Aus der Abteilung Innere Medizin III
der Universität Ulm
(Ärztl. Dir.: Prof. Dr. med. H. Döhner)

Definition immunogener Antigene bei der Akuten Myeloischen Leukämie mittels Serologischem Screening von cDNA – Expressionsbanken

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von

Thomas Hauser
aus Bobingen

2005

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. med. Klaus-Michael Debatin
1. Berichterstatter:	PD Dr. med. Michael Schmitt
2. Berichterstatter:	PD Dr. med. Wolfgang Kratzer

Tag der Promotion: 29.06.2006

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis 5

2. Einleitung 7

2.1 Akute Myeloische Leukämie (AML) 7

2.1.1 Definition und Klinik 7

2.1.2 Epidemiologie 7

2.1.3 Therapieoptionen bei der AML 8

2.2 Immunologische Grundlagen 9

2.3 Identifikation tumorspezifischer Antigene 11

2.3.1 Identifikation durch zytotoxische T – Lymphozyten (CTLs) 11

2.3.2 Identifikation mittels Antikörpern 12

2.4 Tumor – assoziierte Antigene 12

2.4.1 Identifizierung Tumor – assoziierter Antigene (TAA) bei soliden Tumoren ... 12

2.4.2 Leukämie – assoziierte Antigene (LAA) 13

2.5 Immuntherapien 13

2.6 Serologisches Screening von cDNA – Expressionsbanken (SEREX) auf Cancer – Germline – Antigene (CG – AGs) 15

2.7 Fragestellung der Arbeit 16

3. Material und Methoden 17

3.1. Methoden 17

3.1.1 Das SEREX – Verfahren 17

3.1.2 Gewinnung der Testis – cDNA – Phagen – Bank 17

3.1.3 Präabsorption 20

3.1.4 Erstes Screening 20

3.1.5 Zweites Screening 25

3.1.6 Plasmidextraktion 26

3.1.7 Restriktionsansatz 28

3.1.8 Sequenzierung 30

3.1.9 Immunoscreening mit allogenen Seren 31

3.1.10 Reverse – Transkription – Polymerase – Kettenreaktion (RT – PCR) 32

3.2 Materialien 34
3.2.1 Bakterien 34
3.2.2 Agar und Lösungen 34
3.2.3 Chemikalien 37
3.2.4 Spezielle Chemikalien, Marker und Antikörper 38
3.2.5 Verbrauchsmaterialien, Glas- und Plastikwaren 40
3.2.6 Geräte 41
4. Ergebnisse 43
4.1 Screening – Ergebnisse 43
4.1.1 Vorlauf mit Melanomseren 43
4.1.2 Erstes Screening 43
4.1.3 Zweites Screening 45
4.2 Plasmidextraktion, Gelelektrophorese und Sequenzierung 46
4.3 Immunoscrenning mit allogenen Seren 49
4.4 Ergebnisse der RT – PCR 53
5. Diskussion 57
6. Zusammenfassung 66
7. Literaturverzeichnis 68
8. Danksagung 88

1. Abkürzungsverzeichnis

a	Jahr
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AML	Akute Myeloische Leukämie
APCs	Antigen – präsentierende Zellen
AUL	Akute undifferenzierte Leukämie
ATRA	All – trans – Retinoesäure
APL	Akute Promyelozyten – Leukämie
BIF1	Bax – interacting factor 1
CD	Cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA
CENPC1	Centromere protein C 1
CG – AG	Cancer – Germline – Antigen
CMAS	Cytidin – monophosphate – N – acetylneuraminic acid – synthetase
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
COPB2	Coatomer protein complex β 2
CpG – Oligonukleotid	Cytidin – Phosphat – Guanosin – reiches Oligonukleotid
CR	Komplette Remission
CTLs	Zytotoxische T – Lymphozyten
CTCL	Kutanes T – Zell Lymphom
DC	Dendritische Zelle
del	Deletion
E. coli	*Escherichia coli*
FAB – Klassifikation	French – American – British – Group Klassifikation
GM – CSF	Granulozyten – Makrophagen – Kolonie – stimulierender Faktor
GvL – Effekt	Graft – versus – Leukemia – Effekt
Gy	Gray
HLA	Haupthistokompatibilitätskomplex
HSP	Hitze – Schock – Protein
inv	Inversion

KMT	Knochenmarktransplantation
LAA	Leukämie – assoziiertes Antigen
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MDS	Myelodysplastisches Sydrom
MPP1	M – phase – phosphoprotein 1
MPS	Myeloproliferatives Syndrom
mRNA	Messenger – Ribonukleinsäure
PBMN	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PDGFR α	Platelet derived growth factor receptor alpha
PFU	Plaque forming unit
PINCH	Particularly interesting new Cystein – Histidin protein
PML/RARA – Gen	Promyelozytenleukämie / Retinoesäure – Rezeptor – alpha – Fusionsgen
POX	Myeloperoxidasereaktion
PRAME	Preferentially expressed antigen in melanoma
RHAMM	Receptor for hyaluronic acid – mediated motility
RIPX	Rap 2 – interacting protein X
RNPC2	RNA – binding region containing 2
RT – PCR	Reverse – Transkription – Polymerase – Kettenreaktion
SEREX	Serologisches Screening von rekombinanten cDNA – Expressionsbanken
SH3GLB1	SH3 – domain GRB2 – like endohpilin B1
SZT	Stamzelltransplantation
t	Translokation
TAA	Tumor – assoziiertes Antigen
Tab	Tabelle
UBE3A	Ubiquitin protein ligase E3A
WT – 1	Wilms – Tumor – Gen 1
ZHX1	Zinc fingers and Homeoboxes 1

2. Einleitung

2.1 Akute Myeloische Leukämie (AML)

2.1.1 Definition und Klinik

Bei der akuten myeloischen Leukämie handelt es sich um eine maligne Neoplasie hämatopoetischer Stammzellen. Diese ist charakterisiert durch eine klonale Expansion unreifer Zellen im Knochenmark der myeloischen Reihe mit Ausschwemmung in das periphere Blut. Als Konsequenz finden sich im Blut und Knochenmark wenig differenzierte oder undifferenzierte Blasten mit großen, aypischen Nukleolen und schmalem, basophilen Zytoplasmasaum. Bei einem Teil der Patienten lassen sich Auerstäbchen im Zytoplasma nachweisen. Die AML wird entsprechend der Klassifikation der „French – American – British – Group“ (FAB – Klassifikation) [9] nach morphologischen Kriterien in M0 bis M7 sowie mittels Immunphänotypisierung und Zytogenetik unterteilt. Insgesamt ist der Karyotyp einer der wichtigsten prädiktiven Faktoren für das Erreichen einer kompletten Remission und für das krankheitsfreie Überleben [136].
Häufige klinische Befunde bei einer AML sind Abgeschlagenheit, Fieber, Nachtschweiß, Anämie, Blutungen und Infektanfälligkeit.

2.1.2 Epidemiologie und Ätiologie

Die Inzidenz der AML beträgt etwa 2,5 neu diagnostizierte Fälle pro 100.000 Einwohner im Jahr. Der Anteil der AML an den akuten Leukämien nimmt mit dem Alter zu.
Die Ätiologie maligner Neoplasien der Hämatopoese ist vielfältig. Zum einen kann die AML durch eine Knochenmarkschädigung durch ionisierende Strahlen [80, 95], durch chemische Substanzen wie beispielsweise Benzol [57, 113, 149], organische Lösungsmittel [2] oder durch Zytostatika (Alkylantien, Topoisomerase II – Inhibitoren) [78, 80, 132] bedingt sein. Zum anderen kann sich eine AML sekundär aus einem myelodysplastischen Sydrom (MDS) oder einem chronisch myeloproliferativen Syndrom (CMPS) entwickeln [106, 132]. Außerdem spielen genetische Faktoren in der Pathogenese eine Rolle. Beispielsweise haben

Patienten mit Trisomie 21 (Down Syndrom) [23, 94] ein gering erhöhtes Risiko an einer AML zu erkranken.

2.1.3 Therapieoptionen bei der AML

Für die Behandlung der AML gibt es verschiedene Risiko – adaptierte Therapieansätze [32, 41, 125]: Polychemotherapie, allogene Knochenmark – Transplantation (KMT) oder Stammzelltransplantation (SZT) nach myeloablativer oder nicht – myeloablativer Therapie und autologe SZT. Die Wirkung der allogenen SZT beruht sowohl auf dem Effekt von Chemotherapie und Bestrahlung als auch auf der Induktion von Immunmechanismen wie dem Graft – versus – leukemia – Effekt. Darunter wird die Lyse von leukämischen Zellen durch Immunzellen des Spenders verstanden. Bei der AML wurde dieser GvL – Effekt unter anderem durch Porter et al. 1994 [119] beschrieben. Therapieergebnisse zeigten eine Aktivierung des Immunsystems gegen leukämische Blasten und ließen die Existenz von immunogenen Antigenen bei myeloischen Leukämien erwarten [99]. Durch die Gabe von Spenderlymphozyten kann dieser Effekt noch verstärkt werden [28, 72, 73, 118, 119].
Bei bestimmten Subtypen der AML werden weitere Therapieoptionen angewendet. Bei der Promyelozytenleukämie (M3) mit positivem PML / RAR – Alpha – Fusionsgen als Produkt der Translokation t(15;17) werden Patienten beispielsweise mit All – trans – Retinoesäure (ATRA) behandelt. ATRA führt dabei zur Differenzierung von Leukämiezellen zu reifen Granulozyten, die dadurch ihre mitotische Aktivität verlieren [65, 79, 127].
Insgesamt muss jedoch bei etwa 15 % aller AML – Patienten im Erwachsenenalter bis 60 Jahre mit einer primär refraktären AML auf Standardinduktionstherapie gerechnet werden. Die Prognose dieser primär refraktären AML ist sehr schlecht [136]. Da die Therapie von Chemotherapie – refraktären Leukämien und Leukämierezidiven weiterhin problematisch ist, macht es daher die Entwicklung neuer und / oder komplementärer Therapiekonzepte notwendig. Einen derartigen Behandlungsansatz könnte eine Immuntherapie darstellen (2.2.2).

2.2 Immunologische Grundlagen

Eine Immunantwort gegen Tumorzellen beruht auf einer Freisetzung von Tumorantigenen. Dies kann beispielsweise durch Sekretion oder Nekrose erfolgen. Eine integrierte spezifische Immunantwort gegen diese Tumorzellen involviert sowohl das zelluläre als auch das humorale Immunsystem [129, 154, 155] (vgl. Abb. 1). Von zentraler Bedeutung sind hierbei die Antigen – präsentierenden Zellen (APCs) (Dendritische Zellen, Makrophagen, B – Zellen) [56]. Diese können Tumorantigene sowohl spezifisch über Fc – Rezeptoren oder alternativ über Makro –, Mikropinozytose oder Phagozytose aufnehmen. Durch Prozessierung und anschließender Präsentation der Peptide mittels MHC I – und MHC II – Molekülen auf ihrer Oberfläche werden sowohl CD8+ zytotoxische T – Lymphozyten (CTL) als auch CD4+ T – Lymphozyten (T – Helferzellen) aktiviert. Diese T – Helferzellen induzieren sowohl das immunologische Langzeitgedächtnis der CD8+ – T – Zellen [5] als auch den „Class – switch“ der Immunglobulinsekretion der B – Lymphozyten und verstärken die Ig – Antwort der durch die Tumorantigene aktivierten B – Zellen.

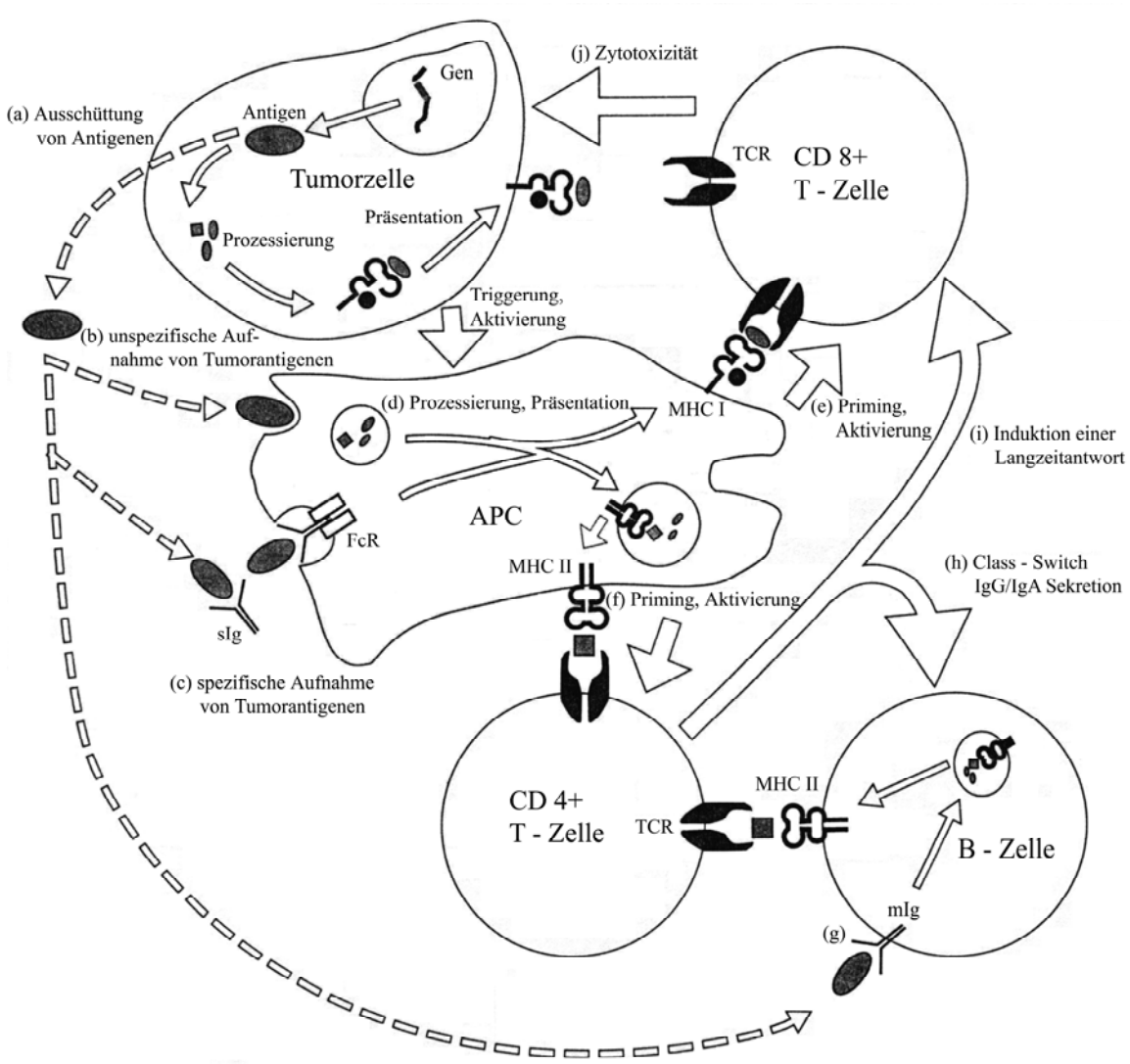

Abb. 1: Integrierte spezifische Immunantwort in Bezug auf menschliche Tumorantigene: (a) Tumorantigene (Ags), die durch Sekretion oder Tumorzelllyse ausgeschüttet werden, werden von Antigen – präsentierenden Zellen (APCs) (b) durch Makro – /Mikropinozytose, Phagozytose oder (c) durch Fc – Rezeptor – vermittelte Endozytose von löslichen Immunglobulin (sIg) – Antigenkomplexen aufgenommen. Die aufgenommenen Antigene werden (d) prozessiert und präsentiert (e) auf MHC – Klasse I – und (f) auf MHC – Klasse II – Molekülen zum Primen und Aktivieren von CD 4+ und CD 8+ T – Lymphozyten. (g) Die Aufnahme von Antigenen von B – Lymphozyten geschieht durch membranständige Immunglobuline (mIg). Diese werden von MHC – Klasse II – Molekülen den CD 4+ T – Lymphozyten präsentiert. Die Aktivierung von CD 4+ T – Zellen durch APCs oder B – Zellen induziert (h) einen Class – Switch und somit die Produktion von IgG und IgA durch B – Zellen und (i) eine T – Zell – Langzeitantwort. Zusätzlich wird (e) durch Primen und Aktivierung von CD 8+ T – Lymphozyten eine zytolytische Aktivität von CD 8+ T – Zellen induziert, welche (j) zur Lyse von Tumorzellen führt. [nach 129]

2.3 Identifikation tumorspezifischer Antigene

Nachdem bereits in den 1950er Jahren durch Tierversuche mit Mäusen sich erste Hinweise auf die Existenz immunogener Strukturen in Tumoren ergaben, wurden erst seit Anfang der 1970er Jahre mit der systematischen Suche nach tumorassoziierten Antigenen begonnen [46, 71, 75, 101, 114, 120].
Es gibt unterschiedliche Ansätze, Tumor – spezifische Antigene *in vitro* zu identifizieren: durch zytotoxische T – Lymphozyten [13, 16, 36, 54, 116, 126] oder durch Antikörper, wie bei dem hier praktiziertem Verfahren SEREX (Abschnitt 2.6 und 3.1.1) [47, 128, 160].

2.3.1 Identifikation durch zytotoxische T – Lymphozyten (CTLs)

Ein Ansatz zur Identifikation und Charakterisierung von Tumorantigenen mit Hilfe von CTLs wurde in den achtziger Jahren von Boon et al. [16, 54] entwickelt. Durch UV – Bestrahlung einer Tumorzelllinie oder durch deren Behandlung mit Mutagenen entwickelten sich unter den überlebenden Zellen Varianten, die nicht oder kaum in der Lage waren im syngenen Empfänger anzuwachsen. Als Ursache erkannten sie eine Immunreaktion des Empfängers gegen das behandelte Tumorgewebe. Zudem war es möglich, diese Tumorimmunität mittels T – Lymphozyten auf syngene Organismen zu übertragen [15].
In einem anderen Ansatz wurden antigene Peptide isoliert, die auf MHC – I – Molekülen gebunden waren. Diese Peptide wurden im Anschluss auf MHC – I – Moleküle von Zellen gebunden, die unfähig zur Antigenprozessierung waren und somit nicht mit den zu untersuchenden CTLs reagierten. Durch Testung dieser neu präparierten Zellen gegen autologe CTLs konnten immunogene Peptide isoliert werden [12, 36].
Mit diesen Methoden konnten einige CTL – definierte Antigene identifiziert werden, wie beispielsweise MAGE – 1 [19] oder MelanA / MART – 1 [29, 67].

2.3.2 Identifikation mittels Antikörpern

Die Ursprünge des Versuches, Tumorantigene durch Antikörper zu identifizieren, liegen Ende der 1970er Jahre. Damals entwickelte die Forschungsgruppe um L.J. Old zur Identifizierung von Tumorantigenen das Verfahren des „autologous typing“ [112]. Mit dieser Methode wurden Patientenseren auf Antikörper gegen Oberflächenantigene von Tumorzelllinien getestet. Dadurch konnte die Existenz von Antikörpern, welche spezifisch an Tumorzellen, nicht jedoch an „normale“ Körperzellen binden, nachgewiesen werden [115, 163]. Da für diese Methode die Antikörperkonzentration in den getesteten Seren sehr niedrig war, konnten nur wenige Tumorantigene charakterisiert werden.
Eine neue Mitte der 1990er Jahre entwickelte Methode zur Identifikation von Tumor – assoziierten Antigene stellt das sogenannte SEREX – Verfahren (Serologisches Screening von rekombinanten cDNA – Expressionsbanken) dar [47, 128, 160] (siehe Abschnitt 2.6 und 3.1.1 für weitere Details). Mit diesem Verfahren wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, spezifische Tumorantigene bei Patienten mit AML zu identifizieren.

2.4 Tumor – assoziierte Antigene

2.4.1 Identifizierung Tumor – assoziierter Antigene (TAA) bei soliden Tumoren

Zuerst wurden Tumor – assoziierte Antigene (TAA) in soliden Tumoren charakterisiert. Von TAA abgeleitete Peptide, die durch Klasse I – Moleküle des Haupthisto – kompatibilitätskomplexes (HLA) präsentiert werden, können spezifische zytotoxische T – Lymphozyten (CTLs) induzieren. Verschiedene Forschungsgruppen konnten derartige TAA zunächst insbesondere beim malignen Melanom charakterisieren [14, 18, 19, 29, 35, 88]. Durch Induktion von CTL können diese Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* erkennen und lysieren [68]. Derzeit werden verschiedene Immuntherapien sowohl beim malignen Melanom als auch bei unterschiedlichen gynäkologischen Tumoren in klinischen Studien untersucht. Die Verwendung von Zytokinen wie GM – CSF [62], von CpG – Oligonukleotiden [74] oder von dendritischen Zellen (DC) [8] könnte einen wichtigen zusätzlichen Benefit erbringen.

2.4.2 Leukämie – assoziierte Antigene (LAA)

Bei malignen hämatologischen Erkrankungen war in der Antigencharakterisierung im Gegensatz zu soliden Tumoren noch wichtige Forschungsarbeit zu leisten. Die Identifizierung von Leukämie – assoziierten Antigenen (LAA) und deren Charakterisierung im Hinblick auf Immunantworten und Expressionsmuster sind hierzu notwendig. Ikeda et al. [58] haben mit dem Antigen PRAME (preferentially expressed antigen in melanomas) zum ersten Mal ein von spezifischen CTL erkanntes Antigen [69] charakterisiert, das sowohl beim malignen Melanom und anderen soliden Tumoren als auch auf mehr als 30 % der Blasten bei AML und bei anderen malignen hämatologischen Erkrankungen exprimiert wird [90]. In den letzten Jahren wurden bei der AML weitere Antigene charakterisiert: WT1 (Wilms – Tumor – Gen – 1), das primär im Wilms' Tumor in der Niere charakterisiert wurde, konnte ebenfalls in leukämischen Blasten detektiert werden [94]. Über die Expression von WT1 in CD34+ Stammzellen gibt es unterschiedliche Ergebnisse [53, 91]: Die Expression von WT1 konnte in CD34+ Stammzellen während einer bestimmten Differenzierungsphase gezeigt werden [91]. Ob dieses Antigen somit für eine Immuntherapie verwendet werden kann, ohne die normale frühe Hämatopoese zu beeinträchtigen, ist umstritten [53, 108]. Für WT1 wurden HLA – A24 Peptide charakterisiert, die von spezifischen CTL erkannt werden und leukämische Blasten lysieren können [108, 109]. Ein weiteres LAA ist Proteinase 3 (synonym: c – ANCA) mit dem Peptid PR1, das ebenfalls zytotoxische T – Lymphozyten (CTL) aktiviert, welche Tumorzellen lysieren können [97, 98]. Proteinase 3 ist jedoch ein in verschiedenen Normalgeweben und ein bei der Wegenerschen Granulomatose exprimiertes Gen, so dass bei einer Immuntherapie mit diesem Antigen auch Autoimmunvorgänge gegen Normalgewebe zu erwarten wären. Aktuelle Vakzinierungsstudien zeigen jedoch sowohl für WT1 als auch für Protease 3 vielversprechende Ergebnisse [51, 100, 110, 158].
Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, weitere LAA mit dem SEREX – Verfahren (2.6 und 3.1) bei Patienten mit einer AML zu identifizieren.

2.5 Immuntherapien

Bei der AML wird derzeit eine risikoadapierte Behandlung mit Polychemotherapie und autologer oder allogener Stammzelltransplantation (SZT) durchgeführt. [41, 136]

Die Behandlung zytostatikaresistenter Leukämien und von Rezidiven ist jedoch weiterhin schwierig [136]. Einen möglichen komplementären Behandlungsansatz stellt bei AML die Immuntherapie dar. Tumor – assoziierte Antigene (TAA) sind Zielstrukturen für eine spezifische Immuntherapie von Tumoren. Bei der CML kann beispielsweise Interferon α durch eine unspezifische T – Zell – Stimulation eine anhaltende zytogenetische Remission erzielen [52]. Eine andere Studie zeigte eine Verlängerung der Überlebenszeit bei einem Einsatz von Interferon α in Kombination mit Interleukin – 2 [38]. Aktuell wird von einer Arbeitsgruppe der Universität Ulm die Sicherheit und Wirksamkeit einer Immuntherapie mit subkutanem Histamindihydrochlorid in Kombination mit Interleukin – 2 versus keine Behandlung (Routinebehandlung) bei Patienten mit AML in erstmaliger oder wiederholter kompletter Remission untersucht.

