

**Identifizierung Hodgkin assoziierter Antigene  
mittels SEREX**

Inaugural- Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch- Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
**Sabine Mayrhofer**  
aus Wels (A)

Köln 2004

Berichtersteller: Prof. Dr. Angelika A. Noegel  
Prof. Dr. Jens C. Brüning

Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2004

## Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt.

Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Frau Prof. Dr. A. A. Noegel betreut worden.

Köln, den 22.04.2004

Sabine Mayrhofer

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden zellbiologischen und molekularbiologischen Untersuchungen sind von mir im Hodgkin-Labor der Klinik I für Innere Medizin der Universität zu Köln, Joseph- Stelzmann Straße 9, 50931 Köln unter der Aufsicht von Frau Prof. Dr. A. A. Noegel und unter der Anleitung von PD Dr. J. Wolf und Dr. A. Staratschek- Jox durchgeführt worden.

Die vorliegende Arbeit wurde durch die Frauke Weiskam und Christel Ruranski-Stiftung gefördert.

Die Sequenzierungsarbeiten (Herstellung des Polyacrylamidgels sowie die Gelelektrophorese auf dem ABI-PRISM 377 DNA- Sequenzer) wurden im Sequenzierlabor des SFB 502, LFI, Klinik I für Innere Medizin der Universität zu Köln, Joseph- Stelzmann Straße 9, 50931 Köln durchgeführt.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1 Adaptive Immunantwort.....	1
1.2 Lymphome.....	3
1.3 Therapie maligner Lymphome.....	4
1.3.1 Herkömmliche Behandlungsmethoden.....	4
1.3.2 Immuntherapie.....	5
1.4 Immuntherapie des Hodgkin- Lymphoms.....	7
1.5 Detektion neuer Tumor- assoziierter oder spezifischer Antigene als Zielstrukturen für die Immuntherapie.....	9
1.5.1 Screening von Expressionsbanken.....	10
1.6 Das SEREX- System.....	11
1.1.1 Erstellung einer cDNA- Expressionsbank in $\lambda$ - Phagen.....	12
1.1.2 Screening von $\lambda$ - Phagen- cDNA- Expressionsbanken mit Antikörpern.....	13
1.7 Zielsetzung der Arbeit.....	14
<b>2. Methoden</b> .....	15
1.1 Erstellung einer Hodgkin- spezifischen cDNA Expressionsbank in $\lambda$ - Phagen.....	15
1.1.1 Kultivierung der Zelllinie L1236.....	15
1.1.2 mRNA Isolierung aus der Zelllinie L1236.....	16
2.1.3 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.....	17
2.1.4 Agarosegelelektrophorese.....	17
2.1.5 Synthese der cDNA.....	19
2.1.6 Ligation der Adaptoren an die cDNA.....	20
2.1.7 Größenfraktionierung der cDNA in der Sepharose- Säule.....	23
2.1.8 Quantifizierung der cDNA im Ethidiumbromid- Platten- Assay.....	25
2.1.9 Ligation der cDNA in den $\lambda$ - Phagen- Vektor ZAP® II.....	26

2.1.10 Verpacken des Vektor- Insertkonstruktes in $\lambda$ - Phagen.....	28
2.1.11 Titrieren der primären Phagenbank.....	29
2.1.3.1 Präparation der kompetenten Bakterien.....	30
2.1.3.2 IPTG/ x-gal Test und Titerbestimmung.....	31
2.1.12 Amplifizieren der cDNA- Phagen Bank.....	32
2.1.12.1 Präparation der Wirtszellen XL1- Blue MRF´.....	32
2.1.12.2 Amplifizierung.....	32
2.1.12.3 Titerbestimmung der amplifizierten Phagenbank.....	33
2.1.13 Testen der L1236 cDNA Bank auf Diversität und die Expression vollständiger kodierender Sequenzen.....	33
2.1.14 Lagerung der cDNA- Expressionsbank.....	35
2.2 Screening der L1236 cDNA- Expressionsbank mit Patientenserum.....	36
2.2.1 Gewinnung des Patientenserums.....	36
2.2.2 Absorption der Seren mit E.coli/ $\lambda$ - Phagen Lysat.....	36
2.2.3 Ausplattieren der cDNA Bank für das Immunoscreening.....	37
2.2.1.1 Präparation der kompetenten Bakterien XL1- Blue MRF´.....	38
2.2.1.2 Übertragen der Plaques auf Nitrocellulosefilter.....	38
2.2.4 Immunfärbung.....	39
2.2.5 Isolierung positiver Plaques.....	40
2.2.6 Subklonierung positiver Phagen zur Vereinzelung positiver Plaques.....	41
2.2.7 Exzision des pBluescript- Phagmids aus $\lambda$ - Phagen mit ExAssist Helferphagen.....	42
2.2.1.1 Präparation der kompetenten Bakterien.....	44
2.2.1.2 Exzision.....	45
2.2.1.3 Transfektion des Konstrukts in Phagen- Infektion resistente Bakterien..	46
2.2.8 Plasmid- DNA- Minipräparation.....	47
2.2.9 Anlegen von Bakterien Glycerolstämmen.....	48
2.2.10 Größenanalyse der erhaltenen Inserts.....	48
2.2.11 Plasmid- Sequenzierung.....	49
2.3 Spezifität und Relevanz der gefundenen Antigene.....	51
2.3.1 Screenen der identifizierten Antikörper mit Seren anderer Patientengruppen..	51
2.3.1.1 Gewinnung des Patientenserums.....	51

2.2.1.2	Absorption der Seren mit E.coli/ $\lambda$ -Phagen Lysat.....	51
2.2.1.3	Ausplattieren der identifizierten Plaques für das Immunoscreening.....	51
2.2.1.4	Immunfärbung.....	51
2.2.2	Signifikanztest.....	51
3.	<b>Ergebnisse</b> .....	53
3.1	Charakterisierung der Hodgkin-spezifischen cDNA- Expressionsbank in $\lambda$ -Phagen...53	
3.1.1	Qualität der $\lambda$ - Phagen- Expressionsbank.....	53
3.1.1.1	mRNA- Isolierung aus der Zelllinie L1236.....	53
3.1.1.2	cDNA Synthese.....	54
3.1.1.3	Größenfraktionierung der cDNA in Sepharose- Säulen.....	55
3.1.1.4	Quantifizierung der cDNA im Ethidiumbromid- Platten Assay.....	55
3.1.1.5	Titerbestimmung der Primärbank mittels Blau- Weiß- Selektion.....	56
3.1.1.6	Amplifizierung der Primärbank.....	57
3.1.2	Diversität und Komplexität der cDNA-Bank.....	58
3.1.2.1	Testen der Diversität der cDNA- Bank mittels PCR.....	58
3.1.2.2	Nachweis der Expression vollständig kodierender Sequenzen.....	59
3.2	Screening der Hodgkin- spezifischen cDNA- Expressionsbank mit Humanserum (SEREX).....	61
3.2.1	Screeningschritte.....	61
3.2.2	Auswahl der Patientenseren.....	62
3.3	Analyse der Inserts positiver Klone des 3. Screenings.....	64
3.3.1	Exzision.....	64
3.3.2	Sequenzierung der Inserts mit BK und T7 Oligonukleotiden.....	67
3.3.3	Spezifität der gefundenen Antigene.....	70
3.3.4	Statistische Auswertung.....	74

<b>4. Diskussion</b> .....	76
4.1 Screening der Hodgkin- spezifischen cDNA- Expressionsbank mit Patientenserum (SEREX).....	77
4.2 Relevante Antigene.....	80
4.3 Ausblick.....	88
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	90
<b>6. Anhang</b> .....	92
6.1 Verzeichnis der Abkürzungen.....	92
6.2 Analyse der Inserts positiver Klone des 3. Screenings durch XhoI/ EcoRI Restriktionsenzym- Verdau.....	93
6.3 Sequenzen der identifizierten Inserts.....	97
6.4 Primärdaten des Screenings der Antigen- Klone mit Seren von gesunden Probanden, NHL- Patienten, Tumor- Patienten und Hodgkin- Patienten.....	99
<b>7. Literaturverzeichnis</b> .....	104

# **1. Einleitung**

Die Erforschung der Immunität begann im späten 18. Jahrhundert mit Edward Jenner. Er entdeckte, dass ein Mensch gegen Pocken geschützt ist, wenn man ihn mit Kuhpocken- oder Vacciniaviren impft (Silverstein, 1989). Bereits Ende des 19. Jahrhunderts wurde die Hypothese von der Existenz von Antikörpern von Emil von Behring und seinen Mitarbeitern vertreten, die Kaninchen mit geringen Mengen von Tetanustoxin impften. Dabei stellten sie fest, dass eine eigentlich letale Dosis Tetanustoxin, nachdem sie mit dem zellfreien Serum der geimpften Tiere gemischt worden war, für andere Kaninchen keine toxische Wirkung mehr hatte. Das Serum der geimpften Tiere musste also ein spezifisches Antitoxin enthalten haben (Behring, 1890). Schließlich formulierte Paul Ehrlich 1900 erstmals die Idee, das menschliche Immunsystem zur spezifischen Therapie maligner Erkrankungen einzusetzen. Ehrlichs Modell vom Immunsystem war schon in der Lage, die Immunisierung von Tieren gegen bestimmte Toxine zu erklären (Ehrlich, 1900).

Seit dem 19. Jahrhundert wurde das Immunsystem in Abhängigkeit von den technischen Möglichkeiten systematisch erforscht und es wurden die einzelnen Komponenten, die bei der Bekämpfung von Krankheitserregern und bei der Entwicklung neuer immunologischer Therapieansätze eine Rolle spielen, bekannt.

Das Immunsystem kann in Form der angeborenen und adaptiven Immunität auf Krankheiten reagieren. Zur angeborenen Immunität zählen phagozytische Zellen (Makrophagen), die Mikroorganismen aufnehmen und vernichten können, während die adaptive Immunität aus Antikörpern besteht und das Zusammenspiel von B- und T-Lymphocyten beinhaltet (Landsteiner, 1964).

## **1.1 Adaptive Immunantwort**

Das Immunsystem benutzt bei der adaptiven Immunantwort zwei verschiedene, jedoch kommunizierende Wege; nämlich das humorale und das zelluläre Erkennungssystem. Die humorale Immunantwort besteht aus löslichen Proteinen, den Serumantikörpern, die von Plasmazellen produziert werden. Die zelluläre Immunantwort umfasst alle adaptiven Immunreaktionen, bei denen antigenspezifische T-Lymphocyten eine zentrale Rolle

spielen. Durch die Unterstützung der B- Zellen, der Vorläufer der Plasmazellen, stimulieren die T- Lymphocyten zudem die humorale Immunantwort.

Adaptive Immunantworten entstehen, wenn die Rezeptoren auf einzelnen Lymphocyten ein Antigen erkennen. B- Lymphocyten werden ein Leben lang im Knochenmark gebildet und rufen bei Infektion die humorale Immunantwort hervor. Diese setzt sich aus der Produktion von Antikörpern, deren Bindung an die Pathogene und deren Beseitigung durch akzessorische Zellen und Moleküle des humoralen Immunsystems zusammen (Kindt et al., 1984).

Die Rezeptoren auf den B- Lymphocyten sind Zelloberflächenimmunglobuline, die diese sezernieren, wenn sie durch ein Antigen aktiviert werden. Antikörper sind also antigenspezifische Produkte von B- Zellen die zwei Funktionen besitzen. Die eine besteht darin, Moleküle desjenigen Pathogens zu binden, das die Immunantwort hervorgerufen hat, die zweite darin, andere Zellen und Moleküle zu rekrutieren, die das Pathogen zerstören. Man unterscheidet biochemisch fünf Klassen von Antikörpern (IgM, IgD, IgG, IgA und IgE). Diese Immunglobuline sind gleichermaßen aus vier Polypeptidketten aufgebaut. Diese Polypeptidketten lassen sich in zwei identische schwere und zwei identische leichte Ketten einteilen, die über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Die schweren und leichten Ketten setzen sich wiederum aus konstanten und variablen Regionen zusammen. Feine Unterschiede innerhalb der variablen Region, die für die Spezifität der Antigenbindung verantwortlich ist, machen die kombinatorische Vielfalt dieser Moleküle aus (Reth et al., 1994). Neben der vererbten Variabilität der variablen Regionen entsteht eine zusätzliche Vielfalt dieser Regionen durch zufällige Rekombination separater DNA- Fragmente, der V-, D- und J- Gensegmente. Nachdem ein Antikörper exprimiert ist, unterliegt er schließlich aufgrund somatischer Hypermutation weiterer vielfältiger Gestaltung. Die Kombination all dieser Mechanismen schaffen aus einer relativ begrenzten Zahl von Genen ein riesiges Repertoire an Antikörperspezifitäten (Berek, C. et al., 1987).

Antikörper die von einem einzigen B- Zell Klon produziert werden, werden monoklonale Antikörper genannt. Diese monoklonalen Antikörper können an die Oberfläche von Zellen über Fremdproteine binden und dort eine Reihe von Reaktionen auslösen, die zur Zerstörung der Zelle führen können. Ein Teil des Antikörpers vermittelt eine Aktivierung der Komplementkaskade und damit eine Lyse der Zelle. Weiterhin werden über den

Antikörper Effektorzellen an die Zelle gebunden, die die sogenannte antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität auslösen und so ebenfalls zur Vernichtung von Zellen beitragen. Durch Blockade von Zytokin- oder Wachstumsrezeptoren können Antikörper Apoptose und nachfolgenden Zelltod induzieren (Schatz et al., 1992).

Die T- Lymphocyten, die im Thymus entstehen, haben ihre eigenen Rezeptoren, die den Antikörpern von der Struktur her ähneln. So besitzen sie ebenfalls schwere und leichte Ketten und V-, D- und J. artige Elemente. Diese Strukturen entstehen auch auf ähnliche Weise wie bei den Immunglobulinen, sind aber monovalent, werden nicht sezerniert und binden nicht direkt an die Antigene. Sie erkennen Peptidfragmente von Proteinantigenen, die an Moleküle gebunden sind, die im Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) kodiert werden und die Peptide rufen so die zellvermittelte Immunität hervor. Auch intrazelluläre Pathogene können so von den T- Lymphocyten erkannt werden (Neefjes et al., 1993). Um an einer adaptiven Immunantwort teilzunehmen, müssen naive T- Zellen durch den Kontakt mit einem Antigen zur Proliferation angeregt werden und sich zu T- Effektorzellen differenzieren. T- Zellen können so infizierte Zellen direkt abtöten, oder Makrophagen aktivieren, die die Krankheitserreger vernichten. Sie sind außerdem erforderlich, um über Botenstoffe die B- Zell Reaktion gegen die meisten Antigene zu aktivieren und damit die humorale Immunantwort auszulösen (Knight et al., 1993).

## **1.2 Lymphome**

Lymphome repräsentieren einen klonalen Auswuchs einer einzigen bösartigen, transformierten Zelle. Dieses unkontrollierte Zellwachstum wird je nachdem welcher Lymphozytentyp transformiert ist, in verschiedene Klassen (B- und T- Zell- Lymphome) unterteilt. Alle Zellen eines solchen Lymphoms zeigen teilweise die gleichen Vorgänge wie ihr gesundes Pendant, z.B. bei B- Zell- Lymphomen ist es die Rekombination von Immunglobulingenen, die ihre Abstammung von einer Vorläuferzelle klar dokumentiert. Das bedeutet, dass obwohl Lymphome sich phänotypisch von gesundem lymphatischem Gewebe unterscheiden, dies genotypisch nicht der Fall ist (Korsmeyer, 1993; Küppers, 1994).

Nach den Herz- Kreislaufferkrankungen stellen maligne Lymphome eine häufige Todesursache in den westlichen Industrieländern dar. Man unterscheidet in Wachstum und Behandlung zwischen hoch und niedrig malignen Lymphomen.

Im Gegensatz zu den Behandlungsmöglichkeiten bei hoch- malignen Lymphomen existiert bislang bei den niedrig malignen Lymphomen (wie z.B. beim follikulären Keimzentrumslymphom oder dem Mantelzelllymphom) noch kein gesicherter kurativer Therapieansatz, da die vollständige Elimination des malignen Zellklons die Voraussetzung für eine langfristige Heilung darstellt (Schnell et al., 2001).

## **1.3 Therapie maligner Lymphome**

### **1.3.1 Herkömmliche Behandlungsmethoden**

Die therapeutischen Maßnahmen, die bei der Bekämpfung von malignen Tumoren zur Zeit zur Verfügung stehen, sind chirurgische Eingriffe, Strahlenbehandlung und Polychemotherapie. Die Versorgung von Krebspatienten konnte durch Kombination und Optimierung der genannten Maßnahmen ständig verbessert werden. So gibt es im Bereich der Chemotherapie Bemühungen, einheitliche Protokolle zur Anwendung bei bestimmten Tumorarten zu entwickeln (Sweetenham, 2001). Zudem wird die Wirksamkeit von Hochdosistherapien in Kombination mit autologer Stammzelltransplantation getestet, um Krebszellen durch eine Erhöhung der Zytostatikadosis effizienter abtöten zu können (Linch et al., 1993).

Die konventionellen Therapiekonzepte sind jedoch oft mit starken Nebenwirkungen behaftet, die den Patienten zusätzlich belasten (Lenhard et al., 1976). Das Hauptproblem der Behandlung maligner Erkrankungen ist zudem häufig nicht der Primärtumor, sondern die Bildung von Metastasen, die auch mit verbesserten Behandlungsschemata kaum verhindert werden können denn sie entstehen durch die geschwächte Immunabwehr der Patienten (Canellos et al., 1992). Trotz intensiver Bemühungen die konventionellen Therapieformen zu optimieren, besteht die Notwendigkeit neue, effizientere Konzepte zu entwickeln, die sich durch eine geringere Toxizität bei möglichst hoher Wirksamkeit auszeichnen.

Eine vielversprechende neue Methode ist die Immuntherapie, die die humoralen und zellulären Komponenten der Immunabwehr zur Bekämpfung der Tumorzellen nutzt. Hierbei handelt es sich entweder um eine aktive oder eine passive Immunisierung. Bei der aktiven Immunisierung werden Tumorstoffe eingesetzt. Hier wird das Immunsystem des Patienten durch die Präsentation von Tumorstoffen stimuliert. Bei der aktiven Immunisierung unterscheidet man zwischen Tumor-assoziierten Antigenen und Tumor-spezifischen Antigenen. Während es sich bei den spezifischen Antigenen um Antigene handelt, die auf eine Tumorentstehung beschränkt sind, sind Tumor-assoziierte Antigene universelle Antigene.

Bei der passiven Immunisierung werden Antikörper zugeführt, die spezifisch gegen Tumorgewebe gerichtet sind (Scott und Welt, 1997).

### **1.3.2 Immuntherapie**

Die antikörpergestützte Krebstherapie hat sich bisher als die vielversprechendste Methode in der Immuntherapie erwiesen. Die Antikörper, die spezifisch gegen Tumorzellenantigene gerichtet sind, sollen die Zerstörung maligner Zellen induzieren. Um Toxizitäten in anderen Geweben zu vermeiden, richten sich die Antikörper gegen Antigene, die nur auf malignen Zellen vorhanden sind oder von diesen in hohem Maße exprimiert werden und erhalten so auch die Zellen des gesunden, umliegenden Gewebes. Es konnten bereits Antikörper gegen verschiedene Antigene der wichtigsten Tumorarten, wie B- Zell- Lymphome, Colon- und Brustkrebs entwickelt werden (Scott & Welt, 1997).

Es muß jedoch berücksichtigt werden, dass es auch mit Hilfe dieser Behandlungsmethode kaum möglich sein wird, größere Tumormassen vollständig zu zerstören. Zur Auflösung vorhandener Mikrometastasen jedoch sowie in Kombination mit konventionellen Behandlungsmethoden wird die Antikörpertherapie in Zukunft sehr wohl einen hohen Stellenwert einnehmen (Raab et al., 2001).

Bei den antikörpergestützten Immuntherapien lassen sich zwei Hauptstrategien unterscheiden. Im ersten Ansatz werden Antikörper als Trägermoleküle eingesetzt, um zytotoxisch wirksame Substanzen gezielt zu den malignen Zellen zu transportieren. Antikörper können so an Zytostatika, bakterielle oder pflanzliche Toxine, radioaktive

Isotope und Prodrug-aktivierende Enzyme gekoppelt werden (Clark & Weiner, 1995). Die zweite Strategie nutzt das körpereigene Immunsystem zur Zerstörung der Tumorzellen. Es kommt zu einer gezielten, antikörpervermittelten Immunantwort, die durch unkonjugierte oder bispezifische Antikörper hervorgerufen wird (Hartmann et al. 1996).

Als Beispiel für den ersten Ansatz steht die Radioimmuntherapie, bei der ein radioaktives Isotop, das an einen monoklonalen Antikörper gekoppelt ist, eine Antikörper- und Isotop-vermittelte Tumorzerstörung bewirken soll. So werden Lymphome heute in Studien vornehmlich mit der Radioimmuntherapie in Kombination mit herkömmlichen Methoden behandelt (Goldenberg, 1995).

Lymphome haben bei dieser Behandlungsmethode den Vorteil gegenüber soliden Tumoren, was die Sensibilität gegenüber radioaktiver Strahlung, den Zugang zu den Tumorzellen und damit die Möglichkeit der Penetration der Tumorzellen mit z.B. Antikörpern anbelangt. Auch auf Grund ihrer relativ großen Molekülmasse von ca. 150 kDa ist die Penetration von Immunglobulinen in maligne Gewebe nur beschränkt möglich. Da die Antikörper zudem häufig mit Toxinen oder Medikamenten konjugiert werden, kommt es zu einer weiteren Herabsetzung der Gewebegängigkeit. Um dies zu vermeiden können auch einzelsträngige, variable Antikörperfragmente, sogenannte scFvs (single chain variable fragments) verwendet werden (Hudson et al., 1998). Die rekombinant hergestellten scFvs haben eine durchschnittliche Molekülmasse von nur 30 kDa und verfügen über Bindungsaffinitäten, die denen der zugehörigen monoklonalen Antikörper vergleichbar ist.

