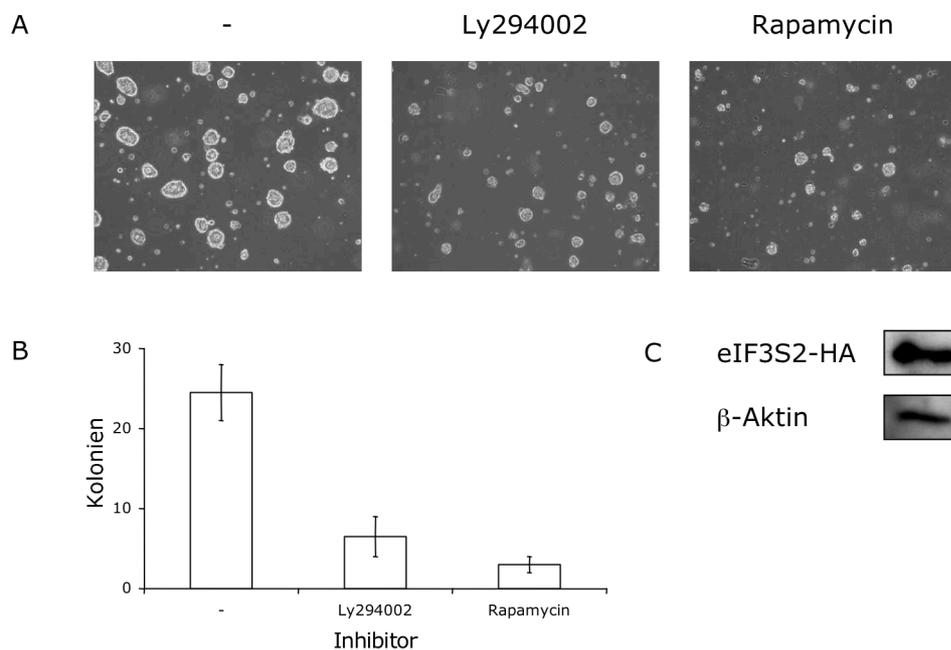


**Abbildung 4.32 Einfluss der Kinaseinhibitoren Ly294002 und Rapamycin auf die Koloniebildung eIF3S2-überexprimierender NIH3T3 Zellen in MC-Medium.** eIF3S2-überexprimierende oder Kontrolltransfektanten wurden für 10 Tage in MC-Medium ohne Inhibitor (-), mit Ly294002 (2,5  $\mu$ M) oder Rapamycin (1 ng/ml) kultiviert und in der Lichtmikroskopie analysiert.

Die lichtmikroskopische Auswertung ergab, dass sowohl Ly294002 als auch Rapamycin die Koloniebildung der eIF3S2-überexprimierenden NIH3T3 Zellen unterdrücken. Allerdings war der Effekt durch Rapamycin bei den hier gewählten Konzentrationen stärker als der von Ly294402.

Für weitere Experimente war ein Epitop, gegen welches ein hochaffiner und spezifischer Antikörper verfügbar ist, notwendig. Deshalb wurde eIF3S2 C-terminal mit

einem HA-Epitop fusioniert (Expressionsvektor pCAG::eIF3S2-HA) und stabil in NIH3T3 Zellen exprimiert. eIF3S2-HA NIH3T3 Zellen wurden lysiert und im Immunoblot auf eIF3S2-HA mit einem HA-spezifischen Antikörper untersucht. Als Ladekontrolle diente ein  $\beta$ -Aktin spezifischer Immunoblot. Abbildung 4.33C zeigt, dass eIF3S2-HA exprimiert wird. Ebenso wie Wildtyp-eIF3S2, führte die Überexpression von eIF3S2-HA zur Bildung von Kolonien in MC-Medium (Abbildung 4.33A). Das gleiche wurde für N-terminal HA-markiertes eIF3S2 beobachtet (Daten nicht gezeigt).



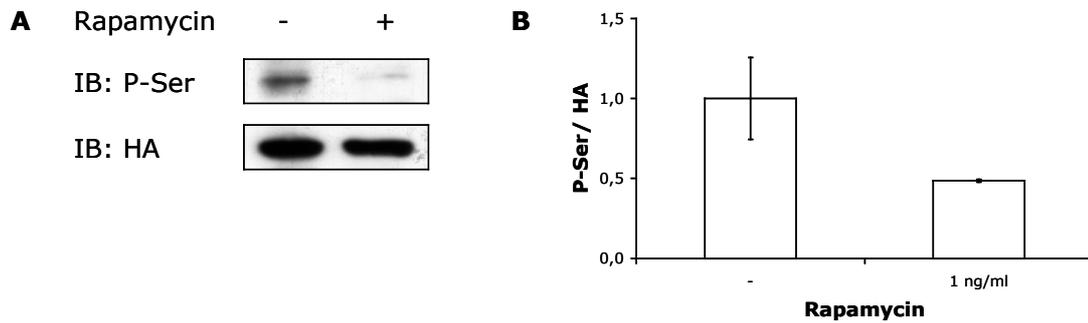
**Abbildung 4.33 Einfluss der Kinaseinhibitoren LY294002 und Rapamycin auf die Koloniebildung von eIF3S2-Ha überexprimierenden NIH3T3 Zellen in MC-Medium.** eIF3S2-HA-überexprimierende NIH3T3 Zellen wurden 10 Tage in MC-Medium ohne Inhibitor (-), mit Ly294002 (2,5 $\mu$ M) oder Rapamycin (1ng/ml) kultiviert und in der Lichtmikroskopie analysiert (A). Die quantitative Auswertung mit Standardabweichung zweier unabhängiger Experimente ist in B dargestellt. eIF3S2-HA NIH3T3 Zellen wurden lysiert und im Immunoblot auf eIF3S2-HA mit einem HA-spezifischen Antikörper untersucht. Als Ladekontrolle diente ein  $\beta$ -Aktin spezifischer Immunoblot (C).

eIF3S2-HA-überexprimierende NIH3T3 Zellen wurden 10 Tage in MC-Medium ohne Inhibitor, mit Rapamycin (1ng/ml) oder mit Ly294002 (2,5 $\mu$ M) kultiviert und in der Lichtmikroskopie analysiert. Wie auch bei eIF3S2-überexprimierenden NIH3T3 Zellen, wurde die Koloniebildung von eIF3S2-HA überexprimierenden NIH3T3 Zellen durch die Inhibitoren reprimiert. Abbildung 4.33A zeigt repräsentative Bilder der

lichtmikroskopischen Analyse. Die quantitative Auswertung zweier unabhängiger Experimente ergab, dass Rapamycin bei einer Konzentration von 1ng/ml die durchschnittliche Kolonienzahl pro Gesichtsfeld von 23 auf 3 und LY294002 bei einer Konzentration von 2,5 $\mu$ M auf 7 senkte.

Die Kinaseinhibitoren Rapamycin und LY294002 senken die Koloniebildung von eIF3S2 überexprimierenden NIH3T3 Zellen. Um zu untersuchen, ob dies ein unspezifischer Effekt ist, oder die Kinaseinhibitoren die Funktion von eIF3S2 beeinträchtigen, wurde die Phosphorylierung von eIF3S2 in Abhängigkeit von Rapamycin untersucht, da dieses den stärkeren Effekt zeigte. eIF3S2 überexprimierende NIH3T3 Zellen wurden 3 Tage ohne Inhibitor oder mit 1ng/ml Rapamycin kultiviert. Die Zellen wurden lysiert und der Proteingehalt der Lysate bestimmt. Für die anschließende HA-Immunopräzipitation wurden gleiche Proteinmengen der Lysate von Zellen, die ohne Inhibitor oder mit Rapamycin kultiviert wurden, eingesetzt. Die Immunopräzipitate wurden in einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt, auf eine PVDF Membran geblottet und phosphoserinhaltige Proteine mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Anschließend wurde dieselbe Membran verwendet, um mit einem anti-HA-Antikörper die Menge an präzipitiertem eIF3S2-HA zu bestimmen. Auf der Höhe des eIF3S2-HA Fusionsproteins (ca. 37 kDa) wurden sowohl im Phosphoserin als auch im HA-Blot spezifische Banden detektiert. Aus den Immunoblots ging hervor, dass bei gleicher eIF3S2-HA-Proteinmenge, die Behandlung der Zellen mit Rapamycin zu einer signifikanten Hemmung der Serinphosphorylierung von eIF3S2 führt. Die Immunoblots wurden densitometrisch mit der ImageJ Software (ImageJ 1.32, NIH, USA) ausgewertet und die Phosphorylierung relativ zur eIF3S2-HA-Proteinmenge berechnet. Die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten sind in Abbildung 4.34B dargestellt.

Die quantitative Auswertung zeigte, dass der mTOR Kinaseinhibitor Rapamycin die Phosphorylierung von eIF3S2 in NIH3T3 Zellen um 50% hemmt. Ob eIF3S2 ein Substrate der Kinase mTOR ist, oder ob eine andere, ihrerseits durch mTOR regulierte Kinase, z.B. die S6Kinase, eIF3S2 phosphoryliert ist offen und Gegenstand derzeitiger Arbeiten.