Ein kurativer Therapieansatz ist die in Abschnitt 2.1.3 beschriebene allogene Stammzelltransplantation. Die allogene Stammzelltransplantation basiert auf den Effekten von Bestrahlung und Chemotherapie, aber auch insbesondere auf der Induktion eines Graft – versus – Leukemia (GvL) – Effektes. Durch die Gabe von Spender – Lymphozyten kann dieser Effekt noch verstärkt werden. [28, 72, 73, 118, 119]

In klinischer Erprobung steht zurzeit die Therapieoption mit monoklonalen Antikörpern. Dabei wird der Nutzen einer AML – Therapie mit einem Zytostatikum untersucht, welches an den anti – CD33 – Antikörper gekoppelt ist (Gemtuzumab – Ozogamicin = Mylotarg). [77, 123, 144, 157]

Spezifischere Immuntherapien, wie eine aktive Immuntherapie mittels einer (rekombinanten) Tumorvakzine aus Tumorantigenen unter Verwendung von LAAs (2.4.2), könnte eine Möglichkeit darstellen, die immunologischen anti – leukämischen Effekte zu steigern. Durch die Verwendung von Antigenen, die spezifisch in Tumoren exprimiert werden, wie beispielsweise Cancer – Germline – Antigene (CG – AGs) (siehe Abschnitt 2.6), könnten autoimmunologische Mechanismen vermieden oder zumindest gering gehalten werden. Folglich könnten die gegen LAA gerichtete Immuntherapie ein geeignetes Mittel darstellen, den antileukämischen Effekt nach Chemotherapie und allogener Stammzell-Transplantation zu steigern und die Dauer einer durch Chemotherapie oder Bestrahlung erreichte Remission zu verlängern bzw. erhalten. Aus diesem Grund könnte die Identifikation von LAA einen wichtigen grundlegenden Schritt in der Erforschung einer Immuntherapie bei AML darstellen. CG – AGs könnten hierzu besonders geeignet sein, da sie in Normalgeweben, die Antigene präsentieren können, nicht exprimiert werden.

2.6 Serologisches Screening von cDNA – Expressionsbanken (SEREX) auf Cancer – Germline – Antigene (CG – AGs)

Das SEREX-Verfahren wurde 1994 von Ugur Sahin et al. [128] erstmals beschrieben. SEREX fand hauptsächlich Verwendung für die Suche nach TAAs bei Patienten mit soliden Tumoren, die eine humorale Immunantwort ausgelöst haben [26, 129, 133, 134, 137]. Es konnten aber auch bereits bei der Chronisch Myeloischen Leukämie (CML) TAAs identifiziert werden, wie beispielsweise CML66 oder RBPJκ [170]. Weiter konnte 2000 von unserer Arbeitsgruppe bei der AML die SEREX – Antigene RHAMM (CD168) und MPP11 isoliert werden [43].

Die Identifikation dieser Antigene beruht vor allem auf hohen Antikörpertitern. Um eine derart hohe Antikörperproduktion auszulösen, müssen B – Zellen Antigen – spezifisch durch CD4+ T – Helferzellen stimuliert werden und so einen „Class-Switch" in der Antikörper – produktion auslösen. Dafür ist es nötig, dass Antigenepitope, die mittels SEREX identifiziert werden können, durch MHC II präsentiert werden. Derartige Epitope wurden zum Beispiel von Hiroshi Shiku et al. [139] bestimmt. Zusätzlich konnte von Jäger et al. gezeigt werden, dass über SEREX charakterisierte Antigene möglicherweise auch Peptidsequenzen enthalten, die von MHC I präsentiert werden können [63]. Beispielsweise weist das Cancer – Germline – Antigen NY – ESO – 1 Peptid – Epitope auf, welche HLA – A2 restringierte zytotoxische T – Zellen (CTL) induzieren [25].

Des Weiteren konnte durch das SEREX – Verfahren bei soliden Tumoren weitere Antigene identifiziert werden, darunter auch mehrere CG – AGs. Bei CG – AGs handelt es sich um eine spezielle Gruppe von TAAs. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie sowohl in unterschiedlichen Tumorentitäten als auch im Keimbahngewebe exprimiert werden. Da sie im Keimbahngewebe zwar exprimiert werden, jedoch nicht präsentiert werden, werden sie durch das Immunsystem nicht erkannt. Aus diesem Grund sind derartige Antigene für eine spezifische Immuntherapie gegen Tumorantigene besonders interessant, da keine Autoimmunreaktionen zu erwarten sind. Beispiele für die mittels SEREX identifizierten CG – Antigene sind folgende: NY – ESO – 1 [25, 63], SSX – 2 [159, 161] und SCP – 1 [162].

Eine Übersicht über alle bislang mit dem SEREX – Verfahren identifizierten Antigene ist in der SEREX – Datenbank (http://www.licr.org/SEREX.html) zu finden.

2.7 Fragestellung der Arbeit

Zahlreiche Tumore exprimieren Proteine, die sowohl eine zelluläre als auch eine humorale Immunantwort auslösen können. Eine Immuntherapie soll diese Immunantworten spezifisch verstärken. Ziel dieser Arbeit war es nun, derartige Antigene bei der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) zu identifizieren. Cancer – Germline – Antigene (CG – AGs) sind Antigene, deren Expression auf Tumor – und Keimzellgewebe beschränkt ist. Bei Immuntherapien, die gegen solche CG – AGs als Targetstrukturen gerichtet sind, ist die Gefahr von Autoimmunphänomenen als Nebenwirkung der Immuntherapie nicht zu erwarten. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, speziell diese Antigene mittels der SEREX – Methode auf Basis einer Testis – cDNA – Phagen – Bibliothek bei der AML zu identifizieren.
Langfristige Ziele dieses Ansatzes sind die weitere Charakterisierung neuer T – und B – Zell – Epitope der neu identifizierten Tumor – / Leukämie – assoziierte Antigene (TAAs / LAAs) im Hinblick auf eine T – Zell – basierte und / oder eine Antikörper – Immuntherapie.

3. Material und Methoden

3.1 Methoden

3.1.1 Das SEREX – Verfahren

Für das SEREX - Verfahren wurde zunächst nach dem mehrfach publizierten Verfahren eine Testis – cDNA – Expressionsbibliothek generiert [43, 44, 128]. Mittels λ – Phagen wurden *E. coli* mit dieser cDNA infiziert. Die Information in der cDNA – Phagenbibliothek wurde somit in Proteine umgeschrieben, die auf Nitrozellulose – Membranen gleich einem Immunoblot transferiert wurden. Nach Inkubation mit Seren von AML – Patienten binden bei hohem IgG – Titer Antikörper gegen das entsprechende Antigen. Dieses IgG wurde mittels anti – humanen – IgG – Antikörpern, die gekoppelt an alkalische Phosphatase waren, durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht. Positive Klone wurden isoliert, das enthaltene Plasmid präpariert, sequenziert und nach Homologien mit bekannten Genen gesucht. Mit den vielversprechenden Klonen wurde zuletzt ein Immunoscreening durchgeführt, um die Häufigkeit der serologischen Immunantworten bei AML – Patienten mit der von gesunden Probanden zu vergleichen.

3.1.2 Gewinnung der Testis – cDNA – Phagen – Bank

Die Präperation der Testis – cDNA – Phagen – Bank wurde entsprechend dem mehrfach publizierten Verfahren zur Erstellung von cDNA – Expressionsbanken [43, 44, 128] durchgeführt.

Die RNA, die der Erstellung der cDNA – Bank zugrunde lag, wurde aus dem Hoden eines aus therapeutisch orchiektomierten Patienten mittels der Phenol / Chloroform – Methode [27] extrahiert. Eine Einverständniserklärung dieses Patienten liegt vor.

Die Präparation und Aufreinigung der mRNA erfolgte säulenaffinitätschromatographisch unter Verwendung eines mRNA – Isolationskits (mRNA Purification Kit, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). Da mRNA im Gegensatz zu anderer RNA einen Poly(A) – Anfangsteil besitzt, bindet mRNA spezifisch an die Oligo – dTs der Sepharosematrix der Säulen. Diese gebundene mRNA konnte im Anschluss eluiert werden. RNA – Moleküle sind

relativ instabil und somit auch schwer zu amplifizieren. Deshalb mussten sie zunächst in stabile Doppelstrang – DNA umgeschrieben werden. Die Herstellung der cDNA – Phagen – Bibliothek erfolgte mit 5 µg mittels ZAP – Express cDNA synthesis kit und ZAP – Express cDNA Gigapack III Gold cloning kit (beide Stratagene, La Jolla, CA, USA). Zur First – Strand – Synthese wurde mit Oligo(dT) – Primer mit einer internen Xho1 – Restriktionsstelle durchgeführt, der an die poly(A) – Teil bindet. Weiter fanden zur Transkription 5 – Methyl – dCTP, dNTPs und Moloney murine leukemia virus reverse transkriptase (MMLV – RT) ohne RNase – Aktivität Verwendung. Aufgrund der Zugabe von methylisiertem dCTP erhielten wir eine hemimethylisierte cDNA. Dadurch wurde die cDNA vor einer Verdauung durch bestimmte Endonukleasen wie Xho1 geschützt. Mit RNAse, DNA – Polymerase I und dNTPs wurde der Second Strand synthetisiert, so dass nun eine hemimethylisierte Doppelstrang – DNA vorlag. Nach der Bindung von EcoR1 – Adapter an die freien Enden der Doppelstrang – DNA erfolgte ein enzymatischer Verdau mit Xho1 – Restriktions – Endonukleasen.

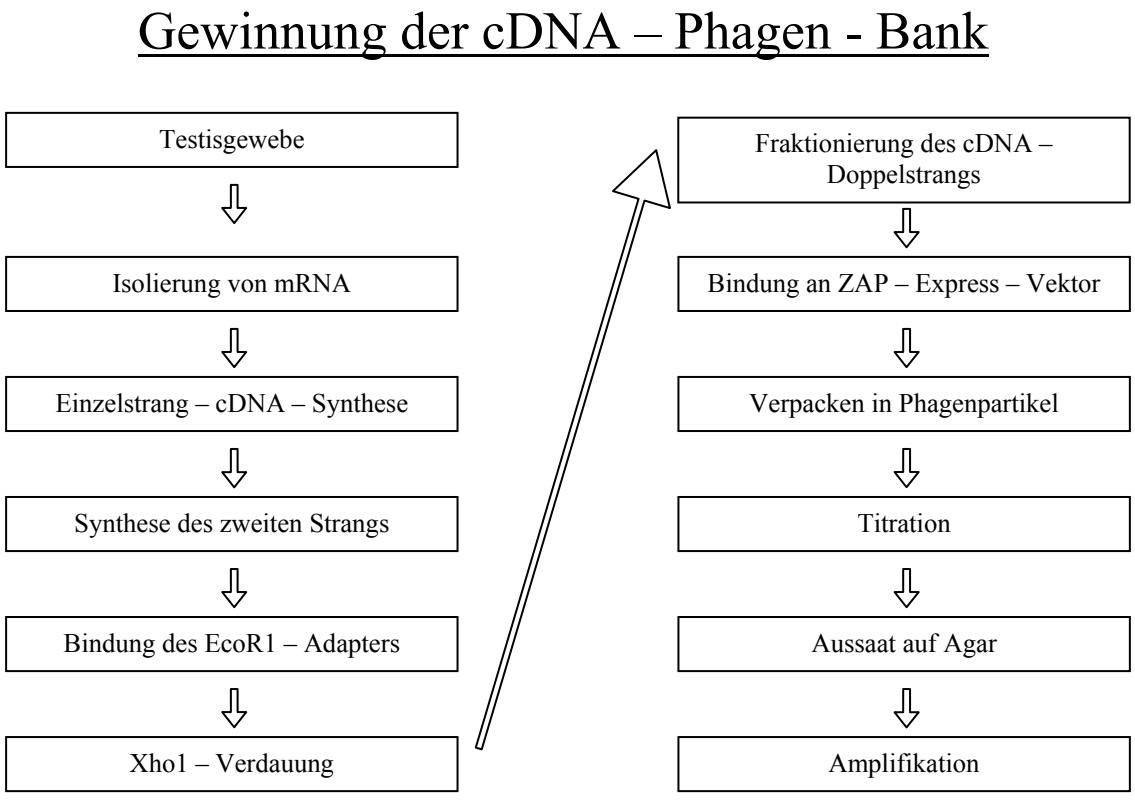

Abb. 2: Gewinnung der cDNA – Phagen – Bank

Aufgrund des hemimethylisierten Zustands der cDNA erfolgte lediglich eine Spaltung der Xho1 – Restriktionsstelle im Primer wodurch der EcoR1 – Adapter wieder abgespalten wurde. Die so gewonnenen cDNA – Fragmente wurden mit Hilfe von Sepharose CL – 2B Gel gefüllten Säulen der Größe nach fraktioniert. Die aufgetrennte cDNA wurde an den ZAP – Express – Vektor (Stratagene, La Jolla, CA, USA) gebunden, aus welchem der Kanamycin – resistente pBK – CMV – Phagemid – Vektor herausgeschnitten werden konnte [141], und anschließend in Phagenpartikel mittels Gigapack III Gold packaging Extract (Stratagene, La Jolla, CA, USA) gepackt.

Für die erste Titration der cDNA – Phagen – Bank wurde zu *E. coli XL1 MRF blue* – Phagenlösung pipettiert und zur Transfektion 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von NZY – Topagar, IPTG – Lösung und X – Gal wurde das Gemisch auf NZY – Agarplatten ausgebracht. Nach einer Inkubationszeit von 6 – 8 h bei 37 °C waren die Plaques sichtbar. Die Anzahl lag bei > 200.000 Klonen, was etwa 10^8 pfu / ml entspricht.
Da die Phagen – DNA als Insert im *E. coli* – Genom das Enzym für den X – Gal – Abbau außer Funktion setzt, können nur *E. coli* ohne dieses Insert X – Gal (5 – Bromo – 4 – Chloro – 3 – Indolyl – ß – D – Galaktopyranoside) verstoffwechseln und erscheinen deshalb blau gefärbt. Die Farbreaktion wurde erst nach einer Inkubation über Nacht sichtbar. Das Verhältnis zwischen blau gefärbten Kolonien ohne Insert und ungefärbten weißen Kolonien, die ein Insert aufweisen, sollte etwa 1 : 100 bis 1 : 10 betragen.

Um eine stabile cDNA – Bibliothek mit hohem Titer an Bakteriophagen zu erhalten, musste einmalig eine Amplifikation durchgeführt werden. Dazu wurden *E. coli* mit den cDNA – Phagen transfiziert, auf Agarplatten aufgebracht und SM – Puffer zugegeben. Nach Inkubation über Nacht wurde der SM – Puffer mit der Bakteriensuspension abpipettiert und die darin enthaltenen Bakterien wurden mit 5%igem Chloroform abgetötet. Nach Zentrifugation ergab sich eine Klonzahl von > 1 x 10^8 / ml. Die Größe der Inserts lag zwischen 600 und 3.000 bp. Eine mehrmalige Amplifikation sollte nicht durchgeführt werden, da es ansonsten zu einer Überrepräsentation bestimmter Klone kommen kann.

Diese Testis – cDNA – Phagen – Bibliothek wurde mir freundlicherweise von PD Dr. Michael Schmitt, Dr. Jochen Greiner und Dr. Masanori Taniguchi zur Verfügung gestellt.

3.1.3 Präabsorption

Bevor mit dem SEREX – Verfahren begonnen werden konnte, wurden Seren von Patienten benötigt. Dafür wurde AML – Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose vor Beginn einer Chemotherapie eine Vollblutprobe entnommen. Die Proben wurden bei 1.200 U / min zentrifugiert. Das Serum musste abpipettiert werden um Verunreinigungen mit Blutzellen zu vermeiden. Für die folgenden Experimente war eine Verdünnung von 1 : 100 nötig. Dafür wurde eine 1 % Albumin – TBS – Lösung hergestellt. Zu dieser wurde 0,01 % Natriumazid zugegeben um bakteriellen Verunreinigungen vorzubeugen und zuletzt wurde dazu Patientenserum 1 % pipettiert. Damit das Patientenserum für die Screenings verwendet werden konnte, mussten zunächst *E. coli* – und Bakterophagenantikörper eliminiert werden (Präabsorption). Ansonsten würde es zu falsch positiven Ergebnissen führen.
Man geht dafür folgendermaßen vor: Entsprechend dem nachfolgenden Teil (3.1.4) erfolgte die Transfektion einer Bakteriensuspension (OD = 0,5) mit einer Testis – cDNA – Bank, die Bebrütung dieser Bakterien und das Auflegen der Nitrozellulosemembranen. Nach dem Blocken und mehreren Waschschritten wurden die Membranen über Nacht in den zu präabsorbierenden Seren inkubiert. Bei diesem Schritt sollten die Antikörper gegen *E. coli* und gegen die verwendeten Bakterophagen aus dem jeweiligen Seren beseitigt werden. Da die Membranen daraufhin nicht mehr benötigt wurden, konnten sie verworfen werden. Um falsch positiven Ergebnisse weitgehend ausschließen zu können, muss die Präabsorption für 20 ml Patientenserum mit einer Verdünnung von 1 : 100 mit mindestens 50 Membranen durchgeführt werden.

3.1.4 Erstes Screening

3.1.4.1 Herstellung der Bakteriensuspension

Am Vortag wurde eine Kolonie von *E. coli XL1 MRF blue* in 12 ml Plastikröhrchen mit 6 ml LB – Medium mit Maltose angesetzt. Die Bakterien wurden daraufhin über Nacht im Brutschrank bei 37 °C auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Bakterienlösung 10 min bei 1.800 U / min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit einer 1 mM $MgSO_4$ gewaschen und nochmals zentrifugiert. Nachdem das Pellet erneut mit 1 mM $MgSO_4$ in Suspension gebracht wurde, wurde die

Bakteriensuspension im Photometer auf eine OD von 0,5 bei einer Wellenlänge von 600 nm eingestellt.

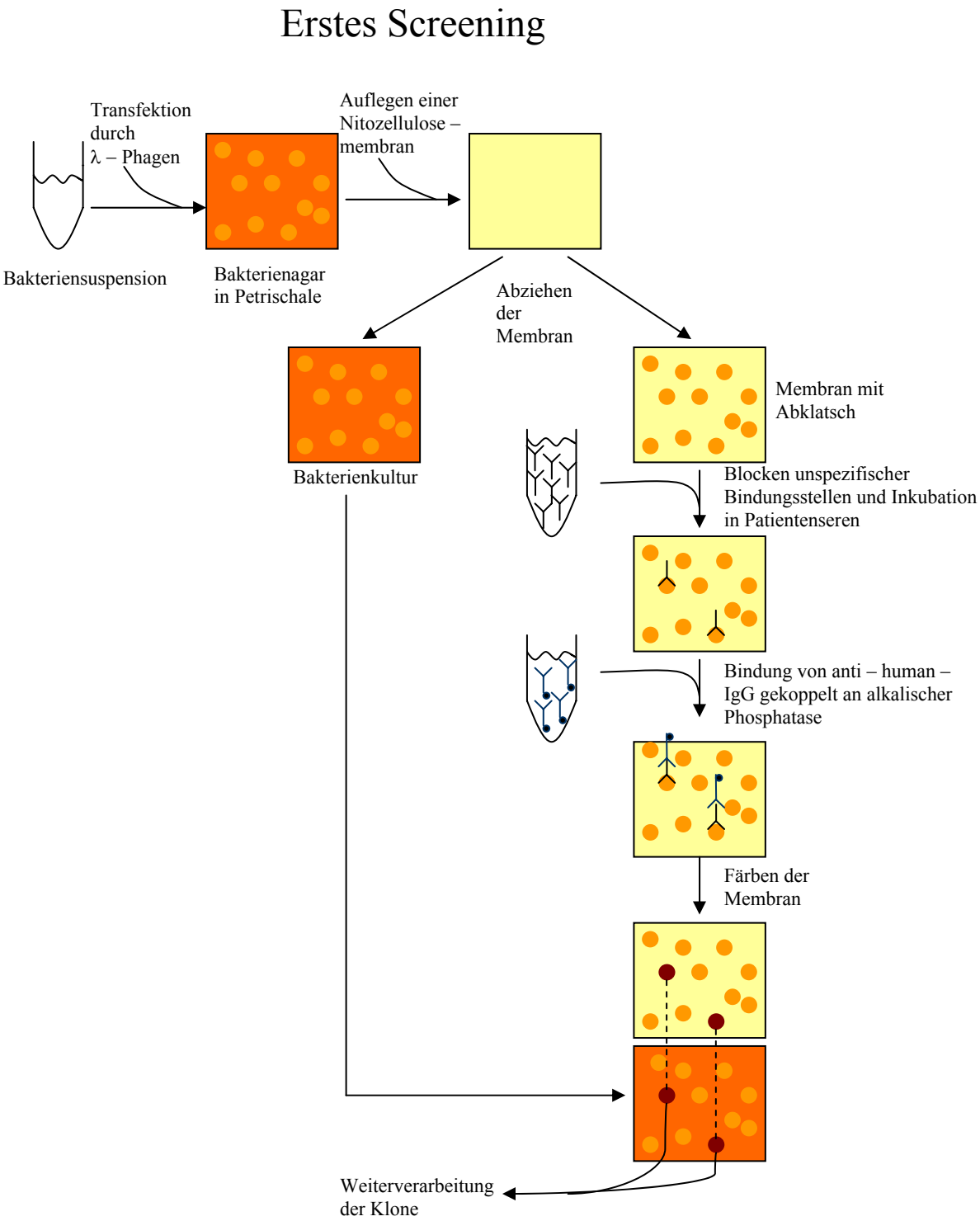

Abb. 3: Durchführung des Ersten Screenings

3.1.4.2 Transfektion der Bakterien

Zur Transfektion wurden je 200 µl dieser Bakterienlösung in 15 ml Reagenzröhrchen pipettiert und mit 2 µl der verdünnten Testis – cDNA – Phagen – Bank (3.1.2) gemischt. Dadurch sollten sich später etwa 2.000 PFUs auf den Agarplatten bilden. Als Positivkontrolle diente ein PINCH – Klon (particularly interesting new Cys – His protein). Dazu wurden zu 200 µl Bakterienlösung 1 µl der Phagenbibliothek und 7 µl des PINCH – Klons (Verdünnung 1 : 100) in ein 15 ml Reagenzröhrchen pipettiert. Während der nachfolgenden Inkubations – zeit von circa 20 min erfolgte unter mehrmaligem Schütteln die Transfektion der Bakterien durch die λ – Phagen. Im Anschluss daran wurden nacheinander in die Röhrchen etwa 5 ml des flüssigen NZY – Topagar (60 °C) gegossen und nach kurzem Schwenken gleichmäßig auf die trockenen und vorgewärmten Agarplatten verteilt. Nach Erhärten des Topagars wurden die Platten umgekehrt für etwa 6 h bei 37 °C im Brutschrank bebrütet.

3.1.4.3 Blotten der exprimierten Proteine

Nach dieser Zeit wurden Nitrozellulosemembranen (110 mm x 110 mm) in 0,24 % (w/v) IPTG (Isopropyl – β – D – Thio – Galaktosid) getränkt. Die teilgetrockneten Membranen wurden luftblasenfrei auf den entstandenen Bakterienrasen gelegt. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C im Brutschrank bildete sich unter den Membranen ein Bakterienrasen mit kleinen Löchern. Diese sogenannten PFUs (plaque forming unit) entstanden an den Stellen, an denen die Transfektion stattgefunden hatte. Die PFUs enthielten Fragmente von lysierten Bakterien, Bakteriophagenmaterial und die von den Bakterien exprimierten Proteine. Durch das Auflegen der Nitrozellulosemembranen wurden die Proteine hieran geblottet.

3.1.4.4 Blocken der Nitrozellulosemembranen

Am nächsten Morgen wurden die Membranen mit der Pinzette vorsichtig vom Agar abgezogen. Eventuell anhaftende Agarreste wurden vorsichtig von den Membranen gelöst, worauf diese dreimal für 10 min auf dem Horizontalschüttler in TBS – T – Lösung gewaschen wurden. Die Petrischalen wurden zur Aufbewahrung bei 4 °C in den Kühlraum gestellt. Um eventuell vorhandene freie Proteinbindungsstellen zu blocken, mussten die Membranen nach den Waschschritten in 300 ml 5 % (w/v) Low Fat Milk (15 g Milchpulver

in 300 ml TBS) für 90 min gegeben und auf dem Horizontalschüttler bei Raumtemperatur inkubiert werden.

3.1.4.5 Inkubation mit dem Serum von AML-Patienten

Nach dem Blocken wurden die Membranen erneut zweimal mit TBS – T – Lösung und zum Schluss einmal mit TBS – Lösung für je 10 min auf dem Horizontalschüttler gewaschen. Gleichzeitig wurde in Petrischalen (120 mm x 120 mm), die zuvor mit 5 %iger BSA – Lösung inkubiert wurden, etwa 30 ml eines präabsorbierten Serummix von vier AML – Patienten (Verdünnung 1 : 100) pipettiert. Anschließend wurden die abgetropften Membranen in das Serum gegeben und für je 1 min darin geschwenkt. Die weitere Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C im Kühlraum auf einem Horizontalschüttler. Während dieser Zeit konnten die Antikörper im Patientenserum an die geblotteten Proteine auf den Membranen binden.

3.1.4.6 Kopplung von anti – human – IgG an die rekombinanten Proteine

Um die nicht gebundenen Reste des Serums von den Membranen zu entfernen, wurden am darauf folgenden Tag die Membranen (2 x 10 min mit TBS – T – Lösung und 1 x 10 min mit TBS – Lösung) auf dem Horizontalschüttler gewaschen. Nach diesen Waschschritten erfolgte die spezifische Bindung von anti – humanen – IgG – Antikörpern, die an alkalische Phosphatase gekoppelt waren, an die Fc – Region der Patientenantikörper auf den Nitrozellulosemembranen. Dafür wurden die anti – humanen – IgG – Antikörpern gekoppelt an alkalische Phosphatase (alkaline phosphatase – conjugated affinipure goat anti – human IgG, Dianova GmbH, Hamburg, Germany) in einem Verhältnis von 1 : 2.000 in TBS mit 1 % BSA gelöst und daraufhin in Petrischalen (120 mm x 120 mm) pipettiert (circa 35 ml). Damit die Antikörper genügend Zeit hatten an die membrangebundenen Proteinen zu binden, erfolgte eine Inkubation für eine Stunde auf dem Horizontalschüttler bei Raumtemperatur.