Im Zuge des zweiten Behandlungsansatzes sucht man schon lange nach einer Möglichkeit um die patienteneigene T-Zell vermittelte Antitumorimmunität hervorzurufen, aber die Lymphomzellen sind schlechte antigenpräsentierende Zellen, da sie wenig MHC Antigene, kostimulatorische oder Adhäsionsmoleküle aufweisen und oft eine veränderte Antigenprozessierung und Transportierung zeigen (Cohen, 1975; Kay und Kaplan, 1986). Inzwischen hat man Wege gefunden, durch die Einschleusung von Genen von MHC-Molekülen, Antigenen, kostimulatorischen Molekülen (B7) oder Zytokinen in Tumorzellen die Fähigkeit der Antigenpräsentation zu erhöhen (Krieg et al., 1995; Cao et al., 1999). Auch der Einsatz von anti-CD40 Antikörpern oder einer

trimeren, rekombinanten Form des CD40 Liganden (rhuCD40L) haben nachweislich die Immunogenität von malignen B- Zellen heraufgesetzt (Chen W. et al., 2001; Vonderheide et al., 2001).

Der erste in der Krebstherapie eingesetzte monoklonale Antikörper wurde schon 1998 durch die FDA (Food and Drug Administration) zugelassen. Rituximab ( Rituxan™, Hersteller: IDEC/Genentech) ist ein chimärer Antikörper, welcher den pan- B- Zell Marker CD20 erkennt. Der Antikörper ist zugelassen für die Behandlung niedrigmaligner B- Zell Non- Hodgkin- Lymphome (NHL) (McLaughlin et al., 1998), wird aber auch auf seine Wirksamkeit bei anderen Lymphomentitäten (Coiffier et al., 1998) getestet. Die Therapie mit Rituximab zeigt eine hohe Effizienz mit einem 50%igen Erfolg bei NHL Patienten und nur geringen Nebenwirkungen (Davis et al., 1999; Onrust et al., 1999). In der Therapie von Non- Hodgkin- Lymphomen werden auch Bexxar™ (Hersteller: Corixa Corp.) und Zevalin™ (Hersteller: IDEC) getestet. Bei beiden handelt es sich um radiomarkierte monoklonale Antikörper (Bexxar™: <sup>131</sup>I- Tositumomab, Zevalin™: <sup>90</sup>Y- Ibritumomab tiuxetan und Rituximab) die auch das CD20 Antigen auf der Oberfläche von B- Zellen erkennen und bisher ebenfalls erfolversprechende Ergebnisse zeigten (Goldenberg, 2001).

#### **1.4 Immuntherapie des Hodgkin- Lymphoms**

Der Morbus Hodgkin ist eine komplexe, lymphoproliferative, maligne Krankheit, die zum ersten Mal 1832 von Thomas Hodgkin beschrieben wurde (Hodgkin, 1832). Das Hodgkin Lymphom präsentiert sich in den meisten Fällen (74%) durch eine Vergrößerung ein oder mehrerer zervikaler Lymphknoten, während orale und nasopharyngiale Läsionen seltener auftreten (Kaplan,1980; Healy et al., 1955).

1898 und 1902 wurden die malignen Zellen dieses Lymphoms, nämlich die mononukleären Hodgkin und die bi- oder polynukleären Reed- Sternberg Zellen identifiziert, die nur 0,1% bis 1% der totalen Population des betroffenen Gewebes ausmachen und noch heute essentiell für die Diagnose sind (Sternberg, 1898; Reed 1902). Diese malignen Zellen sind umgeben von sogenannten „bystander“ Zellen, das sind reaktive T- Zellen, Histiozyten, Eosinophile und Stromazellen (Haluska et al, 1994).

Eine zytogenetische Analyse der malignen Zellen ergab eine Vielzahl von strukturellen und numerischen chromosomalen Abberationen die weder konsistent noch spezifisch waren (Thangavelu et al., 1989). Auch eine Immunotypisierung, bei der ein heterogenes Muster von Expressionsmarkern auf den Hodgkin Reed- Sternbergzellen gefunden wurde, wovon nur wenige Oberflächenantigene, wie CD30, CD15, CD 25 und CD71 einheitlich exprimiert wurden, erlaubte lange keine Zuordnung der malignen Zellen zu ihrem gesunden Gegenstück (Drexler et al., 1992). Neue Untersuchungsmethoden, wie die der Mikromanipulation einzelner Zellen von Gefrierschnitten und einer anschließenden Polymerase Kettenreaktion (Küppers et al, 1993), ließen schließlich den Schluss zu, das die Hodgkin Reed- Sternbergzellen transformierte Keimzentrums B-Zellen sind, da sie rearrangierte Immunglobulingene besitzen (Küppers et al., 1995; Kanzler et al., 1996).

Auch die Behandlung von Hodgkinlymphomen stellt wegen des geringen Vorkommens der Hodgkin Reed- Sternberg Zellen in den Lymphomen eine besondere Herausforderung dar.

Bisher können je nach Stadium (I – IV, Einteilung nach der Cotsworth Modifikation der Ann Arbor Klassifizierung; Arbor A.,1979) und Risiko- Faktor Profil bis zu ca. 80% der Patienten durch die Anwendung einer modernen Kombination aus Strahlen- und Chemotherapie geheilt werden (Diehl et al., 1998). Nebeneffekte dieser Behandlung sind jedoch unter anderem eine auftretende Gonadentoxizität und das Risiko des Auftretens von sekundären Myelodysplasien und akuten myeloischen Leukämien. Um eine komplette Remission bei Patienten mit fortgeschrittenen Krankheitsstadien zu erzielen, werden zusätzlich Hochdosistherapien und autologe Stammzelltherapien oder autologe Knochenmarktransplantation eingesetzt (Linch et al., 1993; Sweetenham et al., 1997; Yuen et al,1997; Lazarus et al., 1999).

Aber nicht für alle Patientengruppen können so die Behandlungsbedingungen verbessert werden und auch der Einsatz von monoklonalen Antikörpern (z.B. CD30) zeigte hier bisher nur limitierten Erfolg (Siegall, 1994). Das Ziel ist es, die Spezifität eines monoklonalen Antikörpers mit der hohen Zytotoxizität von Effektorzellen zu vereinen, um auch klinisch messbare Tumore behandeln zu können. Um einer verminderten Reaktivität des patienteneigenen Immunsystems entgegenzuwirken, werden bispezifische Antikörper eingesetzt, die zytotoxische Effektorzellen an die Tumorzellen binden.

Abhängig von der Rezeptorspezifität des bispezifischen, monoklonalen Antikörpers können unterschiedliche Effektorzellen mit den Tumorzellen vernetzt werden. Am häufigsten werden T- Zellen (CD3), Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen (CD64) und NK- Zellen (CD16) als Ziel für diese Antikörper verwendet (de Gast et al., 1997). Erste klinische Studien mit einem anti CD16/ CD30 Antikörper für die Behandlung des, Hodgkin- Lymphoms zeigen 30% Erfolg bei Patienten, die auf andere Behandlungen nicht angesprochen haben (Hartmann et al., 1998; Renner et al., 2001). Die beobachteten Nebenwirkungen waren meist gering und äußerten sich in Fieber, Myalgien und Blutdruckabfall.

Aber auch bei Studien mit bispezifischen Antikörpern (anti CD16/CD30) haben sich Schwierigkeiten ergeben. So gibt es keine festgesetzten Marker und Mengenangaben für eine optimale Antikörperadministration und keine einheitlichen Applikationsvorschriften. Weiterhin wurden noch nicht die essentiellen Tumorantigene gefunden, weder spezielle noch universelle die weder runterreguliert, noch die Zellen immortalisieren, noch vom Immunsystem toleriert werden (Renner et al., 2001). So bedarf es einer weiteren Suche nach neuen hoch Tumor- spezifischen oder Tumor- assoziierten Antigenen.

## **1.5 Detektion neuer Tumor- assoziierter oder spezifischer Antigene als Zielstrukturen für die Immuntherapie**

Dem pathologischen Wachstumsverhalten von Tumoren liegen komplexe, physiologische Störungen zugrunde, die den Phänotyp des betroffenen Gewebes entscheidend verändern. Dies kann als Folge viraler oder mutierter Gene sowie der deregulierten Expression normaler Gene auftreten. Viele neoplastisch transformierte Zellen tragen daher auf ihrer Oberfläche Proteine, die in normalem Gewebe nicht oder nur in geringen Konzentrationen vorhanden sind. Derartige Moleküle werden als tumorassoziierte Antigene oder tumorspezifische Antigene bezeichnet (Boon et al., 1994). Man unterscheidet verschiedene Klassen von tumorassoziierten oder tumorspezifischen Antigenen. Glykoproteine und Glykolipide zeichnen sich meist durch aberrante Glykosilierung aus und kommen hauptsächlich bei epithelialen Tumoren vor.

Auch Carbohydratantigene sind charakteristisch für Neoplasien epithelialen Ursprungs, ebenso wie das Vorkommen von Wachstumsfaktorrezeptoren. Eine weitere Gruppe Tumor- assoziierter oder Tumor- spezifischer Antigene bilden die oncofetalen Proteine, deren physiologische Expression auf fetales Gewebe beschränkt ist. Für Tumoren des hämatologischen und lymphatischen Systems ist das Auftreten von sogenannten Differenzierungsantigenen kennzeichnend. Solche Marker finden sich physiologischerweise auf Zellen bestimmter Differenzierungsstadien. Hierzu gehören z.B. CD30 beim Hodgkin Lymphom, PRAME und Wt-1 bei Leukämie, MAGE-1 bei malignen Melanomen (Traversari et al., 1992) .

Gegen viele der genannten Antigengruppen sind bereits Antikörper entwickelt worden, die sich in unterschiedlichen klinischen Testphasen befinden. Um neben Antikörpern auch neue Antigenstrukturen für die Immuntherapie nutzbar zu machen und somit das Therapiespektrum zu erweitern, müssen Methoden zur Detektion Tumor- assoziierter und spezifischer Antigene entwickelt werden.

### **1.5.1 Screening von Expressionsbanken**

Durch die Synthese von cDNA, welche den zur RNA komplementären Strang bildet, erhält man die DNA- Sequenzen der Gene, die in der Zelle transkribiert werden. Um die Expression von Genen in bestimmten Zellen oder Geweben zu analysieren, wird die Gesamt- mRNA isoliert, cDNA synthetisiert und diese in prokaryotische Expressionsvektoren kloniert. Es entstehen cDNA- Bibliotheken, die im Idealfall den gesamten mRNA- Pool der Zelle repräsentieren. In den verschiedenen Expressionsvektoren stehen die klonierten cDNA- Inserts unter dem Einfluß eines starken Promotors, so dass sie abgelesen und – sofern sie sich im richtigen Leseraster und in sense Orientierung befinden – das zugehörige Protein gebildet wird.

Auf diese Weise können auch cDNA- Expressionsbanken von Tumorgewebe erstellt und auf das Vorliegen bestimmter Proteine gescreent werden. Vom besonderen Interesse ist hierbei die Untersuchung der Antigenexpression.

Die cDNA Expressionsbanken können mit autologem Patientenserum gescreent werden, um so neue Tumorantigene zu ermitteln. Da in den Bibliotheken die Gene für Tumor-

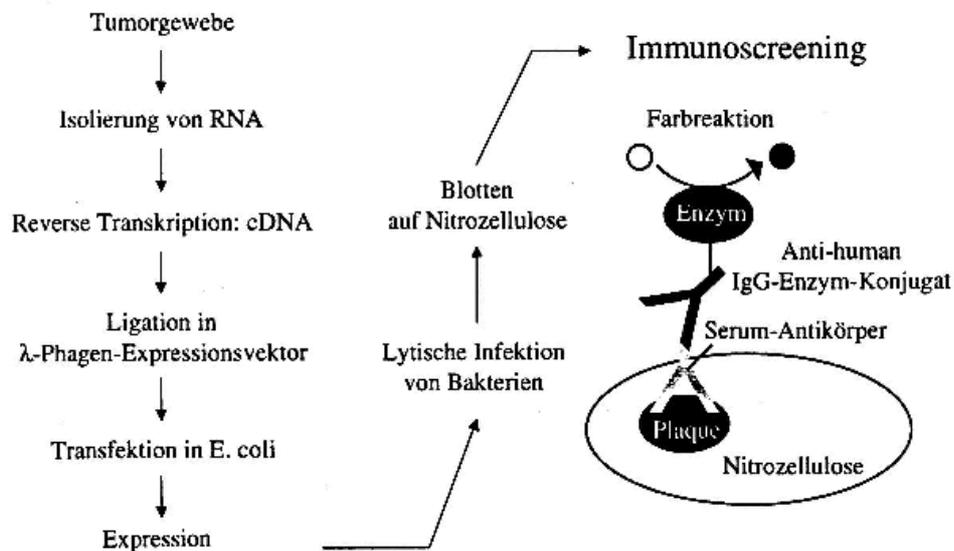
assoziierte Antigene enthalten sind, besteht die Möglichkeit, dass die von Phagenvektoren produzierten Antigene von Antikörpern der Patienten erkannt werden. Das cDNA-Insert des Phagenklons kann sequenziert und das Antigen bestimmt werden. Mit dieser Methode können Aussagen über die Immunogenität eines Proteins gemacht werden; dies konnte mit den bisherigen Methoden, wie mit Expressionsstudien und Microarrays nicht erreicht werden. Eine solche Methode zur Detektion neuer Tumor-assoziierter oder Tumor-spezifischer Antigene wurde 1995 (Sahin et al.) erstmals beschrieben und als SEREX (serological identification of antigens by recombinant expression screening) bezeichnet.

## **1.6 Das SEREX- System**

Das SEREX- System basiert auf der Annahme, dass Tumorpatienten Antikörper gegen autologe Tumorantigene entwickeln. Diese Antikörper können zur Detektion von Tumorantigenen in cDNA- Expressionsbanken verwendet werden. So begannen bereits ab Mitte der siebziger Jahre Untersuchungen zur humanen Immunantwort gegen Tumoren. Old entwickelte die Methode der autologen Typisierung. Die Seren von Tumorpatienten wurden auf Reaktivität gegen autologe und allogene neoplastische und nichtentartete Zelllinien getestet, um Antikörper zu detektieren, die spezifische oder assoziierte Antigene autologer Tumorzellen erkennen (Old, 1981).

Das Auftreten spezieller Antikörper gegen definierte Antigene konnte mit SEREX nachgewiesen werden. So zeigte Croce et al. (1995) mit dem Verfahren der Immunkomplexbildung das Vorliegen der serologischen Reaktion gegen CEA und MUC-1. Sahin et al. (1995) entwickelte die Methode der autologen Typisierung unter Implementierung molekularer Klonierungstechniken weiter und etablierte das sogenannte SEREX- System. Diese Technik basiert auf dem Screening tumorspezifischer cDNA-Expressionsbanken mit autologen Patientenseren. Mit dem SEREX- System ist es jedoch nicht möglich die Häufigkeit des Vorkommens und die präferentielle Expression des Proteins im Tumor zu bestimmen, wohl aber die Immunogenität verschiedener Antigene.

## Erstellung cDNA-Bibliothek



**Abb.1:** Definition von Tumor- Antigenen mittels SEREX. Eine cDNA- Bibliothek wird etabliert und in E.coli exprimiert mittels eines  $\lambda$ - Phagen Expressionsvektors. Die auf dem Bakterienrasen sichtbaren lyrischen Plaques werden mittels Blotting auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die verdünnten Seren werden mit den Membranen inkubiert. Die Antikörper, die an die Tumor- Antigene binden die von den lytischen Plaques exprimiert werden, werden von Enzym- conjugierten anti- human Ig G Antikörpern sichtbar gemacht. (Quelle: Türeci et al., 1997)

### 1.6.1 Erstellung einer cDNA- Expressionsbank in $\lambda$ - Phagen

Die Erstellung der cDNA Bank erfolgt über Expressionsvektoren, die in  $\lambda$ - Phagen kloniert werden.

$\lambda$ - Phagen weisen gegenüber dem Klonieren in Plasmidvektoren mehrere Vorteile auf. Es können sehr viel größere DNA- Stücke insertiert werden (bis 20kb), so dass die Chance, vollständige Gensegmente zu klonieren, steigt. Plasmide können lediglich cDNA bis zu einer Größe von 5kb aufnehmen. Die Klonierungseffizienz in  $\lambda$ - Phagen ist sehr viel höher, da die Verpackung rekombinanter Phagen- DNA effektiver funktioniert als die Transformation von DNA in Bakterien (Boulnois, 1987).

## **1.6.2 Screening von $\lambda$ - Phagen- cDNA- Expressionsbanken mit Antikörpern**

Da  $\lambda$ - Phagen- Expressionsbanken die cDNA der in einem bestimmten Gewebe oder einer bestimmten Zelllinie auftretenden aktiven Gene enthalten, exprimieren sie im Idealfall möglichst viele zellspezifische Proteine, einschließlich aller Antigenstrukturen. Die cDNA- Bibliothek in dieser Arbeit wird aus einer Hodgkin- Zelllinie (L1236) erstellt und in  $\lambda$ - Phagen kloniert. Rekombinante, tumorspezifische- oder assoziierte Proteine werden während der lytischen Infektion von Bakterien in den Plaques produziert und auf Nitrocellulosefilter übertragen. Diese Filter werden mit verdünntem, autologem Patientenserum inkubiert. Gebundene Antikörper werden mit einem Enzymgekoppelten, anti- human Antikörper nachgewiesen. Positive Phagenklone werden subkloniert, bis ein einzelner Plaque isoliert und die Sequenz der enthaltenen cDNA ermittelt werden kann.

Unter Verwendung des SEREX- Systems konnte bereits eine Reihe von bekannten, sowie neuen Antigenen für unterschiedliche Tumore identifiziert werden, wie zum Beispiel das Testis Antigen NY-CO-1 (Chen et al., 1997; Scanlan et al., 1998), das Testis Antigen Hom-Mel-40 (Türeci et al., 1996) oder MAGE-1 und die Tyrosinkinase (Sahin et al, 1995). Diese haben jedoch bisher nicht zur Konstruktion neuer Immuntherapeutika beigetragen, da es sich nur bei den wenigsten um Oberflächenantigene mit hoher Tumorrestriktion handelte.

Bei der Anwendung der SEREX Methode auf den M. Hodgkin gab es bisher das Problem, dass keine sicher als Hodgkin- Zellen identifizierte, reine Population zur Verfügung stand. Mit der etablierten Zelllinie L1236, von peripherem Blut eines Patienten mit dem Rezidiv eines Morbus Hodgkin vom gemischtzelligen Subtyp, steht nun ein ideales Versuchssystem zur Verfügung. Die Zelllinie L1236 exprimiert die typischen HD- assoziierten Oberflächenmarker (CD30, CD15, CD71) und besitzt einen für HD- Zelllinien typischen aberranten Karyotyp. L1236 Zellen exprimieren zudem Antigene, die für die effiziente Antigenpräsentation gegenüber T-Zellen notwendig sind, wie unter anderem HLA Klasse I und II, B7 wie auch Adhäsionsmoleküle ICAM 1 und LFA 3. L1236 Zellen sezernieren die Interleukine 6, 8, 10, Tumor Nekrosefaktor  $\alpha$ , Interferon  $\gamma$ , Transformierender Wachstumsfaktor  $\beta$  und den Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierenden Faktor. Die L1236 Zelllinie weist die gleichen

Immunglobulin- Gen- Rearrangements auf, wie die Hodgkin Reed- Sternberg Zellen, die aus dem Knochenmark desselben Patienten entnommen wurden. Diese Ergebnisse beweisen, das die Zelllinie L1236 einer definierten, reinen Hodgkin Reed- Sternberg Zellpopulation entspricht (Wolf et al, 1996; Kanzler et al. 1996).

### **1.7 Zielsetzung der Arbeit**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll versucht werden, neue Tumor- assoziierte Antigene beim Morbus Hodgkin unter Verwendung des SEREX- Systems zu definieren. Die SEREX- Strategie ermöglicht die Identifizierung neuer Tumorantigene. Diese können dann als Ziel für Antikörper dienen oder als Immunogene bei einer Vakzinierung oder Therapie mit Antigen präsentierenden Zellen. Mit dem SEREX- Verfahren werden sowohl intrazelluläre als auch Oberflächenantigene in der cDNA- Bibliothek nachgewiesen (Sahin et al., 1995).

Es wird eine  $\lambda$ - Phagen- cDNA- Expressionsbank aus der Hodgkin- Zelllinie L1236 mit Hodgkin Patientenserum gescreent, welches Tumor- spezifische oder Tumor- assoziierte Antikörper enthält. Die Identität der etablierten Zelllinie L1236 entspricht hierbei einer definierten, reinen Hodgkin Reed- Sternberg Zellpopulation (Wolf et al, 1996; Kanzler et al. 1996).

## **2. Methoden**

### **2.1 Erstellung einer Hodgkin- spezifischen cDNA Expressionsbank in $\lambda$ -Phagen**

#### **2.1.1 Kultivierung der Zelllinie L1236**

##### **2.1.1.1 Material**

(wenn nicht anders angegeben wurden die Materialien bei GibcoBRL, Eggenstein bestellt)

Zelllinie L1236 (von Dr. J. Wolf zur Verfügung gestellt)

RPMI 1640 Flüssigmedium

FKS 10% (v/v)

Glutamin (30 mg/ ml)

Penicillin (100 I.E./ ml)

Streptavidinsulfat (100  $\mu$ g/ml)

Kulturflaschen 25 cm<sup>2</sup>, 80 cm<sup>2</sup>, 175 cm<sup>2</sup> (Nunc, Wiesbaden)

Die Zellkultivierung erfolgte unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank mit laminarer Luftströmung. Als Kulturmedium wurde RPMI 1640 Flüssigmedium (Moore et al., 1967) unter Zusatz von Hitze inaktiviertem fetalen Kälberserum (FKS) (10% (v/v)), Glutamin, Penicillin und Streptomycinsulfat verwendet. Die Zelllinie wurde in Plastikkulturflaschen bei 37°C feuchter Wärme und einer CO<sub>2</sub>- Konzentration von 5% in einem Brutschrank (Heraeus, Hanau) inkubiert. Das Wachstumsverhalten der Suspensionskulturen wurde kontinuierlich unter einem Invertmikroskop (Leitz, Wetzlar) beurteilt. Verbrauchtes Medium wurde nach Bedarf gegen frisches Medium im Verhältnis von 1: 2 bis 1: 10 gewechselt.

## **2.1.2 mRNA Isolierung aus der Zelllinie L1236**

Für die mRNA Isolierung wird die aus den unter stark denaturierenden Bedingungen lysierten und homogenisierten L1236 Zellen freigesetzte mRNA an magnetische Beads gekoppelt und im magnetischen Feld von Proteinen, DNA und rRNA getrennt.