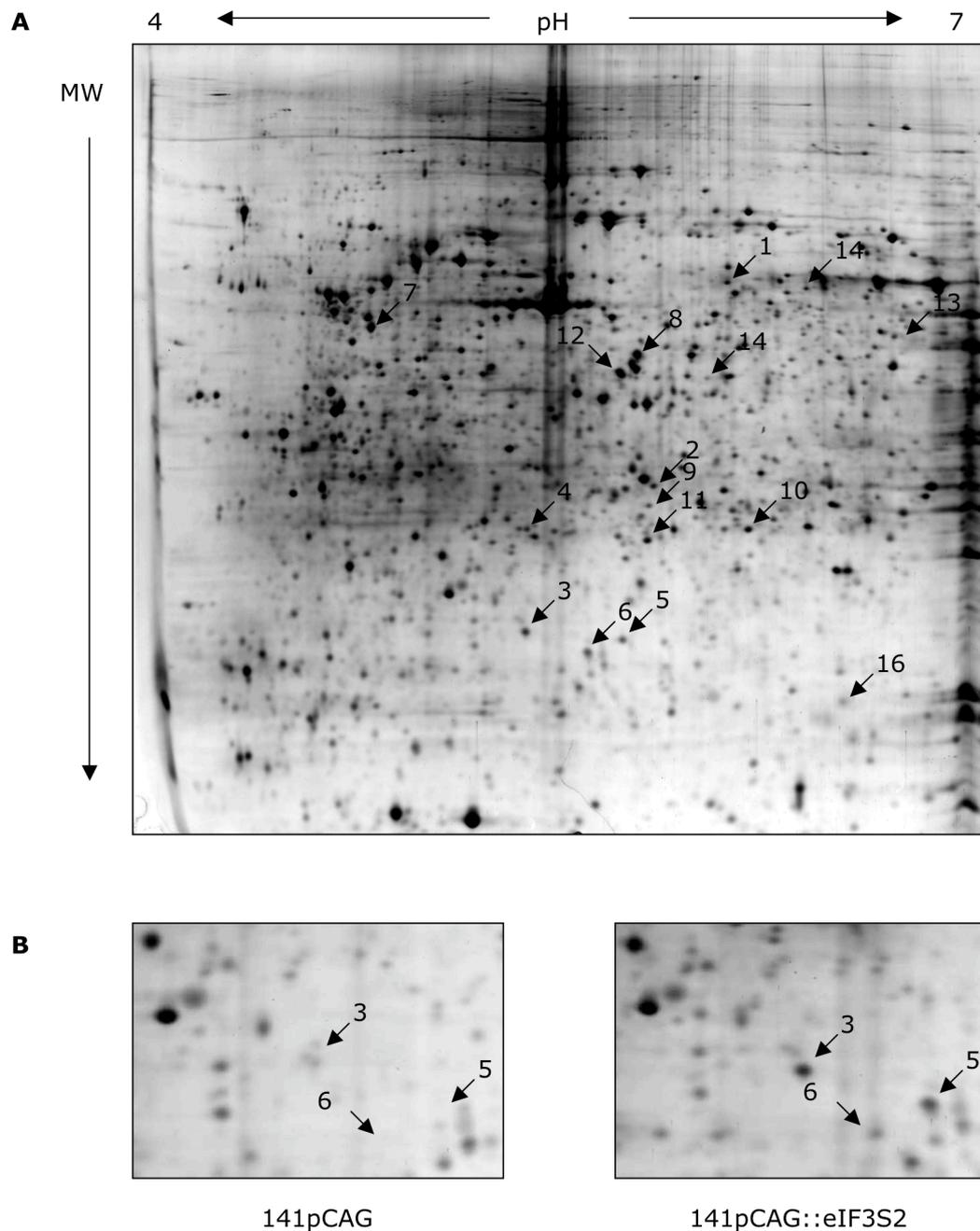


**Abbildung 4.34 Rapamycin inhibiert eIF3S2 Phosphorylierung an Serinresten.** eIF3S2-überexprimierende NIH3T3 Zellen wurden 3 Tage ohne Inhibitor oder mit 1ng/ml Rapamycin kultiviert. eIF3S2-HA wurde aus den generierten Zelllysaten mittels HA-Immunopräzipitationen isoliert und in einer 1D-SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde die Menge präzipitierten eIF3S2-HAs und dessen Phosphorylierung mittels HA- bzw. Phosphoserin-Immunoblots bestimmt (A). Die Phosphorylierung des eIF3S2-HA wurde relativ zur präzipitierten Menge berechnet (P-Ser/HA). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen zweier unabhängiger Experiment (B). (IB - Immunoblot; P-Ser - Phosphoserin)

#### 4.4.12 Identifikation eIF3S2-regulierter Proteine mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese

Da eIF3S2 Rapamycin-sensitive Effekte vermittelt und als Bestandteil des eIF3 Komplexes in den Initiationsprozess der Proteintranslation involviert ist, stellte sich die Frage, ob die Überexpression des eIF3S2 auch zur veränderten Translation spezifischer mRNAs führt. Dies würde zu einer veränderten Menge der entsprechenden Proteine führen. Methodisch bot sich die 2D-PAGE an, da sie den direkten hochauflösenden Vergleich verschiedener Proben auf Proteinebene ermöglicht. Deshalb wurden NIH3T3 eIF3S2-überexprimierende Zellen mit NIH3T3 Zellen, welche den Kontrollvektor enthielten, in der 2D-PAGE verglichen. Hierzu wurden gleiche Zellmengen ( $10^6$  Zellen pro Ansatz) in der 2D-PAGE aufgetrennt, silbergefärbt und die erhaltenen Muster Software-gestützt verglichen. Insgesamt konnten 16 Spots identifiziert werden, die mindestens um den Faktor 3 reguliert waren. Ihre jeweilige Position in einem silbergefärbtem 2D-PAGE Gel ist in Abbildung 4.35A eingezeichnet. Diese Spots wurden für die spätere Analyse ausgeschnitten und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. 11 Spots waren in eIF3S2 NIH3T3 Transfektanten, hoch- und 5 im Vergleich zu den Kontrollzellen runterreguliert. Die massenspektroskopische Identifizierung, der den Spots zugrunde

liegenden Proteine, und die Validierung der beobachteten Unterschiede sind Gegenstand derzeitiger Arbeit.



**Abbildung 4.35 Vergleich von NIH3T3 Zellen mit eIF3S2-überexprimierenden NIH3T3 Zellen in der 2D-PAGE.** Zellen ( $1 \times 10^6$ ) wurden in 2D-Lysispuffer aufgenommen und auf einer IPGphor Fokussierungseinheit mit einem pH Gradienten von pH 4-7 fokussiert. Anschließend wurden die fokussierten Proteine in einem 11%-igem SDS-PAGE Gel aufgetrennt und mit Silbernitrat gefärbt. In A ist ein repräsentatives Gel NIH3T3 eIF3S2-überexprimierender Zellen gezeigt. Die im Vergleich zu NIH3T3-Kontrollvektor mindestens 3-fach regulierten Spots sind markiert (1-16). In B dargestellt sind Ausschnitte aus Silbergefärbten 2D-Gelen von NIH3T3 Kontrollzelllinien (141pCAG) und eIF3S2-überexprimierende NIH3T3 Zellen (141pCAG::eIF3S2, Vergrößerung aus A).

## 5 Diskussion

Trotz intensiver Krebsforschung in den letzten Jahrzehnten und zahlreichen Verbesserungen in Chirurgie, Strahlen- und Chemotherapie konnte die Überlebenserwartung für Krebspatienten nur unwesentlich verbessert werden (siehe 1.2.2). Biomarker, *i.e.* molekulare Merkmale, die mit der Erkrankung korrelieren, ermöglichen eine Diagnose in einem frühen Stadium, in dem eine weitaus bessere Chance auf Therapieerfolg besteht. Biomarker haben daher ein großes Potential, die Überlebenserwartung zukünftig zu verbessern. Bisher stehen jedoch mit wenigen Ausnahmen, wie z.B. PSA bei der Frühdiagnose des Prostatakarzinoms oder dem Pap-Test bei Zervixkarzinomen, nur wenige dringend notwendige Biomarker zur Verfügung.

Die systematische Suche nach geeigneten Biomarkern ist ein junges Forschungsgebiet, dessen Erfolg für die klinische Entwicklung jedoch von enormer Relevanz ist. Tumorspezifische und -assoziierte Antigene sind molekularbiologische Merkmale von Tumoren, welche zum Teil als Biomarker geeignet sind. Serologische Screening-Verfahren, wie SEREX (Chen et al., 1997) oder PROTEOMEX (Klade et al., 2001), identifizierten eine Vielzahl neuer Tumorantigene. Bis *dato* wurde die Mehrzahl der Tumorantigene aus malignen Melanomen und Nierenzellkarzinomen isoliert und identifiziert. Bei Karzinomen des Kopf-Halsbereichs sind bisher nur wenige Tumorantigene beschrieben worden (siehe 1.4.2).

Neben ihrem Potential als Biomarker können Tumorantigene ferner interessante Zielstrukturen für neue Therapieansätze darstellen. So wird das Tumorantigen Her2/neu als Zielstruktur in Mammakarzinomen für Therapien mit monoklonalen Antikörpern genutzt (Adams und Weiner, 2005). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit einer serologischen Screening-Methode Tumorantigene bei Karzinomen des Kopf-Halsbereichs zu identifizieren, zu validieren und zu charakterisieren.

## 5.1 Entwicklung der allo-AMIDA Technologie zur Identifizierung von Tumorantigenen

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit waren insbesondere zwei Methoden zur Identifizierung von Tumorantigenen verbreitet, welche 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 potentieller Tumorantigene mit autologen Serumantikörpern (Sahin et al., 1995). PROTEOMEX stützt sich auf die Auftrennung des Proteoms von primären Tumoren oder Tumorzelllinien mittels 2D-Gelelektrophorese und der anschließenden Detektion von Tumorantigenen mit autologen Serumantikörpern in einem Immunblot-Verfahren (Klade et al., 2001). Beide Techniken bieten, wie unter 1.5 eingehend beschrieben, viele Vorteile, bergen aber auch erhebliche Limitationen.

Keines der Verfahren erlaubt die Kombination einer schnellen und sensitiven Identifizierung von Tumorantigenen. Aus diesem Grund wurde in unserem Labor eine Technik entwickelt, die eine rasche Identifikation von Antigenen erlaubt. Diese neue Technik wurde AMIDA (*Autoantibody Mediated Identification of Antigens*) benannt. Sie basiert auf der Immunopräzipitation 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 (Gires et al., 2004).

Im Vergleich – bei PROTEOMEX werden erst die Tumorproteine in einer 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend die Antigene mittels Serumantikörper detektiert. Da eine klassische 2D-Gelelektrophorese jedoch nur eine begrenzte Anzahl der abundantesten Proteine (maximal 3.000) aufzutrennen vermag, können hierbei nur Antigene aus dieser limitierten Menge untersucht werden. Schätzungen zufolge werden ca. 30.000 bis 50.000 unterschiedliche Proteine pro Zelle gebildet. Somit können bei PROTEOMEX lediglich ca. 10% des Proteoms zur Isolierung von TAs verwendet werden. Die bei AMIDA durchgeführte Selektion der Antigene mittels Immunopräzipitation erfolgt aus der Gesamtheit der zellulären Proteine, resultiert in einer Reduktion der Komplexität des aufzutrennenden Proteingemisches und umgeht somit diese Restriktion. Dies wird vor allem durch eine hohe Anzahl identifizierter,

potentieller Tumorantigene aus einer verhältnismäßig geringen Anzahl bis *dato* durchgeführter AMIDA-Screens bestätigt. Ein Nachteil der AMIDA-Technologie im Vergleich zu PROTEOMEX könnte eine geringere Sensitivität bei der Antigendetektion sein. Bei PROTEOMEX werden die Antigene in einem Immunoblot, bei der AMIDA-Technologie hingegen in einer Silberfärbung, welche ca. 100fach weniger sensitiv ist, detektiert. Allerdings könnten die präzipitierten Antigene auch in der AMIDA-Technologie nach der 2D-Gelelektrophorese, anstatt mit einer Silberfärbung, alternativ mittels Immunoblot mit autologen Serumantikörpern detektiert werden. Dies ist ein zukünftiger Ansatz, die Sensitivität der AMIDA-Technik zu erhöhen.

Um bei der autologen AMIDA-Technologie zwischen natürlichen und tumorspezifischen bzw. -assoziierten Autoantigenen unterscheiden zu können, wurden parallel Immunopräzipitate aus Leukozytenlysaten mit autologen Serumantikörpern des Tumorpatienten analysiert und so nichttumorspezifische Antigene identifiziert. Leukozytenlysate wurden verwendet, da die ideale Kontrolle, Epithelien gesunder autologer Rachenschleimhaut, aus ethischen Gründen nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stand. Diese und auch andere autologe Techniken weisen außerdem zwei weitere Nachteile auf. Zum einen ist die Menge des aus Tumorbiopsien erhältlichen Proteinlysates sehr variabel und nicht immer ausreichend. Zum anderen weisen die Proteinlysate eine sehr heterogene Zusammensetzung auf, da Tumorgewebe eine Vielzahl nicht transformierter Zellen, z.B. Tumor-infiltrierende Lymphozyten, enthält (Goedegebuure und Eberlein, 1995).