3.1.4.7 Detektion gebundener Antikörper

Um die nichtgebundenen Antikörper zu beseitigen, wurden im Anschluss daran die Membranen dreimal mit TBS – Lösung wiederum für je 10 min gewaschen. Währenddessen wurde das Färbemittel (Sigma fast BCIP / NBT, Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA) vorbereitet (für je 2 – 3 Membranen: 2 Tabletten / 25 ml H_2O bidest.). BCIP / NBT (5 – Bromo – 4 – Chloro – 3 – Indolylphosphat / nitro blue tetrazolium) wird mittels einer enzymatischen Reaktion durch die alkalische Phosphatase (Orthophosphorsäure – Monoester – Phosphohydrolase) umgesetzt. An der Stelle von positiven PFUs – Plaques, an die Serumantikörper gebunden hatten, entstanden auf den Membranen lilafarbene Punkte.
Da der Farbstoff sehr lichtempfindlich ist, sollte für diesen Schritt bei reduzierter Beleuchtung gearbeitet werden. Der gelöste Farbstoff wurde in Petrischalen (120 mm x 120 mm) gegeben und darin wurden nacheinander die Membranen gefärbt. Die Membranen waren fertig, sobald zu den eventuell vorhandenen positiven Plaques auch ungefärbte negative Plaques erkennbar waren. Nach dem Waschen in TBS wurden die Membranen getrocknet.

3.1.4.8 Auswertung und Isolierung positiver PFU´s

Erscheint auf den Membranen ein deutlicher lilafarbener Punkt, so wurde dieser markiert und der entsprechende Klon auf der Agarplatte aufgesucht. Dieser positive Klon wurde mit einer sterilen Einmalglaspipette ausgestanzt und in 500 µl SM – Puffer gegeben. Diese Ausstanzung sollte großzügig erfolgen, damit der Klon sicher aufgenommen war. Zudem waren auch „Verunreinigungen“ mit benachbarten negativen Klonen erwünscht, da sie beim Zweiten Screening als negativer Hintergrund dienten. Bis zu diesem Schritt wurden die Klone bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

3.1.5 Zweites Screening

3.1.5.1 Verdünnung

Um die ausgestanzten Klone auf ihre positive Reaktion zu testen, wurde ein zweites Screening durchgeführt. Vor diesem zweiten Screening musste noch eine Titration der Klonsuspension erfolgen, um das Volumen der Suspension festzustellen mit dem später weitergearbeitet werden soll. Dafür wurden die Klonsuspensionen zunächst mit SM – Puffer auf ein Verhältnis von 1 : 100 verdünnt.

3.1.5.2 Titration

Die Titration verläuft ähnlich des Ersten Screenings. Zunächst wurden 200 µl einer Bakterienlösung (*E. coli XL1 MRF blue*) mit OD 0,5 in 15 ml Reagenzröhrchen pipettiert. In diese wurden nacheinander 5 µl der 1 : 100 Verdünnung der jeweiligen positiven Klone des vorangegangenen Ersten Screenings pipettiert. Nach der Transfektionzeit, wie in 3.1.4.2 beschrieben, wurden sie zusammen mit etwa 6 ml Topagar gleichmäßig auf trockene und vorgewärmte Agarplatten verteilt, worauf sie über Nacht im Brutschrank inkubiert wurden. Am nächsten Tag konnten dann die Anzahl der Plaques bestimmt werden. Für das Zweite Screening wurden auf den Platten etwa 200 – 400 Plaques auf dem Bakterienrasen benötigt, damit die einzelnen PFUs sicher von einander abgrenzbar waren und nicht ineinander konfluierten. Folglich musste die Menge der Klonsuspension berechnet werden, die dieser Anzahl von Plaques entsprach.

3.1.5.3 Zweites Screening

Das Vorgehen beim Zweiten Screening entsprach prinzipiell dem des Ersten Screenings (3.1.4). Der einzige Unterschied bestand darin, dass anstatt der Testis – Bank die zuvor berechnete Menge der Klonsuspension gegeben wurde.
Nach der Färbereaktion sollten Membranen vorliegen bei denen ein Großteil der PFUs positiv waren und zugleich ein negatives Hintergrund zu erkennen war. Damit man einen einzelnen Klon erhielt, wurden zwei gut angefärbte, einzelne Plaques gesucht. Die entsprechenden Klone wurden daraufhin, wie in 3.1.4.8 beschrieben, ausgestanzt und in je 500 µl SM – Puffer gegeben. Um einen reinen Klon zu erhalten, musste jedoch diesmal

darauf geachtet werden, dass keine Verunreinigung durch negative Klone mit in dem Puffer gelöst wurden.

3.1.6 Plasmidextraktion

Um das Antigen zu identifizieren, gegen welches Antikörper des Patientenserengemisch gebunden hatten, musste zunächst die Plasmid – cDNA aus den Lambda – Phagen isoliert werden. (Abb. 4)

Dafür wurde zunächst eine *E. coli* – Kolonie vom Stamm *XL1 – MRF blue* in 7 ml LB – Medium mit Maltose und eine Kolonie vom Stamm *XLOLR* in 7 ml NZY – Medium gelöst und über Nacht bei 37 °C im Horizontalschüttler inkubiert.

Am nächsten Tag wurden sie entsprechend 3.1.4.1 im Photometer auf eine OD (optical density) von 1,0 bei einer Wellenlänge von 600 nm gebracht. Im Anschluss daran erfolgte die Transfektion. Dafür wurden 200 µl der *E. coli XL1 – MRF blue* – Suspension, 250 µl der Lambdaphagenlösung eines ausgestanzten positiven Klons und 1 µl des ExAssist Helferphagen in Reagenzröhrchen pipettiert. Diese Röhrchen wurden für 15 min bei 37 °C im Horizontalschüttler inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Bakterien von beiden Phagentypen befallen (Transfektion). Nach den 15 min wurde in jedes Röhrchen 3 ml NZY – Medium pipettiert, worauf eine weitere Inkubation über Nacht im Horizontalschüttler erfolgte. Währendessen wurde in Bakterien, die sowohl mit Lambdaphagen als auch mit dem Helferphagen transfiziert wurden, das Phagemid mit dem cDNA – Insert durch Enzyme des Helferphagen aus der Lambdaphagen – DNA exzidiert. Das Phagemid mit dem cDNA – Insert wurde dann im Bakterium in Hüllproteine verpackt, aus der Zelle ausgeschleust und befand sich in der Suspension.

Am folgenden Tag wurde die Suspension im Wasserbad für 20 min auf 65 – 70 °C erhitzt und dabei die Bakterien abgetötet. Um die Phagenlösung von den Bakterientrümmern zu trennen, wurden die Suspensionen bei 1.500 U / min für 15 min zentrifugiert. 1 ml des Überstandes mit dem pBK – CMV Phagemid – Vektors wurde in sterile 2 ml Eppendorfgefäße überführt. Zum Aufbewahren wurde zusätzlich nochmals je 1 ml des Überstandes in ein 2 ml Eppendorfgefäß pipettiert. 100 µl der Phagenlösung wurde zu

200 µl der *E.coli* vom Stamm *XLOLR* (OD 1,0) in 15 ml Reagenzröhrchen pipettiert und anschließend für 15 min bei 37 °C auf dem Horizontalschüttler inkubiert. Danach wurden 300 µl NZY – Medium dazugegeben und erneut für 45 min bei 37 °C im Horizontalschüttler inkubiert. Mit 30 µl dieses Ansatzes wurden vorgewärmte LB – Kanamycin – Platten beimpft. Nachdem sie getrocknet waren, wurden sie umgekehrt über Nacht im Brutschrank bebrütet. Da der pBK – CMV Phagemid – Vektor auch eine Kanamycinresistenz enthält, konnten nur Bakterien wachsen, die diesen Vektor enthielten. Der Helferphage, der in der Phagenlösung noch vorhanden war, ist durch eine Mutation, welche die Amplifikation in *XLOLR* – Stämmen verhindert, nicht in der Lage sich zu vermehren. Zudem fehlt ihm das Gen für Kanamycinresistenz. Somit gingen die Bakterien zugrunde, welche nur mit dem Helferphagen transfiziert wurden. Aufgrund der Resistenz des *XLOLR* – Stammes gegenüber einer Transfektion durch Lambdaphagen wurde eine Transfektion durch eventuell noch vorhandene Lambdaphagen ausgeschlossen.

Nach der Inkubation wurde jeweils eine der *E.coli XLOLR* – Kolonien in je 3 ml LB – Kanamycin – Medium (Verdünnung 1 : 1.000) eingerührt. Diese Suspensionen wurden wiederum für 24 h bei 37 °C im Horizontalschüttler inkubiert.

Am folgenden Tag erfolgt die Plasmidisolierung mittels QIAprep Spin Miniprep Kit (250) (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland). Zunächst wurden die Bakteriensuspensionen bei 3.000 U / min für 10 min zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Das Pellet (Bakterien) wurde mit 250 µl des RNAse A – haltigen Resuspensionspuffers P1 in Lösung gebracht und in 2 ml Eppendorfgefäße gegeben. Zu dieser Suspension wurden 250 µl Lysis – Puffer P2 pipettiert und gemischt. Die Eppendorfgefäße wurden für maximal 5 min gelegentlich geschwenkt, damit der Lysis – Puffer die Membranen der Bakterien gut auflösen konnte. Bei Puffer P2 handelte es sich um einen alkalischen und SDS – haltigen Puffer. SDS solubilisiert Phospholipide und Proteine der Zellmembran. Dadurch führte es zur Freisetzung der Zellbestandteile. NaOH denaturierte sowohl Proteine, hochmolekulare DNA als auch Plasmid – DNA. Durch die RNAse des Puffers P1 wurde die freiwerdende RNA zerstört.
Danach wurden 350 µl eines Puffers mit hoher Salzkonzentration (Neutralisationspuffers N3), der die RNAse und Tenside unschädlich machen soll, schnell dazugegeben, auf Eis gestellt und wiederum gelegentlich geschwenkt. Die Präzipitate aus SDS, denaturiertem Protein, hochmolekularer DNA und Zelldebris flockten aus. Die Plasmid – DNA renaturierte korrekt und blieb gelöst.

Während dem folgenden Zentrifugieren für 10 min bei 13.000 U / min bildete die chromosomale Bakterien – DNA, die an die Zellmembran gebunden war, das Pellet. Die Plasmid – DNA, die gelöst im Zytoplasma vorlag, befand sich im Überstand. Der Überstand wurde in die QIAprep spin columns gegeben und nochmals für 60 s bei 13.000 U / min zentrifugiert. Die Plasmid – DNA blieb dabei in den Silica – Gel – Membranen hängen. Die durchgelaufene Flüssigkeit wurde verworfen. Die Silica – Gel – Membranen binden selektiv die Plasmid – DNA in Anwesenheit von hochkonzentrierter Salzpufferlösung. Bei Puffern mit niedriger Salzkonzentration lässt sich die DNA auswaschen. Durch geeignete Pufferwahl ließ sich somit sicherstellen, dass nur die Plasmid – DNA, nicht jedoch RNA, zelluläre Proteine oder Metaboliten gewonnen wurden. Dies geschah folgendermaßen: Um eventuell vorhandene Endonukleasen zu beseitigen, wurden die Säulen mit 0,5 ml Puffer PB gewaschen, zentrifugiert (60 s bei 13.000 U / min) und der Durchfluss verworfen. Zum Auswaschen von Salzen wurden im Anschluss daran auf die Säulen 0,75 ml Puffer PE pipettiert und diese wiederum zentrifugiert (60 s bei 13.000 U / min). Auch dieses Eluat wurde verworfen. Um sicherzugehen, dass keine Pufferrückstände zurück blieben, wurden die Säulen nochmals zentrifugiert (60 s bei 13.000 U / min) und der Durchfluss verworfen. Dies war nötig, da Puffer PE – Reste, welche Ethanol enthielten, die folgenden enzymatischen Reaktionen inhibieren könnten. Durch die erniedrigte Salzkonzentration erfolgte zuletzt die Elution der Plasmid – DNA mit 50 µl sterilem destilliertem Wasser. Nach einer Inkubationszeit des Wassers in den Säulen von einer Minute und anschließendem Zentrifugieren (60 s bei 13.000 U / min) wurden die Trichter nicht mehr benötigt. 2 µl der Suspension wurden mit sterilem destilliertem Wasser auf 100 µl verdünnt, der Rest wird im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

Mit dieser Verdünnung (1 : 50) erfolgte die Konzentrationsbestimmung der Plasmid – DNA – Lösung mit dem Photometer. Daraufhin musste für den folgenden Restriktionsansatz und für die folgende PCR auf die Ursprungskonzentration zurückgerechnet werden.

3.1.7 Restriktionsansatz

Um die Länge des Inserts zu bestimmen, musste es mittels Restriktionsendonukleasen wieder aus dem Vektor herausgetrennt werden (Abb. 4). Dafür wurden dieselben Restriktionsendonukleasen verwendet wie bei der Klonierung in den Vektor: Eco R1 und

Xho 1. Der Restriktionsansatz besteht aus 1 µg DNA, 2 µl Sure Cut Buffer, 1 µl Eco R1, 1 µl Xho 1 und sterilem destilliertem Wasser. Das Volumen des Wassers wurde so gewählt, dass man ein Gesamtvolumen von 20 µl erhielt. Dieser Ansatz musste bei 37 °C für mindestens eine Stunde im Horizontalschüttler inkubiert werden. Während dieser Zeit schnitten die Restriktionsendonukleasen das Insert aus dem Plasmid heraus. Bei zufälligen Schnittstellen im Insert entstanden mehrere DNA – Fragmente, deren Einzellängen addiert werden mussten.

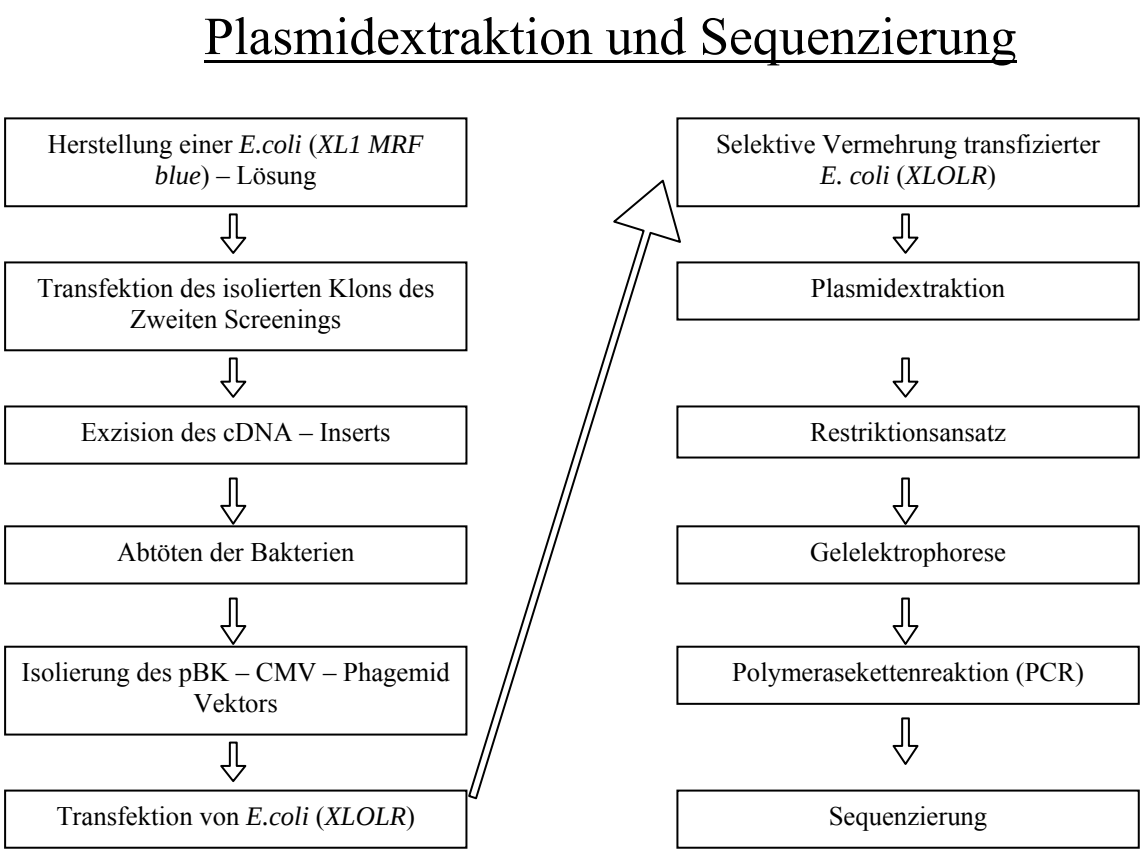

Abb. 4: Durchführung der Plasmidextraktion und Sequenzierung

Nach der Inkubationszeit wurden 7 µl der DNA – Suspension des Restriktionsansatzes mit 3 µl Jodfarbstoff gemischt und auf ein 1,5 %iges PCR – Gel (100 ml TBE 1 % mit 1,5 g Agarose) gegeben. Als Größenmarker wurde 3 µl DNA Molecular Weight Marker zu 3 µl Jodfarbstoff pipettiert und auch auf das PCR – Gel aufgetragen. Die DNA wurde daraufhin bei einer Gleichspannung von 140 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die negativ geladenen Fragmente wanderten größenabhängig unterschiedlich weit im elektrischen Feld.

Sobald der Jodfarbstoff das Gel fast durchlaufen hatte, wurde die Elektrophorese abgebrochen und das Gel in eine Ethidiumbromidlösung (EtBr – Lösung) gelegt. Das Ethidiumbromid interkalierte sequenzunspezifisch an dem DNA – Doppelstrang. Nach einer halben Stunde wurde das Gel mit Wasser gewaschen und anschließend wurden die DNA – Banden im Eagle Eye unter UV – Licht (λ = 300 nm) sichtbar gemacht und abfotografiert. Durch das Ethidiumbromid emittierten diese bei UV – Bestrahlung mit 300 nm Licht der Wellenlänge 590 nm. Die unterste Bande entsprach dem Vektor, die Bande(n) darüber dem Insert bzw. den Fragmenten des Inserts. Es war nun einerseits möglich, die Größe des Inserts zu bestimmen und andererseits konnten die Inserts zu einer ersten groben Abschätzung der Redundanz verglichen werden.

3.1.8 Sequenzierung

Für jeden Klon, der in der Single – clone – Excision gewonnen wurde, wurden zwei Sequenzier – Ansätze gemacht. Dafür wurden jeweils 600 ng der Plasmid – DNA benötigt. Diese wurde auf ein Volumen von 4 ml mit sterilem destilliertem Wasser verdünnt. Zu dieser Lösung wurden 1,6 µl Primer und 4,4 µl Master Mix – dieser enthält thermostabile Polymerase [130], Nukleotide (dNTP und ddNTP) und Puffer – hinzupipettiert und gut gemischt. Für den ersten Ansatz wurde der Primer T3 (5’ – AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG – 3’), für den Zweiten Primer T7 (5’ – GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C – 3’) gewählt. Diese lesen den Plasmidcode in unterschiedlicher Reihenfolge. Durch den Einbau von fluoreszenzmarkierten ddNTP’s des Mastermixes bei der Synthese des Second Strain konnten Kettenabbrüche nach jeder beliebigen Base erfolgen und es entstanden Fragmente unterschiedlicher Länge.

Im Anschluss daran wurden die Ansätze in das PCR – Gerät zur selektiven Anreicherung von bestimmten Nukleinsäuresequenzen der Plasmid – DNA gegeben. Die PCR beginnt zunächst mit dem Denaturieren (2 min bei 96 °C). Daraufhin folgen 28 Zyklen mit 10 s Denaturieren bei 96 °C, 5 s Annealing bei 55 °C und 4 min bei 60 °C für die Elongation.

Nach der PCR wurden die Proben mit 90 µl sterilem destilliertem Wasser verdünnt. 0,5 ml Eppendorfgefäße wurden mit 250 µl 95 %igem Ethanol und 16 µl NaAc (3M) vorbereitet und die verdünnten DNA – Proben dazugegeben. Nach kurzem Vortexen wurden die Eppendorfgefäße für 30 min bei 13.000 U / min zentrifugiert. Der Überstand wurde grob abpipettiert, so dass das winzige Pellet erhalten blieb. Nach Zugabe von 0,5 ml 70 %igen

Ethanol wurden die Proben für 10 min bei 13.000 U / min zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abpipettiert und das Pellet anschließend im Vakuumtrockner SpeedVac für etwa ein bis zwei Minuten getrocknet und dadurch von Ethanolresten befreit. Diese getrocknete DNA wurde in 20 µl sterilem destilliertem Wasser unter häufigem Resuspendieren gelöst und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Nach einem zweiminütigem Erhitzen auf 95 °C zur Trennung der DNA – Doppelstränge, wurden die Proben in das Sequenziergerät gegeben. Dort erfolgte zunächst die größenabhängige elektrophoretische Auftrennung der negativ – geladenen DNA – Abschnitte bei einer Spannung von 15 kV. Da die endständigen Basen (ddNTP) fluoreszenzmarkiert waren, konnten diese anschließend mit Laserlicht definierter Wellenlänge analysiert werden.
Die Ergebnisse wurden mit Hilfe von BLAST – Search [4] des National Center of Biotechnology Information (NCPI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov) ausgewertet.

3.1.9 Immunoscreening mit allogenen Seren

Um eine Vorstellung von der Häufigkeit der Immunogenität der identifizierten Klone bei AML – Patienten zu erhalten, wurde nun mit den vielversprechenden Klonen ein Immunoscreening durchgeführt. Dafür wurden die Seren von bis zu 27 AML – Patienten und bis zu 20 gesunder Probanden verwendet. Das allogene Screening verläuft nach dem gleichen Prinzip wie das zweite Screening (3.1.5). Nach der Verdünnung und Titration wurden die *E. coli* (OD: 0,5) vom Stamm *XL1 MRF* blue mit den Lambdaphagen der Testis – cDNA – Bank und mit den ausgestanzten Klonen des Zweiten Screenings transfiziert. Die Volumina wurden so gewählt, dass sich auf den Platten später etwa 500 PFUs befinden, wobei etwa 400 der Bank und 100 dem zu testenden Klon entsprachen.
Für die Inkubation im Serum konnten die Nitrocellulosemembranen in vier gleich große Teile geschnitten werden, damit mehrere Seren gleichzeitig getestet werden konnten.
Ziel dabei war es, die Inzidenz positiver Serum – Antikörper – Antworten bei AML – Patienten und im Vergleich dazu bei gesunden Probanden festzustellen.

3.1.10 Reverse – Transkription – Polymerase – Kettenreaktion (RT – PCR)

Unter der Reverse – Transkription – Polymerase – Kettenreaktion (RT – PCR) versteht man eine Methode zur enzymatischer Vervielfältigung (Amplifikation) bestimmter Sequenzen von komplementärer – DNA (cDNA) *in vitro*.
Die Untersuchung der cDNA – Proben wurde entsprechend dem unten stehenden Pipettierschema (Tab. 1) durchgeführt.

Tab. 1: Pipettierschema der RT – PCR

Reagenz	**Volumen [µl]**
H_2O steril	40
PCR – Puffer in 15mM $MgCl_2$ – Lösung	5
Primer vorwärts	1
Primer rückwärts	1
dNTP's	1
TAQ – Polymerase	1
Probe (cDNA)	1
insgesamt	50

Als Positivkontrolle wurde cDNA der Zelllinie K562 verwendet, mit welcher diese RT – PCR etabliert wurde. Als Negativkontrolle diente destilliertes Wasser. Folgende Primer wurden für die RT – PCR mit einer Konzentration von 100 pmol / µl verwendet:

CMAS forward primer: 5' – GCA TGT CTT ACC ATA CAC ACT GTC C – 3'
CMAS reverse primer: 5' – TTG TGC TCT ACC TTT CTC TTT ACG C – 3'

CENPC 1 forward primer: 5' – CCT TTT AGA CGA TAT TGT GTC TG – 3'
CENPC 1 reverse primer: 5' – CCT CTG ATT TAG GGT GGT AG – 3'

Tabelle 2 zeigt die Bedingungen der RT – PCR für die beiden detektierten Antigene Cytidin – Monophosphat – N – Acetylneuraminsäure – Synthetase (CMAS) und Centromer – Protein C 1 (CENPC1) (Abschnitt 4.3). Die Anzahl der Zyklen betrug jeweils 35.

Tab. 2: RT – PCR – Bedingungen für die Antigene Cytidin – Monophosphat – N – Acetylneuraminsäure – Synthetase (CMAS) und Centromer – Protein C 1 (CENPC 1); Insgesamt wurden 35 Zyklen durchgeführt.

Schritt	**CMAS**		**CENPC 1**	
	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Temperatur [°C]
Initiale Denaturierung	5	95	5	95
Denaturierung	1	95	1	95
Annealing	1	62	1	57
Elongation	1	72	1	72
Finale Elongation	7	72	7	72
Ende	∞	4	∞	4

Um eine Antigen – Expression der Proben – cDNA zu erkennen, wurde im Anschluss eine Elektrophorese des RT – PCR – Produktes entsprechend Abschnitt 3.1.7 durchgeführt. Nach Zugabe von 3 µl Jodfarbstoff zu 7 µl des RT – PCR – Produktes wurde dies auf ein 2 %iges PCR – Gel (100 ml TBE 1 % mit 2,0 g Agarose) aufgetragen und bei einer Gleichspannung von 140 V elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenmarker diente eine 100 bp DNA – Leiter. Nach Inkubation in einer EtBr – Lösung, wurden die DNA – Banden unter UV – Licht (λ = 300 nm) sichtbar gemacht und abfotografiert.