### **2.1.2.1 Material**

µMACS mRNA Isolierungskits (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach)

Zelllinie L1236 (von Dr. J. Wolf zur Verfügung gestellt)

Trypanblau (Merck, Darmstadt)

Die Zellen der Linie L1236 werden für eine Lebend-/ Totfärbung mit Trypanblau (selektive Färbung von membrangeschädigten Zellen) in einer Konzentration von 0,25% (w/v) angefärbt und in einer Neubauer- Zählkammer unter dem Mikroskop (Leitz, Wetzlar) gezählt.  $1 \times 10^7$  lebende Zellen (plus höchstens ca. 10% tote Zellen) werden in ein Eppendorfröhrchen überführt und bei 1200 rpm (Biofuge17RS, Heraeus, Hanau) zentrifugiert. Der Überstand wird vollständig verworfen und 1 ml des Lysis/ Bindungspuffers zu den Zellen gegeben worauf man diese heftig durchmischt (vortex).

Die µLysate Clear Säule (im Kit enthalten) wird in das Zentrifugationsröhrchen gestellt und 3 Min. bei 13.000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Nun werden 50 µl der Oligo (dT) MicroBeads zu dem Lysat in dem Zentrifugationsröhrchen pipettiert. Die µMACS Säule wird in das magnetische Feld des µMACS- Separators (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach) gehängt und 100 µl des Lyse/ Bindungspuffers werden auf die Säule gegeben. Nachdem diese die Säule passiert haben wird das Zelllysate auf die Säule gegeben und ebenfalls gewartet, bis die Flüssigkeit durchgelaufen ist. Die Säule wird zweimal mit 200 µl Lyse/ Bindungspuffer gespült um Proteine und DNA auszuwaschen. Danach wird die Säule noch 4 mal mit Waschpuffer gespült um DNA und rRNA zu entfernen bevor man 120 µl Elutionspuffer (auf 65°C erwärmt) auf die Säule pipettiert um die mRNA aus der Säule zu lösen. Der zweite bis vierte Tropfen der aus der Säule kommt enthält mehr als 90% der isolierten mRNA in 75 µl Volumen. Die mRNA Tropfen aus der Säule werden in einem 1,5 ml Eppendorfröhrchen aufgefangen.

### **2.1.3 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration**

Der Nukleinsäuregehalt und die Reinheit einer Probe können durch eine spektralphotometrische Messung im UV- Bereich bestimmt werden. Hierbei wird die Absorption der eluierten mRNA Menge ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) im Photometer (Ultrospec K, LKB-Biochrom, Freiburg) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die optische Dichte (OD) einer Nukleinsäurelösung bei 260 nm ist ein Maß für die Konzentration an Nukleotiden. Die Absorption bei der Wellenlänge von 280 nm gibt Aufschluß über die Verunreinigung mit Proteinen. Der Quotient  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  sollte bestimmte Grenzwerte nicht überschreiten, da sonst keine lineare Abhängigkeit der Absorption bei 260 nm zur Nukleinsäurekonzentration gegeben ist. Die erwünschte Reinheit bei einer mRNA liegt bei  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  zwischen 1,5 und 2,0. Die Messung wird in speziellen Quarzküvetten (10mm Schichtdicke, LKB- Biochrom, Freiburg) vorgenommen, da diese keine Eigenabsorption im gemessenen UV- Bereich besitzen.

Formel zu Berechnung der mRNA- Konzentration:

$$\text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 0,004 = \mu\text{g}/\mu\text{l mRNA}$$

### **2.1.4 Agarosegelelektrophorese**

Zur analytischen und präparativen Trennung von Nukleinsäuren werden horizontale Agarosegele verwendet. Abhängig von der Größe der RNA bzw. DNA und dem gewünschten Trennungsbereich werden unterschiedliche Agarosekonzentrationen verwendet. Es entstehen Gele mit verschiedenen Porengrößen, durch die die negativ geladenen Nukleinsäuren nach Anlegen einer Spannung im Laufpuffer zum positiven Pol wandern. Zur Anfärbung der DNA/RNA unter UV- Licht wird dem Gel Ethidiumbromid zugesetzt, welches in den Nukleinsäurestrang eingelagert wird. Durch Auftragen eines Größen- oder Mengenstandards können Größe und Konzentration der DNA/ RNA bestimmt werden.

#### **2.1.4.1 Material**

(wenn nicht anders angegeben wurden die Materialien bei Sigma, St. Louis, USA bestellt)

5x TBE Puffer ( 54 g/l Tris Base; 27,5 g/l Borsäure (Merck, Darmstadt); 20 ml/l 5mM EDTA pH 8,0 )

6x Gelladepuffer ( 30% Glycerol (Merck, Darmstadt); 0,1% Orange G )

Ethidiumbromidlösung, 10mg/ml in dH<sub>2</sub>O

Agarose, Elektrophoresegrad

100 bp Größenstandard, 1µg/µl (Amersham, Piscataway, NJ, USA)

1kb Größenstandard 1 µg/µl (Gibco BRL, Eggenstein)

Je nach Gel wird die entsprechende Menge Agarose abgewogen und mit 150 ml 0,5x (x ist der Multiplikator) TBE gemischt. Diese Mischung wird in der Mikrowelle aufgeköcht, so dass sich die Agarose vollständig löst. Die Lösung wird auf 40- 50°C abgekühlt und mit Ethidiumbromid versetzt zu einer Endkonzentration von 0,2 µg/ ml. Der Gelträger wird mit den entsprechenden Kämmen versehen und das Gel wird in die seitlich abgedichtete Kammer gegossen. Nach der Erhärtung des Gels werden die Kämmen herausgezogen und das Gel wird in die Elektrophoresekammer (Renner, Dannstadt) geschoben. Die Elektrophoresekammer wird mit 0,5x TBE- Puffer aufgefüllt. Die Nukleinsäureproben werden mit 2 µl Gelladepuffer gemischt und in die Taschen des Gels pipettiert. In die erste und letzte Tasche des Gels wird 5 µl des Größenmarkers zur späteren Bestimmung der Fragmentgrößen pipettiert werden. Die Kammer wird geschlossen und eine Spannung von nicht mehr als 5 Volt/ cm Elektrodenabstand eingestellt. Die Nukleinsäurebanden können nachher unter einer UV- Lampe (254 nm) sichtbar gemacht werden.

#### **2.1.4.2 Größenstandards**

Bei den verwendeten Größenstandards handelt es sich um einen 100 bp Marker (Amersham, Piscataway, NJ, USA), dessen Banden in 100 bp Schritten von 100 bp bis 2 kb reichen. Um das Abzählen der Hunderterschritte zu vereinfachen ist die 800 bp Bande doppelt so dick wie alle anderen. Desweiteren wurde ein 1 kb Marker (Gibco BRL, verwendet, der 11 Banden im Bereich von 500 bp bis zu 40 kb aufweist. Im einzelnen

liegen die Banden bei 500 bp, 1 kb, 1,6 kb, 2 kb, 3 kb, 4 kb, 5 kb, 6 kb, 8 kb, 10 kb, 40 kb. Je nach der vermuteten Länge der Fragmente die es auf einem Agarosegel aufzutrennen gilt wird einer der beiden oben aufgeführten Marker ausgewählt.

### **2.1.5 Synthese der cDNA**

Bei der cDNA (complementary Desoxyribonucleic Acid) - Synthese erfolgt zunächst die Erststrangsynthese, hierzu wird der zum mRNA- Strang komplementäre cDNA- Strang mittels einer Reversen Transkriptase (Moloney murine leukemia virus reverse transkriptase – MMLV-RT) synthetisiert. Der Primer besitzt eine poly (dT)- Sequenz sowie eine XhoI- Konsensussequenz.

Es folgt die Zweitstrangsynthese, in der der verbliebene RNA- Strang durch die Rnase H in einzelne Fragmente zerlegt wird, welche der DNA- Polymerase I als Primer dienen. Das Enzym synthetisiert den zum ersten Strang komplementären zweiten DNA- Strang.

#### **2.1.5.1 Material**

ZAP Express® cDNA Synthese Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA)

L1236 mRNA von Punkt 2.1.2

MMLV Reverse- Transkriptase (50U/ µl; Stratagene, La Jolla, CA, USA)

Für die Reaktion der Erststrangsynthese werden 5 µl 10 x Erststrangpuffer, 3 µl Erststrang – Methyl- Nukleotid Mix, 2 µl Linker- Primer, 1 µl Rnase block- Ribonuclease Inhibitor (40U/ µl) und 5 µg mRNA in ein Eppendorfröhrchen pipettiert und mit DEPC- behandeltem Wasser zu einer Gesamtmenge von 48,5 µl aufgefüllt und 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nun werden 1,5 µl der MMLV Reversen- Transkriptase dazugemischt und die Erststrangsynthese wird 1 Stunde bei 37°C durchgeführt. Nach dieser Inkubationszeit werden 5 µl der Reaktion in ein frisches Eppendorfröhrchen gegeben und für eine spätere Analyse der Reaktion auf einem Agarosegel bei -20°C aufgehoben.

Zur Zweitstrangsynthese werden zur verbleibenden Reaktionsmenge 20 µl 10x Zweitstrangpuffer, 6 µl Zweitstrang dNTP mix, 116 µl steriles destilliertes Wasser, 2 µl

RNase H (1,5 U/  $\mu$ l) und 11  $\mu$ l DNA Polymerase I (9,0 U/  $\mu$ l) zugegeben und diese gründlich vermischt. Die Synthese des Zweitstranges verläuft 2,5 Stunden lang bei 16°C, wonach die Reaktionsröhrchen sofort auf Eis gestellt werden.

### **2.1.6 Ligation der Adaptoren an die cDNA**

Damit die cDNA mit dem Vektor ligiert werden kann, müssen die Enden des Stranges geschnitten und mit Adaptoren, die die gewünschten Schnittstellen aufweisen religiert werden, um später eine gerichtete Klonierung zu gewährleisten.

Die überstehenden Enden der cDNA werden mittels Pfu DNA- Polymerase in glatte Enden umgewandelt, da die Ligation mit Adaptoren erfolgt, die ebenfalls glatte Enden aufweisen (blunt ends). Die verwendeten Adaptoren sind doppelsträngige Nukleotide, die ein EcoRI geschnittenes Strangende enthalten (mit überlappenden Enden) und zudem auch ein blunt end aufweisen. Nur das glatte Ende ist phosphoryliert, um eine Anlagerung an die cDNA zu gewährleisten.

Um eine spätere Ligation in den Phagen- Vektor, dessen geschnittene Enden dephosphoryliert sind, zu ermöglichen werden die, an die cDNA ligierten Adaptorenden in einem nachfolgenden Schritt phosphoryliert.

Da sich nur jeweils im 5`Arm der cDNA eine XhoI Schnittstelle befindet, werden nur hier nach der anschließenden XhoI Restriktion die EcoRI Adaptoren und der restliche Linker- Primer wieder freigesetzt. Durch den Einsatz von 5- Methyl dCTP während der Erststrangsynthese, durch das die cDNA hemimethyliert wurde, ist das übrige Insert vor dem Verdau durch das XhoI Resrtiktionenzym geschützt. Man erhält so eine cDNA mit einem XhoI und einem EcoRI verdautem Ende. Da die ZAP® II- DNA mit den gleichen Enzymen geschnitten ist, erfolgt die Insertion der cDNA in der richtigen Leserichtung (EcoRI – XhoI) in Bezug auf den lacZ Promotor.

#### **2.1.6.1 Material**

ZAP Express® cDNA Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA)

cDNA von Punkt 2.1.5

Phenol- Chloroform 1:1 (v/v) (Phenol von Merck, Darmstadt)

Chloroform (J.T. Baker, Deventer, NL)

100% (v/v) und 70% (v/v) Ethanol (J.T. Baker, Deventer, NL)

Die Enden der cDNA Stränge werden aufgefüllt, indem nach der Zweitstrangsynthese 23  $\mu\text{l}$  blunting dNTP mix und 2  $\mu\text{l}$  klonierte Pfu DNA Polymerase (2,5 U/  $\mu\text{l}$ ) hinzugefügt werden, es wird alles gründlich gemischt und inkubiert, genau 30 Min. bei 72°C.

Zum Fällern der DNA werden 200  $\mu\text{l}$  Phenol- Chloroform (Mischungsverhältnis 1:1) dazu pipettiert und 2 Min. bei Raumtemperatur (RT) bei 14.000 rpm zentrifugiert (Tischzentrifuge 5402, Eppendorf, Hamburg). Die obere Phase wird in ein neues 1,5 ml Eppendorfröhrchen überführt und mit dem gleichen Volumen an Chloroform vermengt. Erneutes Zentrifugieren von 2 Min. bei RT und 14.000 rpm folgt, worauf die obere, wässrige Phase wiederum abgenommen und in ein neues Eppendorfröhrchen überführt wird. Die cDNA wird nun mit 20  $\mu\text{l}$  3M NaOH und 400  $\mu\text{l}$  100% (v/v) Ethanol gemischt und über Nacht bei -20°C gefällt.

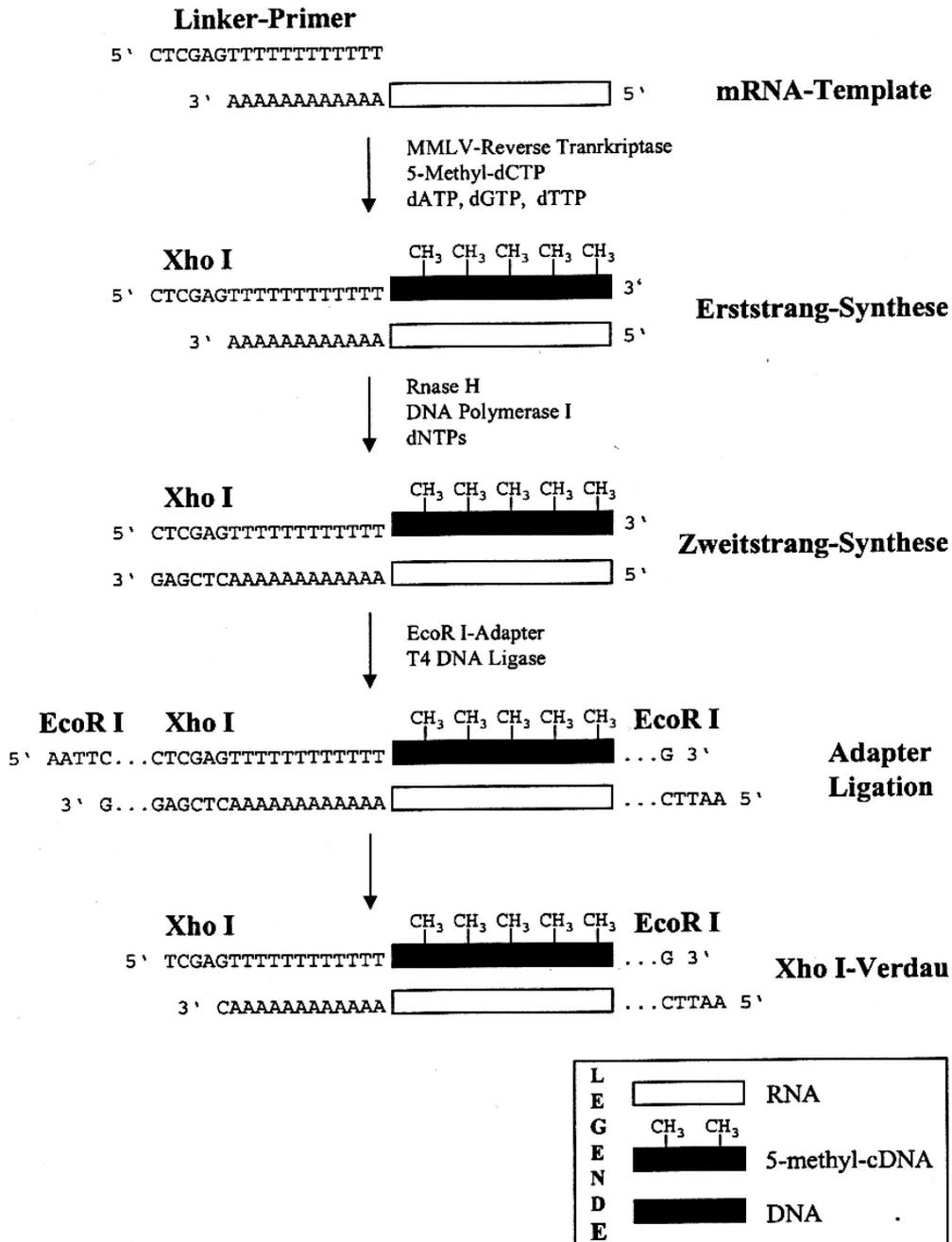
Am nächsten Tag wird die cDNA bei 14.000 rpm (+4°C) 60 Min. zentrifugiert (Tischzentrifuge 5402, Eppendorf, Hamburg) und anschließend mit 500  $\mu\text{l}$  70% (v/v) Ethanol gewaschen, ohne das Pellet beim Pipettieren aufzuwirbeln. Das Ethanol wird nach dem Zentrifugieren verworfen und das Pellet wird bei RT getrocknet.

Die getrocknete cDNA mit 9  $\mu\text{l}$  des EcoRI Adaptors resuspendiert. 1  $\mu\text{l}$  der Reaktion wird in ein neues Eppendorfröhrchen überführt, um den Reaktionsverlauf später auf einem Agarosegel zu analysieren. Nun wird zu dem Adaptor- cDNA Mix noch 1  $\mu\text{l}$  10x Ligationspuffer, 1  $\mu\text{l}$  10mM rATP und 1  $\mu\text{l}$  T4 DNA Ligase (4U/  $\mu\text{l}$ ) zugefügt und vermischt. Die Inkubation für diese Reaktion wird über Nacht bei +8°C durchgeführt. Die Ligase wird am folgenden Tag bei 70°C 30 Min. lang inaktiviert.

Für die Phosphorylierung der EcoRI adaptierten cDNA- Enden wird dem Röhrchen, nachdem es auf RT abgekühlt ist 1  $\mu\text{l}$  10x Ligase Puffer, 2  $\mu\text{l}$  10mM rATP , 6  $\mu\text{l}$  steriles Wasser und 1 ml T4 Polynucleotidkinase (10 U/  $\mu\text{l}$ ) hinzugefügt. Die Reaktion wird 30 Min. bei 37 °C durchgeführt und dann 30 Min. auf 70°C erhitzt um die Kinase zu inaktivieren.

Danach werden zu der abgekühlten Reaktion 28  $\mu\text{l}$  Xho I Puffer und 3  $\mu\text{l}$  XhoI (40U/  $\mu\text{l}$ ) zugegeben und 1.5 Stunden bei 37°C inkubiert. Um die cDNA zu präzipitieren, werden anschließend 5  $\mu\text{l}$  10x STE Puffer und 125  $\mu\text{l}$  100% (v/v) Ethanol zugegeben und über Nacht bei - 20°C stehen gelassen. Am nächsten Tag wird der Versuchsansatz bei 14.000

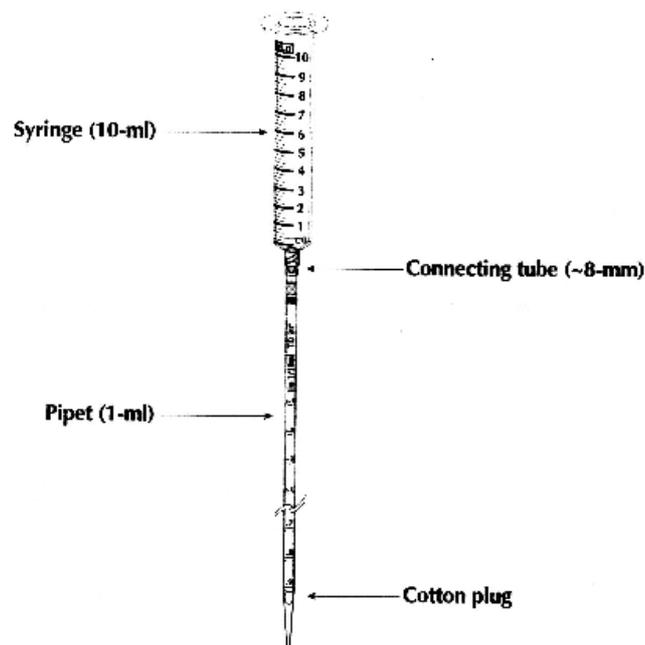
rpm (+4°C) 60 Min. zentrifugiert (Tischzentrifuge 5402, Eppendorf, Hamburg), der Überstand wird verworfen und das entstandene Pellet getrocknet. Das trockene Pellet wird in 14 µl 1x STE Puffer aufgenommen, mit 3,5 µl Säulen- Ladefarbstoff vermischt und wird nun einer Größenfraktionierung unterzogen.



**Abb. 2.1.1:** cDNA- Synthese zur gerichteten Insertion der Inserts in den λ- Phagen-Vektor ZAP® II. (Quelle: cDNA Synthesis Kit, Statagene, La Jolla, CA, USA)

### 2.1.7 Größenfraktionierung der cDNA in Sepharose- Säulen

Die Größenfraktionierung wird durchgeführt, um die mit XhoI geschnittene cDNA von den verbleibenden abgeschnittenen Oligonukleotiden und restlichen Adaptoren zu trennen, die bei der Ligation mit dem Vektor störend wirken könnten. Die Sepharosesäule trennt die Moleküle nach ihrer Größe. In diesem Molekularsieb verdrängen größere, schwere cDNA- Fragmente die Gelpartikel durch ihr Gewicht schneller als kleine, leichte cDNA- Fragmente. Für die Klonierung werden nur die ersten eluierten Fraktionen verwendet, die die größeren DNA- Stränge enthalten. Mit der hier eingesetzten Säule erfolgt eine Anreicherung von cDNA- Fragmenten, die größer als 400 Basenpaare (bp) sind.