Um diese Limitationen der autologen AMIDA-Technologie zu umgehen, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit eine allogene Alternative entwickelt (siehe 4.1.1), in der permanente Tumorzelllinien als Proteinquelle dienen. Dies gewährleistet eine gleich bleibende, homogene Zusammensetzung des zur Immunopräzipitation eingesetzten Proteinlysates. Dadurch ist lediglich Blut des Patienten erforderlich, was die Beschaffung des erforderlichen Primärmaterials und somit die Verwendung der Technologie für Screenings mit großen Patientenkollektiven erheblich erleichtert. Aus der Verwendung von Patientenseren mit allogenen Zelllinien als Proteinquelle für Immunopräzipitationen ergibt sich die Möglichkeit von allogenen Reaktionen. Auch die natürlichen Autoantikörper, die in jedem Menschen vorkommen (Lacroix-Desmazes et al., 1998), führen zur Präzipitation von Antigenen, die keine Tumorantigene sind. Natürliche Autoantigene sowie allo gene Reaktionen wurden aus der Analyse

ausgeschlossen. Hierzu wurden Serumantikörper von gesunden Spendern (n=100) zur Immunopräzipitation von Tumorzelllysaten verwendet. Der Vergleich der Immunopräzipitate von Karzinompatienten mit Kontrollpräzipitaten in der 2D-Gelelektrophorese erlaubt es, tumorassoziierte Antigene von natürlichen Autoantigenen und alloenen Antigenen zu unterscheiden. Die Verwendung eines Pools von 100 Seren gesunder Probanden ermöglicht im Unterschied zu einzelnen Seren gesunder Probanden, individuelle Reaktivitäten zu nivellieren und nur die häufigsten Autoantigene zu berücksichtigen. Gleichzeitig kann diese Nivellierung auch dazu führen, dass seltene Autoantigene oder allo-Reaktionen in den Kontrollen übersehen werden. Eine Validierung der identifizierten Antigene *in vivo* ist daher unerlässlich.

Zusammenfassend erweitert AMIDA das Spektrum der bestehenden Techniken zur Identifizierung diagnostisch und therapeutisch interessanter Tumorantigene. Die allogene AMIDA-Technologie erlaubt nun auch, eine schnelle, sensitive Identifizierung von Tumorantigenen im Rahmen eines breit angelegten Screenings, wofür ausschließlich Blut als Primärmaterial vom Patienten benötigt wird. Die Technologie kann nicht nur bei Tumorerkrankungen, sondern bei allen Krankheiten, die eine veränderte humorale Antwort mit sich bringen, z.B. Autoimmunerkrankungen oder Infektionen mit Pathogenen, Anwendung finden. 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* konnten pathogenspezifische Antigene aus *Borrelia burgdorferi* Lysaten mit Seren der infizierten Mäuse präzipitiert und identifiziert werden. Somit kann AMIDA auch in einem xenogenen Ansatz durchgeführt werden.

## 5.2 Validierung identifizierter Antigene

In der entwickelten und hier zur Identifizierung von TAs des Kopf-Halsbereichs eingesetzten allogenen AMIDA-Technologie werden Zelllinien als Proteinquelle verwendet. Obwohl die Zelllinien aus Karzinomen der entsprechenden Entität generiert wurden (Hypopharynxkarzinom, FaDu und PCI-1-Zelllinie), ist es unerlässlich zu überprüfen, ob die identifizierten Antigene von Karzinomen des Kopf-Halsbereichs auch *in vivo* in einem größeren Patientenkollektiv exprimiert werden.

In den immunhistologischen Untersuchungen wurde eine tumorassoziierte Überexpression von Grb2, e-FABP, Hsp27, Cortactin (siehe 4.2.1, Abbildung 4.6) und hnRNP H (Daten nicht gezeigt) beobachtet. Die aus Zelllinienlysat isolierten und identifizierten Antigene weisen somit eine tumorassoziierte Überexpression *in vivo* auf. Um eine zelluläre oder humorale Immunreaktion auszulösen, müssen Antigene in ausreichenden Mengen exprimiert werden, damit eine Kreuzpräsentation durch professionelle Antigen präsentierende Zellen (APCs) erfolgen kann (Spiotto et al., 2003). Die Beobachtung einer starken Expression im Tumor erklärt somit zum Teil, wieso diese Antigene identifiziert wurden.

Die Literatur liefert weitere Erklärungen für die Identifizierung verschiedener Antigene. Für das Antigen hnRNP H wurde eine tumorassoziierte Überexpression beschrieben (Honore et al., 2004). Als prä-mRNA bindendes Protein (Krecic und Swanson, 1999) verfügt es über mehrere RNA-Bindungsmotive, welche aufgrund ihrer Primärstruktur als stark immunogen bekannt sind (van Venrooij und Pruijn, 1995). Die beobachtete Überexpression eines stark immunogenen Proteins im Tumorgewebe erklärt die Identifizierung von hnRNP H als Antigen im allo-AMIDA-Screen. Drei der identifizierten Proteine wurden bereits zuvor als Antigene identifiziert, die im Rahmen einer Karzinomkrankung eine humorale Antwort auslösen. Anti-Hsp27-Antikörper wurden in Seren von Patienten mit Nierenzellkarzinom und Brustkrebs beobachtet (Conroy et al., 1998; Lichtenfels et al., 2002). Dabei korrelierte das Auftreten solcher Antikörper mit einer verbesserten Überlebensrate bei Brustkrebspatientinnen (Conroy et al., 1998). Im Gegensatz dazu korrelierten anti-Grp78-Antikörper mit einem rascheren Fortschreiten von Prostatakarzinomen und kürzeren Überlebensraten (Mintz et al., 2003). Lagarkova *et al.* identifizierten Cortactin in einem SEREX-Screen von Brustkrebspatientinnen (Lagarkova et al., 2000). In ihren nachfolgenden Untersuchungen konnten sie cortactinspezifische Antikörper auch bei Patienten mit Karzinomen des Kopf-Halsbereichs nachweisen. Die Identifizierung von Antigenen, wie sie mit den derzeit verbreiteten serologischen Techniken (SEREX und PROTEOMEX) identifiziert werden, zeigt, dass die allo-AMIDA-Technologie mindestens ebenbürtig ist. Darüber hinaus konnten im Rahmen des hier durchgeführten Screens humorale Antworten gegen Proteine, für die bereits eine Überexpression in Karzinomen *in vivo* beschrieben wurde (Grb2, e-FABP, eIF3S2), gezeigt werden. So wurde die Überexpression von Grb2 z.B. für Mammakarzinome beschrieben (Verbeek

et al., 1997). Die Überexpression in Metastasen von Kopf-Halskarzinomen könnte Grb2 als einen möglichen Marker für die Detektion und Therapie von MRD-Zellen (*minimal residual disease*) qualifizieren. Ebenso wie für Grb2 wurde eine tumorassoziierte Überexpression von eIF3S2 in hepatozellulären Karzinomen beschrieben (Huang et al., 2004). Bis *dato* war nichts zur Expression von eIF3S2 in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halsbereichs bekannt. Der Vergleich von fünf gesunden Schleimhäuten mit zehn Tumorgewebsproben zeigte, dass die eIF3S2-Expression im Tumorgewebe etwa doppelt so stark wie in der gesunden Schleimhaut war (siehe 4.2.1.2, Abbildung 4.7). EIF3S2 ist eine Untereinheit des eIF3-Komplexes (Asano et al., 1997). Auch für andere Untereinheiten dieses Komplexes wurde eine Überexpression in Tumoren beschrieben (Mayeur und Hershey, 2002; Nupponen et al., 1999), was eine wichtige Rolle des Komplexes in der Karzinogenese vermuten lässt.

Aufgrund der ubiquitären Expression der identifizierten Antigene (EST-Expression Analysis, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) sind sie als Zielstrukturen für Therapien eher ungeeignet. Allerdings kann ihre tumor- und metastasenassoziierte Überexpression als Marker dienen. So wurde im Falle des e-FABP, welches auch als PA-FABP (*psoriasis-associated fatty acid binding protein*) bekannt ist (Zimmerman und Veerkamp, 2002), eine tumorassoziierte Expression für verschiedene Entitäten beschrieben (Ostergaard et al., 1997; Sinha et al., 1999). Weiterhin fördert eine starke e-FABP-Expression die Metastasierung (Adamson et al., 2003). Die immunhistochemische Analyse der e-FABP-Expression bestätigte eine starke Überexpression in Karzinomen des Kopf-Halsbereichs und deren Metastasen im Vergleich zur gesunden Schleimhaut des Kopf-Halsbereichs. Es zeigte sich, dass in 69% aller untersuchten Karzinome und in 100% der untersuchten Metastasen e-FABP stark bis sehr stark exprimiert ist. Alle gesunden Rachenepithelien zeigten hingegen nur eine schwache e-FABP-Expression in der Basalzellschicht (siehe 4.2.1.1, Tabelle 4.2). E-FABP könnte sich daher als Marker zur Detektion von MRD-Zellen oder zum Nachweis von Tumorzellen in Lymphknoten eignen.

E-FABP wurde mit drei von acht getesteten Seren im allogenen AMIDA-Screen isoliert. In einem Bioplex-Test zeigte nur ein Serum von insgesamt 48 Seren gesunder Probanden, jedoch zwölf Seren von insgesamt 59 Seren der Karzinompatienten eine e-FABP Reaktivität (siehe 4.2.2). Die erhöhte Frequenz von e-FABP-Serumreaktivitäten in der Gruppe von Karzinompatienten bestätigt die Validität der allogenen AMIDA-

Technologie. Da jedoch ein Biomarker bei 95%iger Spezifität eine Sensitivität von mindestens 50% aufweisen sollte (Gion und Daidone, 2004), ist die Serumreaktivität gegen e-FABP alleine nicht ausreichend sensitiv (20%), um als singulärer Biomarker zur Differenzierung zwischen gesunden Probanden und Patienten mit Karzinomen im Kopf-Halsbereich verwendet zu werden.

### **5.3 Die humorale Antwort gegen Tumorantigene als Biomarker**

Wie in dieser Arbeit bereits für e-FABP gezeigt, wurde auch eine erhöhte Serumreaktivität gegen das Tumorantigen Zytokeratin 8 (CK8), das mit der autologen AMIDA-Technologie identifiziert wurde, beobachtet. In ersten Experimenten wurde gezeigt, dass anhand der CK8-Serumreaktivität mit 37%iger Sensitivität bei 95%iger Spezifität Seren von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des oberen Kopf-Halsbereichs (n=60) von Seren gesunder Probanden (n=67) unterschieden werden können (Gires et al., 2004). Die Serumreaktivität als Maß für die humorale Antwort gegen das AMIDA-Antigen CK8 wurde deshalb an einem großen Patientenkollektiv getestet (749 Seren von gesunden Probanden und Patienten mit Karzinomen oder benignen Erkrankungen verschiedener Lokalisation).

Erkrankte Personen zeigten öfters CK8-Serumreaktivität als gesunde Spender. Patienten mit benignen Erkrankungen zeigten dreimal und Patienten mit Karzinomen doppelt so oft CK8-Serumreaktivität im Vergleich zu gesunden Spendern. Obwohl CK8 in verschiedenen Geweben gesunder Personen exprimiert wird, wurde keine Immunreaktion erwartet, da die notwendige proinflammatorische Mikroumgebung für die Reifung von APCs in diesen Geweben fehlt (Spiotto et al., 2003). Dass die CK8-Serumreaktivität die Inflammation im erkrankten Gewebe benötigt, erklärt auch die höhere CK8-Serumreaktivität bei Patienten mit benignen Erkrankungen im Vergleich zu Karzinompatienten; denn aktuelle Berichte deuten darauf hin, dass Inflammation nur in der Initiationsphase der Karzinogenese, nicht aber in der klinischen Manifestationsphase etablierter Karzinome förderlich ist (Pikarsky et al., 2004). Vielmehr können etablierte Tumore verschiedene Strategien entwickeln, um dem Immunsystem zu entgehen, einschließlich der Veränderung ihrer Mikroumgebung hin zu immunsuppressiven Bedingungen (Campoli et al., 2005). Dies ist von benignen Erkrankungen, wie sie in dieser Studie enthalten sind, nicht bekannt.