3.2 Materialien

3.2.1 Bakterien

Eschericia coli	*XL - 1 Blue MRF E. Coli* (Stratagene, La Jolla, USA)
	XLOLR E. Coli (Stratagene, La Jolla, USA)

3.2.2 Agar und Lösungen

BSA 5 % (pro Liter):

50 g Albumin bovine fraction V, pH 7

in 1 l demineralisiertes Wasser lösen

C_2H_5OH 70 % (pro Liter)

700 ml C_2H_5OH absolut

300 ml H_2O steril

IPTG (pro Liter):

2,4 g Isopropyl – β – D – Thiogalacto – Pyranoside

in 1 l demineralisiertes Wasser

LB – Kanamycinagar (pro Liter):

10 g NaCl

10 g Trypton

5 g Hefeextrakt

20 g Agar

demineralisiertes Wasser bis zu einem Endvolumen von 1 l zugeben

autoklavieren

bei 50 – 55 °C 1.000 µl Kanamycin zugeben

25 ml in Petrischalen (∅ 100 mm) pipettieren

LB – Medium (pro Liter):

10 g NaCl
10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
demineralisiertes Wasser bis zu einem Endvolumen von 1 l zugeben
autoklavieren

LB – Medium + Maltose (pro Liter):

10 g NaCl
10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
2,46 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$
2 g (w/v) Maltose
demineralisiertes Wasser bis zu einem Endvolumen von 1 l zugeben
autoklavieren

LB – Tetracyclinagar (pro Liter):

10 g NaCl
10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
20 g Agar
demineralisiertes Wasser bis zu einem Endvolumen von 1 l zugeben
autoklavieren
bei 50 – 55 °C 1.000 µl Tetracyclin zugeben
25 ml in Petrischalen (∅ 100 mm) pipettieren

$MgSO_4$ 10 mM (pro Liter):

2,46 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$
in 1 l demineralisiertes Wasser lösen
autoklavieren

NZY – Agar (pro Liter):

5 g NaCl

2 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$

5 g Hefeextrakt

10 g NZ Amin (Casein Hydrolysat)

15 g Agar (Bactoagar)

demineralisiertes Wasser (H_2O bidest.) bis zu einem Endvolumen von 1 l zugeben

autoklavieren

bei 60 °C in Petrischalen gießen (ca. 40 – 50 ml /120 mm Petrischale)

NZY – Medium (pro Liter):

5 g NaCl

2 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$

5 g Hefeextrakt

10 g NZ amine (Casein Hydrolysat)

demineralisiertes Wasser bis zu einem Endvolumen von 1 l zugeben

autoklavieren

NZY – Topagar (pro Liter):

5 g NaCl

2 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$

5 g Hefeextrakt

10 g NZ Amin (Casein Hydrolysat)

0,7% (w/v) Agarose (= 7 g)

demineralisiertes Wasser bis zu einem Endvolumen von 1 l zugeben

autoklavieren

SM – Puffer (pro Liter):

5,8 g NaCl

2 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$

50 ml 1 M Tris – HCl (pH 7,5)

5 ml 2 % (w/v) Gelatine

demineralsiertes Wasser bis zu einem Endvolumen von 1 l zugeben

TBE (pro Liter):

10,8 g Tris
5,5 g Borsäure
2 ml 0,5 M EDTA (pH = 8,0)
demineralsiertes Wasser bis zu einem Endvolumen von 1 l zugeben

TBS (pro Liter):

6 g NaCl
0,2 g KCl
3 g Tris – Puffer
in 1 l demineralisiertes Wasser lösen
mit HCl 37 % auf pH 7,4 einstellen
autoklavieren

TBS – T (pro Liter):

1 l 1 x TBS
1 ml Tween 20

3.2.3 Chemikalien

Sämtliche Laborchemikalien wurden in höchstmöglicher Reinheit von folgenden Firmen bezogen:

- Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
- Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA
- Sigma-Aldrich Chemicals, Deisenhofen, Deutschland
- GibcoBRL™, Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
- Becton Dickinson, Sparks, USA
- Cambrex Bio Science, Rockland, USA
- USB Corporation, Cleveland, USA
- Invitrogen, Carlsbad, USA
- Delta Select GmbH, Pfullingen, Deutschland

3.2.4 Spezielle Chemikalien, Marker und Antikörper

Antibiotika:	Kanamycin (GibcoBRL, Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) Tetracyclin (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)
Antikörper:	Dianova alkaline Phosphatase – conjugated Affini Pure Goat Anti-Human IgG, Fcγ Fragment Specific (Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland)
BSA:	Albumine bovine fraction V, pH 7,0 (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)
Enzyme:	EcoR1 (Boehringer GmbH, Mannheim, Deutschland) Xho1 (Boehringer GmbH, Mannheim, Deutschland)
Färbemittel:	SIGMA FAST™ 5 – Bromo – 4 – Chloro – 3 – Indolyl Phosphate / Nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT) (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)
Helferphage:	Ex Assistant helper phage (Stratagene, La Jolla, USA)
IPTG:	Isopropyl – β – D – Thiogalacto – Pyranoside (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)
Master Mix:	Master Mix (Polymerase, Nukleotide, Puffer) (Applied Biosystems, Foster City, USA)
Nukleotide:	dNTP (Amersham Biosciences UK, Buckinghamshire, England)
PCR – Marker:	DNA Molecular Weight Marker VI 0,15 – 2,1 kbp (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) Ready – load 100bp DNA ladder (0,1 µg / µl) (Invitrogen, Carlsbad, USA)

Plasmidextraktionskit:	QIAprep Spin Miniprep Kit (250) (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland)
Primer:	T3 – Primer (Promega, Madison, USA) T7 – Primer (Promega, Madison, USA) CENPC 1 fw –, CENPC 1 rev – Primer (MWG – Biotech AG, Ebersberg, Deutschland) CMAS fw –, CMAS rev – Primer (MWG – Biotech AG, Ebersberg, Deutschland)
Puffer:	Sure Cut Buffer H (Boehringer GmbH, Mannheim, Deutschland) 10x PCR Buffer in 15 mM $MgCl_2$ (Applied Biosystems, Foster City, USA)
TAQ – Polymerase:	AmpliTaq DNA Polymerase (5 U / µl) (Applied Biosystems, Foster City, USA)

3.2.5 Verbrauchsmaterialien, Glas- und Plastikwaren

Erlenmeyerkolben:	1000 ml, 2000 ml (Schott, Mainz, Deutschland)
Glasflaschen:	100 ml, 200 ml, 500 ml, 1000 ml (Biochrom KG, Berlin, Deutschland)
Impfösen:	Impfösen steril (Bioster s.p.a., Bastia di Rovolon, Italien)
Nitrocellulosemembran:	Optitran BA – S85 Reinforced 0,45 µm (Schleicher&Schuell, Dassel, Deutschland)
Parafilm:	Parafilm „M“ (American National Can, Chicago, USA)
Petrischalen:	quadratisch 120 mm x 120 mm x 17 mm (Greiner BIO – ONE GmbH, Frickenhausen, Deutschland) rund ∅ 100 mm x 15 mm (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA)
Pipetten:	FALCON® Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml) (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) Glas Pasteur – Pipetten 150 mm (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland)
Pipettenspitzen:	Pipettenspitzen epT.I.P.S. Standard (0,1 – 10 µl, 2 – 200 µl und 50 – 1000 µl) (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
Plastik – Röhrchen:	FALCON® Polypropylen Tubes (15 ml, 50 ml) (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) PP tubes 14 ml steril (Greiner BIO – ONE GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
Reaktionsgefäße:	Safe – lock tube 0,25 ml, 0,5 ml, 1,0 ml (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

3.2.6 Geräte

Autoklav:	Varioklav (H & P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland)
Bakterienschüttler:	G 24 Environment Incubator Shaker (New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, N.J., USA)
Brutschrank:	Typ: B 5042 E (Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland)
Digitalwaage:	Precisa 3000 C – 6000 D (PAG Oerlikon AG, Zürich, Schweiz)
Eagle Eye:	Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, USA)
Elektrophoresekammer:	Gibco BRL Horizon 11 – 14 (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland)
Gefrierschrank:	– 20 °C: Bosch GmbH, München, Deutschland – 80 °C: Ultra Low (Sanyo Fisher GmbH, München, Deutschland)
Horizontalschüttler:	GFL Typ: 3005 (Gesellschaft für Labordiagnostik GmbH, Burgwedel, Deutschland)
Kühlschrank:	Bosch GmbH, München, Deutschland
Magnetrührer:	Ikamag REC-G (Häberle Labortechnik, Lonsee-Ettlenschieß, Deutschland)
Mikrowelle:	Bosch GmbH, München, Deutschland
PCR – Gerät:	GeneAmp PCR – System 2400 (Perkin Elmer, Wellesley, USA)
pH – Meter:	Calimatic 761 pH – Meter (Knick GmbH & Co KG, Berlin, Deutschland)

Photometer:	Pharmacia Ultrospec III (LKB Biochrom, Cambridge, England) BioPhotometer (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
Pipetten:	10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl: pipetman (Gilson S.A.S, Villiers le Bel, Frankreich) 0,5 – 10 µl, 10 – 100 µl Eppendorf Reference (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
Pipettierhilfe:	Nalge Nunc international, Wiesbaden, Deutschland
Sequenziergerät:	ABI 310 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)
Sterile Arbeitsbank:	Heraeus LaminAir HLB 2448 (Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland)
Thermomixer:	Thermomixer 5436 (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
Vakuumtrockner:	Speed Vac SC 110 (Savant Technologies Inc, Rockville, USA)
Vortexer:	Cenco Instrumenten b.v., Breda, Niederlande
Wasserbad:	GFL Typ: 1002 (Gesellschaft für Labordiagnostik GmbH, Burgwedel Deutschland) Julabo U3 / 7 (Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach / West Deutschland)
Zentrifugen:	Laborfuge A (Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland) Laborfuge M (Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland) Centrifuge 5402 (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

4. Ergebnisse

4.1 Screening – Ergebnisse

4.1.1 Vorlauf mit Melanomseren

Um die Qualität der Testis – cDNA – Phagen – Bibliothek zu überprüfen, wurden zu Beginn des Screenings 37 Nitrozellulosemembranen (insgesamt ca. 0,1 x 10^6 Klone) mit einem Gemisch aus 4 Seren von Melanompatienten getestet (Abb. 5). Hierbei stand die Überlegung im Vordergrund, dass Melanom – Patienten zu einem hohen Prozentsatz CG – Antigene exprimieren und dagegen serologische Antworten zeigen. Beim Screening unserer Bibliothek sollten einige der bekannten TAAs identifiziert werden. Beim Ersten Screening ließen sich 34 potentiell positive Klone isolieren, von denen 11 Klone auch nach dem Zweiten Screening positiv reagierten. Nach Plasmidextraktion und Gelelektrophorese zeigten sich 9 unterschiedliche Klone. Unter diesen konnten nach der durchgeführten Sequenzierung unter anderem die Antigene M – phase – phosphoprotein 1 (MPP1), Platelet derived growth factor receptor α (PDGFRα), PC 326 – Protein / HOM – TES – 95 tumor antigen und SH3 – domain GRB2 – like endohpilin B1 (SH3GLB1) / Bax – interacting factor 1 (BIF1) / CGI – 61 protein identifiziert werden (Tab. 3).

4.1.2 Erstes Screening

Das erste Screening mit Seren von AML – Patienten wurde mit insgesamt 457 Membranen (ca. 1,3 x 10^6 Klone) durchgeführt. Bei dem Screening von 326 Membranen mit dem AML – Serenmix I konnten 103 positive Klone, beim Screening von 131 Membranen mit AML – Serenmix II konnten 64 positive Klone isoliert werden (Abb. 5). Bei AML – Serenmix I und II handelt es sich jeweils um ein Gemisch von vier Seren verschiedener AML – Patienten. Als positiv wurden alle PFUs (Plaque forming units) gewertet, die sich mit BCIP / NBT eindeutig dunkelviolett anfärbten (siehe Abb. 6).

Ergebnis des Screenings nach Leukämie – assoziierten Antigenen

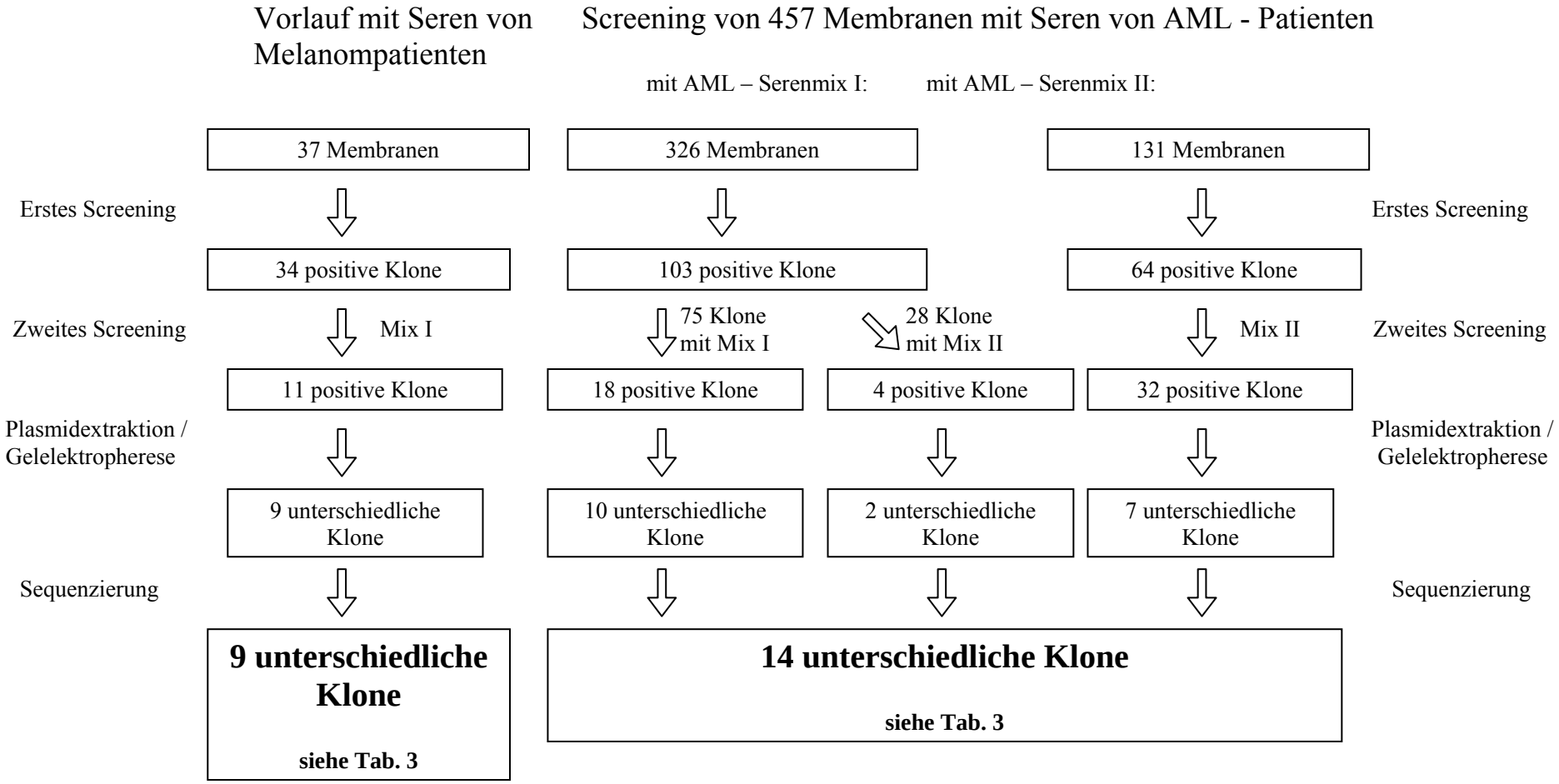

Abb. 5: Ergebnis des Screenings auf Leukämie – assoziierte Antigene (Bei Mix I und Mix II handelt es sich entsprechend Kapitel 4.1.2 um einen Serenmix von jeweils 4 Seren verschiedener AML – Patienten)

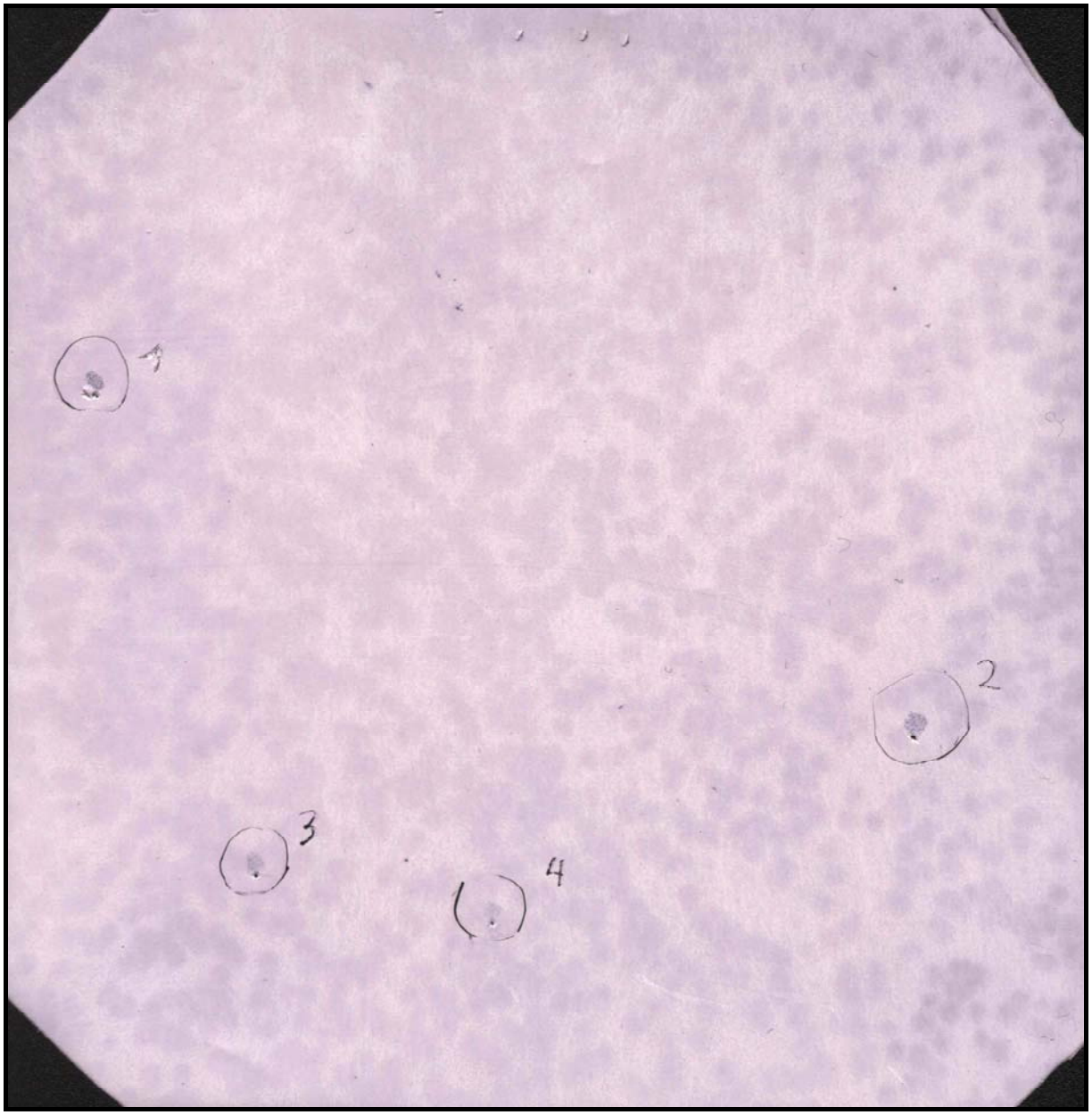

Abb. 6: Membran des Ersten Screenings. Mit den Zahlen 1 bis 4 sind die positiven Klone markiert.

4.1.3 Zweites Screening

Mit den insgesamt 167 isolierten positiven Klonen des Ersten Screenings wurde entsprechend Abschnitt 3.1.5 ein Zweites Screening (Abb. 7) durchgeführt. Dabei ließen sich 54 positive Klone als positiv verifizieren. Als positiv wurden diejenigen Klone (PFUs) gewertet, die sich eindeutig dunkelviolett anfärbten. Außerdem musste auch ein negativer Hintergrund deutlich erkennbar sein (Abb. 7).

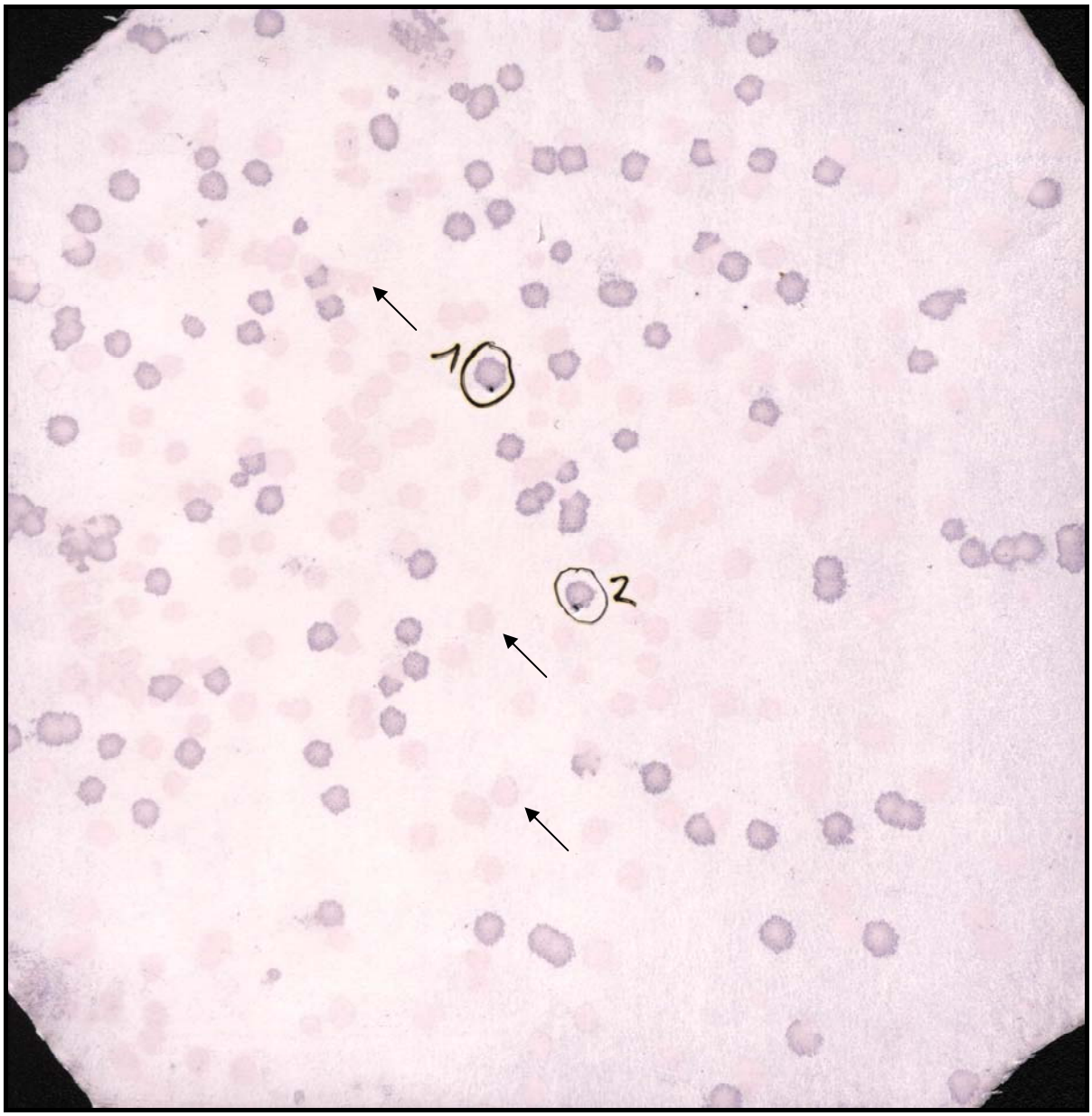

Abb. 7: Membran des Zweiten Screenings. Mit den beiden Kreisen sind zwei der vielen positiven Klone hervorgehoben, die für die weiteren Experimente verwendet wurden. Die Pfeile (↑) verweisen auf nur schwach gefärbte Hintergrundklone.