**Abb. 2.1.2:** Verwendete Sepharosesäule zur Größenfraktionierung der cDNA

Syringe= Spritze, Pipet= Pipette, Cotton Plug= Wattestopfen

Connecting tube= Gummischlauch

(Quelle: cDNA Synthesis Kit, Statagene, La Jolla, CA, USA)

### 2.1.7.1 Material

ZAP Express® cDNA Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA)

1 ml Pipette (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)

10 ml Spritze (Ameba, Kriftel)

Phenol- Chloroform 1:1 (v/v) (Phenol von Merck, Darmstadt)

Chloroform (J.T. Baker, Deventer, NL)

100% (v/v) und 80% (v/v) Ethanol (J.T. Baker, Deventer, NL)

10x STE Puffer (1M NaCl (Roth, Karlsruhe), 100mM EDTA, 200mM Tris pH 7.5

(alle anderen Chemikalien wurden von Sigma, St Louis, USA bestellt)

Die Sepharose- Säule wird wie in der Abbildung 2.1.2 beschrieben zusammengesetzt und in einen Laborständer geklemmt, so daß sie stabil und frei steht. Nun wird die Säule mit ca. 2 ml 1x STE Puffer mittels einer sterilen Glas- Pasteupipette gefüllt und sofort mit dem Sepharose CL- 2B Gelfiltrations Medium nachgefüllt, so daß die Sepharose sich in der 1ml Pipette ohne Luftblasen bis kurz unterhalb der Verbindung zwischen Pipette und Spritze absetzt.

Die Säule wird nun mit 10 ml 1x STE Puffer gewaschen, indem man die Spritze damit auffüllt und den Puffer durchlaufen läßt, wobei die Säule nicht trockenlaufen darf. Wenn sich noch ca. 50 µl des Puffers oberhalb der Geloberfläche befinden wird die cDNA vorsichtig auf das Gel geladen, ohne die Oberfläche zu stören. Wenn die Probe in das Gel eingelaufen ist, werden 3 ml 1x STE Puffer vorsichtig auf die Säule geladen und beobachtet wie die blaue Farbe, die den Aufenthaltsort der Probe markiert, durch die Säule wandert. Da die Säule die Moleküle nach der Größe trennt, werden am Ende der Säule zuerst die großen cDNA Fragmente, dann die kleinen cDNA Fragmente und zuletzt die uninkorporierten Nukleotide erwartet, die den Hauptanteil des Eluates ausmachen. Wenn die Front des blauen Farbbandes die 0,4 ml Markierung auf der Pipette erreicht, werden jeweils drei Tropfen des Eluates in einem frischen 1,5 ml Eppendorfröhrchen gesammelt (3 Tropfen = ca. 100 µl = 1Fraktion). Für cDNA Fragmente die größer als 400 bp sind, wie auch in diesem Fall, sollen ca. 12 Fraktionen gesammelt werden, das heißt, daß die Tropfen aus der Säule so lange aufgefangen werden, bis das Ende des blauen Farbbandes bei der Markierung von 0.3 ml auf der Pipette angelangt ist.

Um zu sehen, in welcher der Fraktionen sich nun die gereinigte cDNA befindet, werden 8 µl aus jeder Fraktion, mit 3 µl Gel- Ladebuffer auf ein 1%iges Agarosegel (w/v) geladen und 10 Min. bei 150 V der Elektrophorese unterzogen (siehe auch 2.1.4) Unter dem UV- Licht lassen sich die relevanten Fraktionen feststellen (2-3 Fraktionen), die in ein 1,5 ml Eppendorfröhrchen überführt werden.

Die cDNA wird anschließend mit dem gleichen Volumen an Phenol- Chloroform (1:1) gemischt und zentrifugiert (2 Min. bei 14.000 rpm; Tischzentrifuge 5402, Eppendorf, Hamburg). Die obere Phase wird in ein neues Eppendorfröhrchen überführt und mit dem gleichen Volumen an Chloroform vermengt und erneut zentrifugiert (2 Min. bei 14.000 rpm). Die obere Phase wird wiederum in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert und mit dem doppelten Volumen an 100% (v/v) Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Am nächsten Tag wird die Probe 60 Min bei 14.000 rpm (bei +4°C) zentrifugiert (Tischzentrifuge 5402, Eppendorf, Hamburg). Der Überstand wird danach abpipettiert; das Pellet wird mit 200 µl 80% (v/v) Ethanol gewaschen (2 Min. bei 14.000 rpm) und anschließend getrocknet. Die cDNA wird in 3,5 µl sterilem Wasser gelöst und bei -20°C bis zur Quantifizierung gelagert.

### **2.1.8 Quantifizierung der cDNA im Ethidiumbromid- Platten- Assay**

Eine genaue Bestimmung der cDNA- Menge ist notwendig, da das Verhältnis von Insert (cDNA) zu Vektor bei der Ligation eine wichtige Rolle spielt. Wird zu viel oder zu wenig eingesetzt, führt dies zu schlechteren Ligationsergebnissen und somit zu einer verminderten Qualität der Expressionsbank. Da die cDNA aus DNA- Molekülen unterschiedlicher Größe besteht, zeigt sich in der Gelelektrophorese, bei der sie der Größe nach aufgetrennt wird, keine distinkte Bande. Daher ist die Quantifizierung mittels Gelelektrophorese und Mengenstandards nicht möglich. Auch eine photometrische Bestimmung der Konzentration ist aufgrund des geringen cDNA- Volumens kaum möglich.

Daher wurde hier der „Ethidiumbromid- Platten- Assay“ angewendet, der den Vorteil bietet, das man trotz dem Einsatz von wenig Volumen die cDNA- Menge recht genau abschätzen kann. So wird hier im Ethidiumbromid- Platten- Assay die Quantität der

cDNA im UV- Licht visuell gemessen, in Bezug zu einer Verdünnungsreihe mit bekannten DNA Konzentrationen.

### **2.1.8.1 Material**

(wenn nicht anders angegeben wurden die Materialien bei Sigma, St. Louis, USA bestellt)

5x TBE Puffer ( 54 g/l Tris Base; 27,5 g/l Borsäure (Merck, Darmstadt); 20 ml/l 5 mM EDTA pH 8,0 )

Ethidiumbromid- Lösung, 10mg/ml in dH<sub>2</sub>O

λ Hind III DNA (Quiagen, Hagen)

100 mM EDTA

Agarose, Elektrophoresegrad

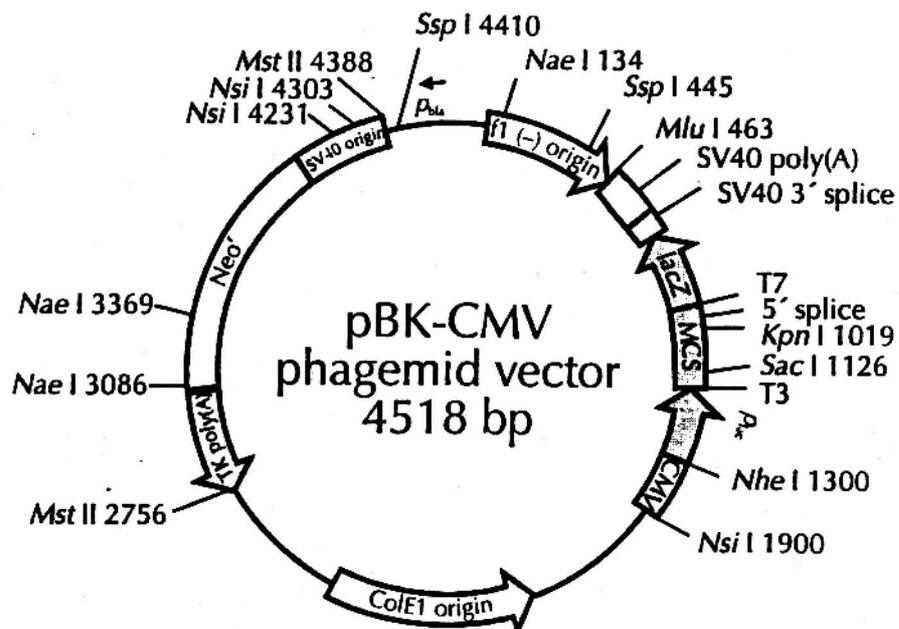
Ein 0,8% (w/v) Agarosegel wird mit 5x TBE hergestellt und mit Ethidiumbromid (10 µl/ 100 ml) vermischt. Dieser Ansatz wird nach dem Aufkochen in eine 100 mm Petrischale (Sarstedt, Nümbrecht) entleert und nach dem Aushärten noch einige Zeit im Inkubator (Heraeus, Hanau) bei 37 °C getrocknet. Als Referenz- DNA wurde λ Hind III DNA verwendet, die in folgenden Verdünnungen (in 100 mM EDTA ) auf die Gelplatte getropft wurden (je 0,5 µl): 200, 150, 100, 75, 50, 25 und 10 ng/ 0,5 µl. Nun werden 0,5 µl der gewonnenen cDNA ebenfalls auf die Platte getropft und die Gelplatte wird 15 Min. bei RT getrocknet. Die Platte wird anschließend unter eine UV Licht gelegt und die Menge der cDNA Probe wird visuell bestimmt.

### **2.1.9 Ligation der cDNA in den λ-Phagen-Vektor ZAP® II**

Bei dem für diese Arbeit verwendeten λ- Phagen- Vektor ZAP® II handelt es sich um einen Substitutionsvektor. Das ist ein Phagenvektor, bei dem das mittlere Gensegment („stuffer fragment“), das für die lytische Infektion nicht essentiell ist, entfernt wurde und nun durch fremde DNA ersetzt werden kann. Die Länge des linken und rechten Phagen-Arms ohne Insert beträgt 41.000 bp. Der Vektor kann cDNA- Inserts von unter 1 kb bis zu 17 kb aufnehmen. Der Vektor enthält bereits das gesamte pBluescript- Phagemid, mit

dem das eingeschleuste Insert, das sich in diesem Phagemid befindet, später wieder vollständig ausgeschnitten werden kann. Das pBluescript- Phagemid enthält neben einer Kanamycin- Resistenz den ColE 1- Replikationsursprung für die Vermehrung bakterieller Plasmide, sowie den f1- Replikationsursprung der filamentösen Helferphagen.

Weiterhin befindet sich im Phagemid ein Teil des  $\beta$ - Galaktosidase- Gens, auch lacZ- Gen genannt. In dieses lacZ- Gen wurde hinter dem lac- Promotor eine „multiple cloning site“ (MCS) mit 12 einmaligen Restriktionsschnittstellen und sechs Primer-Bindungsstellen kloniert. In diese MCS kann die fremde cDNA (Insert), die die gleichen Restriktionsschnittstellen wie der Vektor besitzt, hineinkloniert werden. In diesem Fall werden die Inserts, die ein XhoI und ein EcoRI geschnittenes Ende aufweisen, in den, in der MCS mit XhoI und EcoRI geschnittenen Vektor kloniert.



**Abb. 2.1.3:** Expressionsvektor ZAP® II mit pBK- CMV Phagemid- Vektor  
(Quelle: cDNA Synthesis Kit, Statagene, La Jolla, CA, USA)

### **2.1.9.1 Material**

ZAP Express® cDNA Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA)

Vektor ZAP Express® II, (Stratagene, La Jolla, CA, USA)

cDNA von Punkt 2.1.7

Der Vektor, der hier schon mit EcoRI/ XhoI geschnitten vorliegt (Stratagene, La Jolla, CA, USA), wird nun mit der gewonnenen cDNA gerichtet ligiert, in einem Verhältnis von 1: 10 (100 ng cDNA auf 1 µg Vektor, laut Herstellerangaben (Stratagene, La Jolla, CA, USA) das optimale Insert zu Vektor Verhältnis). Nach der vormals bestimmten Quantität wird die cDNA in entsprechender Menge eingesetzt und mit 0,6 µl 10x Ligasepuffer, 0,6 µl 10 mM rATP, 0,5 µl Vektor vermischt, um dann mit sterilem Wasser auf 5,5 µl aufgefüllt zu werden. Zuletzt werden 0,5 µl der T4 DNA Ligase (4 U/µl; Stratagene, La Jolla, CA, USA) zugegeben und vermenget. Die Reaktion wird in einem Eppendorfröhrchen über Nacht in einem Wasserbad bei +12 °C inkubiert.

### **2.1.10 Verpacken des Vektor- Insertkonstrukts in λ- Phagen**

λ- Phagen gehören wie die filamentösen Phagen zur Gruppe der Bakterienviren, die sich in E.coli vermehren. λ- Phagen bestehen aus einem ikosaedrischen Kopf, welcher die Phagen- DNA enthält, sowie aus einem Schwanzteil, durch den die DNA in das infizierte Bakterium eingeschleust wird.

Nach der Ligation liegt die Phagen- DNA als rekombinante DNA vor. Die so entstandene rekombinante DNA wird in Phagen verpackt (packaging reaction) und es entstehen infektiöse Phagenpartikel, die in E.coli vermehrt werden können und die während dieser Vermehrung ihr cDNA Insert exprimieren. Für die Verpackung der DNA stehen kommerzielle „Verpackungsextrakte“ zur Verfügung, die neben Kopf- und Schwanzproteinen sämtliche Enzyme enthalten, die für die Synthese neuer Phagen notwendig sind.

Die nach der Verpackung entstandene Expressionsbank wird auch als Primärbank bezeichnet.

### **2.1.10.1 Material**

Gigapack® Gold III Packaging Extract (Stratagene, La Jolla, CA, USA)

SM Puffer ( 5,8g NaCl (Roth, Karlsruhe); 2,0g MgSO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt); 50 ml 1M Tris- HCl pH 7,5 (Sigma, St. Louis, USA); 5,0 ml 2% (w/v) Gelatine für 1l dH<sub>2</sub>O, autoklaviert (Merck, Darmstadt))

Chloroform (J.T. Baker, Deventer, NL)

Für die Verpackungsreaktion wird jeweils ein Packaging- Extract pro Ansatz dem –80°C Gefrierschrank entnommen, leicht angetaut und sofort mit 4 µl der ligierten DNA vorsichtig mit der Pipettenspitze vermischt. Das Reaktionsgefäß wird nun 110 Min. bei 22°C inkubiert. Anschließend werden 500 µl SM Puffer und 20 µl Chloroform zugegeben und das Eppendorfröhrchen wird einmal kurz zentrifugiert (Tischzentrifuge 5402, Eppendorf, Hamburg), so daß sich grobe Teilchen absetzen. Der Überstand wird abgenommen und bei +4°C gelagert.

### **2.1.11 Titrieren der primären Phagenbank**

Um festzustellen wie viele infektiöse Partikel pro ml (Plaque forming units/ ml= pfu/ml) die cDNA Phagenbank enthält und wie viele davon ein Insert enthalten, muß man die Bank einem IPTG/x- gal Test und einer Titrierung unterziehen.

Bei dem verwendeten Phagemid befindet sich innerhalb des β- Galaktosidase- Gens, auch lacZ- Gen genannt, die multiple cloning site. Die Lage der MCS innerhalb des lacZ- Gens eröffnet die Möglichkeit der Blau- Weiß- Selektion der nach der Klonierung erhaltenen Plaques. Bei der Vermehrung der Phagen wird deren Genom abgelesen und auch das β- Galaktosidase- Gen in das zugehörige Enzym transkribiert und translatiert. Die β- Galaktosidase setzt in Anwesenheit des Inducers IPTG x-gal zu einem blauen Farbstoff um. Befindet sich ein Insert in der MCS des Vektors, so ist die kodierende Sequenz von ihrem Promotor getrennt und kann nicht abgelesen werden, es wird also kein Enzym gebildet und somit auch kein blauer Farbstoff. Hieraus ergibt sich, dass weiße Plaques rekombinant sind, d.h. ein Insert enthalten und blaue Plaques nicht rekombinant sind.

Die erhaltene Primärbibliothek sollte bestimmte Qualitätsmerkmale erfüllen. Solche Merkmale betreffen die Anzahl der erhaltenen Phagen (plaque forming units = pfu) sowie

den Anteil rekombinanter (ein cDNA- Insert tragenden) und nicht rekombinanter („leerer“) Phagen an der Gesamtbibliothek. Eine Expressionsbank sollte weniger als  $1 \times 10^5$  pfu/  $\mu\text{g}$  Vektor nicht rekombinante Phagen enthalten. Der Anteil rekombinanter Klone sollte 10- 100fach höher sein als der nicht rekombinanter. Ein weiteres Qualitätsmerkmal ist die Gesamtzahl der Phagen. Eine Verpackungsreaktion sollte ca.  $1 \times 10^6$  pfu/  $\mu\text{g}$  Vektor ergeben.

### **2.1.11.1 Präparation der kompetenten Bakterien**

Um die Selektion Episom tragender Bakterien zu erzielen, werden die Bakterien auf Tetrazyklin- haltigem LB- Medium ausgestrichen. Das Flüssigmedium zur Anzucht der Bakterien sollte mit Maltose und  $\text{MgSO}_4$  supplementiert werden, um die Infektion durch die Phagen zu ermöglichen. Diese binden über den Maltoserezeptor an die Bakterien und werden dabei durch  $\text{MgSO}_4$  stabilisiert. Daher sollten alle Flüssig- und Festmedien, die für die Vermehrung von  $\lambda$ - Phagen in Bakterien verwendet werden, Maltose und  $\text{MgSO}_4$  enthalten.

#### **2.1.11.1.1 Material**

XL1-Blue MRF<sup>+</sup> ausgestrichen auf LB- Tetrazyklinplatten (Stratagene, La Jolla, CA, USA)

LB- Flüssigmedium (10g/l NaCl (Roth, Karlsruhe); 10g/l Bacto-Trypton (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA); 5g/l Hefe- Extrakt (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA))

20% Maltose (20 g (w/v) in 100 ml dH<sub>2</sub>O, steril filtriert) (Sigma, St. Louis, USA)

1M  $\text{MgSO}_4$  (246 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  in 1 l dH<sub>2</sub>O, autoklaviert) (Merck, Darmstadt)

Man gibt 1 Kolonie einer auf LB-Tetrazyklin Platten ausgestrichenen XL1-blue MRF<sup>+</sup> Bakterienkultur in 10 ml LB-Medium (+ 0,2% (w/v) Maltose und 10 mM  $\text{MgSO}_4$ ) und läßt sie bei 37°C wachsen , bis sie bei einer Optischen Dichte (OD) von 600 die Absorption von 1,0 aufweisen. Die nun kompetenten Bakterien werden zentrifugiert und mit 10 mM  $\text{MgSO}_4$  auf  $\text{OD}_{600} = 0,5$  verdünnt und weiter verwendet.

## 2.1.11.2 IPTG/x- gal Test und Titerbestimmung

### 2.1.11.2.1 Material

(wenn nicht anders angegeben wurden die Materialien bei Sigma, St. Louis, USA bestellt)

SM- Puffer (5,8g NaCl (Roth, Karlsruhe); 2,0g MgSO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt); 50 ml 1M Tris-HCl pH 7,5; 5,0 ml 2% (w/v) Gelatine für 1L dH<sub>2</sub>O, autoklaviert (Merck, Darmstadt))

NZY- Agarplatten (5g/l NaCl (Roth, Karlsruhe); 2g/l MgSO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt); 5g/l Hefe- Extract (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA); 10g/l NZ Amin + 15g/l Bacto- Agar (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)) + 0,2% Maltose/ 10 mM MgSO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt)

NZY- Top Agar (5g/l NaCl (Roth, Karlsruhe); 2g/l MgSO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt); 5g/l Hefe- Extract (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA); 10g/l NZ Amin + 0,7% (w/v) Bacto- Agar (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)) + 0,2% Maltose/ 10 mM MgSO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt)

IPTG 0,5 M (5,96 g Isopropyl-  $\beta$ - D- Thiogalactopyranosid in 50 ml dH<sub>2</sub>O, steril filtriert)  
x- gal (250mg/ml in DMF, steril filtriert)

Für den IPTG/ x- gal Test und die Titerbestimmung werden 200  $\mu$ l der im letzten Schritt erhaltenen kompetenten Bakterien mit 1  $\mu$ l der primären cDNA Bank vermischt. In einem zweiten Ansatz wird von der primären cDNA Bank 1  $\mu$ l einer 1:10 Verdünnung (in SM Puffer) mit 200  $\mu$ l der kompetenten Bakterien vermengt. Die Phagen und Bakterien werden bei 37°C für 15 Min. inkubiert, damit sich die Phagen an die Bakterien anheften können. 3 ml des NZY Top- Agars werden mit 15  $\mu$ l IPTG (0,5 M in Wasser) und 50  $\mu$ l x- gal (250 mg/ ml in DMF) vermischt. Nach der Inkubation werden hierzu die Bakterien pipettiert und sofort auf eine 100 mm NZY-Agarplatte gegossen. Nachdem die Schicht fest geworden ist, werden die Platten bei 37°C über Nacht inkubiert, wobei sich auf dem Bakterienrasen Phagenplaques bilden. Die rekombinanten Plaques bleiben klar und die Plaques ohne Insert werden blau, woraufhin man die Platten am nächsten Tag auszählt.

## **2.1.12 Amplifizieren der cDNA Phagen Bank**

Um sicherzustellen, dass eine große und stabile Quantität an infektiösen Partikeln in der Bibliothek vorliegt, werden die nach der Verpackung generierten Phagenklone noch einmal in Bakterien vermehrt.

### **2.1.12.1 Präparation der Wirtszellen XL1-Blue MRF'**

Die Durchführung erfolgt wie unter Punkt 2.1.11.1 angegeben

### **2.1.12.2 Amplifizierung**

#### **2.1.12.2.1 Material**

(wenn nicht anders angegeben wurden die Materialien bei Sigma, St. Louis, USA bestellt)

Verpackungsreaktion von Punkt 2.1.10

NZY- Agarplatten (150mm) (5g/l NaCl (Roth, Karlsruhe); 2g/l MgSO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt); 5g/l Hefe- Extract (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA); 10g/l NZ Amin + 15g/l Bacto- Agar (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)) + 0,2% Maltose/ 10 mM MgSO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt)

NZY- Top Agar (5g/l NaCl (Roth, Karlsruhe); 2g/l MgSO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt); 5g/l Hefe- Extract (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA); 10g/l NZ Amin + 0,7% (w/v) Bacto- Agar (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)) + 0,2% Maltose/ 10 mM MgSO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt)

SM- Puffer (5,8g NaCl (Roth, Karlsruhe); 2,0g MgSO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt); 50 ml 1M Tris-HCl pH 7,5; 5,0 ml 2% (w/v) Gelatine für 1L dH<sub>2</sub>O, autoklaviert (Merck, Darmstadt))

Chloroform (J.T. Baker, Deventer, NL)

DMSO

600 µl dieser kompetenten Bakterien werden mit  $1 \times 10^5$  (in max. 300 µl) pfu/ ml der cDNA Phagenbank vermischt und bei 37°C für 15 Min. inkubiert. Das Gemisch wird nach der Inkubation mit 6,5 ml NZY Top- Agar gemischt und auf 150 mm NZY

Agarplatten gegossen. Nachdem die Schicht fest geworden ist, werden die Platten bei 37°C über Nacht inkubiert, wobei sich auf dem Bakterienrasen Phagenplaques bilden.