Der beobachtete Einfluss der Lokalisation der Erkrankung auf die CK8-Serumreaktivität war weithin unabhängig von der Art der Erkrankung (benigne Erkrankung oder Karzinom). Im Fall der bronchial lokalisierten Erkrankungen korrelierte die Zunahme der CK8-Serumreaktivität in Karzinompatienten mit der in der Literatur beschriebenen Zunahme des CK8-Expressionsniveaus. Verschiedene Gruppen beschrieben eine schwache CK8-Expression in gesundem Lungengewebe und eine CK8-Überexpression im Tumorgewebe sowie die Detektion von CK8 im Serum von Patienten mit Lungenkarzinomen (Bergqvist et al., 1999; Gharib et al., 2002). Dies zeigt, dass die CK8-Serumreaktivität von der Lokalisation und der damit verbundenen CK8-Expression im erkrankten Gewebe abhängt, da eine ausreichend starke Expression Voraussetzung für die Ausbildung einer Immunantwort ist (Spiotto et al., 2002). Antikörper gegen p53 wurden in Seren von Krebspatienten beobachtet und ihr Auftreten konnte in verschiedenen Studien bestätigt werden (Crawford et al., 1982). In einem Fall wurden anti-p53-Antikörper einige Monate vor der klinischen Manifestation des Karzinoms und eine Abnahme im Verlauf der Krankheit beobachtet (Lubin et al., 1995). Dies deutet darauf hin, dass die Ausbildung der humoralen Antwort gegen TAs ein frühes Ereignis in der Karzinogenese ist. Auch wenn CK8-Serumreaktivität bei Patienten in frühen Stadien von Tumorerkrankungen (T1) beobachtet wurde, konnte dennoch keine Korrelation zwischen dem Tumorstadium (entsprechend der TNM-Klassifikation) und der CK8-Serumreaktivität beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Derzeit ist eine Vielzahl potentieller Biomarker in der Literatur beschrieben. Diese in die klinische Anwendung zu überführen, bringt hohe Anforderungen mit sich, und ist eine der großen Herausforderungen (Etzioni et al., 2003). Pepe *et al.* haben dabei die Entwicklung in fünf Phasen unterteilt (siehe 1.2.3). Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die ersten drei Phasen, die Identifizierung potentieller Biomarker, die Entwicklung eines Tests zum Screenen großer Probenmengen und die Evaluierung an eingelagerten Proben, bearbeitet. Mittels der AMIDA-Technologie wurden sowohl im autologen als auch im allogenen Verfahren TAs identifiziert und validiert. Als Test wurde das Screening-Verfahren im Bioplex-Gerät zur Untersuchung auf Serumreaktivitäten gegen TAs entwickelt. Dieser Test wurde genutzt, um die CK8-Serumreaktivität an eingelagerten Proben als Biomarker zu evaluieren. CK8-Serumreaktivität wurde nicht ausschließlich bei Patienten mit Karzinomen, sondern auch bei Patienten mit benignen Erkrankungen nachgewiesen. CK8-Serumreaktivität

zeigte bei 95% Spezifität eine Sensitivität von 37% für Seren von Patienten mit Karzinomen des Kopf-Halsbereichs im Vergleich zu gesunden Spendern (Gires et al., 2004). Eine vergleichbare Sensitivität wurde auch für Zervixkarzinome festgestellt (35%). Ebenso zeigten Karzinome anderer Lokalisation (Blase, Leber, Kolon und Lunge) und benigne Erkrankungen eine deutlich erhöhte CK8-Serumreaktivität im Vergleich zu gesunden Kontrollen. CK8-Serumreaktivität ist also nicht auf Patienten mit Karzinomen des Kopf-Halsbereichs begrenzt. Die maximal beobachtete Sensitivität mit 35% ist alleine nicht ausreichend, um als Marker in der klinischen Anwendung von Interesse zu sein. Auch sollte ein guter Biomarker zwischen benignen und malignen Erkrankungen unterscheiden können, jedoch wurde CK8-Serumreaktivität auch bei benignen Erkrankungen gefunden.

Der Vorteil des im Bioplex-Verfahren etablierten Tests besteht in der Möglichkeit, Serumreaktivitäten gegen mehrere Antigene gleichzeitig in einem Multiplexansatz zu bestimmen. Durch die Messung mehrerer Serumreaktivitäten und der Erstellung eines Serumreaktivitätsprofils könnte eine Verbesserung der Sensitivität bei gleicher Spezifität erzielt werden. Einen solchen Test zu entwickeln, ist Bestandteil derzeitiger Arbeiten in unserem Labor. Da hierfür viele verschiedene hochreine Proteine in großen Mengen erforderlich sind, von denen die wenigsten kommerziell zur Verfügung stehen, ist dies ein langfristiges Projekt, das im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht abgeschlossen werden konnte.

#### **5.4 Charakterisierung des Tumorantigens eIF3S2**

Viele Tumorantigene sind Proteine, die tumorzellspezifisch oder in Tumorzellen überexprimiert sind. Daher liegt es nahe, einen Zusammenhang zwischen tumor-assoziiertes Expression und den molekularen Ursachen für die Entartung der Zelle zu vermuten. Das bekannteste hier anzuführende Beispiel ist p53, welches eine humorale Antwort in Tumorpatienten hervorruft und zudem eine hervorragend dokumentierte Rolle in der Karzinogenese spielt (siehe 4.4 und 1.3). Daher war es von Interesse, die im allo-AMIDA-Screen identifizierten Tumorantigene hinsichtlich ihres möglichen Beitrags zur Tumorentwicklung zu untersuchen. Hierfür wurde eIF3S2 ausgewählt. Die Expressionsanalyse des eukaryotischen Initiationsfaktors 3 Subuntereinheit 2 (eIF3S2, auch eIF3i und eIF3p36 genannt) zeigte eine signifikante Überexpression in Tumoren

der oberen Atemwege (siehe 4.2.1.2). Die Überexpression anderer Untereinheiten des eIF3-Komplexes, z.B. eIF3a, -b, -c, -e, und h und eIF3S10, wurde bereits für verschiedene Karzinome beschrieben (Mamma-, Lungen- Zervix- Oesophagus- Prostatakarzinom und Hodenkrebs (Rajasekhar und Holland, 2004). Ferner wurde während der Untersuchungen für diese Doktorarbeit die Überexpression des eIF3S2 bei hepatozellulären Karzinomen beschrieben (Huang et al., 2004).

EIF3S2 ist ein 36 kDa großes Protein, das über fünf WD40-Domänen verfügt (Abbildung 4.14). WD40 sind Strukturdomänen, welche Protein-Proteininteraktion erlauben. Ferner ist eIF3S2 an Serin- und Threonin-, nicht aber an Tyrosinresten phosphoryliert (Chen et al., 1995). EIF3S2 ist eine von mindestens zwölf Untereinheiten des eIF3-Komplexes (Mayeur et al., 2003). Dieser Komplex spielt eine zentrale Rolle in der Initiation der Proteintranslation, dem am stärksten regulierten Schritt dieses Prozesses. Neben der Elongation und Termination der Translation kommt der Initiation daher eine besondere Bedeutung für die gesamte Regulation der Proteintranslation zu. Der Initiationsprozess der Proteintranslation wird von eukaryotischen Initiationsfaktoren (eIF) gestaltet. Zuerst kommt es zur Bildung eines 43S Prä-Initiationskomplexes aus der kleinen Untereinheit des Ribosoms (40S), der Methionyl-tRNA und den Initiationsfaktoren 1, 2 und 3. Dieser Komplex bindet einen zweiten Komplex, bestehend aus eIF4 und der zu translatierenden mRNA. Die Bindung wird vom eIF3-Komplex des Prä-Initiationskomplexes und eIF4 vermittelt und hat die Wechselwirkung der mRNA mit der kleinen Untereinheit des Ribosoms zur Folge. Die Initiationsfaktoren verlassen den Komplex und die große Untereinheit des Ribosoms (60S) bindet den Komplex aus mRNA und kleiner Untereinheit, wodurch der 80S-Initiationskomplex gebildet wird (Gebauer und Hentze, 2004).

#### **5.4.1 Einfluss des eIF3S2 auf den Metabolismus, die Zellgröße und die Proliferation**

Ein Merkmal transformierter Zellen ist ihre Fähigkeit, uneingeschränkt zu wachsen und zu proliferieren (siehe 1.3). Die Grundlagen dieser Eigenschaften sind Metabolismus und Proliferation. Deshalb wurden diese in Abhängigkeit der eIF3S2-Expression untersucht.

Mittels siRNA wurde die eIF3S2-Expression reprimiert. In einer Kinetik über drei Tage zeigte sich, dass die mRNA-Expression nach einem Tag am stärksten reprimiert war

und anschließend wieder zunahm. Auf Proteinebene hingegen dauerte es ca. zwei Tage, bevor eine Repression zu beobachten war. Dies deutet auf eine Halbwertszeit des Proteins von mehr als 24h hin.

Die siRNA vermittelte eIF3S2-Repression bewirkte einen geringeren Metabolismus und auch eine geringere Proliferation im Vergleich zu Zellen, welche mit Kontroll-siRNA behandelt wurden (siehe 4.4.2). Dies weist auf eine essentielle Rolle im Metabolismus und der Proliferation der Zelle hin. Der Einfluss von eIF3S2 war sowohl in einer Hyphopharynxkarzinom- (PCI-1) als auch in einer Zervixkarzinomzelllinie (HeLa) zu beobachten (siehe 4.4.2). Dasselbe galt für die viral transformierte Nierenzelllinie HEK293 (Daten nicht gezeigt). Eine eIF3S2-Expression konnte in allen humanen Zelllinien festgestellt werden. Der eIF3S2 vermittelte Einfluss auf Metabolismus und Proliferation ist daher offensichtlich ein allgemeines Phänomen und nicht abhängig von der Art der Zelllinie. Der Einfluss der eIF3S2-Repression auf die Zellgröße wurde in HeLa- und HEK293-Zellen beobachtet. Durch eine eIF3S2-Repression nahm die Zellgröße ab (siehe 4.4.3). Damit sich Zellen teilen können, müssen sie verschiedene kritische Restriktionspunkte im Zellzyklus überwinden. In diesem Zusammenhang ist die Zellgröße ein wichtiger Parameter (Stocker und Hafn, 2000). Eine Zelle kann sich nur dann teilen, wenn eine kritische Zellmasse und damit verbundene Zellgröße überschritten wurde. Die beobachtete Abnahme der Zellgröße nach eIF3S2-Repression kann somit die ebenfalls beobachtete Proliferationsabnahme erklären. Zellwachstum benötigt den Aufbau von energiereichen makromolekularen Verbindungen, wie z.B. Proteinen. Dazu ist ein aktiver Metabolismus erforderlich. Die beobachteten Veränderungen des Metabolismus, der Proliferation und der Zellgröße stehen im Einklang miteinander und bedingen sich gegenseitig.

*In vivo* wurde die Überexpression von eIF3S2 für Karzinome verschiedener Entitäten beschrieben. Daher wurde für das Studium der molekularbiologischen Effekte der eIF3S2-Überexpression in epithelialen Zellen ein *In-vitro*-System etabliert, welches die *in vivo* beobachtete Überexpression imitiert. Eine *In-vitro*-Überexpression von eIF3S2 führt zu einem verstärkten Metabolismus und einer Zunahme der Proliferation (siehe 4.4.6). Der Einfluss auf den Metabolismus und die Proliferation wurde von beiden Seiten dargestellt und beleuchtet, wobei sich die Ergebnisse der Repression und der Überexpression gegenseitig bestätigten.