4.2 Plasmidextraktion, Gelelektrophorese und Sequenzierung

Nach der Plasmidextraktion und Gelelektrophorese konnten 19 unterschiedliche Klone detektiert werden. Diese Klone wurden sequenziert. Dabei konnten 14 verschiedene Genabschnitte (Tab. 3) detektiert werden, gegen welche Antigene in den Patientenseren

vorhanden waren. Die Aufstellung der positiven Klone sowohl des Vorlaufs mit Seren von Melanompatienten als auch des Screening mit Seren von AML – Patienten ist in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tab. 3: Sequenzierungsergebnisse (AML 1 – AML 14 sind die Klone, die beim Screening mit Seren von AML – Patienten identifiziert wurden. Es wurde mit allen im Anschluss ein Immunoscreening (4.3) durchgeführt; Mel 1 – Mel 9 sind entsprechend die Klone des Screenings von Melanomseren)

Aufstellung der sequenzierten Klone:			
Screening mit Seren von AML - Patienten:			
Identifizierte Klone		Häufigkeit nach dem Zweiten Screening	Genbank - Nummer
AML 1	Heat – shock protein 105 (HSP 105) / NY – CO – 25 – antigen	1	NM_006644 / AF039695
AML 2	KIA A 1764 protein	1	NM_033402
AML 3	DEK – oncogene	1	NM_003472
AML 4	RNA – binding region containing 2 (RNPC2)	1	NM_184237
AML 5	CTCL – tumor antigen se 2 – 2 / KIA A0373	2	AF273044 / AB002371
AML 6	Ubiquitin protein ligase E3A (UBE3A) / NY – CO – 30 – antigene	3	NM_000462 / NM_130839
AML 7	Ski oncogene	2	HSSKIR
AML 8	Coatomer protein complex β 2 (COPB2)	11	NM_004766
AML 9	Cytidin – monophosphate – N – acetylneuraminic acid – synthetase (CMAS)	17	NM_018686
AML 10	Rap 2 – interacting protein X (RIPX)	1	NM_014961
AML 11	Centromere protein C 1 (CENPC1)	1	NM_001812
AML 12	Zinc fingers and Homeoboxes 1 (ZHX1)	1	NM_007222
AML 13	Spi – 1 proto – oncogene	1	HSSPI1
AML 14	NP 220 nuclear protein / CTCL tumor antigen se 33 – 1	2	HUMNP220 / AF273049

Vorlauf mit Seren von Melanompatienten:				
Identifizierte Klone		Häufigkeit nach dem Zweiten Screening	Verwendung zum Immuno – Screening	Genbank - Nummer
Mel 1	M – phase – phosphoprotein 1 (MPP1)	1	+	NM_016195
Mel 2	Plateleted derived growth factor receptor α (PDGFR α)	2	+	NM_006206
Mel 3	PC 326 – protein / HOM – TES – 95 tumor antigen	1	+	NM_018442 / AF124434
Mel 4	SH3 – domain GRB2 – like endohpilin B1 (SH3GLB1) / Bax – interacting factor 1 (BIF1) / CGI – 61 protein	1	+	NM_016009 / AF350371 / AF151819
Mel 5	Hypothetical protein MGC33887	1	–	NM_145036
Mel 6	Ubiquitin specific protease 16 (USP16)	1	–	NM_006447
Mel 7	HDCMA18P protein	1	–	BC006981
Mel 8	unnamed protein product	1	–	–
Mel 9	Hypothetical protein FLJ20156	1	–	NM_017691

Auffällig häufig konnte ein Genabschnitt der Klone Coatomer protein complex β 2 (COPB2) (11x) und Cytidin – monophosphate – N – acetylneuraminic acid – synthetase (CMAS) (17x) identifiziert werden. Alle übrigen Klone konnten nur einmal bis dreimal identifiziert werden (Tab. 3).

Mit allen Klonen, die beim Screening von Seren von AML – Patienten detektiert wurden, und mit den primär interessantesten Klonen beim Screening von Seren von Melanompatienten wurde entsprechend Tabelle 3 ein Immunnoscreening durchgeführt. Die Kriterien für einen cut – off bestimmter identifizierter Antigene beim Screening von Melanompatienten waren folgende:

- Über die identifizierten Antigene sind bislang zu wenig Informationen verfügbar
- Bekannte ubiquitäre Expression von detektierten Antigenen

Bei mehreren gleichen Klonen wurde einer repräsentativ für das nachfolgende Immunnoscreening ausgewählt. Die Voraussetzung für diejenigen Klone war ein eindeutig positives Ergebnis im Zweiten Screening als auch eine eindeutige Identifikation der Sequenz mit den Primern T3 als auch mit T7.

4.3 Immunoscreening mit allogenen Seren

Um die Häufigkeit der serologischen Immunantworten bei AML – Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden zu analysieren, wurde ein Immunnoscreening mit bis zu 20 Seren von gesunden Probanden und mit Seren von bis zu 27 AML – Patienten durchgeführt. Abbildung 8 zeigt exemplarisch eine gefärbte Membran des Immunnoscreenings. In Tabelle 4 und Abbildung 9 sind die Ergebnisse des Immunnoscreenings zusammengefasst.

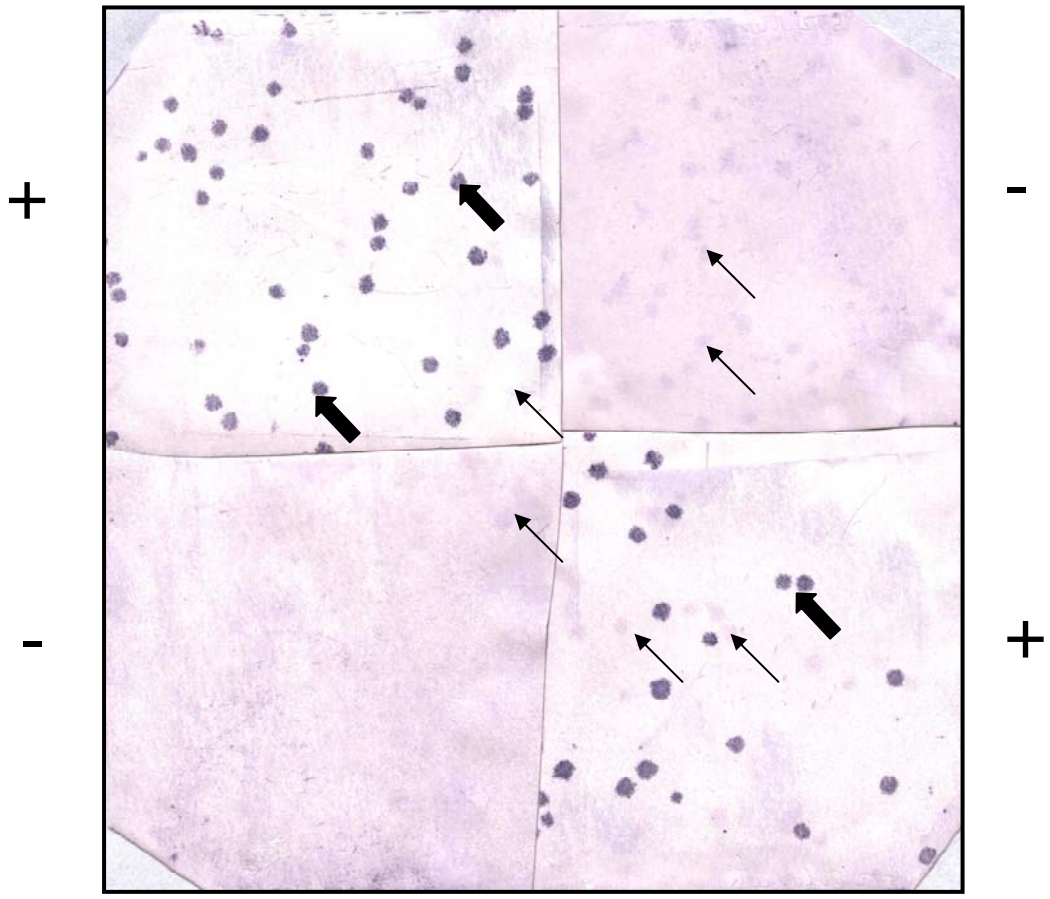

Abb. 8: Membran des allogenen Screenings für das Antigen CMAS (Cytidin – monophosphate – N – acetylneuraminic acid – synthetase). Das Viertel der Membran links oben und rechts unten wurde als positiv gewertet, da sowohl positive (⬆) als auch negative (↑) Klone (zugemischter Hintergrund) zu identifizieren sind. Auf den anderen beiden Teilen sind nur minimal angefärbte negative Klone zu erkennen.

Ausschließlich positive Reaktion beim Screening AML – Patienten:

Die Klone AML 1, 3, 9, 11, 13 und die Klone MEL 2, 4 reagierten nicht mit Seren von gesunden Probanden, jedoch in unterschiedlichem Maße mit Seren von AML – Patienten. Von diesen waren beim Immunosreening von Seren von AML – Patienten am häufigsten Heat – shock protein 105 (HSP 105) / NY – CO – 25 – Antigen (2 / 15 ; 13 %), Cytidin – monophosphate – N – acetylneuraminic acid – synthetase (CMAS) (5 / 27 ; 19 %), Centromere protein C 1 (CENPC1) (3 / 15 ; 20 %) und Zinc fingers and Homeoboxes 1 (ZHX1) (2 / 15 ; 13 %) positiv. (Tab. 4, Abb. 9)

Positive Reaktion sowohl im Screening mit Seren von AML – Patienten als auch mit Seren von gesunden Probanden:

Häufig positiv waren auch die Klone AML 5, 7, 8, 10 und 14 auf. Im Gegensatz zu den oben genannten zeigten diese jedoch auch beim Screening von Seren gesunder Probanden häufig positive Reaktionen (gesunde Probanden / AML – Patienten: CTCL – tumor antigen se 2 – 2 / KIA A0373 (67 % / 25 %), Ski proto – oncogene (15 % / 47 %), Coatomer protein complex β 2 (COPB2) (40 % / 25 %), Rap 2 – interacting protein X (RIPX) (100 % / 100 %), NP 220 nuclear protein / CTCL tumor antigen se 33 – 1 (58 % / 100 %)). (Tab. 4, Abb. 9)

Aufgrund ihrer relativ häufigen positiven Reaktion beim Immunoscreening mit Seren von AML – Patienten bei fehlender Reaktion mit Seren von gesunden Probanden wurden für die weitere Charakterisierung mittels RT – PCR die Klone Cytidin – monophosphate – N – acetylneuraminic acid – synthetase (CMAS) und Centromere protein C 1 (CENPC1) ausgewählt.

Tab 4: Tabellarische Zusammenfassung des Immunoscreenings mit allogenen Seren: Vergleich der serologischen Immunantwort der identifizierten Antigene in Probandenseren und Patientenseren.

Immunoscreening: Vergleich Probanden zu AML – Patienten					
Klon – Nr.	Gen	Gesunde Probanden		AML – Patienten	
AML 1	Heat – shock protein 105 (HSP 105) / NY – CO – 25 – antigen	0 / 20	0 %	2 / 15	13 %
AML 2	KIA A 1764 protein	1 / 20	5 %	2 / 16	13 %
AML 3	DEK – oncogene	0 / 20	0 %	1 / 15	7 %
AML 4	RNA – binding region containing 2 (RNPC2)	3 / 20	15 %	3 / 17	18 %
AML 5	CTCL – tumor antigen se 2 – 2 / KIA A0373	8 / 12	67 %	1 / 4	25 %
AML 6	Ubiquitin protein ligase E3A (UBE3A) / NY – CO – 30 – antigene	4 / 20	20 %	3 / 16	19 %
AML 7	Ski oncogene	3 / 20	15 %	8 / 17	47 %
AML 8	Coatomer protein complex β 2 (COPB2)	8 / 20	40 %	4 / 16	25 %
AML 9	Cytidin – monophosphate – N – acetylneuraminic acid – synthetase (CMAS)	0 / 20	0 %	5 / 27	19 %
AML 10	Rap 2 – interacting protein X (RIPX)	12 / 12	100 %	4 / 4	100 %
AML 11	Centromere protein C 1 (CENPC1)	0 / 20	0 %	3 / 15	20 %
AML 12	Zinc fingers and Homeoboxes 1 (ZHX1)	0 / 20	0 %	2 / 15	13 %
AML 13	Spi – 1 proto – oncogene	1 / 20	5 %	3 / 26	12 %
AML 14	NP 220 nuclear protein / CTCL tumor antigen se 33 – 1	7 / 12	58 %	4 / 4	100 %
Mel 1	M – phase – phosphoprotein 1 (MPP1)	1 / 20	5 %	3 / 15	20 %
Mel 2	Plateleted derived growth factor receptor α (PDGFR α)	0 / 20	0 %	0 / 15	0 %
Mel 3	PC 326 – protein / HOM – TES – 95 tumor antigen	2 / 20	10 %	2 / 15	13 %
Mel 4	SH3 – domain GRB2 – like endohpilin B1 (SH3GLB1) / Bax – interacting factor 1 (BIF1) / CGI – 61 protein	0 / 20	0 %	1 / 15	7 %

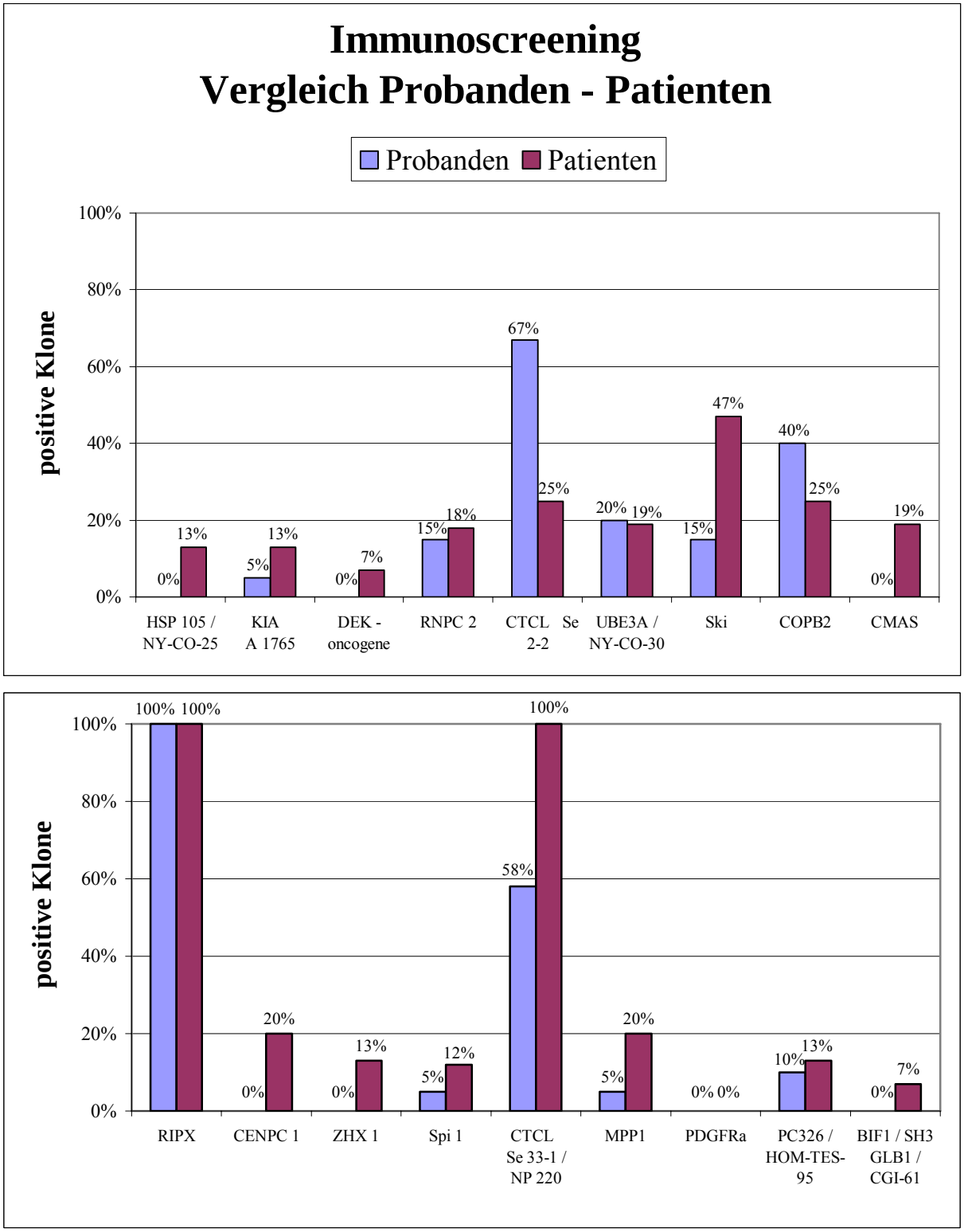

Abb. 9: Immunoscreening mit allogenen Seren: graphischer Vergleich der Häufigkeitsverteilung der Expression detektierter Antigene bei Probanden und Patienten; HSP105: Heat – shock protein 105, RNPC2: RNA – binding region containing 2, UBE3A: Ubiquitin protein ligase E3A, COPB2: Coatomer protein complex β 2, CMAS: Cytidin – monophosphate – N – acetylneuraminic acid – synthetase, RIPX: Rap 2 – interacting protein X, CENPC1: Centromere protein C 1, ZHX1: Zinc fingers and Homeoboxes 1, MPP1: M – phase – phosphoprotein 1, PDGFR α: Plateleted derived growth factor receptor α, SH3GLB1: SH3 – domain GRB2 – like endohpilin B1, BIF1: Bax – interacting factor 1

4.4 Ergebnisse der RT – PCR

Zur Überprüfung der Spezifität der beiden interessantesten Antigene Cytidin – monophosphate – N – acetylneuraminic acid – synthetase (CMAS) und Centromere protein C 1 (CENPC1) (4.3) und damit zur Abschätzung des Risikos von Nebenwirkungen bei deren Einsatz im Rahmen einer Immuntherapie, wurde deren Expressionsrate in verschiedenen Normalgeweben untersucht. Dazu wurde mit cDNA aus unterschiedlichen humanen Geweben (Normalgewebspanel) eine konventionelle RT – PCR durchgeführt. Dieses Normalgewebspanel enthielt, entsprechend Tabelle 5, cDNA – Proben von 15 verschiedenen menschlichen Gewebeentitäten. Außerdem wurde die Expressionsrate dieser beiden Antigene anhand von cDNA – Proben aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMN) von 10 Probanden untersucht. Dabei ließ sich ein eher unspezifisches Expressionsmuster in Normalgeweben detektieren. (Tab. 5)

Eine Expression des Antigens CMAS wurde in 13 / 15 (87 %) der untersuchten Normalgeweben festgestellt. Die beiden Gewebeentitäten, die keine Expression aufwiesen, waren das Ovar und der Dünndarm. (Abb. 10, Tab. 5)
CENPC 1 wies dagegen eine geringere Expressionsrate in Normalgewebe auf. Das Antigen konnte entsprechend Tabelle 5 in 10 / 15 (67 %) Geweben des Panels detektiert werden. (Abb. 11, Tab. 5)
Bei der abschließenden Untersuchung von cDNA – Proben aus PBMN von 10 Probanden wurde eine eindeutige mRNA – Expression in 10 / 10 (100 %) Proben für beide Gene festgestellt. (Abb. 10, 11)

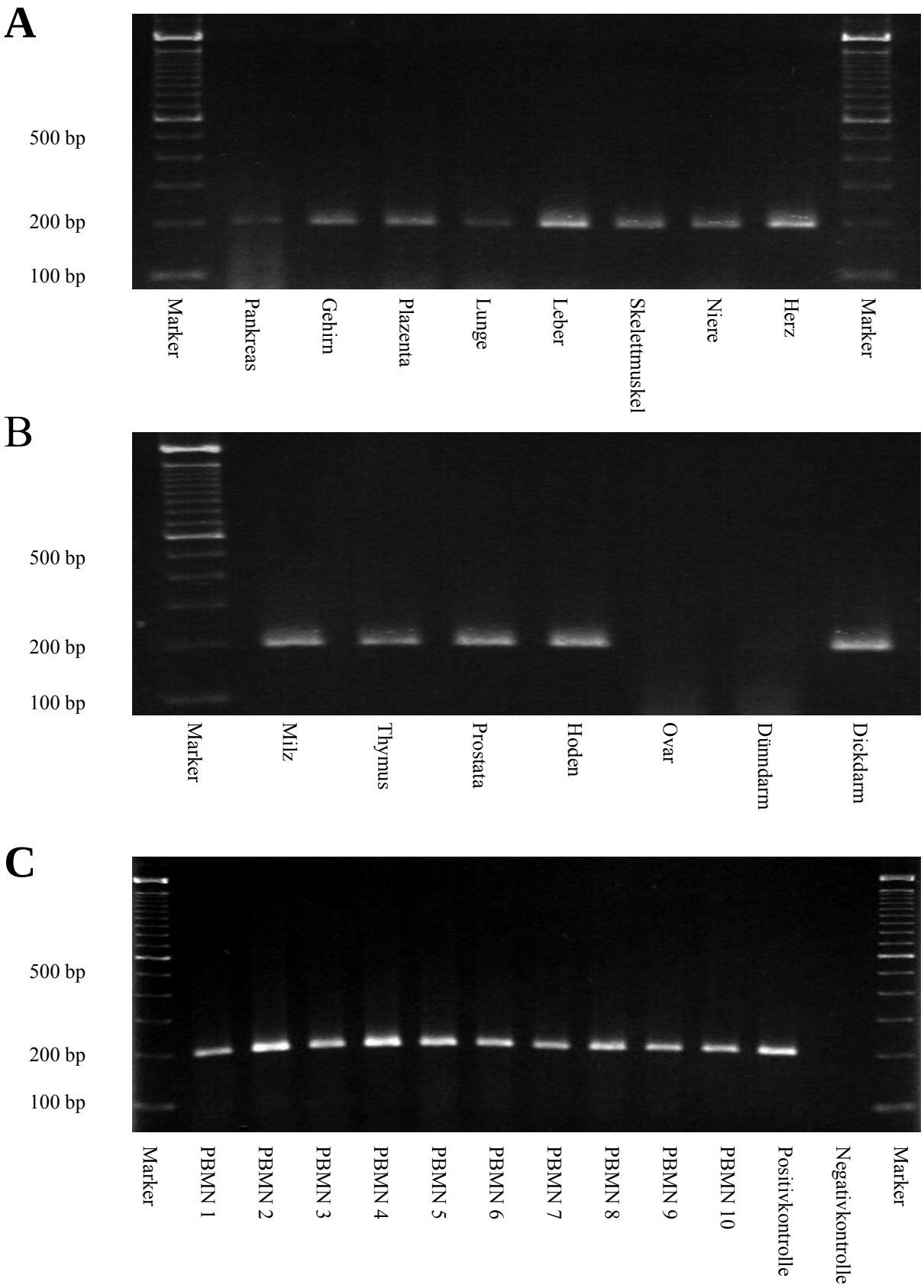

Abb. 10: Ergebnis der Bestimmung der Expression von Cytidin – monophosphate – N – acetylneuraminic acid – synthetase (CMAS) mittels RT – PCR und anschließender Gelelektrophoerese anhand eines Normalgewebspanels (A, B) und anhand von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMN) von 10 Probanden (C)

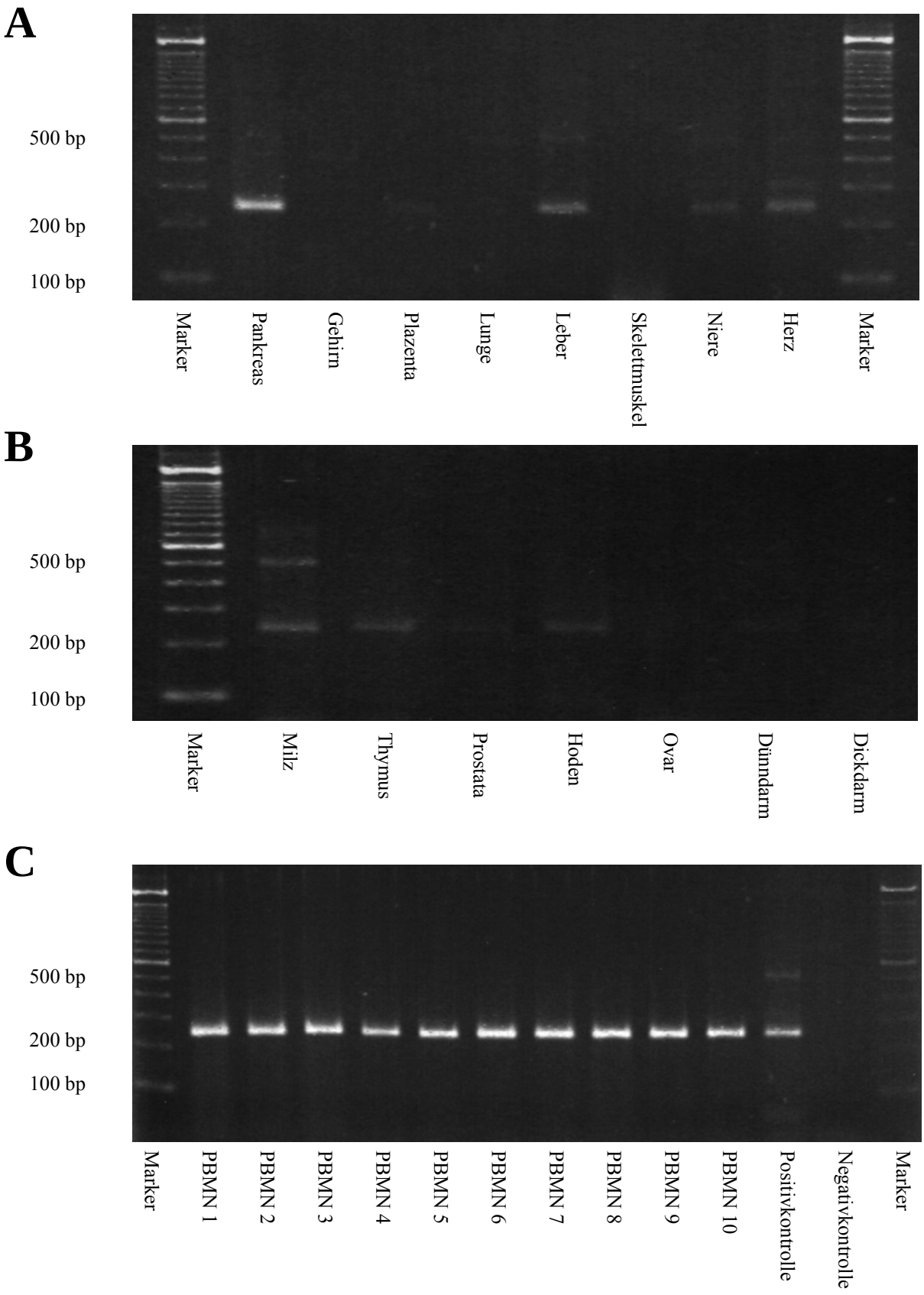

Abb. 11: Ergebnis der Bestimmung der Expression von Centromere protein C 1 (CENPC1) mittels RT – PCR und anschließender Gelelektrophorese anhand eines Normalgewebspanels (A, B) und anhand von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMN) von 10 Probanden (C)

Tab. 5: Expression der Antigene Cytidin – monophosphate – N – acetylneuraminic acid – synthetase (CMAS) und Centromere protein C 1 (CENPC1) in verschiedenen menschlichen Geweben

Expressionsverhalten der Antigene CMAS und CENPC 1		
Gewebe	Cytidin – monophosphate – N – acetylneuraminic acid – synthetase (CMAS)	Centromere protein C 1 (CENPC1)
Pankreas	+	+
Gehirn	+	–
Plazenta	+	+
Lunge	+	–
Leber	+	+
Skelettmuskel	+	–
Niere	+	+
Herz	+	+
Milz	+	+
Thymus	+	+
Prostata	+	+
Hoden	+	+
Ovar	–	–
Dünndarm	–	+
Dickdarm	+	–

5. Diskussion

Um eine effiziente T – Zell – vermittelte Immuntherapie für Patienten mit Malignomen zu entwickeln, bedarf es zunächst einer Identifikation und einer Charakterisierung spezieller Zielstrukturen, welche von T – Lymphozyten erkannt werden. Durch das hierzu in der vorliegenden Arbeit verwendete SEREX – Verfahren, welches bei soliden Tumoren wie dem malignen Melanom entwickelt wurde (2.6), konnten bereits zahlreiche TAAs definiert werden [129, 133]. Dabei wurden Cancer – Germline – Antigene (CG – Antigene) charakterisiert, welche ausschließlich in Tumoren und in Testisgewebe exprimiert werden, jedoch nicht in anderen Normalgeweben. Mittlerweile konnten bereits 44 CG – Gen – Familien identifiziert werden [135]. Beispiele für derartige Antigene sind RHAMM [44], PRAME [58], NY – ESO – 1 [25, 63], SSX [161], MAGE [19, 24, 42], BAGE [14], GAGE [35]. Durch das SEREX – Verfahren konnten mittlerweile auch mehrere LAAs definiert werden, wie beispielsweise MPP11 [45] oder die oben genannten Antigene RHAMM [44], NY – ESO – 1 [25, 107] und SSX – 2 [25, 107].