Die Platten werden nun mit 8 ml SM Puffer überschichtet und über Nacht bei +4°C leicht geschwenkt; dies erlaubt den Phagen in den Puffer zu diffundieren.

Am folgenden Tag wird der Puffer zusammengeführt (gepoolt) und die Platten werden nochmals mit 2 ml SM Puffer gewaschen, die dann ebenfalls zu dem schon gepoolten Puffer pipettiert wird. Das Endvolumen nach der ersten Amplifikation betrug nach Aufreinigung 40 ml. Nun wird 5% (v/v) Chloroform zugegeben und für 15 Min. inkubiert. Die Lösung wird 10 Min. bei 1800 rpm zentrifugiert (Biofuge 17RS, Heraeus, Hanau) und der Überstand wird in ein neues Falconröhrchen (50 ml, Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) überführt. Die letzten Schritte ab der Zugabe des Chloroforms werden so oft wiederholt, bis der Überstand klar ist. 1,5 ml Aliquots wurden mit 7% (Endkonzentration) DMSO versetzt und bei -80°C gelagert, während zwei 1,5 ml Aliquots unter Zusatz von 0,3% (Endkonzentration) Chloroform bei +4°C gelagert wurden.

### **2.1.12.3 Titerbestimmung der amplifizierten Phagenbank**

Um festzustellen wie viele infektiöse Partikel pro ml (pfu/ ml) die cDNA Phagenbank nun enthält und wie viele davon ein Insert enthalten, wird die cDNA- Bank nochmals einem IPTG/ x- gal Test und einer Titrierung unterziehen. Die Vorgehensweise entspricht der unter Punkt 2.1.11.1 und 2.1.11.2 beschriebenen Methode. Da die amplifizierte Bank vermutlich einen hohen Titer aufweist werden die kompetenten Bakterien (200 µl) mit jeweils 1µl der folgenden Verdünnungsreihe ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ; in SM Puffer), die von der amplifizierten cDNA Bank hergestellt wird, gemischt.

### **2.1.13 Testen der L1236 cDNA Bank auf Diversität und die Expression vollständiger kodierender Sequenzen**

Um die Diversität der cDNA Bank zu testen wird sie mittels Polymerase Kettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR) auf das Vorkommen von einem housekeeping Gen

(p53) und Hodgkin Reed- Sternberg spezifische Sequenzen (CD30, Restin) hin untersucht.

Um zu sehen, ob die cDNA Bank auch vollständige, für die Proteine kodierende Sequenzen beinhaltet, wird eine PCR mit Primern, die am Ende der kodierenden Sequenz des CD30 Proteins liegen angeschlossen.

Das Prinzip der PCR beruht auf einer zyklischen Wiederholung von drei Reaktionsschritten, die bei unterschiedlichen Temperaturen ablaufen. Im ersten Schritt wird die zu amplifizierenden DNA- Moleküle durch Hitze denaturiert. Die DNA Stränge lösen sich von einander und ermöglichen so im nächsten Schritt eine Primer- Anlagerung. Die Primer hybridisieren unter geeigneten Temperaturbedingungen mit je einem der beiden DNA- Einzelstränge. Im letzten Teil der PCR erfolgt die Verlängerung dieser Startermoleküle entlang der einzelsträngigen Matrize durch die hitzestabile Taq- DNA- Polymerase.

#### **2.1.13.1 Material**

(wenn nicht anders angegeben wurden die Materialien bei Promega, Madison, WI, USA bestellt)

10x Taq- Polymerase- Puffer

dNTP- Mix (20 mM) (Amersham, Piscataway, NJ, USA)

MgCl<sub>2</sub> (25 mM)

Forwärts (S)- und Revers (AS)- Primer ( je 50 pmol/ µl) (ARK Sigma, Darmstadt) :

p35 S 5' GCT GAA TGA GGC CTT GGA ACT 3'

AS 5' ATC CAT TGC TTG GGA CGG CAA 3'

CD30 S 5' CAG TGC TCT TCT GGG TGA TCC T 3'

AS 5' GGC AAG GGG TCT TCT TTC CCT T 3'

Restin S 5' TGG AAG CAC AGC TCT GAA GAC A 3'

AS 5' AGG CGT AGC TGA AGG TTC CTT T 3'

CD30 3' Ende S 5' TGA AGG CTG ACA CCG TGA TCG T 3'

3' Ende AS 5' TCA CTT TCC AGA GGC AGC TGT G 3'

Taq- DNA- Polymerase (5U/ µl)

dH<sub>2</sub>O (Delta Pharma, Pfullingen)

Mineralöl (Sigma, , St. Louis, USA)

PCR Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg)

Hierzu werden 1 µl der cDNA (vormals 10 Min. auf 95°C erhitzt und auf Eis gestellt) mit 1µl Taq-Polymerase (1:5 verdünnt mit H<sub>2</sub>O) , 5 µl dNTP- Mix (20 µmol), 5 µl 10x Puffer, 3 µl MgCl<sub>2</sub>, 1 µl Primer (25 pmol/ µl), 33 µl steriles Wasser vermischt und mit Mineralöl überschichtet. Die Reaktion verläuft in einer sogenannten PCR- Maschine (Thermocycler, Biometra, Göttingen) bei 5 Min. 95°C, 1 Min. 63°C (außer bei Restin (61°C) und p53 (59°C) Primern), 2 Min. 72°C über 40 Zyklen, die mit einem letzten Zyklus von 10 Min. 72°C abgeschlossen und dann auf +4°C gekühlt werden, bis man von der Reaktion 5 µl mit 2 µl Gelladepuffer auf einem 1% (w/v) Agarosegel aufträgt (siehe Punkt 2.1.4). Die Elektrophorese wird 2 Stunden bei 90 Volt durchgeführt und das Gel wird unter dem UV Licht begutachtet.

### **2.1.14 Lagerung der cDNA- Expressionsbank**

λ- Phagen Bibliotheken können ohne großen Titerverlust ca. 1 Jahr im Kühlschrank aufbewahrt werden. Zur Sicherheit sollten jedoch auch Aliquots bei –80°C gelagert werden.

#### **2.1.14.1 Material**

Chloroform (J.T. Baker, Deventer, NL)

DMSO (Sigma, St. Louis, USA)

Cryoeinfrierröhrchen (InterMed Nunc, Wiesbaden)

Ein Teil der Bank wird in 1 ml Aliquots aufgeteilt und in jedes Gefäß (1,5 ml; Eppendorf, Hamburg) 0,3% (finale Konzentration, v/v) Chloroform pipettiert, um ein Bakterienwachstum zu verhindern. Diese Aliquots werden bei + 4°C gelagert.

Die andere Hälfte der Bibliothek wird ebenfalls aliquotiert und mit 7% (finale Konzentration, v/v) DMSO gut vermischt. Die Bank wird in Cryoeinfrierröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80°C aufbewahrt.

## **2.2. Screening der L1236 cDNA Expressionsbank mit Patientenserum**

### **2.2.1. Gewinnung des Patientenserums**

20 ml Blut wird dem Patienten oder Probanden in ein Serum- Blutbank- Röhrchen abgenommen, worauf das Röhrchen bei 1200 rpm zentrifugiert (Rotordurchmesser 4.2, Beckmann J-6M/E, München) wird und der Überstand (Serum) in ein 50 ml Falconröhrchen (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) überführt wird. Das Serum wird nun nochmals bei 1600 rpm zentrifugiert (Rotordurchmesser 4.2, Beckmann J-6M/E, München), um auch die letzten Zellen zu entfernen, wonach der Überstand in Cryo- Einfrierröhrchen (InterMed Nunc, Wiesbaden) pipettiert wird und diese in flüssigem Stickstoff schockgefroren werden. Die Lagerung des Serums erfolgt bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **2.2.2. Absorption der Seren mit E.coli/ Phagen Lysat**

Jeder Proband besitzt Antikörper im Blut, die gegen E.coli Bakterien und Bakteriophagen gerichtet sind. Diese können im nachfolgenden Immunoscreening zu falsch positiven Farbreaktionen führen und müssen daher schon im Vorfeld aus dem Serum entfernt werden. Um diese Antikörper im Serum zu eliminieren, werden die Seren mit E.coli/ Phagenlysate behandelten Filtern inkubiert, an die sich die Antikörper heften und so aus dem Serum gefischt werden.

#### **2.2.2.1 Material**

(wenn nicht anders angegeben wurden die Materialien bei Sigma, St. Louis, USA bestellt)

TBS pH 7,5 ( 20mM Tris-HCl pH 7,5; 150mM NaCl (Roth, Karlsruhe))

TBST pH 7,5 ( TBS; 0,05% (v/v) Tween 20 )

Blocking Lösung I ( TBS; 1% BSA )

Nitrocellulosefilter (Millipore, Bedford, MA, USA)

E. coli- Phagen- Lysat (Stratagene, La Jolla, CA, USA)

Petrischalen (150 mm, Sarstedt, Nümbrecht)

10% NaN<sub>3</sub>

Das E.coli/ Phagenlysat (von Stratagene, La Jolla, CA, USA) wird hierzu mit TBST 1: 10 verdünnt. Es sollen laut Hersteller vier Nitrocellulose- Membranen im Format von 5x 10 cm zugeschnitten werden und 30 Min. lang unter gelegentlichem Schwenken in das verdünnte Lysat eingetaucht werden. Die Membranen werden auf Gel- Übertragungspapier (Gel blotting paper, Schleicher und Schuell, Dassel) bei RT getrocknet, dann dreimal in je 50 ml TBS gewaschen und anschließend in 50 ml Blocking Lösung I für 45 Min. bei RT geschwenkt. Die Membranen werden dreimal in je 50 ml TBST gewaschen und anschließend wird jeweils ein Filter in das 1:10 in TBST verdünnte Serum gelegt und 10 Min. bei 37°C geschwenkt. Der Filter wird nach den 10 Min verworfen und der nächste Filter wird in das verdünnte Serum gelegt. Man verfährt mit den anderen Membranen in gleicher Weise, bis alle verbraucht sind und das Serum mit 0,5 % (v/v) NaN<sub>3</sub> versetzt bei -20 °C gelagert werden kann.

### **2.2.3 Ausplattieren der cDNA Bank für das Immunoscreening**

λ- Phagen – Vektoren exprimieren klonierte Proteine nicht wie filamentöse Phagen auf ihrer Oberfläche, sondern die insertierte cDNA wird im Verlauf des normalen Vermehrungszyklus abgelesen und das klonierte Protein innerhalb der Bakterien gebildet. Die λ- Phagen verfolgen einen lytischen Vermehrungszyklus. Hierbei wird die Wand der E.coli- Zelle durch das Phagenlysozym aufgelöst und die neuen Phagen werden freigesetzt. In einem geschlossenen Bakterienrasen entsteht an der Stelle, an der sich lytische Phagen vermehren, ein Loch im Rasen, ein sogenannter Plaque.

Nach der Lyse der Wirtszellen liegt das rekombinante Protein frei in den Plaques im Bakterienrasen vor und kann mit Antikörpern detektiert werden. Hierbei muß bedacht werden, das nur korrekt gefaltete Proteine und solche die ihre Epitope freiliegend präsentieren von den Antikörpern erfaßt werden können. Pro 15 cm Durchmesser der Agarplatte können bis zu 60.000 Plaques, also 60.000 Phagenklone ausplattiert werden. Das in den Phagen befindliche Protein wird durch Auflegen eines Nitrocellulosefilters

auf die Platten an diese Matrix gebunden. Die Filter werden mit Antikörpern inkubiert und eine Bindung durch eine enzymatische Farbreaktion nachgewiesen.

### **2.2.3.1 Präparation der kompetenten Bakterien XL1-Blue MRF'**

Die Durchführung erfolgt wie unter Punkt 2.1.11.1 angegeben

### **2.2.3.2 Übertragen der Plaques auf Nitrocellulosefilter**

#### **2.2.3.2.1 Material**

(wenn nicht anders angegeben wurden die Materialien bei Sigma, St. Louis, USA bestellt)

NZY- Agarplatten (150mm) ( 5g/l NaCl (Roth, Karlsruhe); 2g/l MgSO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt); 5g/l Hefe- Extract (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA); 10g/l NZ Amin + 15g/l Bacto- Agar (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)) + 0,2% Maltose/ 10 mM MgSO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt)

NZY- Top Agar ( 5g/l NaCl (Roth, Karlsruhe); 2g/l MgSO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt); 5g/l Hefe- Extract (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA); 10g/l NZ Amin + 0,7% (w/v) Bacto- Agar (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)) + 0,2% Maltose/ 10 mM MgSO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt)

SM Puffer ( 5,8g NaCl (Roth, Karlsruhe); 2,0g MgSO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt); 50 ml 1M Tris- HCl pH 7,5; 5,0 ml 2% (w/v) Gelatine für 1L dH<sub>2</sub>O, autoklaviert (Merck, Darmstadt))

cDNA- Expressionsbank von Punkt 2.1.14

XL1- Blue MRF' (OD<sub>600</sub>: 0,5) (Stratagene, La Jolla, CA)

0,5 M IPTG (Isopropyl- β- D- Thiogalactopyranosid)

steriles dH<sub>2</sub>O (Delta Pharma, Pfullingen)

Nitrocellulosefilter (Millipore, Bedford, MA, USA)

TBST pH 7,5 (20mM Tris-HCl pH 7,5; 150mM NaCl (Roth, Karlsruhe) + 0,05% (v/v) Tween 20)

Blockinglösung II (20mM Tris-HCl pH 7,5; 150mM NaCl (Roth, Karlsruhe); 5% Milchpulver (Fluka, Buchs, CH))

Petrischalen (150 mm, Sarstedt, Nümbrecht)

1 µl L1236 cDNA Bank wird mit SM Puffer bis zu 1: 10.000 in Zehnerschritten verdünnt. 2 µl der höchsten cDNA Bank Verdünnung ( $6 \times 10^4$ ) wird mit 600 µl der verdünnten XL-1 blue E.coli vermengt und 15 Min bei 37°C inkubiert. Danach werden die behandelten E.coli mit 7.5 ml NZY Top- Agar vermischt und auf eine NZY Agarplatte (150 mm Durchmesser) ausplattiert. Nachdem diese Schicht erkaltet ist werden die Platten umgedreht bei 42°C inkubiert bis in dem entstandenen Bakterienrasen kleine Plaques zu erkennen sind (nach 4-5 h). Gegen Ende der Inkubationszeit der Agarplatten werden Membranen zum Screenen vorbereitet, indem man auf die Filter jeweils mit dem Bleistift Positionsmarkierungen aufbringt und sie 10 Min. in 10 mM IPTG (frisch angesetzt oder von einem 0,5 M Stock in -20°C) bei RT inkubiert. Anschließend werden die Membranen auf Gelblottingpapier (Schleicher + Schuell, Dassel) getrocknet und auf die Agarplatten gelegt, mit der Oberseite der Filter auf die Oberseite der Platten. Luftblasen werden glattgestrichen, die Orientierung der Filter wird mit Stiften an der Plattenunterseite markiert. Die Platten werden weitere 3,5 h bei 37°C inkubiert. Danach werden die Membranen von den Platten gelöst und 3 mal 15 Min in TBST gewaschen, um dann über Nacht bei +4°C in Blocking Lösung II (mit Milchpulver) langsam geschwenkt zu werden. Die Platten werden bei +4°C umgedreht gelagert.

## **2.2.4 Immunfärbung**

Gebundene Antikörper können auf den Membranen durch enzymgekoppelte Sekundärantikörper nachgewiesen werden. Auf den Membranen bildet sich an der Stelle, an der der Antikörper gebunden hat, ein farbiger Niederschlag. Die Enzymreaktion mit alkalischer Phosphatase ergibt eine rötliche Farbreaktion.

### **2.2.4.1 Material**

(wenn nicht anders angegeben wurden die Materialien bei Sigma, St. Louis, USA bestellt)

Blocking Lösung I (20mM Tris-HCl pH 7,5; 150mM NaCl (Roth, Karlsruhe) + 1% BSA)

TBST pH7,5 (20mM Tris-HCl pH 7,5; 150mM NaCl (Roth, Karlsruhe) + 0,05% (v/v) Tween 20)

10% (w/v) NaN<sub>3</sub> (in 100 ml dH<sub>2</sub>O, steril filtriert)

Ziege- anti- human IgG- AP konj. (Promega, Madison, WI, USA)

FAST RED Färbelösung ( 40mg Naphtol- phosphat in 4ml DMF + 200ml Tris-HCl pH 8,2; +200mg FAST RED)

Nitrocellulosemembranen von Punkt 2.2.3.2

Das Serum wird 1: 10 in Blockinglösung I verdünnt (Endkonzentration von 1: 100) und mit 10% NaN<sub>3</sub> versetzt (Endkonzentration 0,1% (v/v)). In dem Serum werden bis zu 3 Nitrocellulosemembranen (Durchmesser von 130 mm) 2 Stunden bei RT in einer 150 mm Petrischale mit Deckel leicht geschwenkt. Die Membranen werden dann dreimal für 5 Min, in je 150 ml TBST Puffer bei RT gewaschen, um danach für 1 Stunde im sekundären Antikörper bei RT geschwenkt zu werden. Der sekundäre Antikörper ist hier ein Ziege –anti- human Ig G- Alkaline Phosphatase konjugierter Antikörper, 1: 7500 in Blockinglösung I verdünnt. Die Membranen werden anschließend noch dreimal je drei Minuten in je 150 ml TBST gewaschen, bevor sie abgedunkelt in 100 ml einer gefilterten FAST RED Färbelösung bei 37°C 1 Stunde geschwenkt werden. Der Filterhintergrund und die negativen Plaques bleiben weiß oder werden leicht rosa, während sich positive Plaques rot färben.

## **2.2.5 Isolierung positiver Plaques**

Um positive Signale in einem 2. Screening zu bestätigen, werden positive Plaques aus dem Agar ausgestochen; die enthaltenen Phagen werden aufgereinigt und erneut ausplattiert.

### **2.2.5.1 Material**

(wenn nicht anders angegeben wurden die Materialien bei Merck, Darmstadt bestellt)

SM- Puffer ( 5,8g NaCl (Roth, Karlsruhe); 2,0g MgSO<sub>4</sub>; 50 ml 1M Tris-HCl pH 7,5

(Sigma, St. Louis, USA); 5,0 ml 2% (w/v) Gelatine für 1l dH<sub>2</sub>O, autoklaviert )

gelbe Eppendorf- Spitzen (Eppendorf, Hamburg)

Chloroform (J.T. Baker, Deventer, NL)

Glas-Pasteurpipette

Die Position geröteter Plaques auf dem Filter wird mittels eines Stiftes auf die Unterseite der original NZY- Agarplatten (von Punkt 2.2.3.2) markiert und die betroffenen Plaques werden mit einer sterilen Glas- Pasteurpipette oder einer gelben Eppendorf Pipettenspitze ausgestochen und in ein Eppendorfröhrchen in 500 µl SM Puffer mit 20 µl Chloroform überführt. Der Inhalt des Röhrchens wird gründlich gemischt und über Nacht in einem +4°C Kühlschrank gelagert, damit die Phagen aus dem Gel in den Puffer diffundieren können.

### **2.2.5.2 Nomenklatur**

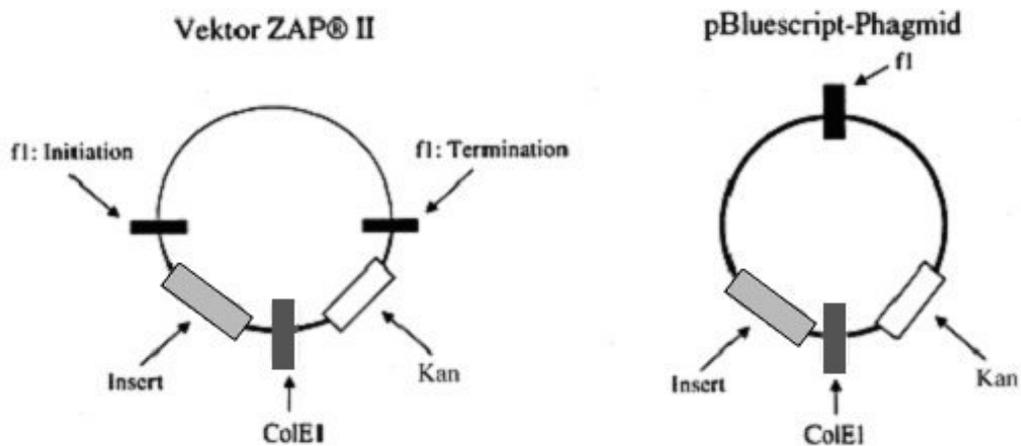
Die Beschriftung der positiven Plaques nach dem ersten Screening wird wie folgt gehandhabt. Nach jeder Plattierung (10 Platten pro Plattierung mit je  $6 \times 10^4$  Plaques) werden die positiven Plaques mit der Nummer des Plattierungsdurchgangs und nach der Reihenfolge seiner Entdeckung nummeriert (zum Beispiel ist 1/1 der erste Plaque, der bei der ersten Plattierung gefunden wurde). Die gefundenen positiven Farbreaktionen werden zuerst als Plaques benannt, bis sie nach der Exzision (Punkt 2.2.7.2) als Klone bezeichnet werden. Die Nummerierung der Plaques geht auf die Klone über. Bei der Exzision ist die Nummerierung der Positiven nicht mehr durchgängig, da die Plaques wegfallen, die sich bei einem zweiten Screeningschritt nicht mehr als positiv herausgestellt haben.

### **2.2.6 Subklonierung positiver Phagen zur Vereinzelung positiver Plaques**

Damit man die in positiven Plaques enthaltenen cDNA sequenzieren kann, müssen mögliche andere negative Phagenpartikel und Mehrfachinfektionen der Bakterien eliminiert werden; dies geschieht durch zwei weitere Ausplattierungs- und Färbevorgänge (siehe Punkt 2.2.3 – 2.2.5). Hierbei wird die Verdünnung beim letzten Ausplattierungsdurchgang so angelegt, dass man einzelne Plaques mit viel Zwischenraum erhält, damit der positive Plaque mit Sicherheit keine cDNA umliegender Plaques enthält. Bei diesem letzten Durchgang sollte bereits eine monoklonale Phagenpopulation vorliegen (500- 750 pfu/ 10 cm Agarplatte).