EIF3S2 könnte mit seinen WD40 Protein-Protein-Interaktionsdomänen als Plattform zur Bildung des eIF3-Komplexes dienen. Diese zentrale Rolle lassen Experimente in Hefe vermuten. Die Deletion von TIF34, dem Hefehomolog des humanen eIF3S2, führt zum Abbau der übrigen Bestandteile des Komplexes (Naranda et al., 1997). Im Umkehrschluss könnte durch eine eIF3S2-Überexpression der gesamte Komplex stabilisiert und so seine Aktivität verstärkt werden. Größere Mengen an aktivem eIF3-Komplex in der Zelle würden zu einer erhöhten Proteintranslation führen, sofern andere, die Translation beeinflussende Faktoren nicht limitierend wirken. Eine gesteigerte Proteintranslation erlaubt auch eine schnellere Zunahme der Zellgröße, wie sie beobachtet wurde (siehe 4.4.8). Entsprechend hat eine geringere Proteinsynthese kleinere Zellen zur Folge, so wie es für die eIF3S2-Repression beobachtet wurde.

Im Kontext der Karzinogenese betrachtet, ist eine verstärkte Proteinsynthese vorteilhaft für transformierte Zellen, weil sie dadurch einen Wachstumsvorteil erfahren. Dieser würde eIF3S2 überexprimierenden Zellen einen Selektionsvorteil in der Entwicklung des Tumors geben, die sich nach der Darwinschen Evolutionstheorie verhält (Nowell, 1976). Die *in vitro* analysierten Effekte auf Metabolismus, Zellgröße und Proliferation lassen vermuten, dass die *in vivo* beobachtete Überexpression von eIF3S2 in Karzinomen des Kopf-Halsbereichs dem Tumor einen Wachstumsvorteil verschafft. Ein weiteres klassisches Merkmal transformierter Zellen ist die Unabhängigkeit von Wachstumssignalen (siehe 1.3). EIF3S2-Überexpression hat in NIH3T3 Fibroblasten keinen Einfluss auf die Abhängigkeit von FKS (siehe 4.4.7). Die Zellen benötigen weiterhin FKS zum Wachstum und zur Proliferation. Die Überexpression von eIF3S2 selbst erlaubt es also nicht, wachstumsinhibitorische Signale aufgrund des Serummangels zu überkommen. Allerdings konnte nach Zugabe des FKS ein verstärktes Wachstum der eIF3S2-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu Kontrolltransfektanten beobachtet werden. Die eIF3S2-Überexpression erleichtert die Integration der durch die FKS-Zugabe gegebenen Wachstumssignale. Nur wenn ausreichend Zellmasse erzeugt wurde, kann die Zelle den Restriktionspunkt überschreiten und in die S-Phase des Zellzyklus eintreten (Polymenis und Schmidt, 1999). Es konnte beobachtet werden, dass eIF3S2-überexprimierende Zellen schneller aus der G1/G0-Phase in die S- und G2-Phase übergehen. Sie waren schneller in der Lage, die erforderliche Masse durch Proteinsynthese in der G1-Phase, in der sie durch den Serummangel arretiert waren, zu generieren.

Im Gegensatz zur derzeitigen Beschreibung von eIF3S2 als Bestandteil des eukaryotischen Initiationsfaktors 3 isolierte die Gruppe um Derynck dieses Protein 1995 in einer Co-Immunopräzipitation als das Typ II TGF $\beta$ -Rezeptor interagierende Protein 1 (TRIP-1, (Chen et al., 1995). Dies konnte in konfokalen fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zur zellulären Lokalisation des eIF3S2 nicht untermauert werden. EIF3S2 lokalisierte in Typ II TGF $\beta$ -Rezeptor positiven Zellen nicht an der Membran, wie von einem Interaktionspartner des Typ II TGF $\beta$ -Rezeptors angenommen werden kann. Aufgrund der WD40 Protein-Protein Interaktionsdomänen kann die Identifizierung in einer Co-Immunopräzipitation mit Typ II TGF $\beta$ -Rezeptor auch ein experimentelles Artefakt gewesen sein. In einer zweiten Publikation konnte die Gruppe den Einfluss der eIF3S2-Expression auf TGF $\beta$  vermittelte Effekte, wie die Regulation von PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*), zeigen. Jedoch musste sie feststellen, dass die von ihnen beobachteten Effekte eine Interaktion von eIF3S2 und Typ II TGF $\beta$ -Rezeptor nicht belegen. Vielmehr räumten sie ein, dass es sich auch um additive Effekte, also Typ II TGF $\beta$ -Rezeptor unabhängig vermittelte Effekte des eIF3S2, handeln kann (Choy und Derynck, 1998).

#### **5.4.2 EIF3S2-Überexpression erlaubt adhäsionsunabhängiges Wachstum**

Neben unkontrolliertem Wachstum ist die Fähigkeit, Metastasen zu bilden, eine charakteristische Eigenschaft vieler Karzinome im fortgeschrittenen Stadium (Chambers et al., 2002). Disseminierende Tumorzellen müssen, um vom Primärtumor an eine andere Stelle des Körpers, z.B. den Lymphknoten, zu gelangen, in der Lage sein, frei in der Lymphe oder dem Blut zu zirkulieren und dabei zu überleben. Jedoch gehen bei Verlust der Adhärenz nichttransformierter Zellen, wie z.B. Fibroblasten, in Apoptose (Assoian, 1997). Dieser Prozess der Anoikis dient dem humanen Organismus als Schutz, um zu verhindern, dass Zellen, die sich aus ihrem Ursprungsgewebe gelöst haben, in andere Gewebe gelangen (Frisch und Screaton, 2001). Transformierte Zellen haben Mechanismen entwickelt, die Anoikis zu überkommen, *i.e.* sie sind in der Lage, ohne Adhärenz in Suspension zu wachsen (Wang, 2004).

In adhärent wachsenden Zellen haben Integrin-ECM-Signale durch einen komplizierten *cross-talk* mit Wachstumsrezeptorsignalen Einfluss auf das Zellwachstum (Carraway und Carraway, 1995; Dedhar et al., 1999; Zhang et al., 1996). Dabei läuft ein zentraler

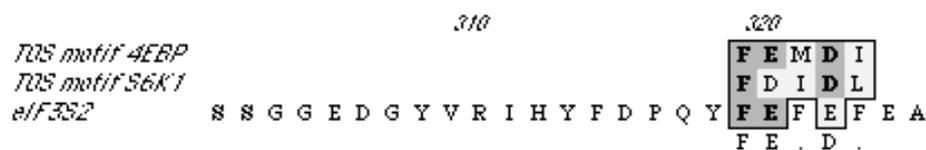
Signalweg über die Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), deren Deregulation auch eine wichtige Rolle in vielen Karzinomen spielt (Bader et al., 2005). Aktivierte PI3K phosphoryliert Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat, so dass Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP3) entsteht (Fruman et al., 1998). PIP3 aktiviert verschiedene Kinasen, u.a. Akt und PDK1 (*3-phosphoinositide-dependent kinase 1*, (Cantley, 2002). Akt aktiviert neben anderen Proteinen die Kinasen IKK  $\alpha$  und mTOR (*mammalian target of rapamycin*), die ihrerseits Wachstums- und Proliferation fördern (Bader und Vogt, 2004). Die Interaktion von extrazellulärer Matrix (ECM) und Integrinen der Zelle ist bei adhärenzunabhängigem Wachstum nicht mehr erforderlich. *In-vitro*-Versuche zeigten die Fähigkeit von NIH3T3 Fibroblasten zur Koloniebildung in Suspension in Abhängigkeit der eIF3S2-Überexpression. HeLa-Zellen, deren Wildtyp-Zellen Kolonien bilden, waren nach siRNA vermittelter Repression von eIF3S2 dazu nicht mehr in der Lage.

Die beobachtete Koloniebildung von eIF3S2 überexprimierenden Transfektanten war LY294002- und Rapamycinsensitiv. Bei diesen beiden niedermolekularen Verbindungen handelt es sich um Kinaseinhibitoren der PI3K bzw. mTOR. Beide Kinasen integrieren Wachstumssignale in die Proteintranslation und den Zellzyklus (Stocker und Hafan, 2000). Interessanterweise wurde eine LY294002-Abhängigkeit der Koloniebildung für Zellen, welche mit onkogenen Formen des Insulinrezeptors oder IGF1R (*insulin-like growth factor-1 receptor*) transformiert wurden, beobachtet (Nguyen et al., 2000). Diese Rezeptoren regulieren die Translation und fördern, wie auch eIF3S2, das Zellwachstum. Die Überexpression von eIF3S2 führt nicht zu einer generellen Unabhängigkeit von mTOR (Rapamycin-sensitiv) und PI3K (LY294002-sensitiv) vermittelten Wachstumssignalen, wie es für andere Onkogene wie Src, Jun, Yes, Sa, Abl, Mos, Fos oder Myc beschrieben wurde (Aoki et al., 1998). Vielmehr werden eIF3S2-Effekte durch mTOR und PI3K reguliert.

### 5.4.3 Regulation von eIF3S2 durch mTOR

Die Kinaseinhibitoren Rapamycin und LY294002 senken die Koloniebildung von eIF3S2-überexprimierenden NIH3T3-Zellen. Ob dies ein unspezifischer Effekt ist, oder ob eIF3S2 in den Signalweg flussabwärts von PI3K und mTOR eingebunden ist, wurde untersucht, indem die Phosphorylierung von eIF3S2 in Abhängigkeit von Rapamycin bestimmt wurde. Rapamycin führte zu einer 50%igen Abnahme der eIF3S2-

Phosphorylierung, verglichen mit der Phosphorylierung in Kontrollzellen. Dies deutet darauf hin, dass eIF3S2 ein Substrat von mTOR oder einer mTOR-regulierten Kinase, wie der S6Kinase, ist. Substrate von mTOR weisen im N- oder C-Terminus ein gemeinsames Motiv in ihrer Primärstruktur, das TOS Motiv (*mTOR signaling motif*), auf (Nojima et al., 2003; Schalm und Blenis, 2002). Dieses Motiv ist für die Bindung der Proteine an Raptor unerlässlich. Raptor bindet seinerseits mTOR und führt der Kinase so ihre Substrate zu. Im Sequenzvergleich mit den TOS-Motiven der beschriebenen mTOR-Substrate S6Kinase 1 und 4EBP zeigt EIF3S2 im C-Terminus eine homologe Primärstruktur (Abbildung 5.1). Es ist daher vorstellbar, dass eIF3S2 über dieses Motiv an Raptor bindet und nachfolgend von mTOR phosphoryliert wird. Gegenstand derzeitiger Arbeiten in unserem Labor ist es, diese Hypothese mit einer C-terminalen Deletionsmutante des potentiellen TOS-Motivs zu überprüfen.



**Abbildung 5.1 Sequenzvergleich des eIF3S2 C-Terminus mit TOS Motiven der mTOR Substrate S6Kinase 1 und 4EBP.** S6Kinase 1 (S6K1) und das eukaryotische Initiationsfaktor 4 interagierende Protein (4EBP) binden über ein gemeinsames TOS Motiv (Schalm und Blenis, 2002) in ihrem C- bzw. N-Terminus an den mTOR/Raptor Komplex und werden von der Kinase mTOR phosphoryliert. EIF3S2 weist eine homologe Sequenz im C-Terminus auf.