In einem Testlauf der von unserer Gruppe generierten cDNA – Bibliothek mit Seren von Melanompatienten (4.1.1) konnten mehrere vorbeschriebene Antigene detektiert werden (Tab. 3), darunter die SEREX – Antigene M – phase – phosphoprotein 1 (MPP1), Plateleted derived growth factor receptor α (PDGFRα), PC 326 – protein / HOM – TES – 95 tumor antigen und SH3 – domain GRB2 – like endohpilin B1 (SH3GLB1) / Bax – interacting factor 1 (BIF1) / CGI – 61 protein [137]. Durch diese positiven Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die präparierte Phagenbibliothek ein geeignetes Mittel für die Identifikation von TAAs darstellt. Aufgrund der durchgeführte Restriktions – und Sequenzanalyse konnte eine hohe Redundanz von Antigenen ausgeschlossen werden.
Beim nachfolgenden Immunnoscreening zeigte sich sowohl bei gesunden Probanden als auch bei den getesteten AML – Patienten keine bzw. nur eine geringe positive Serologie der SEREX – Antigene MPP1 (5 % / 20 %), PDGFRα (0 % / 0 %), PC 326 – protein / HOM – TES – 95 Tumor antigen (10 % / 13 %) und SH3GLB1 / BIF1 / CGI – 61 protein (0 % / 7 %). Aufgrund dieser geringen Expressionsfrequenz eignen sich diese Antigene bei hämatologischen Erkrankungen wie der AML nicht für eine Immunvakzine.

Die Größe der Phagenbibliothek lag nach Transfektion bei > 200.000 Klonen, nach der Amplifikation ergab sich eine Klonzahl von > 1 x 10^8 /ml. Die Größe der Inserts lag zwischen 600 und 3.000 bp. Dies ist als geeignet für ein Antigenscreening anzusehen [43, 44]. Unsere Arbeitsgruppe konnte zudem bereits zeigen, dass bei der AML hochtitrige Antikörperreaktionen gegen TAAs auftreten [43, 44].
Beim Screening von Seren von AML – Patienten zeigte sich in dieser Arbeit jedoch eine scheinbar höhere Redundanz der Ergebnisse als beim Screening von Seren von Melanompatienten (Tab. 3). Die Ursache könnte in der hohen Anzahl von Screeningdurchläufen mit Seren der AML – Patienten liegen. Beim Screening von Melanomseren waren maximal zwei von 37 gescreenten Membranen (5,4 %) vom gleichen Klon, beim Screening von Seren von AML – Patienten jedoch konnte bei 457 Membranen maximal 17 mal der gleiche Klon (3,7 %) identifiziert werden. Die detektierten Antigene wurden sowohl upstream – als auch downstream sequenziert.

Durch das Screening von Seren von Patienten mit einer AML konnten in dieser Arbeit insgesamt 14 verschiedene Antigene identifiziert werden. Keines dieser Antigene ist jedoch den CG – Antigenen zuzuordnen. Aus dieser Tatsache und weiteren publizierter Arbeiten [83, 107] lässt sich schließen, dass CG – Antigene nicht oder nur sehr selten bei Patienten mit einer AML exprimiert werden. Ein ähnliches Ergebnis wurde bereits 2003 von Niemeyer et al [107] beschrieben. Diese Arbeitsgruppe untersuchte die Expression von fünf CG – Antigenen (SSX – 1, HOM – MEL – 40 / SSX – 2, HOM – TES – 14 / SCP – 1, SCP – 3 und NY – ESO – 1) bei AML – und ALL – Patienten. Dabei wurde keine Expression dieser CG – Antigene bei Patienten mit AML im Gegensatz zu denjenigen mit einer ALL festgestellt. Entsprechend beschrieb auch Lim et al 1999 [83] keine bzw. nur seltene Expression der von ihm untersuchten CG – Antigene NY – ESO – 1, SSX – 2 und SCP1 bei hämatologischen Erkrankungen.
Statt dessen konnten in der vorliegenden Arbeit andere interessante Antigene bei dem Patientenkollektiv identifiziert werden, wie beispielsweise Cytidin – monophosphate – N – acetylneuraminic acid – synthetase (CMAS) und Centromere protein C 1 (CENPC1). Keines dieser Antigene konnte im Immunnoscreening bei Probanden nachgewiesen werden, jedoch bei 19 % bzw. 20 % des Patientenkollektivs (Tab. 4, Abb. 9).
Eine mögliche Assoziation des Antigens CMAS mit unterschiedlichen Tumoren wurde bereits 1989 von der Arbeitsgruppe um Thampoe [153] beschrieben. Er erkannte, dass CMAS das Gangliosid G_{M3} zu G_{D3} umwandelt, welches beispielsweise in Melanomzellen

höher exprimiert ist als in normalen Melanozyten. Durch die Untersuchung verschiedener Tumorzelllinien erkannte diese Arbeitsgruppe eine signifikant erhöhte Expression von CMAS in Melanom –, Neuroblastom – und teilweise in Astrozytomzelllinien. Münster et al. [102] beschrieben 1998 einen Zusammenhang von CMAS mit der Embryonalentwicklung und den verschiedenen Differenzierungsstufen. Die durch CMAS regulierte Sialinsäure ist für Strukturen der zellulären Erinnerungsstrukturen wichtig. Außerdem spielt sie eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung der embryonalen Entwicklung von Zell – Zell – Interaktionen. Auch hochmaligne Zellen exprimieren vermehrt Sialinsäure. Zuletzt konnte eine Verbindung mit der Amplifikation von testikulären Keimzelltumoren nachgewiesen werden [124]. (Tab. 6)

Als zweites Antigen mit einer interessanten positiven Serologie im allogenen Screening wurde in dieser Arbeit Centromere protein C 1 (CENPC1) detektiert (Tab. 6). Dieses Antigen ist, ähnlich wie das SEREX – Antigen RHAMM / CD 168 (Receptor for hyaluronic acid – mediated motility), mit dem Spindelapparat assoziiert [92]. CENPC 1 stellt dabei eine Komponente der inneren Kinetochore – Platte von Zentromeren dar [131], wobei es zwei signifikant unterschiedliche Zielstrukturen besitzt [156], die vermutlich multiple Kontakte sowohl mit DNA als auch mit Proteinbestandteilen des Kinetochores ausbilden können. Dadurch ist unter anderem eine Beeinflussung der Lokalisation des Centromers direkt über die Bindung von DNA möglich [147]. Untersuchungen ergaben außerdem eine Assoziation von CENPC sowohl mit Autoimmunerkrankungen wie der Sklerodermie [61, 76] als auch mit anderen rheumatischen Erkrankungen [150]. Dabei ist die Wahrscheinlichkeit schwerwiegender systemischer Organbeteiligungen bei Sklerodermie – Patienten mit einem Anti – Zentromer – Antikörpern signifikant geringer [93, 168].

Von Interesse war auch die Identifizierung von Heat – shock protein 105 (HSP 105) und DEK – oncogene als TAAs. Sie waren bei keinem Probanden im allogenen Screening nachweisbar, jedoch bei 13 % (2 / 15) (HSP 105) bzw. bei 7 % (1 / 15) (DEK – oncogene) des Patientenkollektivs.

Für HSP 105 wurde bereits eine Assoziation mit zahlreichen unterschiedlichen Tumoren, unter anderem auch mit Leukämien, vorbeschrieben [64]. Zusätzlich ist auch eine Beteiligung an der Apoptose und Nekrose bekannt [48, 49, 60, 148] (Tab. 6). Besonderes Interesse gilt den laufenden Vakzinierungsstudien mit Heat – shock Proteinen (HSP 70 / HSP Glycoprotein 96 (gp 96)) [6, 22, 82, 175]. Es konnten bislang erfolgreich Phase I / II Vakzinierungsstudien bei Patienten mit soliden Tumoren wie Melanom [22], Kolorektalem Karzinom [22] oder Nierenzellkarzinom [6], als auch bei Patienten mit CML [82] oder

indolenten Lymphomen [175] durchgeführt werden. Anhand von Immuntherapien von Patienten mit metastasiertem Kolorektalen Karzinom mit autologem gp 96 – Komplex konnte beispielsweise ein immunologisches Ansprechen bei einer Vielzahl von Patienten (17 / 29; 59 %) festgestellt werden [22]. Diese Patientengruppe zeigte sowohl eine höhere 2 – Jahres – Überlebensquote als auch einen höheren Anteil an Patienten mit einem mindestens zweijährigen krankheitsfreiem Intervall. Entsprechend konnte auch bei der CML bei der Mehrzahl der vakzinierten Patienten die Induktion einer Immunantwort von natürlichen Killerzellen als auch von CML – spezifischen T – Zellen nachgewiesen werden [82]. Es traten bei den Patienten keine oder nur sehr geringe toxische Effekte auf [6, 82].
Für das Onkogen DEK wurde 2003 durch Casas et al. [21] eine Assoziation mit der AML beschrieben. Die Arbeitsgruppe konnte bei 97,6 % (40 / 41) der AML – Patienten eine Überexpression von DEK – oncogene nachweisen. Von besonderer Bedeutung ist auch das Fusionsprotein DEK – CAN, welches durch die Translokation t(6;9) entsteht und mit einer ungünstigen Prognose verbunden ist [146, 166]. Des Weiteren konnte eine Verbindung von DEK – oncogene mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen, wie beispielsweise juveniler rheumatoider Arthritis (JRA) [33, 151], systemischer Lupus erythematodes (SLE) [33, 151] oder Sarkoidose [33] nachgewiesen werden.
Das Vorkommen, die Funktion und die Wertung weiterer identifizierter Klone sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Die unterschiedliche Expression der Antigene CMAS und CENPC 1 in verschiedenen gesunden Geweben wurde durch eine Expressionsanalyse mittels einer konventionellen RT – PCR [44] ermittelt. Dafür wurde die RT – PCR zunächst mittels der Zelllinie K562 – cDNA etabliert. Bei der anschließenden Testung des Expressionsverhaltens der Antigene CMAS und CENPC 1 in verschiedenen humanen Geweben anhand von cDNA eines Normalgewebspanels und cDNA von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMNs) von 10 Probanden durch die RT – PCR, konnte in dieser Arbeit ein eher unspezifisches Expressionsmuster nachgewiesen werden (Abb. 10 – 12, Tab. 5). Ein ähnliches Expressionsverhalten wurde auch bereits für andere relevante TAAs oder LAAs wie Proteinase – 3 (c – ANCA), Wilms – Tumor – Gen – 1 (WT – 1) oder Heat – shock protein 70 / 90 (HSP 70 / 90) beschrieben. Für diese Antigene laufen jedoch bereits erfolgreich Vakzinierungsstudien für eine Therapie der AML [51, 86, 92, 98, 100, 110, 158].
Die Effektivität einer Peptid – Vakzinierungstherapie mittels des Antigens Proteinase – 3 mit dem Epitop PR 1 bei Leukämie – Patienten konnte durch Molldrem et al. [97, 98] gezeigt

werden. Es zeigte sich sowohl bei einigen Patienten ein immunologisches Ansprechen (höhere Frequenz von spezifischen zytotoxischen T – Lymphozyten (CTL) gemessen anhand von PR1 / HLA – A2 Tetrameren) als auch ein hämatologisches Ansprechen mit Verringerung des Blastenanteils im peripheren Blut bis zur kompletten Remission (CR) [51, 62, 97, 98].

Ein vergleichbar vielversprechendes Ergebnis erbrachte auch eine Vakzinierungsstudie mit WT – 1. Als Nebenwirkung trat lediglich ein Erythem an der Injektionsstelle auf. Bei einigen Patienten mit myelodysplastischem Syndrom (MDS) kam es zudem zu einer Leukozytopenie, was durch eine Expression von WT – 1 auf CD 34+ Stammzellen erklärbar ist. [110, 158]

Die Ergebnisse der Vakzinierungsstudien mit Heat – shock protein 70 / 90 (HSP 70 / 90) sind bereits oben beschrieben.

Der Erfolg dieser Vakzinierungen könnte dadurch erklärt werden, dass diese Antigene zwar in gesunden Geweben eine hohe Expressionsrate auf mRNA – Ebene aufweisen, jedoch kaum Antigenprotein an der Zelloberfläche präsentiert wird. Dadurch entstünden keine oder nur geringe autoimmunologische Reaktionen gegen Normalgewebe. Im Gegensatz dazu müssen Tumorzellen eine wesentlich höhere Anzahl dieser Antigene an ihrer Oberfläche präsentieren, so dass diese Zellen nach einer Vakzinierung vom körpereigenen Immunsystem attackiert werden. [110]

Tab. 6: Vorkommen, Funktion, Lokalisation und Wertung der identifizierten Antigene

Überblick über das Vorkommen, Funktion und Wertung der Klone des Zweiten Screenings				
Klon – Nr.	Gen	Zitat	Vorkommen / Funktion / Lokalisation	Wertung
AML 1	Heat – shock protein 105 (HSP 105) / NY – CO – 25 – antigen	Kai et al. 2003 [64] Nakatsura et al. 2001 [104] Scanlan et al. 1998 [133] Ishihara et al. 2003 [60] Hatayama et al. 1997 und 2001 [48, 49] Srivastava 2003 [148] Li et al 2004 [82] Castelli et al [22]	• Assoziation mit vielen unterschiedlichen Tumorentitäten, unter anderem Leukämien • Protektion neuronaler Zellen gegen Apoptose • Assoziation mit Apoptose in der Maus – Embryogenese • Komponente der immunstimulatorischen Aktivität von nekrotischen Zellen	+ : SEREX – Antigen [137] erfolgreiche Vakzinierungsstudien Phase I und II mit HSPs Assoziation mit Leukämien und anderen Malignomen – : relativ unspezifische Expression
AML 2	KIA A 1764 protein		Funktion nicht bekannt	unklar
AML 3	DEK – oncogene	Casas et al. 2003 [21] von Lindern et al. 1992 [166] Makita et al. 2002 [87] Soekarmann et al 1992 [146] Dong et al. 2000 [33] Szer et al. 1994 [151] Wichmann et al. 2000 [169]	• Assoziation mit AML: ▪ Bildung des Fusionsproteins DEK – CAN durch t(6;9) ▪ Präsentation durch DCs ▪ Mit schlechter Prognose assoziiert • Assoziation mit Autoimmunerkrankungen, wie beispielsweise juveniler rheumatoider Arthritis (JRA), systemischer Lupus erythematodes (SLE), Sarkoidose	+ : bei AML beschriebenes Peptid T – Zell – Epitope beschrieben – : geringe Expressionsfrequenz (Tab. 4, Abb. 9)

AML 4	RNA – binding region containing 2 (RNPC2)	Imai et al. 1993 [59]	• Spezifische Bindung an RNA • Beteiligung an Protein – Protein Interaktion	+ : potentielle Rolle bei der Zellproliferation – : ähnliche Expressionsfrequenz in Probanden und AML – Patienten (Tab. 4, Abb. 9)
AML 5	CTCL – tumor antigen se 2 – 2 / KIA A0373	Eichmüller et al. 2001 [34]	• Assoziation mit kutanem T – Zell Lymphom (CTCL)	+ : Übereinstimmung mit anderer SEREX – Analyse [34] – : relativ geringe Expressionsrate in AML – Patienten (Tab. 4, Abb. 9)
AML 6	Ubiquitin protein ligase E3A (UBE3A) / NY – CO – 30 – antigen	Fang et al. 1999 [33] Burger et al. 2002 [20] Eichmüller et al. 2001 [34] Huibregtse et al. 1993 [55]	• Assoziation mit Angelman – Syndrom • Assoziation mit kutanem T-Zell Lymphom (CTCL) • Kodiert für humanes Papilloma – Virus E6 Onkoprotein und für Tumorsuppressorgen p53 • Chromosomale Lokalisation: 15q11 – q13	+ : Übereinstimmung mit anderer SEREX – Analyse [34] – : relativ unspezifische ubiquitäre Expression
AML 7	Ski oncogene	Shinagawa et al. 2001 [140] Reed et al. 2001 [122] Lyons et al. 1994 [84] Kahn et al. 2001 [70] Namciu et al. 1994 [105]	• c – Ski vermittelt die transkriptionelle Repression • Inhibition von tumor growth factor – β (TGF – β) • Chromosomale Lokalisation: 1p36.3 • Cytoplasmatische Lokalisation • Assoziation mit Tumorgenese (Melanom, Promyelozytische Leukämie (PML)) • Assoziation mit embryonaler Entwicklung des Nervensystems • Beteiligung an der Regulation der Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Zellen	+ : Assoziation mit Leukämie (PML) Beteiligung an der Regulation der Hämatopoese – : gegen dieses AG gerichtete Immuntherapien könnten auch die normale Hämatopoese beeinträchtigen
AML 8	Coatomer protein complex β 2 (COPB2)	De Baere et al. 1998 [7] Tarsounas et al. 1999 [152] Li et al. 1999 [81]	• Chromosomale Lokalisation: 3q23 • Ak gegen COPB2 bei Patienten mit CREST • Assoziiert mit dem Golgi – Apparat	+ : Assoziation mit Autoimmunerkrankungen – : relativ niedrige Expressionsfrequenz in AML – Patienten (Tab. 4, Abb. 9)

AML 9	Cytidin – monophosphate – N – acetylneuraminic acid – synthetase (CMAS)	Thampoe et al. 1989 [153] Münster et al. 1998 [102] Rodriguez et al. 2003 [124]	• Überexpression in Melanom –, Neuroblastom – und teilweise in Astrozytomzelllinien • Assoziation mit Embryonalentwicklung und Differenzierung • Assoziation mit testikulären Keimzelltumoren	+ : Assoziation mit Malignomen – : ubiquitäre Expression in verschiedenen Geweben (Abb. 10)
AML 10	Rap 2 – interacting protein X (RIPX)		Funktion nicht bekannt	– : ubiquitäre Expression in Probanden und AML – Patienten (Tab. 4, Abb. 9)
AML 11	Centromere protein C 1 (CENPC1)	Kuwana et al. 1995 [76] Jabs et al. 1993 [61] Sugimoto et al. 1998 [150] Saitoh et al. 1992 [131] Xie et al. 1996 [171]	• Assoziation mit Sklerodermie • Assoziation mit rheumatischen Erkrankungen • Teil der inneren Kinetochore – Platte von Centromeren • Chromosomale Lokalisation: 4q31 → q21	+ : Assoziation mit Autoimmunerkrankungen – : relativ unspezifisches Expressionsmuster in Normalgeweben (Abb. 11)
AML 12	Zinc fingers and Homeoboxes 1 (ZHX1)	Yamada et al. 1999 und 2003 [172, 173] Shou et al. 2003 und 2004 [142, 143]	• Ubiquitärer nucleärer transkriptioneller Repressor • Induktion durch Interleukin – 2 (IL – 2) in einer Maus – CTL – Zelllinie • Lokalisation auf Chromosom 8	+ : einige SEREX – Antigene sind Zinkfinger – Proteine (z.B. MAZ [17], PINCH [165]) – : unspezifische ubiquitäre Expression
AML 13	Spi – 1 proto – oncogene	Ray-Gallet et al. 1995 [121] Delgado et al. 1994 und 1998 [30, 31]	• Hämotopoetischer Transkriptionsfaktor der Ets – Familie • Inhibition der Differenzierung von Erythrozyten • Zunahme der Differenzierung von Monozyten • Kodierung für den Transkriptionsfaktor PU.1	+ : Beteiligung an der Differenzierung von hämatopoetischen Zellen – : geringe Expressionsrate in Probanden und AML – Patienten (Tab. 4, Abb. 9)
AML 14	NP 220 nuclear protein / CTCL tumor antigen se 33 – 1	Eichmüller et al. 2001 [34] Okumara et al. 1998 [111]	• Expression in vielen Geweben • Assoziation mit kutanem T – Zell Lymphom (CTCL) • chromosomale Lokalisation: 2p13.1 – p13.2	+ : Übereinstimmung mit anderer SEREX – Analyse [34] – : relativ unspezifische ubiquitäre Expression

Mel 1	M – phase – phosphoprotein 1 (MPP1)	Abaza et al. 2003 [1] Fritzler et al. 2000 [40]	• Assoziation mit Mitose: molekularer Motor durch Beeinflussung der Funktion der Mikrotubuli • Autoantigen bei idiopathischer Ataxie	+ : SEREX – Antigen [137] Assoziation mit Zellteilung – : relativ geringe Expressionsfrequenz (Tab. 4, Abb. 9)
Mel 2	Plateleted derived growth factor receptor α (PDGFR α)	Kawagishi J et al. 1995 [66] Heldin 1992 [50] Yeh et al. 1993 [174] MacDonald TJ et al. 2001 [85] Smith JS et al. 2000 [145] Müschen et al. 2002 [103]	• Tyrosinkinaserezeptor • Assoziation mit der Proliferation und Differenzierung von Gliazellen und Mesenchymalen Zellen • Assoziation mit metastasierenden Medulloblastomen • Assoziation mit Oligodendrogliomen Grad 4 • Expression in pre – B Zellen (PBCs) • Expression in myeloproliferativen Erkrankungen	+ : SEREX – Antigen [137] Assoziation mit ZNS – Malignomen – : keine Expression in AML
Mel 3	PC 326 – protein / HOM – TES – 95 tumor antigen	Bergsagel PL et al. 1992 [10, 11]	• Mitglied der β – transducin repeat „mosaic“ Proteinfamilie • X – chromosomale Lokalisation • Geringe Expression in Testis – Zellen und stark in Plasmazellen mit Plasmozytom; keine Expression in „normalen“ Plasmazellen • Teil der Tumorgenese	+ : SEREX – Antigen [137] – : ähnlich geringe Expressionsrate von Probanden und AML – Patienten (Tab. 4, Abb. 9)
Mel 4	SH3 – domain GRB2 – like endohpilin B1 (SH3GLB1) / Bax – interacting factor 1 (BIF1) / CGI – 61 protein	Pierrat et al. 2001 [117]	• Zytoplasmatische Lokalisation • Kein Einfluss auf die Bax – vermittelte Apoptose	+ : SEREX – Antigen [137] – : geringe Expressionsfrequenz (Tab. 4, Abb. 9)

6. Zusammenfassung

Die Therapie von chemotherapierefraktären Leukämien und von Leukämierezidiven stellt weiterhin eine Herausforderung dar. Die Akute Myeloische Leukämie (AML) – Studiengruppe Ulm hat eine auf zytogenetische Analyse der AML beruhende risikoadaptierte Therapiestrategie mit Polychemotherapie und Stammzelltransplantation entwickelt. Eine Immuntherapie von Leukämien ist ein komplemetärer Therapieansatz, dessen Grundlagen in dieser Arbeit weiter erarbeitet wurde.