## 2.2.7 Exzision des pBluescript- Phagmids aus $\lambda$ - Phagen mit ExAssist Helferphagen

Bei dem ZAP® II System besteht die Möglichkeit, von der Arbeit mit  $\lambda$ - Phagen überzugehen auf Phagmide oder Plasmide. Dies geschieht mit Hilfe filamentöser Helferphagen, von der Firma als „ExAssist“ bezeichnet. Die Initiations- und die Terminationssequenz des f1- Helferphagen- Replikationsursprungs wurden separat in den ZAP® II Vektor kloniert und zwar die Initiationsseite an das eine und die Terminationsseite an das andere Ende des Phagmids.

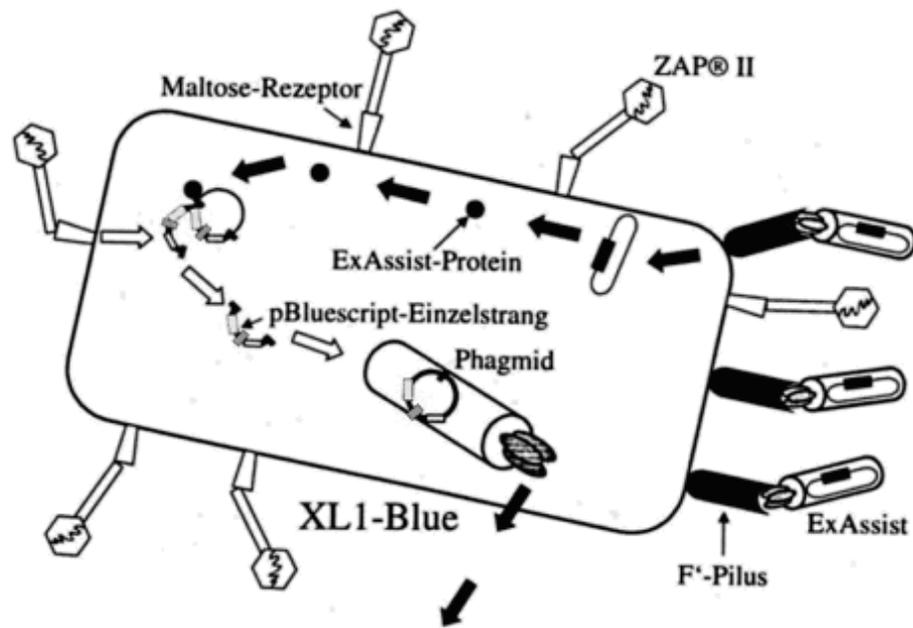


**Abb. 2.2.1:** Schematische Darstellung des Uni- ZAP® II Vektors und des pBluescript Phagmids. f1 = Replikationsursprung der filamentösen Helferphagen; ColEI = Plasmid- Replikationsursprung; Kan = Kanamycin- Resistenz

Werden E.coli Zellen sowohl mit dem Insert- tragenden ZAP® II- Phagen als auch mit den Helferphagen infiziert, so erkennen bestimmte Proteine der Helferphagen die Initiationsstelle und lagern sich an einen DNA- Strang an. Es erfolgt die Synthese eines DNA- Einzelstranges bis zum Teminationssignal. Dieser DNA- Strang enthält alles, was zwischen Initiations- und Terminationsseite liegt, also das gesamte Bluescript – Phagmid mit Insert.

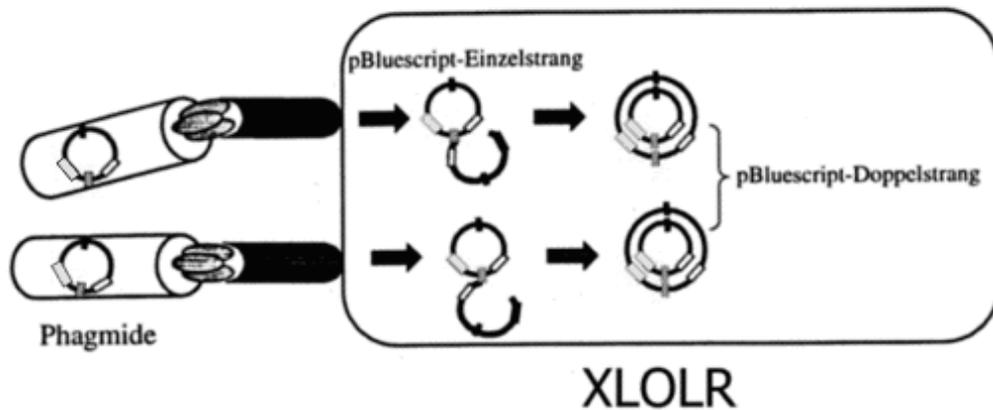
Die neu gebildete Einzelstrang- DNA wird zirkularisiert, in Phagmidpartikel verpackt und aus dem Bakterium ausgeschleust. Nach der Infektion mit beiden Phagen werden die

XL1- Blue Bakterien durch Hitze abgetötet, die Phagmide überstehen hierbei die Hitzebehandlung.



**Abb. 2.2.2:** Infektion von XL1-Blue MRF' mit ZAP® II und ExAssist;  
Produktion von pBlueskript- tragenden Phagmiden

Mit den gewonnenen Phagmiden wird nun ein anderer E.coli- Stamm infiziert, in dem sich die Helferphagen nicht vermehren können (XLOLR-Stamm) und somit nur das Phagmid repliziert wird. In den XLOLR- Zellen wird das zirkularisierte, einsträngige Molekül in ein doppelsträngiges umgewandelt. Da das Phagmid den ColE1-Replikationsursprung besitzt, wird das doppelsträngige Phagmid jetzt wie ein normales Plasmid repliziert.



**Abb. 2.2.3:** Infektion von XL0LR mit Phagmiden;  
Synthese des zweiten Plasmidstranges

Um das Plasmid selektiv aufrecht zu erhalten, werden die XL0LR- Zellen auf Tetrazyklin- Platten ausgestrichen. Die Kolonien können dann für Mini- und Maxi-DNA- Präparationen verwendet werden, um beispielsweise die Insert- DNA zu sequenzieren.

## 2.2.7.1 Präparation der kompetenten Bakterien

### 2.2.7.1.1 Material

(wenn nicht anders angegeben wurden die Materialien bei Sigma, St. Louis, USA bestellt)

Glycerolstock XL1- Blue MRF' (Stratagene, La Jolla, CA, USA)

Glycerolstock XL0LR (Stratagene, La Jolla, CA, USA)

LB- Flüssigmedium (10g/l NaCl (Roth, Karlsruhe); 10g/l Bacto-Trypton (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA); 5g/l Hefe- Extrakt (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)) + 0,2% Maltose/ 10mM MgSO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt)

LB- Tetrazyklin Platten ( LB- Medium; 20g/l Bacto-Agar (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)) + 1,5 ml 10 mg/ ml Tetrazyklin

NZY- Flüssigmedium ( 5g/l NaCl (Roth, Karlsruhe); 2g/l MgSO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt);  
5g/l Hefe- Extract (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA); 10 g/l NZ  
Amin)

Die Gewinnung der Wirtsbakterien erfolgt wie unter 2.1.11.1 beschrieben. Beide Bakterienstämme werden auf den LB- Tetrazyklin- Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Jeweils eine Kolonie der Stämme wurde zum Animpfen der Medien genommen. XL1- Blue MRF' wird in LB- Flüssigmedium + 0,2% Maltose/ 10mM MgSO<sub>4</sub> und XLOLR wird in NZY- Flüssigmedium kultiviert. Die Bakterien wachsen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1.0, werden dann zentrifugiert (10 Min. bei 1800 rpm, Biofuge 17RS, Heraeus, Hanau) und in 1 ml 10 mM MgSO<sub>4</sub> resuspendiert.

## **2.2.7.2 Exzision**

### **2.2.7.2.1 Material**

(wenn nicht anders angegeben wurden die Materialien bei Sigma, St. Louis, USA bestellt)

XL1-blue MRF' (OD<sub>600</sub>: 1,0) von Punkt 2.2.7.1

ExAssist (Stratagene, La Jolla, CA, USA)

NZY- Medium ( 5g/l NaCl (Roth, Karlsruhe); 2g/l MgSO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt); 5g/l  
Hefe- Extract (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA); 10g/l NZ Amin )

Positiver Phagenplaque von Punkt 2.2.6

Hierbei werden 200 µl kompetente XL1-blue MRF' Bakterien, 100 µl der monoklonalen Phagenpopulation und 1 µl der ExAssist Helferphage gemischt und in einem 50 ml Falkonröhrchen (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) 15 Min. bei 37°C inkubiert. 3 ml NZY- Medium werden zupipettiert und das Gemisch wird 3 Stunden bei 37°C geschwenkt. Das Falkongefäß wird anschließend bei 67°C für 20 Min. erhitzt und dann bei 1800 rpm 15 Min. zentrifugiert (Biofuge 17RS, Heraeus, Hanau). Der Überstand

enthält nun den herausgeschnittenen pBK-CMV Phagemid Vektor mit dem Insert und liegt als filamentöses Phagenpartikel vor, das bei +4°C gelagert werden kann.

### **2.2.7.3 Transfektion des Konstrukts in Phagen- Infektion resistente Bakterien**

Dieser Schritt garantiert, dass keine bei der Sequenzierung störende Phagen DNA mehr in der Probe enthalten ist. Auch Reste des Helfer- Phagen werden eliminiert, da sie keine Kanamycinresistenz besitzen, wie die Zielbakterien, die diese Resistenz mit der Einschleusung des filamentösen Phagenpartikels erlangen.

#### **2.2.7.3.1 Material**

(wenn nicht anders angegeben wurden die Materialien bei Sigma, St. Louis, USA bestellt)

XL0LR (OD<sub>600</sub>: 1,0) von Punkt 2.2.7.1

Phagemid von Punkt 2.2.7.2

NZY- Flüssigmedium ( 5g/l NaCl (Roth, Karlsruhe); 2g/l MgSO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt);

5g/l Hefe- Extract (Becton Dickinson, (Becton Sparks, MD, USA); 10g/l NZ Amin )

LB- Kanamycin Platten (10g/l NaCl (Roth, Karlsruhe); 10g/l Bacto-Trypton (Becton

Dickinson, Sparks, MD, USA); 5g/l Hefe- Extrakt (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) + 20g/l Bacto-Agar (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)) + 50 mg/ l Kanamycin

200 µl der kompetenten XL0LR Bakterien werden mit 10 µl der filamentösen Phagenpartikel gemischt und 15 Min. bei 37°C inkubiert. 300 µl NZY- Medium werden zugegeben und eine weitere Inkubation bei 37°C für 45 Min. folgt. Danach werden 20 µl dieser Suspension auf LB- Kanamycin Agarplatten ausgestrichen und 15 Min. bei RT getrocknet. Die Platten werden dann über Nacht bei 37°C, umgedreht inkubiert. Am nächsten Tag zeigen sich Bakterienkolonien auf der Agaroberfläche, die den pBK- CMV doppelsträngigen Phagemid- Vektor und das Insert enthalten. Diese Platten werden bei +4°C gelagert.

## **2.2.8 Plasmid- DNA- Minipräparation**

Hierfür wird das QIAprep Spin Miniprep Kit verwendet (Quiagen, Hilden). Dieses basiert auf der Methode der alkalischen Lyse nach Birnboim & Doly (1979). Die Bakterien werden in einem NaOH/ SDS- Puffer unter Zusatz von RNase lysiert. SDS löst Phospholipide und Proteine aus der Zellwand, die alkalischen Bedingungen führen zur Denaturierung der Proteine sowie chromosomaler und Plasmid- DNA. Durch Zugabe von Puffer N3 wird das Lysat neutralisiert und eine hohe Salzkonzentration eingestellt. Durch eine Erhöhung der Salzkonzentration werden denaturierte Proteine, chromosomale DNA, Zelltrümmer und SDS präzipitiert. Plasmid- DNA wird renaturiert und bleibt in Lösung. Der die Plasmid- DNA enthaltende Überstand wird auf QIAprep- Säulen aufgetragen und die DNA an die Silica- Gel- Membran gebunden. In mehreren Waschschrinen werden Endonukleasen und Salze entfernt. Die DNA wird mit sterilem dH<sub>2</sub>O von der Säule eluiert.

### **2.2.8.1 Material**

(wenn nicht anders angegeben wurden die Materialien bei Sigma, St. Louis, USA bestellt)

LB-Flüssigmedium (10g/l NaCl (Roth, Karlsruhe); 10g/l Bacto-Trypton (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA); 5g/l Hefe- Extrakt (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)) Kanamycin (50 mg/l)

QIAprep Spin Miniprep Kit (Quiagen, Hilden)

Steriles dH<sub>2</sub>O (Delta Pharma, Pfullingen)

Man läßt hierfür eine Kolonie (von Schritt 2.2.7.3) über Nacht bei 37°C in 5 ml LB-Medium + Kanamycin wachsen, zentrifugiert am nächsten Morgen 2 ml davon 10 Min bei 8000 rpm (Tischzentrifuge 5402, Eppendorf, Hamburg), verwirft den Überstand und pipettiert 250 µl des RNase A Puffers P1, 250 µl Lysepuffer P2 und 350 µl Präzipitationspuffer N3 dazu. Nach dem Zentrifugieren (14.000 rpm, 10 Min.; Tischzentrifuge 5402, Eppendorf, Hamburg) wird der Überstand in eine Membran-Zentrifugationssäule überführt und kurz zentrifugiert. Die durchgelaufene Flüssigkeit wird nun bei jedem Schritt verworfen. Die Säule wird nun kurz mit 0,5 ml PB und 0,75 ml PE Puffer gewaschen. Es wird ein letztes Mal zentrifugiert, um auch den letzten Rest

an Flüssigkeit zu entfernen. Die Säule wird danach in ein Eppendorfröhrchen gestellt, mit 50 µl sterilem Wasser beladen 1 Min. bei RT stehen gelassen und wieder kurz zentrifugiert, um die DNA zu eluieren.

## **2.2.9 Anlegen von Bakterien Glycerolstämmen**

Von XLORL Bakterien, die das pBluescript- Plasmid positiver Klone tragen, werden als Reserve Aliquots gemacht, die bei – 80°C eingefroren werden.

### **2.2.9.1 Material**

(wenn nicht anders angegeben wurden die Materialien bei Sigma, St. Louis, USA bestellt)

LB- Kanamycin Platten mit XLORL Einzelkolonien von Punkt 2.2.7.3

LB- Kanamycin- Flüssigmedium (10g/l NaCl (Roth, Karlsruhe); 10g/l Bacto-Trypton (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA); 5g/l Hefe- Extrakt (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)) + 50mg/l Kanamycin

87% Glycerol, steril filtriert (Merck, Darmstadt)

Eine Bakterienkultur wird von der Platte in 3ml LB- Kanamycin überführt und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,0 wachsen gelassen. Um eine Endkonzentration von 15% (v/v) Glycerol zu erreichen werden zu 3 Volumenteil (VT) Bakterienkultur 0,7 VT 87% (v/v) Glycerol gemischt. Die Lösung wird aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei – 80°C gelagert.

### **2.2.10 Größenanalyse der erhaltenen Inserts**

Um festzustellen wie groß das Insert ist, werden die aus der λ- Phagen- DNA mittels Helferphagen amplifizierte Plasmide mit den Restriktionsenzymen EcoRI und XhoI geschnitten. Das Insert wird so herausgeschnitten und die Größe kann durch eine Agarosegelelektrophorese bestimmt werden.

Die Fragmentlängen werden bestimmt, indem man die Größe der erhaltenen Fragmente auf dem Agarosegel im Vergleich zu dem Größenmarker (1 kb Marker) visuell bestimmt und die Fragmentlängen eines Klons addiert.

### **2.2.10.1 Material**

Plasmid – DNA von Punkt 2.2.8

Restriktionsenzyme XhoI und EcoRI (je 10 U/  $\mu$ l; Boehringer, Mannheim)

10x Restriktionsenzym-puffer H (Boehringer, Mannheim)

steriles dH<sub>2</sub>O (Delta Pharma, Pfullingen)

Hierbei werden zu 5  $\mu$ l der extrahierten (siehe Schritt 2.2.8) DNA 3  $\mu$ l des Puffers H, 1  $\mu$ l XhoI, 1  $\mu$ l EcoRI und 20  $\mu$ l steriles Wasser in ein Eppendorfröhrchen pipettiert und inkubiert (bei 37°C für 3 Stunden). Um die Länge des ausgeschnittenen Inserts zu ermitteln, werden 5  $\mu$ l des Ansatzes auf ein 2% (w/v) Agarosegel (mit 2  $\mu$ l Gelladepuffer) geladen (siehe Punkt 2.1.4), zusammen mit dem Größenmarker. Das Gel wird 2 Stunden bei 90 Volt der Elektrophorese unterzogen und anschließend unter UV-Licht begutachtet.

### **2.2.11 Plasmid- Sequenzierung**

Um zu bestimmen, um welches Protein es sich bei dem jeweiligen Insert handelt, oder mit welchem es Ähnlichkeiten aufweist, wird die DNA zunächst sequenziert, unter zu Hilfenahme des Big Dye Terminator Sequenzierungs Kits (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). Die Sequenzierung wurde nach der Didesoxy- Kettenabbruch- Methode (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Sie beruht auf dem Einbau eines 2', 3'-Didesoxynukleotids (ddNTP), so dass die DNA- Polymerase aufgrund der fehlenden OH-Gruppe des ddNTP den neu zu sequenzierenden Strang nicht weiter verlängern kann. Bei dem Big- Dye Terminator Sequenzierkit sind die Desoxynukleotide mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert, die es ermöglichen, die entstehenden PCR- Fragmente in einer anschließenden Gelelektrophorese mittels Laser zu detektieren. Der Reaktionsmix des Kits enthält bereits Taq- Polymerase, Reaktionspuffer und die mit

Farbstoffen markierte Nukleotidmischung. Zur Durchführung der PCR- Reaktion müssen noch Plasmid- DNA und Primer hinzugegeben werden.

### **2.2.11.1 Material**

Plasmid DNA von Punkt 2.2.8

Sequenzierprimer BK und T7 (je 50 pmol/ µl) (ARK Sigma, Darmstadt):

BK 5' CAG GAA ACA GCT ATG ACC TTG A 3'

T7 5' GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C 3'

3M NaOH (Merck, Darmstadt)

100% (v/v) und 70% (v/v) Ethanol (J.T. Baker, Deventer, NL)

ABI- PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaktion Kit

(PE applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

Mineralöl (Sigma, St. Louis, USA)

Hierzu werden zu 3 µl der Insert- DNA 4 µl Big Dye Terminator mix, 1 µl Primer (auf 3,2 pmol verdünnen mit sterilem Wasser), 12 µl steriles Wasser gegeben und mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. In der PCR- Maschine (Biometra, Göttingen) wird die Reaktion 30 Sec. bei 96°C, 15 Sec. bei 50°C und 4 Min. bei 60°C 30 Zyklen lang durchgeführt, und dann auf +4°C gekühlt. 30 µl steriles Wasser werden zu der Reaktion gegeben, so das das Gesamtvolumen nun 50 µl beträgt. Diese werden in ein neues 1,5 ml Eppendorfröhrchen ohne Öl überführt. 120 µl 100% (v/v) Ethanol und 3 µl 3M NaOH werden zugefügt, vermischt und 2 Min. bei RT gefällt. Danach wird die DNA 30 Min. bei 14.000 rpm zentrifugiert (Tischzentrifuge 5402, Eppendorf, Hamburg). Das Pellet wird mit 200 µl 70% (v/v) Ethanol gewaschen und anschließend bei RT getrocknet. Die Sequenzreaktion wird auf ein Polyacrylamid- Sequenzgel aufgetragen und der Elektrophorese unterzogen. Die Sequenzen werden per Computer ausgewertet und mit den Sequenzen in der Datenbank (NCBI, BLAST- Pogramm) verglichen. Eine Sequenz wurde dann als ein Homolog eines bereits bekannten Gens in der Datenbank bestimmt, wenn eine Übereinstimmung der Nukleotidsequenz von gleich oder mehr als 90% vorliegt.

## **2.3 Spezifität und Relevanz der gefundenen Antigene**

### **2.3.1 Screenen der identifizierten Antikörper mit Seren anderer Patientengruppen**

Um festzustellen welche Antigene spezifisch mit Antikörpern in Morbus Hodgkin Seren reagieren, wurden die Klone mit weiteren Hodgkin- Patientenserum inkubiert. Als Referenzgruppe wurden die Seren gesunder Probanden eingesetzt. Um zu überprüfen, ob die Antigene eine relevante Rolle bei Non- Hodgkin- Lymphomen oder bei anderen Tumorerkrankungen spielen wurden die Klone ebenfalls mit Non- Hodgkin- Lymphomen- Seren und Seren anderer Tumorpatienten (vorwiegend Mammakarzinom, aber auch Hoden-, Pankreas-, Magen-, Rektum- und Bronchialkarzinom Patienten) inkubiert.