Ein weiteres Indiz dafür, dass eIF3S2 ein Substrat von mTOR ist, ergibt sich aus der beobachteten Abnahme der Zellgröße durch die Repression von eIF3S2. Denn auch die Repression von mTOR oder Raptor durch spezifische siRNAs oder aber der bekannten mTOR/Raptor Substrate S6Kinase 1 und SKAR führen zu einer Abnahme der Zellgröße (Kim et al., 2002; Richardson et al., 2004).

Kürzlich wurde eine direkte Interaktion von mTOR/Raptor und der S6Kinase 1 mit dem eIF3-Komplex berichtet. Dabei wurde gezeigt, dass mTOR/Raptor und S6Kinase 1 in einer signalabhängigen und koordinierten Weise den eIF3-Komplex binden und verlassen. S6Kinase 1 bindet im inaktiven Zustand an den eIF3-Komplex. mTOR/Raptor bindet nach Aktivierung an eIF3 und phosphoryliert die S6Kinase 1,

welche daraufhin aktiviert den eIF3-Komplex verlässt. Der eIF3-Komplex bildet somit ein Gerüst, um eine effiziente Proteinsynthese durch koordinierte und dynamische Regulationsereignisse zu fördern (Holz et al., 2005). Die direkte Interaktion des eIF3-Komplexes mit dem mTOR/Raptor stärkt die Hypothese einer Phosphorylierung von eIF3S2 durch mTOR/Raptor.

#### **5.4.4 Deregulation der Translation – Quantität versus Qualität**

Der molekulare Prozess der mRNA-Translationskontrolle und der Ribosomenbiogenese in eukaryotischen Zellen ist komplex und mehrschichtig reguliert (Gebauer und Hentze, 2004). Eine Deregulation kann prinzipiell auf vielen Ebenen stattfinden und zur Krebsentstehung beitragen. Vermehrt werden neue molekulare Verbindungen zwischen tumorsuppressiven und onkogenen Regulationswegen mit der Proteinsynthesemaschinerie entdeckt (Übersichtsartikel der Sonderausgabe „*mRNA Translational Control in Cancer Pathogenesis*“, *Oncogene* Vol. 23, 2004). Die Rolle der Deregulation von Proteinsynthese in der Karzinogenese wird dabei durch die Entdeckung der antikanzerogenen Wirkung von Rapamycin unterstrichen, welches bekanntermaßen regulatorische Signalwege der Proteinsynthese moduliert (Pandolfi, 2004). Die derzeitige Diskussion, wie aberrante Proteintranslation zum Transformationsprozess der Zelle beiträgt, kann unter der Überschrift „Quantität versus Qualität“ zusammengefasst werden. Zum einen kann die mRNA-Translation insgesamt angehoben werden und damit die Proteinsynthese global gefördert werden. Die damit verbundene Zunahme der Zellgröße führt bei defekten Kontrollpunkten zu exzessiver Zellteilung (Quantität). Andererseits könnte eine veränderte Ribosomenbiogenese und Translationskontrolle die Translation spezifischer mRNAs betreffen, welche für den Transformationsprozess wichtige Proteine kodieren (Qualität). Beide Möglichkeiten schließen sich nicht zwangsläufig aus, sondern können kooperativ zum Transformationsprozess beitragen (Pandolfi, 2004).

Muise-Helmericks *et al.* (1998) konnten zeigen, dass PI3K Rapamycin-sensitiv die Translation der Cyclin D mRNA fördert. Cyclin-D-Überexpression führt zu einem schnelleren Eintritt in die S-Phase. Dieser Vorgang konnte für eIF3S2 überexprimierende Zellen nach Serumangel ebenfalls beobachtet werden. Daher wurden erste Experimente durchgeführt, um zu untersuchen, ob die Überexpression des eIF3S2 auch zur veränderten Translation spezifischer mRNAs führt. Dazu wurden eIF3S2 überexprimierende Zellen mit Kontrollzellen in der 2D-Gelelektrophorese

verglichen. Dabei wurde die Regulation von insgesamt 16 Proteinen festgestellt. Es ist somit möglich, dass eIF3S2-Überexpression auch selektiv die Translationskontrolle einzelner mRNAs beeinflusst. Die massenspektroskopische Bestimmung der regulierten Proteine und anschließende Untersuchungen zur Translationsrate ihrer mRNAs in Abhängigkeit der eIF3S2-Expression sind derzeitige Arbeiten, die diese Frage klären sollen.

## 6 Zusammenfassung

Maligne Erkrankungen sind die zweithäufigste Todesursache in den industrialisierten Nationen. Auch nach jahrelanger Forschungsarbeit ist ein Heilungserfolg für die meisten Tumorarten noch nicht in Sicht. Tumorantigene erlangen hier eine immer wichtigere Bedeutung. Ihre tumorspezifische oder -assoziierte Expression macht sie zu möglichen molekularen Markern, die zur frühen und verbesserten Detektion und zum gezielten Bekämpfen von Tumorzellen genutzt werden können.

In dieser Arbeit wurde eine Technik entwickelt, die die Identifikation von Tumorantigenen, aber auch von Antigenen anderer Erkrankungen, ermöglicht. Diese Technik beruht auf der allogenen Immunpräzipitation von Tumorantigenen aus Zelllinienlysaten mit Serumantikörpern von Patienten und einer anschließenden Analyse in der 2D-Gelelektrophorese. Der Vorteil der allogenen AMIDA-Technologie (*autoantibody mediated identification of Antigens*) gegenüber anderen serologischen Techniken wie SEREX oder PROTOMEX liegt in der Möglichkeit, schnell und sensitiv Tumorantigene, basierend auf der gegen sie gerichteten humoralen Antwort im Patienten, aus dem Gesamtproteom einer Tumorzelllinie zu isolieren. Da nur Blut als Primärmaterial vom Patienten benötigt wird, ist ihre Anwendung besonders einfach in den klinischen Alltag zu integrieren. Mit Hilfe der allogenen AMIDA-Technik wurden Tumorantigene von Kopf-Halskarzinomen identifiziert und die tumorspezifische Überexpression im Primärtumor und in Lymphknotenmetastasen für verschiedene Antigene *in vivo* gezeigt. Weiterhin konnte für ein identifiziertes Antigen (e-FABP) eine humorale Antwort bei 20% eines größeren Kollektives von Patienten mit Kopf-Halskarzinomen nachgewiesen werden. Für einige der identifizierten Antigene war bereits eine humorale Antwort beschrieben (Hsp27, Grb78, Cortactin). Zusammen belegt dies die Validität der entwickelten allogenen AMIDA-Technologie.

Die humorale Immunantwort gegen das Tumorantigen Zytokeratin 8 wurde im Rahmen einer groß angelegten Studie untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine

humorale Antwort gegen das Tumorantigen von seiner Expression im erkrankten Gewebe, weniger von der Art der Erkrankung (benigne oder maligne) abhängt. Die humorale Antwort alleine war nicht ausreichend tumorspezifisch und ferner mit maximal 35% positiven Patienten auch nicht sensitiv genug, um als singulärer klinischer Biomarker von Interesse zu sein. Ein Multiplexsystem zur Aufnahme eines Profils der humoralen Antwort gegen mehrere AMIDA-Tumorantigene könnte zukünftig erlauben, die humorale Antwort gegen Tumorantigene als klinischen Marker nutzbar zu machen.

Die Charakterisierung des identifizierten und *in vivo* im Tumor überexprimierten Antigens eIF3S2 zeigte, dass die verstärkte Bildung *in vitro* einen erhöhten Metabolismus, Proliferation und ein adhärenzunabhängiges Wachstum bewirkt. Das adhärenzunabhängige Wachstum war sensitiv für die PI3K- und mTOR-Kinaseinhibitoren LY294002 bzw. Rapamycin. Genau wie die Repression der Kinase mTOR oder ihrer Substrate S6Kinase 1 und SKAR, führte die Repression von eIF3S2 zu einer Abnahme der Zellgröße. Ferner konnte gezeigt werden, dass eIF3S2 durch eine Rapamycin sensitive Kinase phosphoryliert wird. Folglich wird eIF3S2 durch mTOR oder eine nachgeschaltete Kinase reguliert. Die tumorassoziierte eIF3S2 Überexpression konnte in den PI3K/Akt-mTOR-Signalweg, dessen aberrante Regulation in Tumoren zu einer veränderten Translationskontrolle führt, und einen wichtigen Beitrag zur Karzinogenese darstellt, eingeordnet werden.

# Literaturverzeichnis

- Adams, G.P. and Weiner, L.M. (2005) Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol*, **23**, 1147-1157.
- Adamson, J., Morgan, E.A., Beesley, C., Mei, Y., Foster, C.S., Fujii, H., Rudland, P.S., Smith, P.H. and Ke, Y. (2003) High-level expression of cutaneous fatty acid-binding protein in prostatic carcinomas and its effect on tumorigenicity. *Oncogene*, **22**, 2739-2749.
- Aoki, M., Batista, O., Bellacosa, A., Tsichlis, P. and Vogt, P.K. (1998) The akt kinase: molecular determinants of oncogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 14950-14955.
- Asano, K., Kinzy, T.G., Merrick, W.C. and Hershey, J.W. (1997) Conservation and diversity of eukaryotic translation initiation factor eIF3. *J Biol Chem*, **272**, 1101-1109.
- Assoian, R.K. (1997) Anchorage-dependent cell cycle progression. *J Cell Biol*, **136**, 1-4.
- Assoian, R.K., Boardman, L.A. and Drosinos, S. (1989) A preparative suspension culture system permitting quantitation of anchorage-independent growth by direct radiolabeling of cellular DNA. *Anal Biochem*, **177**, 95-99.
- Bader, A.G., Kang, S., Zhao, L. and Vogt, P.K. (2005) Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer*, **5**, 921-929.
- Bader, A.G. and Vogt, P.K. (2004) An essential role for protein synthesis in oncogenic cellular transformation. *Oncogene*, **23**, 3145-3150.
- 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.
- Bergqvist, M., Brattstrom, D., Hesselius, P., Wiklund, B., Silen, A., Wagenius, G. and Brodin, O. (1999) Cytokeratin 8 and 18 fragments measured in serum and their relation to survival in patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer Res*, **19**, 1833-1836.
- 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.
- Black, P.H., Rowe, W.P., Turner, H.C. and Huebner, R.J. (1963) A Specific Complement-Fixing Antigen Present in Sv40 Tumor and Transformed Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **50**, 1148-1156.

- Boutayeb, A. and Boutayeb, S. (2005) The burden of non communicable diseases in developing countries. *Int J Equity Health*, **4**, 2.
- Brennan, J.A., Mao, L., Hruban, R.H., Boyle, J.O., Eby, Y.J., Koch, W.M., Goodman, S.N. and Sidransky, D. (1995) Molecular assessment of histopathological staging in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*, **332**, 429-435.
- Brichard, V., Van Pel, A., Wolfel, T., Wolfel, C., De Plaen, E., Lethe, B., Coulie, P. and Boon, T. (1993) The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med*, **178**, 489-495.
- Brichory, F.M., Misek, D.E., Yim, A.M., Krause, M.C., Giordano, T.J., Beer, D.G. and 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.
- Burnet, M. (1957) Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications. *Br Med J*, 841-847.
- Campoli, M., Ferrone, S., Zea, A.H., Rodriguez, P.C. and Ochoa, A.C. (2005) Mechanisms of tumor evasion. *Cancer Treat Res*, **123**, 61-88.
- Cantley, L.C. (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, **296**, 1655-1657.
- Carraway, K.L. and Carraway, C.A. (1995) Signaling, mitogenesis and the cytoskeleton: where the action is. *Bioessays*, **17**, 171-175.
- Chambers, A.F., Groom, A.C. and MacDonald, I.C. (2002) Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*, **2**, 563-572.
- Chen, R.H., Miettinen, P.J., Maruoka, E.M., Choy, L. and Derynck, R. (1995) A WD-domain protein that is associated with and phosphorylated by the type II TGF-beta receptor. *Nature*, **377**, 548-552.
- 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.
- Choy, L. and Derynck, R. (1998) The type II transforming growth factor (TGF)-beta receptor-interacting protein TRIP-1 acts as a modulator of the TGF-beta response. *J Biol Chem*, **273**, 31455-31462.
- Conroy, S.E., Sasieni, P.D., Amin, V., Wang, D.Y., Smith, P., Fentiman, I.S. and Latchman, D.S. (1998) Antibodies to heat-shock protein 27 are associated with improved survival in patients with breast cancer. *Br J Cancer*, **77**, 1875-1879.
- Cornelison, T.L. (2000) Human papillomavirus genotype 16 vaccines for cervical cancer prophylaxis and treatment. *Curr Opin Oncol*, **12**, 466-473.
- Coussens, L.M. and Werb, Z. (2002) Inflammation and cancer. *Nature*, **420**, 860-867.
- Crawford, L.V., Pim, D.C. and Bulbrook, R.D. (1982) Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer. *Int J Cancer*, **30**, 403-408.