Zur Entwicklung einer spezifischen Immuntherapie müssen spezifische Zielstrukturen, Leukämie – assoziierte Antigene (LAAs), definiert werden, die von zytotoxischen Zellen und / oder Antikörpern erkannt und angegriffen werden können. Um LAAs bei Patienten mit AML zu identifizieren, wurde in dieser Arbeit Verfahren der serologischen Analyse von rekombinanten cDNA – Expressionsbanken (SEREX) auf der Basis einer Testis – cDNA – Expressionsbibliothek durchgeführt (Abschnitt 2.6). Spezielles Interesse bei der Suche nach spezifischen LAAs galt den sogenannten Cancer – Germline – Antigenen (CG – Antigene), da diese in verschiedenen Tumorentitäten und in normalem Testisgewebe exprimiert werden, nicht jedoch in anderen gesunden Geweben. Aufgrund dieser gewebespezifischen Expression wären bei einer Immuntherapie gegen CG – Antigene keine Autoimmunreaktionen zu befürchten.

Bei der SEREX – Analyse mit Seren von AML – Patienten konnten insgesamt 14 verschieden Antigenstrukturen identifiziert werden (Tab. 3). Keines dieser Antigene konnte jedoch den CG – Antigenen zugeordnet werden. Die Wertigkeit der identifizierten Antigenstrukturen wurde durch ein Immunnoscreening von allogenen Patienten – versus Probandenseren ermittelt. Von besonderem Interesse waren die Antigene Cytidin – monophosphate – N – acetylneuraminic acid – synthetase (CMAS) und Centromere protein C 1 (CENPC1), da diese nicht in Probandenseren (0 %), jedoch in 19 % bzw. 20 % der Patientenseren detektiert wurden.

Für das Antigen CMAS wurde bereits eine Assoziation mit verschiedenen Tumorentitäten, wie beispielsweise dem malignen Melanom, beschrieben. Zudem spielt CMAS eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung.

Das Antigen CENPC1 stellt eine Komponente der inneren Kinetochore – Platte von Zentromeren dar. Ihm wird eine Assoziation sowohl mit Autoimmunerkrankungen wie der Sklerodermie als auch mit anderen rheumatischen Erkrankungen zugeschrieben.

Für das identifizierte Antigen Heat – shock protein 105 (HSP 105), welches mit keinem Probandenserum, jedoch mit 2 von 15 der untersuchten AML – Patienten – Seren positiv reagierte, wurde bereits eine Assoziation mit zahlreichen unterschiedlichen Tumorentitäten beschrieben.

Antikörper gegen das Onkogen DEK, für das bereits eine Assoziation mit der AML beschrieben wurde, wurde in einem von 15 Patientenseren, jedoch nicht in Probandenseren gefunden. Das Fusionsprotein DEK – CAN der Translokation t(6;9), welches mit einer schlechten Prognose verbunden ist, stellt dabei eines von wenigen bei der AML identifizierten Fusionsantigene dar. Des Weiteren ist DEK mit einer Vielzahl verschiedener Autoimmunerkrankungen assoziiert.

Bei der Analyse der mRNA (Messenger – Ribonukleinsäure) – Expression der beiden Gene CMAS und CENPC1 zeigte sich in der konventionellen RT – PCR (Reverse – Transkription – Polymerase – Kettenreaktion), wie auch bei anderen bereits für klinische Vakzinierungsstudien relevanten Antigenen wie Proteinase – 3, Wilms – Tumor – Gen – 1 (WT – 1) oder Heat – shock protein 70 (HSP 70), eine Expression in verschiedenen Normalgeweben.

In einem Nachfolgeprojekt sollen nun sowohl die Expressionsstärke mittels quantitativer RT – PCR der mRNA dieser Gene in Tumorgewebe versus Normalgewebe als auch ihre Expression auf der Proteinebene untersucht werden. Langfristige Ziele dieser Arbeiten ist die Definition von spezifischen T – Zell – Epitopen im Hinblick auf eine Tumorvakzinierung mittels Peptiden und / oder Dendritischen Zellen (DCs).

7. Literaturverzeichnis

1. Abaza A, Soleilhac JM, Westendorf J, Piel M, Crevel I, Roux A, Pirollet F. M phase phosphoprotein 1 is a human plus – end – directed kinesin – related protein required for cytokinesis. J Biol Chem 278: 27844 – 27852, 2003

2. Albin M, Bjork J, Welinder H, Tinnerberg H, Mauritzson N, Johansson B, Billstrom R, Stromberg U, Mikoczy Z, Ahlgren T, Nilsson PG, Mitelman F, Hagmar L. Acute myeloid leukemia and clonal chromosome aberrations in relation to past exposure to organic solvents. Scand J Work Environ Health 26: 482 – 491, 2000

3. Alcalay M, Meani N, Gelmetti V, Fantozzi A, Fagioli M, Orleth A, Riganelli D, Sebastiani C, Cappelli E, Casciari C, Sciurpi MT, Mariano AR, Minardi SP, Luzi L, Muller H, Di Fiore PP, Frosina G, Pelicci PG. Acute myeloid leukemia fusion proteins deregulate genes involved in stem cell maintenance and DNA repair. J Clin Invest 112: 1751 – 1761, 2003

4. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215: 403 – 410, 1990

5. Aruffo A, Farrington M, Hollenbaugh D, Li X, Milatovich A, Nonoyama S, Bajorath J, Grosmaire LS, Stenkamp R, Neubauer M. The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X – linked hyper – IgM syndrome. Cell 72: 291 – 300, 1993

6. Assikis VJ, Daliani D, Pagliaro L, Wood C, Perez C, Logothetis C, Papandreou C, Hawkins ES, Srivastava P. Phase II study of an autologous tumor derived heat shock protein – peptide complex vaccine (HSPPC – 96) for patients with metastatic renal cell carcinoma (mRCC). Proc Am Soc Clin Oncol 22: 386, 2003

7. De Baere E, Speleman F, Van Roy N, De Paepe A, Messiaen L. Assignment of the cellular retinol-binding protein 1 gene (RBP1) and of the coatomer beta subunit gene (COPB2) to human chromosome band 3q23 by in situ hybridization. Cytogenet Cell Genet 82: 226 – 227, 1998

8. Banchereau J, Schuler – Thurner B, Palucka AK, Schuler G. Dendritic cells as vectors for therapy. Cell 106: 271 – 274, 2001

9. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French – American – British (FAB) co – operative group. Br J Haematol 33: 451 – 458, 1976

10. Bergsagel PL, Timblin CR, Eckhardt L, Laskow R, Kuehl WM. Sequence and expression of a murine cDNA encoding PC326, a novel gene expressed in plasmacytomas but not in normal plasma cells. Oncogene 7: 2059 – 2064, 1992

11. Bergsagel PL, Victor – Kobrin C, Brents LA, Mushinski JF, Kuehl WM. Genes expressed selectively in plasmacytomas: markers of differentiation and transformation. Curr Top Microbiol Immunol 182: 223 – 228, 1992

12. Van Bleek GM, Nathenson SG. Isolation of an endogenously processed immunodominant viral peptide from the class I H – 2Kb molecule. Nature 348: 213 – 216, 1990

13. Van Bleek GM, Nathenson SG. Peptide presentation by major histocompatibility class I molecules. Chem Immunol 57: 1 – 17, 1993

14. Boel P, Wildmann C, Sensi ML, Brasseur R, Renauld JC, Coulie P, Boon T, Van der Bruggen P. BAGE: a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes. Immunity 2: 167 – 175, 1995

15. Boon T, Van Pel A. Teratocarcinoma cell variants rejected by syngeneic mice: protection of mice immunized with these variants against other variants and against the other original malignant cell line. Proc Natl Acad Sci USA 75: 1519 – 1523, 1978

16. Boon T. Antigenic tumor cell variants obtained with mutagens. Adv Cancer Res 39: 121 – 151, 1983

17. Bossone SA, Asselin C, Patel AJ, Marcu KB. MAZ, a zinc finger protein, binds to c – MYC and C2 gene sequences regulating transcriptional initiation and termination. Proc Natl Acad Sci USA 89: 7452 – 7456, 1992

18. Brichard V, Van Pel A, Wölfel T, Wölfel C, De Plaen E, Lethe B, Coulie P, Boon T. The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T – lymphocytes on HLA – A2 melanomas. J Exp Med 178: 489 – 495, 1993

19. Van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. Science 254: 1643 – 1647, 1991

20. Burger J, Horn D, Tonnies H, Neitzel H, Reis A. Familial interstitial 570 kbp deletion of the UBE3A gene region causing Angelman syndrome but not Prader – Willi syndrome. Am J Med Genet 111: 233 – 237, 2002

21. Casas S, Nagy B, Elonen E, Aventin A, Larramendy ML, Sierra J, Ruutu T, Knuutila S. Aberrant expression of HOXA9, DEK, CBL and CSF1R in acute myeloid leukemia. Leuk Lymphoma 44: 1935 – 1941, 2003

22. Castelli C, Rivoltini L, Rini F, Belli F, Testori A, Maio M, Mazzaferro V, Coppa J, Srivastava PK, Parmiani G. Heat shock proteins: biological functions and clinical application as personalized vaccines for human cancer. Cancer Immunol Immunother 53: 227 – 233, 2004

23. Cavani S, Perfumo C, Argusti A, Pierluigi M, Perroni L, Schmiegelow K, Petersen MB, Cotter FE, Strigini P, Dagna – Bricarelli F, Nizetic D. Cytogenetic and molecular study of 32 Down syndrome families: potential leukaemia predisposing role of the most proximal segment of chromosome 21q. Br J Haematol 103: 213 – 216, 1998

24. Chambost H, Brasseur F, Coulie P, De Plaen E, Stoppa AM, Baume D, Mannoni P, Boon T, Maraninchi D, Olive D. A tumour – associated antigen expression in human haematological malignancies. Br J Haematol 84: 524 – 526, 1993

25. Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, Türeci Ö, Gure AO, Tsang S, Williamson B, Stockert E, Pfreundschuh M, Old LJ. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. Proc Natl Acad Sci USA 94: 1914 – 1918, 1997

26. Chen YT, Scanlan MJ, Obata Y, Old LJ. Cancer vaccines. In: Rosenberg SA (ed.) Principles and Practice of the Biologic Therapy of Cancer, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 557, 2000

27. Chomczynski P, Sacchi N. Single Step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate – phenol – chloroform extraction. Anal Biochem 162: 156 – 159, 1987

28. Collins RH Jr, Shpilberg O, Drobyski WR, Porter DL, Giralt S, Champlin R, Goodman SA, Wolff SN, Hu W, Verfaillie C, List A, Dalton W, Ognoskie N, Chetrit A, Antin JH, Nemunaitis J. Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation. J Clin Oncol 15: 416 – 417, 1997

29. Coulie PG, Brichard V, Van Pel A, Wolfel T, Schneider J, Traversari C, Mattei S, De Plaen E, Lurquin C, Szikora JP. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA – A2 melanomas. J Exp Med 180: 35 – 42, 1994

30. Delgado MD, Hallier M, Meneceur P, Tavitian A, Moreau – Gachelin F. Inhibition of Friend cells proliferation by spi – 1 antisense oligodeoxynucleotides. Oncogene 9: 1723 – 1727, 1994

31. Delgado MD, Gutierrez P, Richard C, Cuadrado MA, Moreau – Gachelin F, Leon J. Spi – 1 / PU.1 proto – oncogene induces opposite effects on monocytic and erythroid differentiation of K562 cells. Biochem Biophys Res Commun 252: 383 – 391, 1998

32. Döhner H, Fischer K, Del Valle F. Stratification of postremission therapy in adult acute myeloid leukemia according to the karyotype. First results of the AML HD93 multicenter treatment trial. Blood 90: 564, 1997

33. Dong X, Wang J, Kabir FN, Shaw M, Reed AM, Stein L, Andrade LE, Trevisani VF, Miller ML, Fujii T, Akizuki M, Pachman LM, Satoh M, Reeves WH. Autoantibodies to DEK oncoprotein in human inflammatory disease. Arthritis Rheum 43: 85 – 93, 2000

34. Eichmüller S, Usener D, Dummer R, Stein A, Thiel D, Schadendorf D. Serological detection of cutaneous T – cell lymphoma – associated antigens. Proc Natl Acad Sci USA 98: 629 – 634, 2001

35. Van den Eynde B, Peeters O, De Backer O, Gaugler B, Lucas S, Boon T. A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. J Exp Med 182: 689 – 698, 1995

36. Falk K, Rötzschke O, Stevanovic S, Jung G, Rammensee HG. Allele – specific motifs revealed by sequencing of self – peptides eluted from MHC molecules. Nature 351: 290 – 296, 1991

37. Fang P, Lev-Lehman E, Tsai TF, Matsuura T, Benton CS, Sutcliffe JS, Christian SL, Kubota T, Halley DJ, Meijers – Heijboer H, Langlois S, Graham JM Jr, Beuten J, Willems PJ, Ledbetter DH, Beaudet AL. The spectrum of mutations in UBE3A causing Angelman syndrome. Hum Mol Genet 8: 129 – 135, 1999

38. Foa R, Fierro MT, Tosti S, Meloni G, Gavosto F, Mandelli F. Induction and persistance of complete remission in a resistent acute myeloid leukemia patient after treatment with recombinant interleukin – 2. Leuk Lymphoma 11: 113 – 117, 1990

39. Foa R, Fierro MT, Tosti S, Meloni G, Gavosto F, and Mandelli F. Induction and persistence of complete remission in a resistant acute myeloid leukemia patient after treatment with recombinant interleukin – 2. Leukemia and Lymphoma 11: 113 – 117, 1998

40. Fritzler MJ, Kerfoot SM, Feasby TE, Zochodne DW, Westendorf JM, Dalmau JO, Chan EK. Autoantibodies from patients with idiopathic ataxia bind to M – phase phosphoprotein – 1 (MPP1). J Investig Med 48: 28 – 39, 2000

41. Fröhling S, Skelin S, Liebisch C, Scholl C, Schlenk RF, Döhner H, and Döhner K. Comparison of cytogenetic and molecular cytogenetic detection of chromosome abnormalities in 240 consecutive adult patients with acute myeloid leukemia. J Clin Oncol 20: 2480 – 2485, 2002

42. Gaugler B, Van der Eynde B, Van der Bruggen P, Romero R, Gafario JJ, De Plaen E, Lethe B, Brasseur G, Boon T. Human gene MAGE – 3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. J Exp Med 179: 921 – 930, 1994

43. Greiner J, Ringhoffer M, Simikopinko O, Szmaragowska A, Huebsch S, Maurer U, Bergmann L, Schmitt M. Simultaneous expression of different immunogenic antigens in acute myeloid leukemia (AML). Exp J Hematol 28: 1413 – 1422, 2000

44. Greiner J, Ringhoffer M, Taniguchi M, Schmitt A, Kirchner D, Krähn G, Heilmann V, Gschwend J, Bergmann L, Döhner H, Schmitt M. Receptor for hyaluronan acid – mediated motility (RHAMM) is a new immunogenic leukemia – associated antigen in acute and chronic myeloid leukemia. Exp J Hematol 30: 1029 – 1035, 2002

45. Greiner J, Ringhoffer M, Taniguchi M, Hauser T, Schmitt A, Döhner H, Schmitt M. Characterization of several leukemia – associated antigens inducing humoral immune responses in acute and chronic myeloid leukemia. Int J Cancer 106: 224 – 231, 2003

46. Gross L. Intradermal immunization of CH3 mice against a sarcoma that originated in an animal of the same line. Cancer Res 3: 326 – 333, 1943

47. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Müller – Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. Ann Oncol 10: 1419 – 1432, 1999

48. Hatayama T, Takigawa T, Takeuchi S, Shiota K. Characteristic expression of high molecular mass heat shock protein HSP105 during mouse embryo development. Cell Struct Funct 22: 517 – 525, 1997

49. Hatayama T, Yamagishi N, Minobe E, Sakai K. Role of hsp105 in protection against stress – induced apoptosis in neuronal PC12 cells. Biochem Biophys Res Commun 288: 528 – 534, 2001

50. Heldin CH. Structural and functional studies on platelet – derived growth factor. EMBO J 11: 4251 – 4259, 1992

51. Heslop HE, Stevenson FK, Molldrem JJ. Immunotherapy of hematologic malignancy. Hematology (Am Soc Hematol Educ Program): 331 – 349, 2003

52. Hochhaus A, Reiter A, Saußele S, Reichert A, Emig M, Kaeda J, Schultheis B, Berger U, Shepherd PCA, Allan H, Hehlmann R, Goldman JM, Cross NCP for the

German CML Study Group and the UK MRC CML Study Group. Molecular heterogeneity in complete cytogenetic responders after interferon – alpha therapy for chronic myeloid leukemia: low levels of minimal residual disease are associated with continuing remission. Blood 95: 62 – 66, 2000

53. Hosen N, Sonoda Y, Oji Y, Kimura T, Minamiguchi H, Tamaki H, Kawakami M, Asada M, Kanato K, Motomura M, Murakami M, Fujioka T, Masuda T, Kim EH, Tsuboi A, Oka Y, Soma T, Ogawa H, Sugiyama H. Very low frequencies of human normal CD34+ haematopoietic progenitor cells express the Wilms' tumour gene WT1 at levels similar to those in leukaemia cells. Br J Haematol 116: 409 – 420, 2002

54. Hostetler LW, Ananthaswamy HN, Kripke ML. Generation of tumor – specific transplantation antigens by UV radiation can occur independently of neoplastic transformation. J Immunol 137: 2721 – 2725, 1986

55. Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM. Cloning and expression of the cDNA for E6 – AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. Mol Cell Biol 13: 775 – 784, 1993

56. Hung AY, Golumbek P, Amadzadeh M, Jaffee EW, Pardoll D, Levitsky H. Role of bone marrow – derived cells in presenting MHC class I – restricted tumor antigens. Science 264: 961 – 965, 1994

57. Hutt AM, Kalf GF. Inhibition of human DNA topoisomerase II by hydroquinone and p – benzoquinone, reactive metabolites of benzene. Environ Health Perspect 104: 1265 – 1269, 1996

58. Ikeda H, Lethe B, Lehmann F, Van Baren N, Baurain JF, De Smet C, Chambost H, Vitale M, Moretta A, Boon T, Coulie PG. Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. Immunity 6: 199 – 208, 1997

59. Imai H, Chan EK, Kiyosawa K, Fu XD, Tan EM. Novel nuclear autoantigen with splicing factor motifs identified with antibody from hepatocellular carcinoma. J Clin Invest 92: 2419 – 2426, 1993

60. Ishihara K, Yamagishi N, Saito Y, Adachi H, Kobayashi Y, Sobue G, Ohtsuka K, Hatayama T. Hsp105alpha suppresses the aggregation of truncated androgen receptor with expanded CAG repeats and cell toxicity. J Biol Chem 278: 25143 – 25150, 2003

61. Jabs EW, Tuck – Muller CM, Anhalt GJ, Earnshaw W, Wise RA, Wigley F. Cytogenetic survey in systemic sclerosis: correlation of aneuploidy with the presence of anticentromere antibodies. Cytogenet Cell Genet 63: 169 – 175, 1993

62. Jäger E, Ringhoffer M, Dienes HP, Arand M, Karbach J, Jäger D, Ilsemann C, Hagedorn M, Oesch F, and Knuth A. Granulocyte – macrophage – colony – stimulating factor enhances immune responses to melanoma – associated peptides in vivo. Int J Cancer 67: 54 – 62, 1996

63. Jäger E, Chen YT, Drijfhout JW, Karbach J, Ringhoffer M, Jäger D, Arand M, Wada H, Noguchi Y, Stockert E, Old LJ and Knuth A. Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer – testis antigen NY – ESO – 1: Definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA) – A2 – binding peptide epitopes. J Exp Med 187: 265 – 270, 1998

64. Kai M, Nakatsura T, Egami H, Senju S, Nishimura Y, Ogawa M. Heat shock protein 105 is overexpressed in a variety of human tumors. Oncol Rep 10: 1777 – 1782, 2003

65. Kastner P, Lawrence HJ, Waltzinger C, Ghyselinck NB, Chambon P, Chan S. Positive and negative regulation of granulopoiesis by endogenous RARalpha. Blood 97: 1314 – 1320, 2001

66. Kawagishi J, Kumabe T, Yoshimoto T, Yamamoto T. Structure, organization, and transcription units of the human alpha – platelet – derived growth factor receptor gene, PDGFRA. Genomics 30: 224 – 232, 1995

67. Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH, Robbins PF, Rivoltini L, Topalian SL, Miki T, Rosenberg SA. Cloning of the gene for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. Proc Natl Acad Sci USA 91: 3515 – 3519, 1994 a

68. Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH, Robbins PF, Sakaguchi K, Appella E, Yannelli JR, Adema GJ, Miki T, Rosenberg SA. Identification of a human melanoma

antigen recognized by tumor – infiltrating lymphocytes associated with in vivo tumor rejection. Proc Natl Acad Sci USA 91: 6458 – 6462, 1994 b

69. Kessler JH, Beekman NJ, Bres-Vloemans SA, Verdijk P, van Veeler PA, Kloosterman-Joosten AM, Vissers DC, Ten Bosch GJ, Kester MG, Sijts A, Wouter Drijfhout J, Ossendorp F, Offringa R, Melief CJ. Efficient identification of novel HLA – A 0201 – presented cytotoxic T lymphocyte epitopes in the widely expressed tumor antigen PRAME by proteasome-mediated digestion analysis. J Exp Med 193: 73 – 88, 2001

70. Khan MM, Nomura T, Kim H, Kaul SC, Wadhwa R, Shinagawa T, Ichikawa – Iwata E, Zhong S, Pandolfi PP, Ishii S. Role of PML and PML – RARalpha in Mad – mediated transcriptional repression. Mol Cell 7: 1233 – 1243, 2001

71. Klein E, Klein G, Hellstrom KE. Further studies on isoantigenic variation in mouse carcinomas and sarcomas. J Natl Cancer Inst 25: 271 – 294, 1960

72. Kolb HJ, Mittermüller J, Clemm C, Holler E, Ledderose G, Brehm G, Heim M, Wilmanns W. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. Blood 76: 2462 – 2465, 1990

73. Kolb KJ, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W, Ljungman P, Ferrant A, Verdonck L, Niederwieser D, Van Rhee F, Mittermüller J, De Witte T, Holler E, and Ansari H. Graft – versus – leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. Blood 86: 2041 – 2050, 1995

74. Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. Annu Rev Immunol 20: 709 – 760, 2002

75. Kripke ML. Antigenicity of murine skin tumors induced by ultraviolet light. J Natl Cancer Inst 53: 1333 – 1336, 1974

76. Kuwana M, Okano Y, Kaburaki J, Inoko H. HLA class II genes associated with anticentromere antibody in Japanese patients with systemic sclerosis (scleroderma). Ann Rheum Dis 54: 983 – 987, 1995

77. Larson RA, Boogaerts M, Estey E, Karanes C, Stadtmauer EA, Sievers EL, Mineur P, Bennett JM, Berger MS, Eten CB, Munteanu M, Loken MR, Van Dongen JJ, Bernstein ID, Appelbaum FR. Antibody – targeted chemotherapy of older patients with

acute myeloid leukemia in first relapse using Mylotarg (gemtuzumab ozogamicin). Leukemia 16: 1627 – 1636, 2002

78. Lawler M. Leukaemogenesis, gene interplay, and the role of the haemopoietic environment. Radiat Oncol Investig 5: 154 – 157, 1997

79. Lee KH, Chang MY, Ahn JI, Yu DH, Jung SS, Choi JH, Noh YH, Lee YS, Ahn MJ. Differential gene expression in retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells, NB4 and HL-60 cells. Biochem Biophys Res Commun 296: 1125 – 1133, 2002

80. Leone G, Mele L, Pulsoni A, Equitani F, Pagano L. The incidence of secondary leukemias. Haematologica 84: 937 – 945, 1999

81. Li W, Elliott RW, Novak EK, Swank RT. cDNA sequence and mapping of the mouse Copb gene encoding the beta subunit of the COPI coatomer complex. Somat Cell Mol Genet 25: 177 – 183, 1999

82. Li Z, Qiao Y, Liu B, Srivastava P. Heat shock protein 70 – based vaccine stimulates both innate and adaptive immunity against chronic myeloid leukemia. J Clin Oncol, 2004 Annual Meeting Proceedings, 22: 2515, 2004

83. Lim SH, Austin S, Owen – Jones E, Robinson L. Expression of testicular genes in haematological malignancies. Br J Cancer 81: 1162 – 1164, 1999

84. Lyons GE, Micales BK, Herr MJ, Horrigan SK, Namciu S, Shardy D, Stavnezer E. Protooncogene c – ski is expressed in both proliferating and postmitotic neuronal populations. Dev Dyn 201: 354 – 365, 1994

85. MacDonald TJ, Brown KM, LaFleur B, Peterson K, Lawlor C, Chen Y, Packer RJ, Cogen P, Stephan DA. Expression profiling of medulloblastoma: PDGFRA and the RAS / MAPK pathway as therapeutic targets for metastatic disease. Nat Genet 29: 143 – 152, 2001