#### **2.3.1.1 Gewinnung des Patientensserums**

siehe Punkt 2.2.1

#### **2.3.1.2 Absorption der Seren mit E.coli/ Phagen Lysat**

siehe Punkt 2.2.2

#### **2.3.1.3 Ausplattieren der identifizierten Plaques für das Immunoscreening**

Ausplattiert werden jeweils 1µl der unter Punkt 2.2.6 erhaltenen Plaques. Weiteres Vorgehen siehe Punkt 2.2.3

#### **2.3.1.4 Immunfärbung**

siehe Punkt 2.2.4

### **2.3.2 Signifikanztest**

Um festzustellen ob ein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl der Farbreaktionen der Hodgkin-, Tumor- oder NHL- Patienten und der gesunden

Referenzgruppe besteht, muß ein sogenannter Fischer „exakter Test“ (Fischer R.A., 1932) auf die Ergebnisse angewendet werden. Es handelt sich hierbei um einen nicht parametrischen Test mit zwei unabhängigen Stichproben zweiklassiger Merkmale, der speziell für kleine Probenumfänge angewendet werden kann. Der sonst übliche Chi-Quadrat- Test kann wegen der kleinen Probenumfänge hier nicht genutzt werden. Aus dem Einsetzen der Ergebnisse in die folgende Formel ergibt sich beim Fischer- Test dann die Signifikanzwahrscheinlichkeit P. Der P- Wert ist die Wahrscheinlichkeit für eine gegebene (beobachtete) experimentelle Situation. Die Signifikanzwerte wurden per Computer berechnet. Es gilt das die Werte von  $P \leq 1$  bis  $P \geq 0,05$  als nicht signifikant gelten, während die Werte von  $P \leq 0,05$  bis  $P \geq 0,01$  als signifikant bezeichnet werden. P-Werte von kleiner als 0,01 werden hingegen als hoch signifikant eingestuft.

$$P = \frac{(A+B)! (C+D)! (A+C)! (B+D)!}{N! A!B!C!D!}$$

**Abb. 2.3.1:** Formel zur Berechnung der Signifikanzwahrscheinlichkeit P  
(Fischer „exakter Test“)

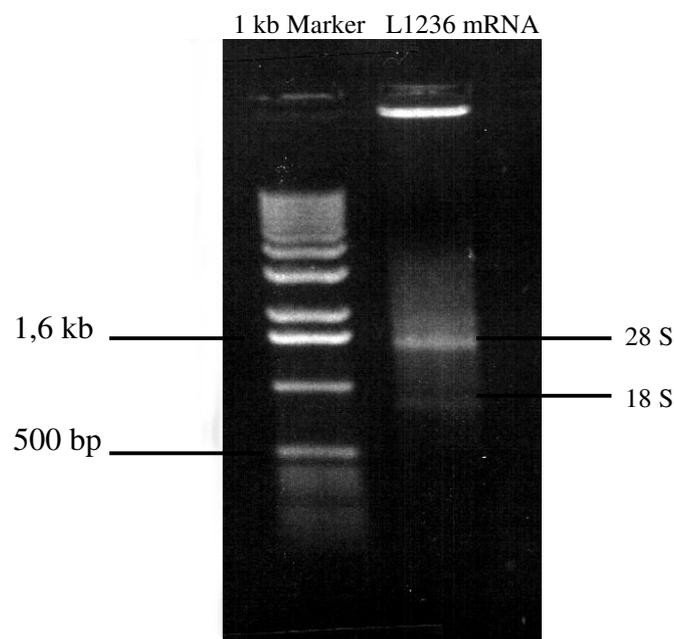
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung der Hodgkin- spezifischen cDNA- Expressionsbank in $\lambda$ - Phagen

##### 3.1.1 Qualität der $\lambda$ - Phagen- Expressionsbank

###### 3.1.1.1 mRNA- Isolierung aus der Zelllinie L1236

Von den 75  $\mu$ l gereinigter mRNA (vergl. 2.1.2), die man aus der  $\mu$ MACS- Säule eluiert werden 5  $\mu$ l auf ein 1% (w/v) Agarosegel aufgetragen, um sicherzustellen, dass keine Degradation vorliegt. Die mRNA ist unter dem UV- Licht als Schmier von 0,5 kb bis 12 kb zu sehen, während leichte Rückstände von 18S rRNA und 20S rRNA als schwache Banden in dem Schmier zu erkennen sind.



**Abb.3.1.1:** Qualitätskontrolle der L1236 mRNA- Präparation. Die mRNA ist als Schmier zwischen ca. 0,5 kb bis ca. 12 kb zu sehen. Die zwei Banden sind Rückstände der 18S und 20S rRNA

Die RNA- Konzentration und Reinheit wurde durch eine photometrische Messung bestimmt (vergl. 2.1.3).

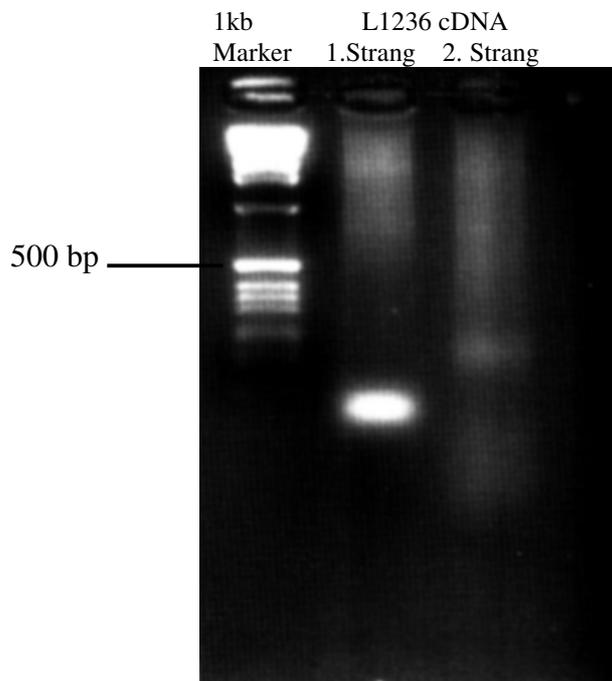
Hier wurden 2 µl der mRNA in 498 µl DEPC H<sub>2</sub>O gemessen.

Probe 1x10 <sup>7</sup> Zellen	Proben- volumen	OD <sub>260</sub>	OD <sub>280</sub>	OD <sub>260</sub> / OD <sub>280</sub>	mRNA µg/ µl	µg mRNA gesamt
	68µl	0,017	0,01	1,7	0,17	11,56

**Tabelle 3.1.1:** Konzentration und Reinheit der L1236 mRNA

### 3.1.1.2 cDNA Synthese

Von den 50 µl der Erststrangsynthese (vergl. 2.1.5) werden 5 µl der Reaktion für eine spätere Qualitätskontrolle entnommen und verwahrt. Nach der Zweitstrangsynthese und dem Blunten der cDNA wird abermals 1 µl (von 9 µl) der Reaktion entnommen und ebenfalls zur Qualitätskontrolle auf einem 1% (w/v) Agarosegel aufgetragen.



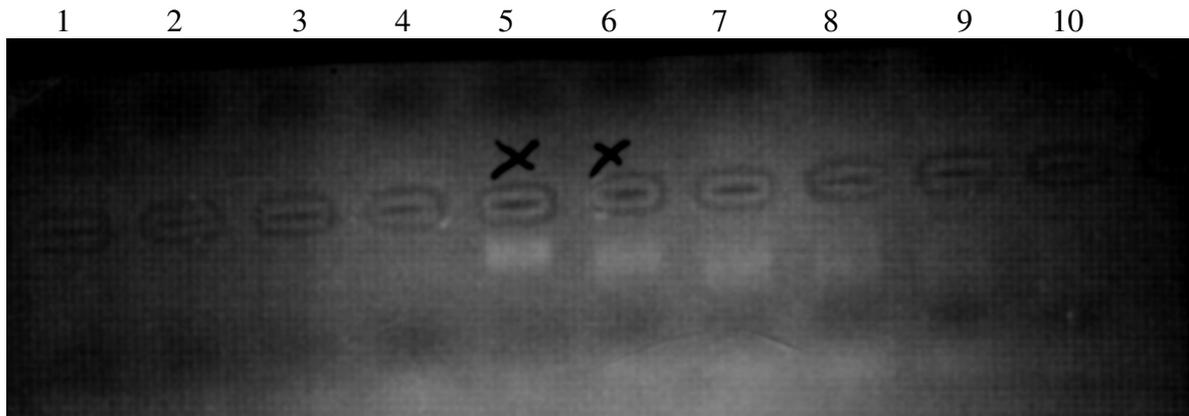
**Abb. 3.1.2 :** Qualitätskontrolle der Erst- und Zweitstrangsynthese der L1236 cDNA  
bei der Erststrangsynthese ist der Linker-Primer Überschuß als dicke  
Bande zu sehen. Die Synthetisierte cDNA erstreckt sich bei Erst- und  
Zweitstrangsynthese von ca. 100 bp bis ca. 12 kb.

### 3.1.1.3 Größenfraktionierung der cDNA in Sepharose- Säulen

Die Größenfraktionierung der mit XhoI verdauten cDNA erfolgt in einem nächsten Schritt (vergl. 2.1.7).

Um die ersten Fraktionen, die DNA enthalten bestimmen zu können, werden von jeder Fraktion 8 µl (jede enthält ca. 100 µl Eluat) auf ein 1% (w/v) Agarosegel aufgetragen.

cDNA Fraktionen:



**Abb.3.1.3 :** cDNA Fraktionen nach Größenfraktionierung durch die Sepharose- Säule  
Fraktionen sind ab Gelbahn 5 zu sehen. Nur die zwei ersten Fraktionen  
werden für die cDNA Bank eingesetzt (siehe Markierung)

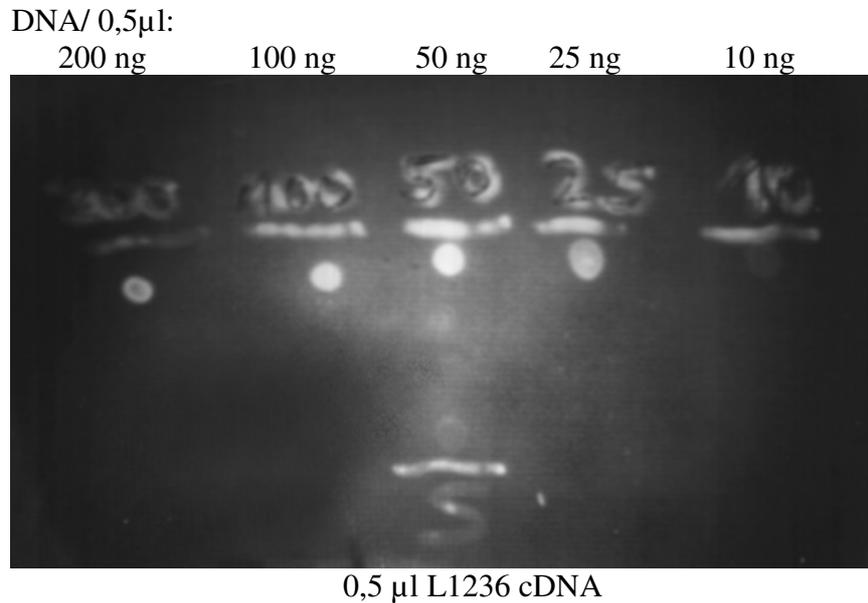
Da in der cDNA Bank möglichst vollständige kodierende Sequenzen exprimiert werden sollen, werden nur die ersten Fraktionen gepoolt und für eine Ligation eingesetzt.

Von den insgesamt 10 Fraktionen wurden hier 2 Fraktionen (Fraktionen 5 und 6, vergl. Abb. 3.1.1.3) gepoolt. Nach der Extraktion und Fällung wird die cDNA in 3,5 µl sterilem Wasser resuspendiert.

### 3.1.1.4 Quantifizierung der cDNA im Ethidiumbromid- Platten- Assay

Je 0,5 µl eine Mengenstandards (Standardreihe von 200 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 10 ng/ 0,5 µl), sowie 0,5 µl cDNA wurden auf ein Ethidiumbromid- Agarosegel aufgetragen

(vergl. 2.1.8). Unter dem UV- Licht kann durch den Vergleich der Fluoreszenzintensität der cDNA- Probe mit der Standardreihe die cDNA Menge bestimmt werden.



**Abb.3.1.4:** Bestimmung der cDNA- Konzentration mit dem Ethidiumbromid- Platten- Assay. Man kann hier die Konzentration der cDNA Verdünnungen im Bezug zur Referenzkonzentration abschätzen

Die cDNA- Konzentration dieser Probe betrug laut Assay ca. 5 ng/ 0,5 µl. Dies ergab eine Gesamtmenge von 30 ng in 3 µl.

### **3.1.1.5 Titerbestimmung der Primärbank mittels Blau- Weiß- Selektion**

Nach der Ligation, bei der cDNA und Phagevektor im Verhältnis von 1:10 eingesetzt wurden (vergl. 2.1.9) folgt die Verpackung der cDNA- Phagenbank in Bakteriophagenpartikel. In diesem Experiment wurden 4 µl der vorangegangenen Ligation verpackt und von der entstandenen Phagenbank wurde der Titer, sowie der Anteil nicht rekombinanter Phagen durch eine Blau- Weiß Selektion bestimmt (vergl.2.1.11).

Die entstandene Primärbibliothek wurde als P III L1236 bezeichnet und konnte wie folgt charakterisiert werden:

pfu/ ml	Recomb./ ml	Nicht Rekomb./ ml	pfu/ ug Vektor	Rekomb./ ug Vektor	Nicht Rek./ ug Vektor
580.000	550.000	30.000	$1,16 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$6 \times 10^4$
		soll	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^5$

**Tabelle 3.1.2:** Parameter Primärbibliothek P III L1236. Die Primär cDNA-Bibliothek erfüllt alle gewünschten Voraussetzungen

Die Verpackungsreaktion ergab deutlich mehr als 50.000 pfu. Die gesamte Primärbibliothek enthält  $5,5 \times 10^5$  rekombinante und  $3 \times 10^4$  nicht rekombinante Plaques pro ml. Dies ergab 18,3fach mehr Phagen mit als ohne Insert. Der Anteil nicht rekombinanter Phagen an der Gesamt- Primärbibliothek beträgt 5,17 %.

### 3.1.1.6 Amplifizierung der Primärbank

Um eine stabile Bibliothek zu etablieren, müssen die Klone der Primärbibliothek nochmals vermehrt werden (vergl. 2.1.12). Dies erfolgt in einer sogenannten Amplifizierungsreaktion. Um die Qualität der amplifizierten Bibliothek zu evaluieren, wurde eine Titerbestimmung mit Blau- Weiß Selektion vorgenommen (vergl.2.1.11). Nach der Amplifizierung sollte der Titer bei  $10^9 - 10^{11}$  pfu /ml liegen, wobei 10 – 100 mal mehr Rekombinante als nicht Rekombinante enthalten sein sollten. Der Anteil nicht rekombinanter Phagen an der Gesamt- Bibliothek beträgt 4,69%.

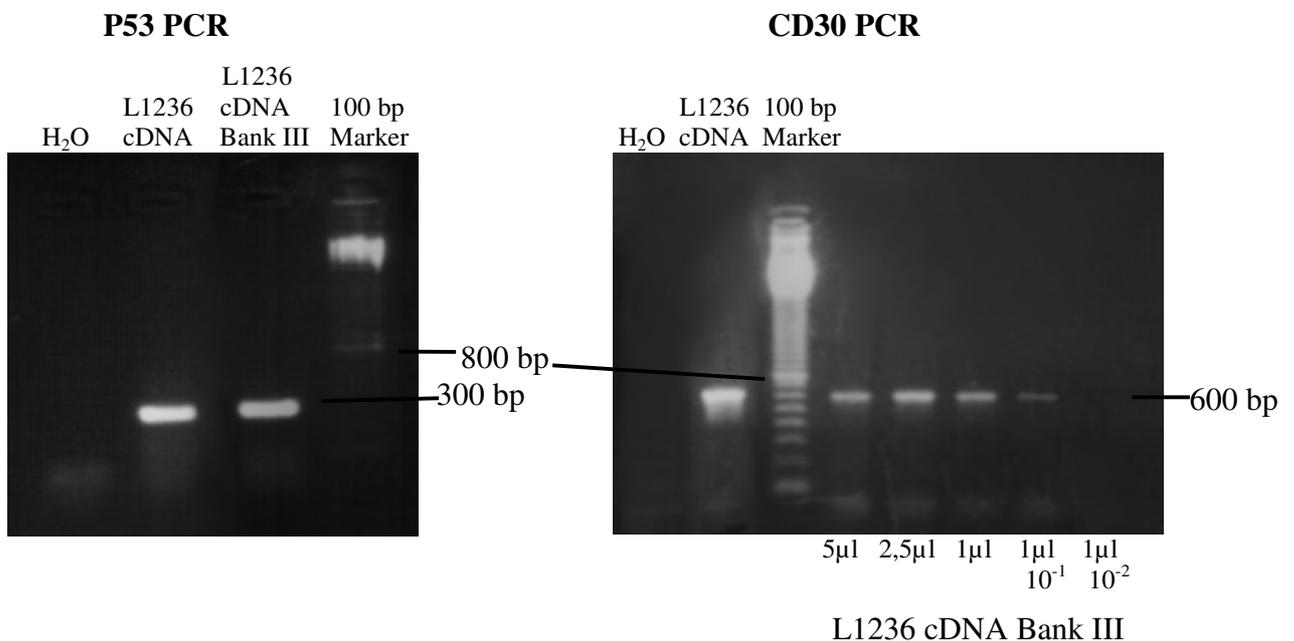
pfu/ ml	Rekomb./ ml	Nicht Rekomb./ ml
$3,2 \times 10^{10}$	$2,98 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^9$

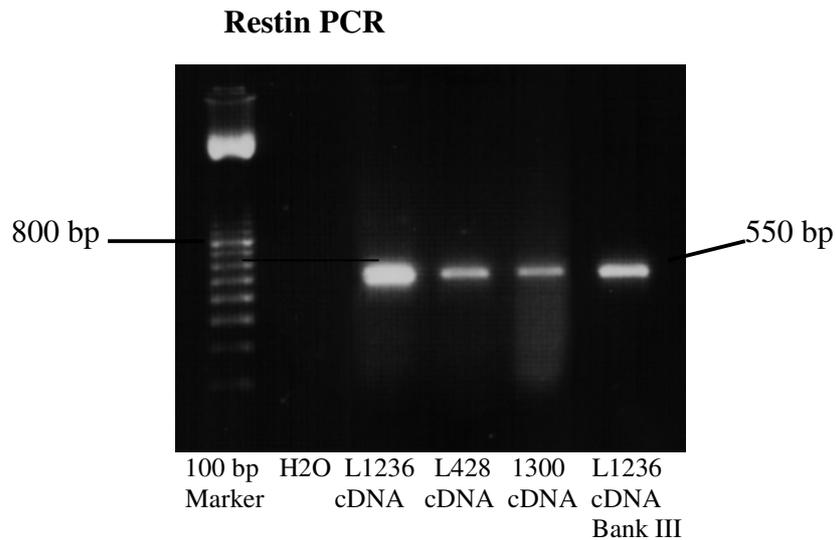
**Tabelle 3.1.3:** Parameter der amplifizierten Bibliothek III L1236. Diese Bibliothek erfüllt alle der gewünschten Qualitäts- Anforderungen

### 3.1.2 Diversität und Komplexität der cDNA- Bank

#### 3.1.2.1 Testen der Diversität der cDNA- Bank mittels PCR

Um die Diversität der Bank zu testen wird eine PCR vorgenommen mit Oligonukleotiden von Genen, deren Vorkommen in der L1236 als gesichert gilt (vergl. 2.1.13). Die Wahl fiel auf das housekeeping Gen p53 und zwei Hodgkin Reed- Sternberg spezifische Gene CD30 und Restin. Die Oligonukleotide wurden alle so gewählt, das eine cDNA Sequenz gegen 3' Ende der kodierenden Sequenz amplifiziert werden kann (vergl. 2.1.13.1). Es werden folgende PCR- Produkte erwartet und auch beobachtet: 600 bp (CD30), 350 bp (p53) und 550 bp (Restin). Um abschätzen zu können, in welcher Verdünnung die CD30 Gene noch in UV- Licht detektierbar vorliegen wird die PCR ebenfalls mit einer Verdünnungsreihe (5 µl; 2,5 µl; 1 µl; 1/10 µl; 1/20 µl) vorgenommen. Man sieht anhand der PCR, das allgemein exprimierte wie auch Hodgkin- spezifische Gene in dieser cDNA Bank repräsentiert werden und das das CD30 Gene noch in der 1: 10 Verdünnung (3 x 10<sup>6</sup> pfu) unter dem UV- Licht nachzuweisen ist.

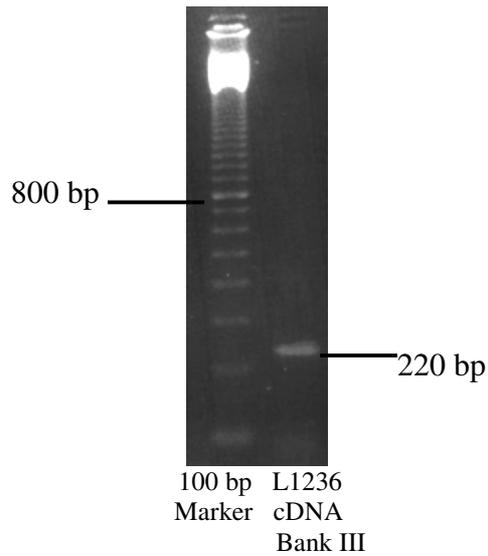




**Abb.3.1.5:** p53, CD30 und Restin- PCR zur Überprüfung der Diversität der III L1236 cDNA Bank. Allgemein exprimierte (z.B. p53) und auch Hodgkin-spezifische Gensequenzen können in der cDNA Bank nachgewiesen werden

### 3.1.2.2 Nachweis der Expression vollständiger kodierender Sequenzen

Um sicherzustellen, dass die Insertgrößen der fertiggestellten Bank ausreichen, um vollständige Längen (von Exon 1 an) kodierender Sequenzen zu repräsentieren, wurde eine PCR vorgenommen in der CD30 aus der III L1236 cDNA Bank heraus amplifiziert wurde (vergl. 2.1.13). Das Oligonukleotidpaar wurden so gewählt, das es das 3' Ende der CD30 kodierenden cDNA Sequenz dokumentieren kann (vergl. 2.1.13.1). Es wird ein 220bp großes Produkte erwartet. Nach der erfolgreichen PCR wird das Produkt aufgereinigt und sequenziert. Das PCR- Produkt wurde in der Folge mit den PCR-Oligonukleotiden sequenziert, um die Sequenz des Produktes zu überprüfen (vergl. 2.1.13 und 2.2.10).