- Dedhar, S., Williams, B. and Hannigan, G. (1999) Integrin-linked kinase (ILK): a regulator of integrin and growth-factor signalling. *Trends Cell Biol*, **9**, 319-323.
- DeLeo, A.B., Jay, G., Appella, E., Dubois, G.C., Law, L.W. and Old, L.J. (1979) Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 2420-2424.
- Dighe, A.S., Richards, E., Old, L.J. and Schreiber, R.D. (1994) Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity*, **1**, 447-456.
- Dvorak, H.F. (1986) Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*, **315**, 1650-1659.
- Ehrlich, P. (1909) Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned.Tijdschr.Geneeskd.*, **5**, 273-290.
- 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.
- Ernst, P.B. and Gold, B.D. (2000) The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu Rev Microbiol*, **54**, 615-640.
- Esteller, M., Corn, P.G., Baylin, S.B. and Herman, J.G. (2001) A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res*, **61**, 3225-3229.
- Etzioni, R., Urban, N., Ramsey, S., McIntosh, M., Schwartz, S., Reid, B., Radich, J., Anderson, G. and Hartwell, L. (2003) The case for early detection. *Nat Rev Cancer*, **3**, 243-252.
- 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.
- Foulds, L. (1954) *The Experimental Study of Tumor Progression*. Academic Press, London.
- Frisch, S.M. and Screaton, R.A. (2001) Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 555-562.
- Fruman, D.A., Meyers, R.E. and Cantley, L.C. (1998) Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem*, **67**, 481-507.
- Fu, Y.X. and Chaplin, D.D. (1999) Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu Rev Immunol*, **17**, 399-433.
- Gath, H.J. and Brakenhoff, R.H. (1999) Minimal residual disease in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev*, **18**, 109-126.
- Gebauer, F. and Hentze, M.W. (2004) Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 827-835.
- 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.
- Gion, M. and Daidone, M.G. (2004) Circulating biomarkers from tumour bulk to tumour machinery: promises and pitfalls. *Eur J Cancer*, **40**, 2613-2622.
- Gires, O., Munz, M., Schaffrik, M., Kieu, C., Rauch, J., Ahlemann, M., Eberle, D., Mack, B., Wollenberg, B., Lang, S., Hofmann, T., Hammerschmidt, W. and Zeidler, R. (2004) Profile identification of disease-associated humoral antigens using AMIDA, a novel proteomics-based technology. *Cell Mol Life Sci*, **61**, 1198-1207.
- Goedegebuure, P.S. and Eberlein, T.J. (1995) The role of CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes in human solid tumors. *Immunol Res*, **14**, 119-131.
- Goldenberg, D., Golz, A., Netzer, A., Rosenblatt, E., Rachmiel, A., Goldenberg, R.F. and Joachims, H.Z. (2001) Epstein-Barr virus and cancers of the head and neck. *Am J Otolaryngol*, **22**, 197-205.
- Hahn, W.C., Counter, C.M., Lundberg, A.S., Beijersbergen, R.L., Brooks, M.W. and Weinberg, R.A. (1999) Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*, **400**, 464-468.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57-70.
- Holz, M.K., Ballif, B.A., Gygi, S.P. and Blenis, J. (2005) mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell*, **123**, 569-580.
- Honore, B., Baandrup, U. and Vorum, H. (2004) Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins F and H/H' show differential expression in normal and selected cancer tissues. *Exp Cell Res*, **294**, 199-209.
- 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.
- Huang, J.S., Chao, C.C., Su, T.L., Yeh, S.H., Chen, D.S., Chen, C.T., Chen, P.J. and Jou, Y.S. (2004) Diverse cellular transformation capability of overexpressed genes in human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*, **315**, 950-958.
- 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.
- Jeronimo, C., Usadel, H., Henrique, R., Oliveira, J., Lopes, C., Nelson, W.G. and Sidransky, D. (2001) Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organ-confined prostate adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst*, **93**, 1747-1752.
- Kaplan, D.H., Shankaran, V., Dighe, A.S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L.J. and Schreiber, R.D. (1998) Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor

- surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 7556-7561.
- Kawakami, Y., Elyahu, S., Delgado, C.H., Robbins, P.F., Rivoltini, L., Topalian, S.L., Miki, T. and Rosenberg, S.A. (1994) Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 3515-3519.
- Kellner, R., Lichtenfels, R., Atkins, D., Bukur, J., Ackermann, A., Beck, J., Brenner, W., Melchior, S. and Seliger, B. (2002) Targeting of tumor associated antigens in renal cell carcinoma using proteome-based analysis and their clinical significance. *Proteomics*, **2**, 1743-1751.
- Khong, H.T. and Restifo, N.P. (2002) Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol*, **3**, 999-1005.
- Kim, D.H., Sarbassov, D.D., Ali, S.M., King, J.E., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Sabatini, D.M. (2002) mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*, **110**, 163-175.
- 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.
- Klein, G. (1966) Tumor antigens. *Annu Rev Microbiol*, **20**, 223-252.
- Krecic, A.M. and Swanson, M.S. (1999) hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 363-371.
- Kuper, H., Adami, H.O. and Trichopoulos, D. (2000) Infections as a major preventable cause of human cancer. *J Intern Med*, **248**, 171-183.
- Lacroix-Desmazes, S., Kaveri, S.V., Mouthon, L., Ayouba, A., Malanchere, E., Coutinho, A. and Kazatchkine, M.D. (1998) Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals. *J Immunol Methods*, **216**, 117-137.
- Lagarkova, M.A., Boitchenko, V.E., Mescheryakov, A.A., Kashkarova, U.A. and Nedospasov, S.A. (2000) Human cortactin as putative cancer antigen. *Oncogene*, **19**, 5204-5207.
- Lang, S., Wollenberg, B., Dellian, M., Steuer-Vogt, M.K., Schwenzer, K., Sautier, W., Chucholowski, M., Eckel, R., Faas, I., Wilmes, E., Ehrenfeld, M., Arnold, W., Kastenbauer, E. and Holz, D. (2002) [Clinical and epidemiological data of patients with malignomas of the head and neck]. *Laryngorhinootologie*, **81**, 499-508.
- Leon, S.A., Shapiro, B., Sklaroff, D.M. and Yaros, M.J. (1977) Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res*, **37**, 646-650.
- Levine, A.J. (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, **88**, 323-331.
- Lichtenfels, R., Kellner, R., Bukur, J., Beck, J., Brenner, W., Ackermann, A. and Seliger, B. (2002) Heat shock protein expression and anti-heat shock protein reactivity in renal cell carcinoma. *Proteomics*, **2**, 561-570.

- Lubin, R., Zalcman, G., Bouchet, L., Tredanel, J., Legros, Y., Cazals, D., Hirsch, A. and Soussi, T. (1995) Serum p53 antibodies as early markers of lung cancer. *Nat Med*, **1**, 701-702.
- Ludwig, J.A. and Weinstein, J.N. (2005) Biomarkers in Cancer Staging, Prognosis and Treatment Selection. *Nat Rev Cancer*.
- Maeda, H. and Akaike, T. (1998) Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. *Biochemistry (Mosc)*, **63**, 854-865.
- 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.
- Masouye, I., Hagens, G., Van Kuppevelt, T.H., Madsen, P., Saurat, J.H., Veerkamp, J.H., Pepper, M.S. and Siegenthaler, G. (1997) Endothelial cells of the human microvasculature express epidermal fatty acid-binding protein. *Circ Res*, **81**, 297-303.
- Mayeur, G.L., Fraser, C.S., Peiretti, F., Block, K.L. and Hershey, J.W. (2003) Characterization of eIF3k: a newly discovered subunit of mammalian translation initiation factor eIF3. *Eur J Biochem*, **270**, 4133-4139.
- Mayeur, G.L. and Hershey, J.W. (2002) Malignant transformation by the eukaryotic translation initiation factor 3 subunit p48 (eIF3e). *FEBS Lett*, **514**, 49-54.
- Minn, A.J., Gupta, G.P., Siegel, P.M., Bos, P.D., Shu, W., Giri, D.D., Viale, A., Olshen, A.B., Gerald, W.L. and Massague, J. (2005) Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*, **436**, 518-524.
- 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.
- Mischel, P.S., Cloughesy, T.F. and Nelson, S.F. (2004) DNA-microarray analysis of brain cancer: molecular classification for therapy. *Nat Rev Neurosci*, **5**, 782-792.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, **65**, 55-63.
- Muise-Helmericks, R.C., Grimes, H.L., Bellacosa, A., Malstrom, S.E., Tsihchlis, P.N. and Rosen, N. (1998) Cyclin D expression is controlled post-transcriptionally via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *J Biol Chem*, **273**, 29864-29872.
- Naranda, T., Kainuma, M., MacMillan, S.E. and Hershey, J.W. (1997) The 39-kilodalton subunit of eukaryotic translation initiation factor 3 is essential for the complex's integrity and for cell viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **17**, 145-153.
- Nguyen, K.T., Wang, W.J., Chan, J.L. and Wang, L.H. (2000) Differential requirements of the MAP kinase and PI3 kinase signaling pathways in Src- versus insulin and