86. Mailänder V, Scheibenbogen C, Thiel E, Letsch A, Blau IW, Keilholz U. Complete remission in a patient with recurrent acute myeloid leukemia induced by vaccination with WT1 peptide in the absence of hematological or renal toxicity. Leukemia 18: 165 – 166, 2004

87. Makita M, Azuma T, Hamaguchi H, Niiya H, Kojima K, Fujita S, Tanimoto M, Harada M, Yasukawa M. Leukemia – associated fusion proteins, dek – can and bcr – abl, represent immunogenic HLA – DR – restricted epitopes recognized by fusion peptide – specific CD4+ T lymphocytes. Leukemia 16: 2400 – 2407, 2002

88. Mandelboim O, Berke G, Fridkin M, Feldman M, Eisenstein M, Eisenbach L. CTL induction by a tumour – associated antigen octapeptide derived from a murine lung carcinoma. Nature 369: 67 – 71, 1994

89. Matsumori M, Itoh H, Toyoshima I, Komatsuda A, Sawada K, Fukuda J, Tanaka T, Okubo A, Kinouchi H, Mizoi K, Hama T, Suzuki A, Hamada F, Otaka M, Shoji Y, Takada G. Characterization of the 105 – kDa molecular chaperone. Identification, biochemical properties, and localization. Eur J Biochem 269: 5632 – 5641, 2002

90. Matsushita M, Ikeda H, Kizaki M, Okamoto S, Ogasawara M, Ikeda Y, Kawakami Y. Quantitative monitoring of the PRAME gene for the detection of minimal residual disease in leukaemia. Br J Haematol 112: 916 – 926, 2001

91. Maurer U, Weidmann E, Karakas T, Hoelzer D, Bergmann L. Wilms tumor gene (wt1) mRNA is equally expressed in blast cells from acute myeloid leukemia and normal CD34+ progenitors. Blood 90: 4230 – 4232, 1997

92. Maxwell CA, Keats JJ, Crainie M, Sun X, Yen T, Shibuya E, Hendzel M, Chan G, Pilarski LM. RHAMM is a centrosomal protein that interacts with dynein and maintains spindle pole stability. Mol Biol Cell 14: 2262 – 2276, 2003

93. McCarty GA, Rice JR, Bembe ML, Barada FA. Anticentromere antibody: clinical correlations and association with favorable prognosis in patients with scleroderma variants. Arthritis Rheum 26: 1 – 7, 1983

94. Mertens AC, Wen W, Davies SM, Steinbuch M, Buckley JD, Potter JD, Robison LL. Congenital abnormalities in children with acute leukemia: a report from the Children's Cancer Group. J Pediatr 133: 617 – 623, 1998

95. Mitchel RE, Jackson JS, McCann RA, Boreham DR. The adaptive response modifies latency for radiation – induced myeloid leukemia in CBA / H mice. Radiat Res 152: 273 – 279, 1999

96. Miwa H, Beran M, Saunders GF. Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in human leukemias. Leukemia 6: 405 – 409, 1992

97. Molldrem J, Dermime S, Parker K, Jiang YZ, Mavroudis D, Hensel N, Fukushima P, Barrett AJ. Targeted T – cell therapy for human leukemia: cytotoxic T lymphocytes specific for a peptide derived from proteinase 3 preferentially lyse human myeloid leukemia cells. Blood 88: 2450 – 2457, 1996

98. Molldrem J, Lee PP, Wang C, Champlin RE, Davis MM. A PR1 – human leukocyte antigen – A2 tetramer can be used to isolate low – frequency cytotoxic T lymphocytes from healthy donors that selectively lyse chronic myeloid leukemia. Cancer Res 59: 2675 – 2681, 1999

99. Molldrem JJ, Lee PP, Wang C, Felio K, Kantarjian HM, Champlin RE, Davis MM. Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia. Nat Med 6: 1018 – 1023, 2000

100. Molldrem JJ, Lee PP, Kant S, Wieder E, Jiang W, Lu S, Wang C, Davis MM. Chronic myelogenous leukemia shapes host immunity by selective deletion of high – avidity leukemia – specific T cells. J Clin Invest 111: 639 – 647, 2003

101. Morton DL, Miller GF, Wood DA. Demonstration of tumor – specific immunity against antigens unrelated to the mammary tumor virus in spontaneous mammary adenocarcinomas. J Natl Cancer Inst 42: 289 – 301, 1969

102. Münster AK, Eckhardt M, Potvin B, Mühlenhoff M, Stanley P, Gerardy – Schahn R. Mammalian cytidine 5’ – monophosphate N – acetylneuraminic acid synthetase: a nuclear protein with evolutionarily conserved structural motifs. Proc Natl Acad Sci USA 95: 9140 – 9145, 1998

103. Müschen M, Lee S, Zhou G, Feldhahn N, Barath VS, Chen J, Moers C, Krönke M, Rowley JD, Wang SM. Molecular portraits of B cell lineage commitment. Proc Natl Acad Sci USA 99: 10014 – 10019, 2002

104. Nakatsura T, Senju S, Yamada K, Jotsuka T, Ogawa M, Nishimura Y. Gene cloning of immunogenic antigens overexpressed in pancreatic cancer. Biochem Biophys Res Commun 281: 936 – 944, 2001

105. Namciu S, Lieberman MA, Stavnezer E. Induction of the c – ski proto – oncogene by phorbol ester correlates with induction of megakaryocyte differentiation. Oncogene 9: 1407 – 1416, 1994

106. Neuwirtova R, Mocikova K, Musilova J, Jelinek J, Havlicek F, Michalova K, Adamkov M. Mixed myelodysplastic and myeloproliferative syndromes. Leuk Res 20: 717 – 726, 1996

107. Niemeyer P, Türeci Ö, Eberle T, Graf N, Pfreundschuh M, Sahin U. Expression of serologically identified tumor antigens in acute leukemias. Leuk Res 27: 655 – 660, 2003

108. Oka Y, Elisseeva OA, Tsuboi A, Ogawa H, Tamaki H, Li H, Oji Y, Kim EH, SomaT, Asada M, Ueda K, Maruya E, Saji H, Kishimoto T, Udaka K, Sugiyama H. Human cytotoxic T – lymphocyte responses specific for peptides of the wild – type Wilms' tumor gene (WT1) product. Immunogenetics 51: 99 – 107, 2000

109. Oka Y, Udaka K, Tsuboi A, Elisseeva OA, Ogawa H, Aozasa K, Kishimoto T, Sugiyama H. Cancer immunotherapy targeting Wilms' tumor gene WT1 product. J Immunol 164: 1873 – 1880, 2000

110. Oka Y, Tsuboi A, Taguchi T, Osaki T, Kyo T, Nakajima H, Elisseeva OA, Oji Y, Kawakami M, Ikegame K, Hosen N, Yoshihara S, Wu F, Fujiki F, Murakami M, Masuda T, Nishida S, Shirakata T, Nakatsuka S, Sasaki A, Udaka K, Dohy H, Aozasa K, Noguchi S, Kawase I, Sugiyama H. Induction of WT1 (Wilms' tumor gene) – specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. Proc Natl Acad Sci USA 101: 13885 – 13890, 2004

111. Okumara K, Nogami M, Matsushima Y, Matsumura K, Nakamura K, Taguchi H, Kitagawa Y. Mapping of human DNA – binding nuclear protein (NP220) to chromosome band 2p13.1 – p13.2 and its relation to matrin 3. Biosci Biotechnol Biochem 62: 1640 – 1642, 1998

112. Old LJ. Cancer immunology: the search for specificity. Cancer Res 41: 361 – 375, 1981

113. Paustenbach DJ, Bass RD, Price P. Benzene toxicity and risk assessment, 1972 – 1992: implications for future regulation. Environ Health Perspect 101: 177 – 200, 1993

114. Van Pel A, Vessiere F, Boon T. Protection against two spontaneous mouse leukemias conferred by immunogenic variants obtained by mutagenesis. J Exp Med 157: 1992 – 2001, 1983

115. Pfreundschuh M, Shiku H, Takahashi T, Ueda R, Ransohoff J, Oettgen HF, Old LJ. Serological analysis of cell surface antigens of malignant human brain tumors. Proc Natl Acad Sci USA 75: 5122 – 5126, 1978

116. De Plaen E, Lurquin C, Van Pel A, Mariame B, Szikora JP, Wölfel T, Sibille C, Chomez P, Boon T. Immunogenic (tum –) variants of mouse tumor P815: cloning of the gene of tum– antigen P91A and identification of the tum– mutation. Proc Natl Acad Sci USA 85: 2274 – 2278, 1988

117. Pierrat B, Simonen M, Cueto M, Mestan J, Ferrigno P, Heim J. SH3GLB, a new endophilin – related protein family featuring an SH3 domain. Genomics 71: 222 – 234, 2001

118. Porter DL, Roth MS, McGarigle C, Ferrara JL, Antin JH. Induction of graft – versus – host disease leukemia as immunotherapy for relapsed chronic myeloid leukemia. N Engl J Med 330: 100 – 106, 1994

119. Porter DL, Roth MS, Lee SJ, McGarigle C, Ferrara JL, Antin JH. Adoptive immunotherapy with donor mononuclear cell infusions to treat relapse of acute leukemia or myelodysplasia after allogeneic bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant 18: 975 – 980, 1996

120. Prehn RT, Main JM. Immunity to methylcholanthrene – induced sarcomas. J Natl Cancer Inst 18: 769 – 778, 1957

121. Ray – Gallet D, Mao C, Tavitian A, Moreau – Gachelin F. DNA binding specificities of Spi – 1 / PU.1 and Spi – B transcription factors and identification of a Spi – 1 / Spi – B binding site in the c – fes / c – fps promoter. Oncogene 11: 303 – 313, 1995

122. Reed JA, Bales E, Xu W, Okan NA, Bandyopadhyay D, Medrano EE. Cytoplasmic localization of the oncogenic protein Ski in human cutaneous melanomas in vivo: functional implications for transforming growth factor beta signalling. Cancer Res 61: 8074 – 8078, 2001

123. Reinhardt D, Diekamp S, Fleischhack G, Corbacioglu C, Jurgens H, Dworzak M, Kaspers G, Creutzig U, Zwaan CM. Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) in children with refractory or relapsed acute myeloid leukemia. Onkologie 27: 269 – 272, 2004

124. Rodriguez S, Jafer O, Goker H, Summersgill BM, Zafarana G, Gillis AJ, Van Gurp RJ, Oosterhuis JW, Lu YJ, Huddart R, Coopers CS, Clark J, Looijenga LH, Shipley JM. Expression profile of genes from 12p in testicular germ cell tumors of adolescents and adults associated with i(12p) and amplification at 12p11.2 – p12.1. Oncogene 22: 1880 – 1891, 2003

125. Rosenbauer F, Wagner K, Kutok JL, Iwasaki H, Le Beau MM, Okuno Y, Akashi K, Fiering S, Tenen DG. Acute myeloid leukemia induced by graded reduction of a lineage – specific transcription factor, PU.1. Nat Genet 36: 624 – 630, 2004

126. Rötzschke O, Falk K, Deres K, Schild H, Norda M, Metzger J, Jung G, Rammensee HG. Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells. Nature 348: 252 – 254, 1990

127. Rousselot P, Hardas B, Patel A, Guidez F, Gaken J, Castaigne S, Dejean A, de The H, Degos L, Farzaneh F. The PML-RAR alpha gene product of the t(15;17) translocation inhibits retinoic acid-induced granulocytic differentiation and mediated transactivation in human myeloid cells. Oncogene 9: 545 – 551, 1994

128. Sahin U, Türeci Ö, Schmitt H, Cochlovius B, Johannes T, Schmits R, Stenner F, Schobert I, Pfreundschuh M. Human neoplasms elicit multiple specific immune responsews in the autologous host. Proc Natl Acad Sci USA 92: 11810 – 11813, 1995

129. Sahin U, Türeci Ö, Pfreundschuh M. Serological identification of human tumor antigens. Curr Opin Immunol 9: 709 – 716, 1997

130. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer – directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487 – 491, 1988

131. Saitoh H, Tomkiel J, Cooke CA, Ratrie H 3rd, Maurer M, Rothfield NF, Earnshaw WC. CENP – C, an autoantigen in scleroderma, is a component of the human inner kinetochore plate. Cell 70: 115 – 125, 1992

132. Sanz GF, Sanz MA, Vallespi T. Etiopathogeny, prognosis and therapy of myelodysplastic syndromes. Hematol Cell Ther 39: 277 – 294, 1997

133. Scanlan MJ, Chen YT, Williamson B, Gure AO, Stockert E, Gordan JD, Türeci Ö, Sahin U, Pfreundschuh M, Old LJ. Characterization of human colon cancer antigens recognized by autologous antibodies. Int J Cancer 76: 652 – 658, 1998

134. Scanlan MJ, Gordan JD, Williamson B, Stockert E, Bander NH, Jongeneel V, Gure AO, Jäger D, Jäger E, Knuth A, Chen YT, Old LJ. Antigens recognized by autologous antibody in patients with renal – cell carcinoma. Int J Cancer 83: 456 – 464, 1999

135. Scanlan MJ, Simpson AJ, Old LJ. The cancer / testis genes: review, standardization, and commentary. Cancer Immun 4: 1 (Review), 2004

136. Schlenk RF, Benner A, Hartmann F, Del Valle F, Weber C, Pralle H, Fischer JT, Gunzer U, Pezzutto A, Weber W, Grimminger W, Preiss J, Hensel M, Fröhling S, Döhner K, Haas R, Döhner H; AML Study Group Ulm (AMLSG ULM). Risk – adapted postremission therapy in acute myeloid leukemia: results of the German multicenter AML HD93 treatment trial. Leukemia 17: 1521 – 1528, 2003

137. Serex – Database: http://www.licr.org/SEREX.html

138. Shiku H, Takahashi T, Oettgen HF. Cell surface antigens of human malignant melanoma. II. Serological typing with immune adherence assays and definition of two new surface antigens. J Exp Med 144: 873 – 881, 1976

139. Shiku H, Wang L, Ikuta Y, Okugawa T, Schmitt M, Gu X, Akiyoshi K, Sunamoto J, Nakamura H. Development of a cancer vaccine: peptides, proteins, and DNA. Cancer Chemother Pharmacol 46: 77 – 82, 2000

140. Shinagawa T, Nomura T, Colmenares C, Ohira M, Nakagawara A, Ishii S. Increased susceptibility to tumorigenesis of ski – deficient heterozygous mice. Oncogene 20: 8100 – 8108, 2001

141. Short JM, Sorge JA. In vivo excision properties of bacteriophage lambda ZAP expression vectors. Methods Enzymol 216: 495 – 508, 1992

142. Shou Z, Yamada K, Inazu T, Kawata H, Hirano S, Mizutani T, Yazawa T, Sekiguchi T, Yoshino M, Kajitani T, Okada K, Miyamoto K. Genomic structure and analysis of transcriptional regulation of the mouse zinc – fingers and homeoboxes 1 (ZHX1) gene. Gene 302: 83 – 94, 2003

143. Shou Z, Yamada K, Kawata H, Yokoyama O, Miyamoto K. A mechanism of induction of the mouse zinc – fingers and homeoboxes 1 (ZHX1) gene expression by interleukin – 2. Biochem Biophys Res Commun 314: 885 – 890, 2004

144. Sievers EL. Antibody – targeted chemotherapy of acute myeloid leukemia using gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg). Blood Cells Mol Dis 31: 7 – 10, 2003

145. Smith JS, Wang XY, Qian J, Hosek SM, Scheithauer BW, Jenkins R, James CD. Amplification of the platelet – derived growth factor receptor α (PDGFRA) gene occurs in oligodendrogliomas with grade IV anaplastic features. J Neuropathol Exp Neurol 59: 495 – 503, 2000

146. Soekarmann D, Von Lindern M, Daenen S, De Jong B, Fonatsch C, Heinze B, Bartram C, Hagemeijer A, Grosveld G. The translocation t(6;9)(p23;q34) shows consistent rearrangement of two genes and defines a myeloproliferative disorder with specific clinical features. Blood 79: 2990 – 2997, 1992

147. Song K, Gronemeyer B, Lu W, Eugster E, Tomkiel JE. Mutational analysis of the central centromere targeting domain of human centromere protein C, (CENP – C). Exp Cell Res 275: 81 – 91, 2002

148. Srivastava PK. Hypothesis: Controlled necrosis as a tool for immunotherapy of human cancer. Cancer Immun 3: 4, 2003

149. Stillman WS, Varella – Garcia M, Irons RD. The benzene metabolites hydroquinone and catechol act in synergy to induce dose – dependent hypoploidy and –5q31 in a human cell line. Leuk Lymphoma 35: 269 – 281, 1999

150. Sugimoto K, Kuriyama K, Himeno M, Muro Y. Epitope mapping of human centromere autoantigen centromere protein C (CENPC – C); heterogeneity of anti – CENP – C response in rheumatic diseases. J Rheumatol 25: 474 – 481, 1998

151. Szer IS, Sierakowska H, Szer W. A novel autoantibody to the putative oncoprotein DEK in pauciarticular onset juvenile rheumatoid arthritis. J Rheumatol 21: 2136 – 2142, 1994

152. Tarsounas M, Heng HH, Ye CJ, Pearlman RE, Moens PB. Identification of the mouse beta' – COP Golgi component as a spermatocyte autoantigen in scleroderma and mapping of its gene Copb2 to mouse chromosome 9. Cytogenet Cell Genet 87: 201 – 204, 1999

153. Thampoe IJ, Furukawa K, Vellvé E, Lloyd KO. Sialyltransferase levels and ganglioside expression in melanoma and other cultured human cancer cells. Cancer Res 49: 6258 – 6264, 1989

154. Topalian SL, Rivoltini L, Mancini M, Markus NR, Robbins PF, Kawakami Y, Rosenberg SA: Human CD4 T cells specifically recognize a shared melanoma – associated antigen encoded by the tyrosinase gene. Proc Natl Acad Sci USA 91: 9461 – 9465, 1994

155. Topalian SL, Gonzales MI, Parkhurst M, Li YF, Southwood S, Sette A, Rosenberg SA, Robbins PF: Melanoma-specific CD4+ T cells recognize nonmutated HLA – DR restricted tyrosinase epitopes. J Exp Med 183: 1965 – 1971, 1996

156. Trazzi S, Bernardoni R, Diolaiti D, Politi V, Earnshaw WC, Perini G, Della Valle G. In vivo functional dissection of human inner kinetochore protein CENP – C. J Struct Biol 140: 39 – 48, 2002

157. Tsimberidou AM, Estey E, Cortes JE, Garcia-Manero G, Faderl S, Verstovsek S, Thomas DA, Ferrajoli A, Keating MJ, O'Brien S, Kantarjian HM, Giles FJ. Mylotarg, fludarabine, cytarabine (ara – C), and cyclosporine (MFAC) regimen as post – remission therapy in acute myelogenous leukemia. Cancer Chemother Pharmacol 52: 449 – 452, 2003

158. Tsuboi A, Oka Y, Osaki T, Kumagai T, Tachibana I, Hayashi S, Murakami M, Nakajima H, Elisseeva OA, Fei W, Masuda T, Yasukawa M, Oji Y, Kawakami M, Hosen N, Ikegame K, Yoshihara S, Udaka K, Nakatsuka S, Aozasa K, Kawase I, Sugiyama H. WT1 peptide – based immunotherapy for patients with lung cancer: Report of two cases. Microbiol Immunol 48: 175 – 184, 2004

159. Türeci Ö, Sahin U, Schobert I, Koslowski M, Schmitt H, Schild HJ, Stenner F, Seitz G, Rammensee HG, Pfreundschuh M: The SSX – 2 gene, which is involved in the t(X;18) translocation of synovial sarcomas, codes for the human tumor antigen HOM – MEL – 40. Cancer Res 56: 4766 – 4772, 1996

160. Türeci Ö, Sahin U, Pfreundschuh M. Serological analysis of human tumor antigens: molecular definition and implications. Mol Med Today 3: 342 – 349, 1997

161. Türeci Ö, Chen YT, Sahin U, Gure AO, Zwick C, Villena C, Tsang S, Seitz G, Old LJ, Pfreundschuh M: Expression of SSX genes in human tumors. Int J Cancer 77: 19 – 23, 1998

162. Türeci Ö, Sahin U, Zwick C, Koslowski M, Seitz G, Pfreundschuh M: Identification of a meiosis – specific protein as a member of the class of cancer / testis antigens. Proc Natl Acad Sci 95: 5211 – 5216, 1998

163. Ueda R, Ogata S, Morrissey DM, Finstad CL, Szkudlarek J, Whitmore WF, Oettgen HF, Lloyd KO, Old LJ. Cell surface antigens of human renal cancer defined by mouse monoclonal antibodies: identification of tissue – specific kidney glycoproteins. Proc Natl Acad Sci USA 78: 5122 – 5126, 1981

164. Urioste M, Martinez – Ramirez A, Cigudosa JC, Mateo MS, Martinez P, Contra T, Benitez J. Identification of ins (8;21) with AML1 / ETO fusion in acute myelogenous leukemia M2 by molecular cytogenetics. Cancer Genet Cytogenet 133: 83 - 86, 2002

165. Velyvis A, Yang Y, Wu C, Qin J. Solution structure of the focal adhesion adaptor PINCH LIM1 domain and characterization of its interaction with the integrin – linked kinase ankyrin repeat domain. J Biol Chem 276: 4932 – 4939, 2001

166. Von Lindern M, Fornerod M, Van Baal S, Jaegle M, De Wit T, Buijs A, Grosveld G. The translocation (6;9), associated with a specific subtype of acute myeloid leukemia, results in the fusion of two genes, dek and can, and the expression of a chimeric, leukemia – specific dek – can mRNA. Mol Cell Biol 12: 1687 – 1697, 1992

167. Wang J, Hoshino T, Redner RL, Kajigaya S, Liu JM. ETO, fusion partner in t(8;21) acute myeloid leukemia, represses transcription by interaction with the human

N – CoR / mSin3 / HDAC1 complex. Proc Natl Acad Sci USA 95: 10860 – 10865, 1998

168. Weiner ES, Earnshaw WC, Senecal JL, Bordwell B, Johnson P, Rothfield NF. Clinical associations of anticentromere antibodies and antibodies to topoisomerase I: a study of 355 patients. Arthritis Rheum 31: 37 – 85, 1988

169. Wichmann I, Respaldiza N, Garcia – Lozano JR, Montes M, Sanchez – Roman J, Nunez – Roldan A. Autoantibodies to DEK oncoprotein in systemic lupus erythematosus (SLE). Clin Exp Immunol 119: 530 – 532, 2000

170. Wu CJ, Yang XF, McLaughlin S, Neuberg D, Canning C, Stein B, Alyea EP, Soiffer RJ, Dranoff G, Ritz J. Detection of a potent humoral response associated with immune – induced remission of chronic myelogenous leukemia. J Clin Invest 106: 705 – 714, 2000

171. Xie Y, Heng HH. FISH mapping of centromere protein C (CENPC) on human chromosome 4q31 → q21. Cytogenet Cell Genet 74: 192 – 193, 1996

172. Yamada K, Printz RL, Osawa H, Granner DK. Human ZHX1: cloning, chromosomal lokalisation, and interaction with transcription factor NF – Y. Biochem Biophys Res Commun 261: 614 – 621, 1999

173. Yamada K, Kawata H, Shou Z, Hirano S, Mizutani T, Yazawa T, Sekiguchi T, Yoshino M, Kajitani T, Miyamoto K. Analysis of zinc – fingers and homeoboxes (ZHX) – 1 – interacting proteins: molecular cloning and characterisation of a member of the ZHX family, ZHX3. Biochem J 373: 167 – 178, 2003

174. Yeh HJ, Silos – Santiago I, Wang YX, George RJ, Snider WD, Deuel TF. Developmental expression of the platelet – derived growth factor α – receptor gene in mammalian central nervous system. Proc Natl Acad Sci USA 90: 1952 – 1956, 1993

175. Younes A, Fayad LE, Pro B, McLaughlin P, Hagemeister FB, Mansfield P, Clayman G, Medeiros LJ, Lewis J, Srivastava P. Safety and efficacy of heat shock protein – peptide 96 complex (HSPPC – 96) in low – grade lymphoma. Proc Am Soc Clin Oncol 22: 570, 2003

8. Danksagung

Zuerst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. H. Döhner für die Überlassung dieses Themas und die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit in seiner Abteilung.

Bei Herrn PD Dr. Michael Schmitt und Herrn Dr. Jochen Greiner möchte ich mich für ihre vorbildliche Betreuung, ihre Diskussionsbereitschaft und die freundliche Unterstützung herzlichst bedanken.

Danken möchte ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Labore der Abteilung Innere Medizin III für das angenehme Arbeitsklima. Insbesonders bedanke ich mich bei Frau Anita Szmaragowska für die gute Einarbeitung und freundliche Hilfe bei der Durchführung meiner Experimente im Labor.

Außerdem möchte ich mich bedanken bei meinen Eltern August und Josefine Hauser für ihr beständiges Vertrauen und fortwährende Unterstützung während meines Studiums und der Erstellung dieser Dissertation.

Dank gilt auch meinem Bruder Michael Hauser, der mir bei computertechnischen Fragen stets zur Seite stand.

Besonders herzlich bedanke ich mich auch bei meiner Freundin Birgit Weber, die während meiner Promotion alle Höhen und Tiefen mit mir teilte und mich stets moralisch unterstützte.

Zuletzt möchte ich allen meinen Freunden und Freundinnen danken, die mich während dieser Zeit begleitet und angespornt haben.