- IGF-1 receptors-induced growth and transformation of rat intestinal epithelial cells. *Oncogene*, **19**, 5385-5397.
- Nigro, J.M., Baker, S.J., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., Hostetter, R., Cleary, K., Bigner, S.H., Davidson, N., Baylin, S., Devilee, P. and et al. (1989) Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature*, **342**, 705-708.
- Nojima, H., Tokunaga, C., Eguchi, S., Oshiro, N., Hidayat, S., Yoshino, K., Hara, K., Tanaka, N., Avruch, J. and Yonezawa, K. (2003) The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. *J Biol Chem*, **278**, 15461-15464.
- Nowell, P.C. (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, **194**, 23-28.
- Nupponen, N.N., Porkka, K., Kakkola, L., Tanner, M., Persson, K., Borg, A., Isola, J. and Visakorpi, T. (1999) Amplification and overexpression of p40 subunit of eukaryotic translation initiation factor 3 in breast and prostate cancer. *Am J Pathol*, **154**, 1777-1783.
- Old, L.J. and Boyse, E.A. (1964) Immunology of Experimental Tumors. *Annu Rev Med*, **15**, 167-186.
- Ostergaard, M., Rasmussen, H.H., Nielsen, H.V., Vorum, H., Orntoft, T.F., Wolf, H. and Celis, J.E. (1997) Proteome profiling of bladder squamous cell carcinomas: identification of markers that define their degree of differentiation. *Cancer Res*, **57**, 4111-4117.
- Pandolfi, P.P. (2004) Aberrant mRNA translation in cancer pathogenesis: an old concept revisited comes finally of age. *Oncogene*, **23**, 3134-3137.
- Paschen, A., Eichmuller, S. and Schadendorf, D. (2004) Identification of tumor antigens and T-cell epitopes, and its clinical application. *Cancer Immunol Immunother*, **53**, 196-203.
- Pepe, M.S., Etzioni, R., Feng, Z., Potter, J.D., Thompson, M.L., Thornquist, M., Winget, M. and Yasui, Y. (2001) Phases of biomarker development for early detection of cancer. *J Natl Cancer Inst*, **93**, 1054-1061.
- Pikarsky, E., Porat, R.M., Stein, I., Abramovitch, R., Amit, S., Kasem, S., Galkovitch-Pyest, E., Urieli-Shoval, S., Galun, E. and Ben-Neriah, Y. (2004) NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature*, **431**, 461-466.
- Polymenis, M. and Schmidt, E.V. (1999) Coordination of cell growth with cell division. *Curr Opin Genet Dev*, **9**, 76-80.
- Probst, H.C., Lagnel, J., Kollias, G. and van den Broek, M. (2003) Inducible transgenic mice reveal resting dendritic cells as potent inducers of CD8+ T cell tolerance. *Immunity*, **18**, 713-720.
- Rajasekhar, V.K. and Holland, E.C. (2004) Postgenomic global analysis of translational control induced by oncogenic signaling. *Oncogene*, **23**, 3248-3264.
- Richardson, C.J., Broenstrup, M., Fingar, D.C., Julich, K., Ballif, B.A., Gygi, S. and Blenis, J. (2004) SKAR is a specific target of S6 kinase 1 in cell growth control. *Curr Biol*, **14**, 1540-1549.

- 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.
- Robison, J.E., Perreard, L. and Bernard, P.S. (2004) State of the science: molecular classifications of breast cancer for clinical diagnostics. *Clin Biochem*, **37**, 572-578.
- Rock, C.L., Michael, C.W., Reynolds, R.K. and Ruffin, M.T. (2000) Prevention of cervix cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, **33**, 169-185.
- Rotman, G. and Shiloh, Y. (1999) ATM: a mediator of multiple responses to genotoxic stress. *Oncogene*, **18**, 6135-6144.
- Sahin, U., Tureci, O., Schmitt, H., Cochlovius, B., Johannes, T., Schmits, R., Stenner, F., Luo, G., Schobert, I. and Pfreundschuh, M. (1995) Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 11810-11813.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 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.
- Schalm, S.S. and Blenis, J. (2002) Identification of a conserved motif required for mTOR signaling. *Curr Biol*, **12**, 632-639.
- Schmitz, M., Diestelkoetter, P., Weigle, B., Schmachtenberg, F., Stevanovic, S., Ockert, D., Rammensee, H.G. and Rieber, E.P. (2000) Generation of survivin-specific CD8+ T effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides. *Cancer Res*, **60**, 4845-4849.
- 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.
- Shacter, E. and Weitzman, S.A. (2002) Chronic inflammation and cancer. *Oncology (Williston Park)*, **16**, 217-226, 229; discussion 230-212.
- Shamji, A.F., Nghiem, P. and Schreiber, S.L. (2003) Integration of growth factor and nutrient signaling: implications for cancer biology. *Mol Cell*, **12**, 271-280.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J. and Schreiber, R.D. (2001) IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*, **410**, 1107-1111.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. and Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem*, **68**, 850-858.
- Shichijo, S., Nakao, M., Imai, Y., Takasu, H., Kawamoto, M., Niiya, F., Yang, D., Toh, Y., Yamana, H. and Itoh, K. (1998) A gene encoding antigenic peptides of human squamous cell carcinoma recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med*, **187**, 277-288.

- Sidransky, D. (2002) Emerging molecular markers of cancer. *Nat Rev Cancer*, **2**, 210-219.
- Simpson, A.J., Caballero, O.L., Jungbluth, A., Chen, Y.T. and Old, L.J. (2005) Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer*, **5**, 615-625.
- Singh-Jasuja, H., Emmerich, N.P. and Rammensee, H.G. (2004) The Tubingen approach: identification, selection, and validation of tumor-associated HLA peptides for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother*, **53**, 187-195.
- Sinha, P., Hutter, G., Kottgen, E., Dietel, M., Schadendorf, D. and Lage, H. (1999) Increased expression of epidermal fatty acid binding protein, cofilin, and 14-3-3-sigma (stratifin) detected by two-dimensional gel electrophoresis, mass spectrometry and microsequencing of drug-resistant human adenocarcinoma of the pancreas. *Electrophoresis*, **20**, 2952-2960.
- Soltys, S.G., Le, Q.T., Shi, G., Tibshirani, R., Giaccia, A.J. and Koong, A.C. (2004) The use of plasma surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry proteomic patterns for detection of head and neck squamous cell cancers. *Clin Cancer Res*, **10**, 4806-4812.
- 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.
- Spizzo, G., Went, P., Dirnhofer, S., Obrist, P., Simon, R., Spichtin, H., Maurer, R., Metzger, U., von Castelberg, B., Bart, R., Stopatschinskaya, S., Kochli, O.R., Haas, P., Mross, F., Zuber, M., Dietrich, H., Bischoff, S., Mirlacher, M., Sauter, G. and Gastl, G. (2004) High Ep-CAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, **86**, 207-213.
- Stocker, H. and Hafen, E. (2000) Genetic control of cell size. *Curr Opin Genet Dev*, **10**, 529-535.
- 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.
- 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 Venrooij, W.J. and Pruijn, G.J. (1995) Ribonucleoprotein complexes as autoantigens. *Curr Opin Immunol*, **7**, 819-824.
- Velculescu, V.E., Zhang, L., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (1995) Serial analysis of gene expression. *Science*, **270**, 484-487.
- Verbeek, B.S., Adriaansen-Slot, S.S., Rijksen, G. and Vroom, T.M. (1997) Grb2 overexpression in nuclei and cytoplasm of human breast cells: a histochemical

- and biochemical study of normal and neoplastic mammary tissue specimens. *J Pathol*, **183**, 195-203.
- Vernham, G.A. and Crowther, J.A. (1994) Head and neck carcinoma--stage at presentation. *Clin Otolaryngol Allied Sci*, **19**, 120-124.
- Vogelstein, B., Lane, D. and Levine, A.J. (2000) Surfing the p53 network. *Nature*, **408**, 307-310.
- 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.
- Vonderheide, R.H., Hahn, W.C., Schultze, J.L. and Nadler, L.M. (1999) The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity*, **10**, 673-679.
- Wang, L.H. (2004) Molecular signaling regulating anchorage-independent growth of cancer cells. *Mt Sinai J Med*, **71**, 361-367.
- Wulfkuhle, J.D., Liotta, L.A. and Petricoin, E.F. (2003) Proteomic applications for the early detection of cancer. *Nat Rev Cancer*, **3**, 267-275.
- Zhang, Z., Vuori, K., Wang, H., Reed, J.C. and Ruoslahti, E. (1996) Integrin activation by R-ras. *Cell*, **85**, 61-69.
- Zimmerman, A.W. and Veerkamp, J.H. (2002) New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins. *Cell Mol Life Sci*, **59**, 1096-1116.

# Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
a	anti
AK	Antikörper
AMIDA	auto-antibody mediated identification of antigens
APC	antigenpräsentierende Zelle
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
AS	antisens
ATCC	American Type Culture Collection
BPB	Bromphenolblau
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
CEA	carcinoembryonic antigen
CK	Zytokeratin
CMV	Cytomegalovirus
CT	Cancer-Testis
CTA	Cancer-Testis Antigene
CTLA-4	zytotoxisches T-Zell assoziiertes Antigen 4
d.h.	das heißt
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTE	Dithioerythreiol
E.coli	Escherichia coli
EBV	Ebstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiaminessäure

EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzymimmunoassay
EpCAM	epidermal cell adhesion molecule
EST	expressed sequence tag
FACS	fluorescence-aktiviert cell sorter
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
FSC	forward-scatter
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.	id est
IEF	isoelektische Fokussierung
IEP	isoelektischer Punkt
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP	Immunopräzipitation
IPG	immobilisierter pH Gradient
IRES	interne Ribosomen-Eintrittsstellen
ISH	in situ Hybridisierung
Kat.Nr.	Katalog Nummer
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Broth
LKM	Lymphknotenmetastase

M	Molar
m	milli
mA	Milliamper
mAK	monoklonaler Antikörper
MALDI- ToF	Matrix-unterstütztes Laserdesorptions-/Ionisations-Massenpektrometer (Flugzeitmassenspektrometer)
MFI	mean fluorescence intensity
mg	Mikrogramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
ml	Mikroliter
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MRD	minimal residual disease
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
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
s	Sekunde

S	sense
SCC	squamous cell carcinoma antigen
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SEREX	serological identification of antigens by recombinant expression cloning
siRNA	small interference RNA
SRH	second region of homology
SSC	sideward-scatter
SV40	simian virus 40
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
eYFP	enhanced yellow fluorescent protein
z.B.	zum Beispiel

# Danksagung

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

Herrn PD Dr. Reinhard Zeidler und Dr. Olivier Gires für die interessante Themenstellung, die ständige Diskussionsbereitschaft und die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Frau PD Dr. Bettina Kempkes für ihr Interesse an und ihre Ratschläge zu dieser Arbeit und für die freundliche Bereitschaft, diese Arbeit als Gutachterin zu betreuen.

Frau Bärbel Schmidt und Frau Brigitte Mack für die tatkräftige Unterstützung bei der mehrfachen Messung von nahezu 800 Seren bzw. ihre Expertise in der Immunhistochemie und konfokalen Fluoreszenzmikroskopie.

Frau Dr. Martina Schaffrick und Herrn Jens Rauch für die erfolgreiche Teamarbeit und die vielen fruchtbaren Diskussionen.

Frau Dr. med. Suna Schmitz, Frau Dr. med. Michaela Andratschke, Herrn David Eberle und Herrn Prof. Dr. med. Stefan Lang für die Bereitstellung von Patientenmaterial und Einblicke in den klinischen Alltag.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für das angenehme und offene Arbeitsklima, die guten Diskussionen, die große Hilfsbereitschaft und vielen netten Stunden im „Cafe Kuschel“.

# Lebenslauf

## Persönliche Angaben:

Name: Jens Martin Ahlemann  
Geburtsdatum: 11.01.1977  
Geburtsort: Tübingen  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig  
Wohnort: Lindwurmstr. 100A  
80337 München

## Schulbildung/Studium:

seit Januar 2003      Dissertation in der Forschungsabteilung der Hals-, Nasen- und Ohrenklinik des Klinikums Großhadern, München

2002                      Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biochemie der Universität Leipzig (Prof. Dr. A. Beck-Sickinger)

1997 - 2002              Studium der Biochemie an der Universität Leipzig und der University of Bath, England

1996 – 1997              Wehrdienst beim 2. Panzerflugabwehrkanonenbataillon 111, Achim

1996                      Schulabschluss mit der allgemeinen Hochschulreife (Abitur)

1987 - 1996              Zeppelin-Gymnasium in Lüdenscheid und Gresham's School in Holt, England

1983 - 1987              Grund- und Hauptschule in Nehren und Grundschule Brügge in Lüdenscheid