**Abb. 3.1.6:** CD30 PCR der III L1236 cDNA Bank. Man erkennt das gewünschte PCR-Produkt von 220 bp

1780/520

ATG AAG GCT GAC ACC GTG ATC GTG GGG ACC GTG AAG GCT GAG CTG CCG GAG GGC  
M K A D T V I V G T V K A E L P E G

1834/538

CGG GGC CTG GCG GGG CCA GCA GAG CCC GAG TTG GAG GAG GAG CTG GAG GCG GAC  
R G L A G P A E P E L E E E L E A D

1888/556

CAT ACC CCC CAC TAC CCC GAG CAG GAG ACA GAA CCG CCT CTG GGC AGC TGC AGC  
H T P H Y P E Q E T E P P L G S C S

1942/574

GAT GTC ATG CTC TCA GTG GAA GAG GAA GGG AAA GAA GAC CCC TTG CCC ACA GCT  
D V M L S V E E E G K E D P L P T A

1996/592

2008/596

GCC TCT GGA AAG TGA

A S G K \*

**Abb. 3.1.7:** CD30 Nukleotid- und Aminosäuresequenz (GenBank Accession Nr M83554). Das Stop- Codon ist mit einem Stern markiert. Die in der cDNA- Bank gefundene Sequenz entspricht der Sequenz, die in der Gen-Datenbank zu finden ist.

## **3.2 Screening der Hodgkin- spezifischen cDNA Expressionsbank mit Human- Serum ( SEREX )**

### **3.2.1 Screeningschritte**

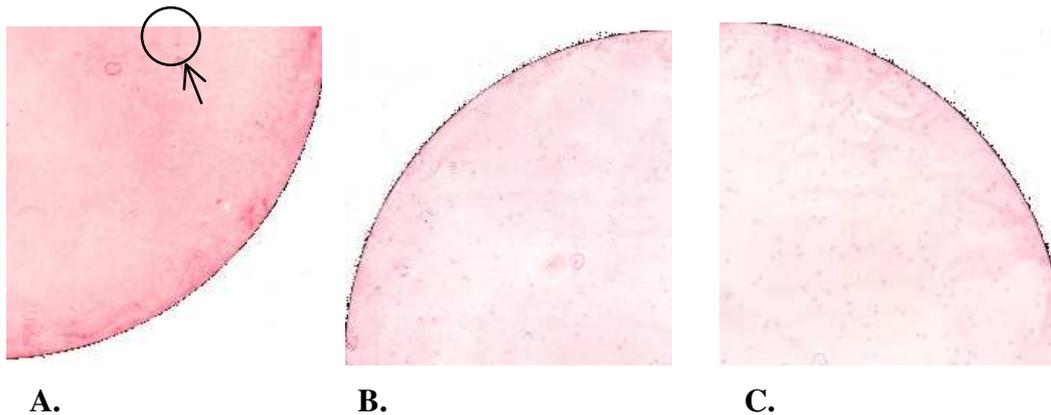
Vor dem Screening werden die zu verwendenden Seren mit E.coli/ Phagenlysat behandelten Filtern inkubiert (vergl. 2.2.2). Dieser Schritt wird durchgeführt, um bei der späteren Inkubation der cDNA- Bank tragenden Filter mit den Seren eine falsch positive Reaktion gegen E.coli oder Phagen DNA zu vermeiden.

In einem ersten Screening werden jeweils 10 Filter mit je  $6 \times 10^4$  Plaques auf das Vorliegen positiver Serumreaktionen getestet. Um zu bestätigen, dass tatsächlich eine Serumreaktion gegen ein von den Phagen gebildetes Fusionsprotein vorliegt, werden die gepickten, positiven Plaques erneut ausplattiert und mit dem selben Humanserum gescreent. Aufgrund der hohen Plaquedichte beim ersten Screening werden mit den positiven Plaques auch weitere, nicht positive Plaques aus der näheren Umgebung mit ausgestochen und bei der weiteren Subklonierung mit ausgestrichen (vergl. 2.2.3- 2.2.6).

Für das zweite Screening werden etwa ein Drittel der Phagenzahl des ersten Screenings eingesetzt (ca. 20.000 pfu/ Filter), um eine geringere Plaquedichte zu erreichen und somit das Picken positiver, isoliert liegender Plaques zu erleichtern. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine deutlich höhere Anzahl positiver Plaques vorliegt. Von den Platten des zweiten Screenings wurden 1- 3 positive Plaques aus dem Agar gestochen und aufgereinigt.

Wegen der geringeren Plaquedichte wurden mit jedem Plaque nur 1- 2 weitere nicht positive Plaques ausgestochen.

Diese wiederum positiven Plaques werden in einem dritten Screening in einer noch geringeren Dichte ausplattiert (ca. 500 Plaques). Die positiven Plaques lassen sich nun deutlich von den wenigen negativen Plaques abgrenzen und so werden auch nur ein bis zwei Plaques pro Platte gepickt und aufgereinigt.



**Abb.3.2.1:** Screening der Hodgkin-spezifischen cDNA Expressionsbank III L1236 mit Humanserum, zur Detektion reaktiver Plaques

A. 1. Screening: 60.000 Plaques/ Filter. Der positive Klon ist mit einem Pfeil markiert

B. 2. Screening: 20.000 Plaques/ Filter. Ausgestrichen wurde Klon 1/1. Positive Farbreaktionen sind vermehrt zu erkennen.

C. 3. Screening: 500 Plaques/ Filter. Es sind nur noch positive Farbreaktionen zu sehen

### 3.2.2 Auswahl der Patientenserum

Für das primäre Screening und die darauffolgenden bestätigenden und aufreinigenden Screeningschritte wurden die in der Tabelle 3.2.1 dargestellten Seren verschiedener Hodgkinpatienten eingesetzt (vergl. 2.2.3- 2.2.6). Es wurden 8 Patienten im Stadium II, 6 Patienten im Stadium III und ein Patient im Stadium IV (Einteilung nach der Cotsworth Modifikation der Ann Arbor Klassifizierung; A= ohne Nachtschweiß, Fieber und Gewichtsverlust, B= mit Nachtschweiß, Fieber und Gewichtsverlust) rekrutiert. Von dieser Population waren 10 Patienten männlich und 5 weiblich. Ein Patient war zum Zeitpunkt der Blutentnahme jünger als 25 Jahre, sieben befanden sich im Alter zwischen 25 und 35 Jahren, vier Patienten waren im Alter zwischen 45 und 55 Jahren und drei Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme im Alter zwischen 55 und 65 Jahren. Die Auswahl der Patienten stellt ein repräsentatives Hodgkin- Patientenkollektiv dar (Burke JS, 1992; Harris NL et al., 1994).

Um ein möglichst breites Spektrum an Antikörpern im Serum zu gewährleisten, wurden sowohl Patienten mit fortgeschrittenen Stadien als auch Patienten mit frühen Stadien des

Morbus Hodgkin ausgewählt (im Verhältnis von ca. 1:1). Die Mehrzahl der gewählten Patienten befand sich noch vor einer Therapie.

Patienten-Nr.	HD-Stadium	Histologie (Subtyp)	Zeitpunkt i.d. Therapie	Geburtsjahr des Patienten	Geschlecht
1576	II A	NS	vor 3. Zyklus	'67	m
1577	II B	NS	im 1. Zyklus	'69	m
1580	IV A	NS	vor Therapie	'72	m
1594	IIB+MT	MC	vor Therapie	'69	m
1595	III B	NS	im 1. Zyklus	'53	w
1597	II B	NS	vor Therapie	'43	m
1601	II B	NS	vor Therapie	'49	w
1632	II B	NS	vor 2. Zyklus	'46	m
1647	III A	NS	vor Therapie	'79	w
1649	III A	NS	im 1. Zyklus	'71	w
1690	II B	MC	vor Therapie	'67	m
1743	II A	NS	vor Therapie	'68	m
1744	III B	MC	vor Therapie	'40	w
1745	III B	MC	vor Therapie	'37	m
1753	III A	MC	im 1. Zyklus	'54	m

**Tabelle 3.2.1:** Zusammenfassung der zum Screenen verwendeten Patientendaten

HD- Seren; m = männlich, w = weiblich, MT = Medastinaltumor,  
 NS = Nodulär sklerotisiert, MC = Gemischtzellig (mixed cellularity)  
 Überblick über Alter, Geschlecht, Therapiegeschichte und Hodgkin-  
 Stadium und Subtyp

### 3.3 Analyse des Inserts positiver Klone des 3. Screenings

#### 3.3.1 Exzision

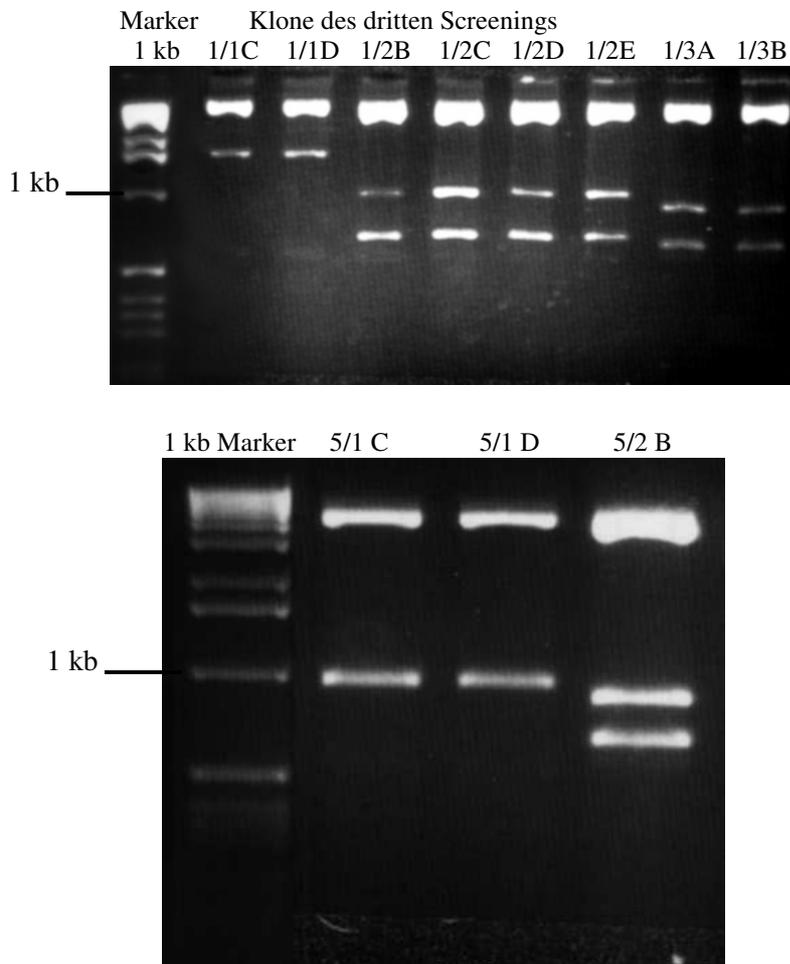
Nach jeder Plattierung der L1236 cDNA Expressionsbank III (10 Platten pro Plattierung mit je  $6 \times 10^4$  Plaques) wurden die positiven Plaques mit der Nummer der Plattierung und nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung nummeriert. So erhielt beispielsweise der erste entnommene Plaque der ersten Platte die Nummerierung 1/1 (vergl. 2.2.5.2). Die Nummerierung der Plaques und später der Klone stammen von der ersten Plattierung und wird für alle weiteren Untersuchungen beibehalten.

Die nummerierten Plaques, die sich nach dem ersten Screening nicht wieder als positiv erwiesen haben wurden verworfen und werden unten nicht aufgeführt. Es wurden nur Exzisionen der beim dritten Screening positiven Klone vorgenommen (vergl. 2.2.7):

Plattierung	1	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	19
Klon Nr.	1/1	5/1	6/3	7/1	8/1	9/1	10/6	11/1	12/3	13/1	14/1	15/1	16/1	17/1	19/1
	1/2	5/2	6/4		8/2	9/2	10/7			13/2		15/2			19/2
	1/3				8/3		10/8								19/3
					8/4		10/9								
					8/5		10/11								
							10/13								
							10/14								
							10/15								
							10/16								

**Tabelle 3.3.1:** Dargestellt sind nur die Klone, die im dritten Plaquiring Schritt positiv waren. Die Nummerierung der Plaques stammt vom ersten Screening-Schritt und bezeichnet den Klon mit der Platten- Nummer und der Plaque- Nummer.

Nach Plasmidpräparation und EcoRI/ XhoI Verdau wurden die Insertgrößen in einem 1% (w/v) Agarosegel analysiert (vergl. 2.2.8, 2.2.10).



**Abb.3.3.1:** Beispiel: Inserts der positiven Klone des 3. Screenings die mittels XhoI/ EcoRI Verdau aus dem Phagen- Vektor geschnitten wurden. Die Inserts liegen bei diesen Klonen im Bereich von 2 kb- 500 bp. Die Buchstaben bezeichnen die Plaques, die nach der dritten Plattierung gepickt wurden. Es ist zu erkennen, das die Plaques derselben Platte auch dieselbe Insertgröße besitzen, es sich also um einen reinen Klon handelt.

Bei dem folgenden Restriktionsverdau mit den Enzymen EcoRI und XhoI, werden die Inserts der beim dritten Screening positiven Klone (1- 4 Plaques pro Klon wurden jeweils mit den Enzymen geschnitten, gekennzeichnet durch A, B, und so weiter) aus ihrem pBlueskript Vektor geschnitten (vergl. 2.2.8, 2.2.10). Es zeigt sich nach dem

Durchführen der Agarosegelelektrophorese, das jeder der getesteten Plaques der folgenden Klone 1/1, 1/2, 1/3, 5/1 und 5/2 jeweils die gleiche Höhe der Fragmente aufweisen. Die Insert-Fragmentlänge von Klon 1/1 beträgt ca. 1,8 kb, die von Klon 1/2 ca. 1,7 kb, die von Klon 1/3 ca. 1,4 kb, die von Klon 5/1 ca.1 kb und die Insert-Fragmentlänge von Klon 5/2 beträgt ca. 1,5 kb. Die Fragmentlängen werden anhand des verwendeten Größenmarkers (1 kb Marker) bestimmt (vergl. Abb. 3.3.1 und Punkt 2.1.4.2). Um die Klone genauer zu untersuchen, wurden Sequenzierungen der Inserts durchgeführt. Sequenziert wurde jeweils ein Klon von den Klonen 1/1, 1/2, 1/3, 5/1 und 5/2 wegen der übereinstimmenden Ergebnisse der Restriktionsanalyse. Mit den anderen Klonen wurde ebenfalls wie oben beschrieben verfahren. Die erhaltenen Restriktionsfragmente werden in der Tabelle 3.3.2 zusammengefasst. Die übrigen PCR-Bilder der Restriktionsenzymanalyse der Klone sind im Anhang (Punkt 6.2, Abb. 6.2.1 bis Abb.6.2.8) zu sehen.

Klon Nr.	1/1	1/2	1/3	5/1	5/2	6/3	6/4	7/1	8/1
Fragmentlänge	1,8 kb	1,7 kb	1,4 kb	1 kb	1,5 kb	1,9 kb	1,6 kb	5,5 kb	1,5kb

Klon Nr.	8/2	8/3	8/4	8/5	9/1	9/2	10/6	10/7	10/8
Fragmentlänge	3,4 kb	2,4 kb	2,1 kb	1,65 kb	2 kb	1,9 kb	5 kb	1,7 kb	3,3 kb

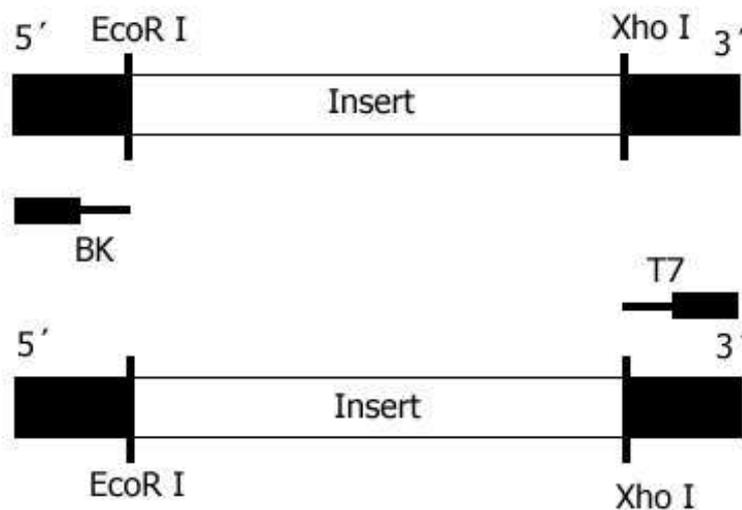
Klon Nr.	10/9	10/11	10/13	10/14	10/15	10/16	11/1	12/3	13/1
Fragmentlänge	1,2 kb	1,8 kb	1,9 kb	2,5 kb	1 kb	800 bp	1 kb	900 bp	900 bp

Klon Nr.	13/2	14/1	15/1	15/2	16/1	17/1	19/1	19/2	19/3
Fragmentlänge	950 bp	4 kb	900 bp	1,5 kb	1,4 kb	1,2 kb	1 kb	900 bp	850 bp

**Tabelle 3.3.2:** Insertgrößen der Klone nach XhoI/ EcoRI Verdau. Die jeweils 1- 4 getesteten Plaques pro Klon wiesen jeweils dieselben Insertlängen auf. Die verschiedenen Insertlängen betragen von 800 bp bis 5,5 bp.

### 3.3.2 Sequenzierung der Inserts mit BK und T7 Oligonukleotiden

Das BK Oligonukleotid legt sich 109 bp 5' der EcoRI Schnittstelle, das T7 oligonukleotid 95 bp 3' der XhoI Konsensus Sequenz an. Es werden das Insert, sowie kurze Stücke der Vektor DNA sequenziert (vergl. 2.2.11). Es wurden NCBI-Datenbankabfragen (BLAST) mit der Nukleotidsequenz durchgeführt, um Homologien zu bereits bekannten Genen zu ermitteln.



**Abb. 3.3.2:** Schematische Darstellung der Sequenzierung der aus der cDNA- Bank isolierten Insertsequenzen, mit den Oligonukleotid Ansatzstellen.

In der nachfolgenden Tabelle 3.3.3 werden alle sequenzierten Klone dargestellt. Es wurde pro Klon jeweils ein Plaque sequenziert und die Sequenzen sind je nach Sequenzhomologie in der nachfolgenden Tabelle eingeteilt. Alle gefundenen Sequenzen waren im richtigen Leserahmen und richtiger Orientierung. Die Referenzen zu den gefundenen Sequenzen befinden sich im Anhang unter Punkt 6.3.

<b>Klon Nr.</b>	<b>bp lesbar sequenziert</b>	<b>% Homologie</b>	<b>Bezeichnung der Humanen Sequenz</b>	<b>Gen Bank Accession No.</b>
1/1	800 von 1,8 kb	99	Ran-Bindungsprotein2 (Ran BP2)	D42063
1/2	770 von 1,7 kb	95	Jκ -Rekombinations Signal Bindungs- protein1 (RBP-Jκ)	L07872
1/3	800 von 1,4 kb	94		
5/1	660 bp von 1 kb	93		
9/2	800 von 1,8 kb	90		
10/6	600 von 5 kb	90		
13/1	800 von 900 bp	93		
17/1	900 von 1,2 kb	96		
5/2	800 von 1,5 kb	97	Sequenz von Klon DKFZp564C2063	AL117595
6/3	600 von 1,9 kb	94	Nukleäres Antigen No.55	XM036469
9/1	600 von 2 kb	95		
6/4	950 von 1,6 kb	97	cobW- ähnliches Protein	AF2557330
7/1	430 von 5,5 kb	99	Retinoblastoma Bindungsprotein 1 (RBP1) Isoform II	S57160
8/1	950 von 1,5 kb	98	Klon RP1- 144C9	AL096774
8/4	700 von 2,1 kb	90		
8/2	950 von 3,4 kb	99	Transkriptions – Aktivator hbrm	X72889
8/3	900 von 2,4 kb	95		
8/5	950 von 1,6 kb	100	Cytoplasmatischer Linker (CYN2)	NM003388
10/7	950 von 1,7 kb	94	Globaler Transkriptions- Aktivator SNF2	D26155
10/16	800 von 800 bp	97		

Klon Nr.	bp lesbar sequenziert	% Homologie	Bezeichnung der Humanen Sequenz	Gen Bank Accession No.
10/8	800 von 3,3 kb	96	Adenosin Mono- phosphat Deaminase 2 (AMPD2)	AK025706
10/9	800 von 1,2 kb	94	AMPD2 Isoform L	U16272
10/11	800 von 1,8 kb	96	HIRA interagierendes Protein 4	XM007963
10/13	800 von 1,9 kb	94	Antigen NY-CO-1	AF039687
10/14	400 von 2,5 kb	90	Klon RP4-670F13	AL134105
10/15	400 von 1 kb	100	Inorganische Pyrophosphatase	AF119665
11/1	900 von 1 kb	100	Klon RP11432N13	AL391380
13/2	600 von 950 bp	98		
19/1	800 von 1 kb	90		
19/2	900 von 900 bp	90		
19/3	600 von 850 bp	90		
12/3	900 von 900 bp	99	Mitochondriale Sequenz	AF346999
14/1	900 von 4 kb	90	Klon KIAA0663	AB014563
15/1	950 von 900 bp	99	Nukleäres Protein p40	U86602
15/2	950 von 1,5 kb	98	Minichromosom Maintenance deficient (MCM5)	D83986
16/1	900 von 1,4 kb	99	Rabaptin- 4	AF098638

**Tabelle 3.3.3:** Zusammenfassung der bei der Gen Datenbank Abfrage erhaltenen Sequenzhomologien. Die Klone sind nach der jeweils gefundenen Human-Sequenzhomologie eingeteilt.

Die Suche nach Sequenzhomologien in der NCBI- Datenbank (BLAST- Programm) hat ergeben, dass der Hauptanteil der gefundenen Proteine (12 von 21) nukleäre Proteine sind, die ihre Funktion in der Transkription (AMPD2, HIRA interagierendes Protein 4, hbrm, SNF2), DNA- Synthese (Pyrophosphatase), Zell Zyklus Regulation (RBP1, Antigen No.55, p40, MUCM5, NY-CO-1), Gen- Rekombination (RBP- Jκ) oder dem Austausch von Proteinen und Nukleotiden zwischen Zellkern und Zytoplasma (Ran BP2) besitzen. Ungefähr ein Viertel der identifizierten Proteine spielen im Zytoplasma eine Rolle, entweder im Zellstoffwechsel (cobW, RP4-670F13), im Mitochondrion (Mitochondrale Sequenz), oder im Zelltransport (CYN2, Rabaptin- 4). Vier der gefundenen Antigensequenzen zeigen Homologien zu Proteinen, deren Sequenz bekannt ist, aber deren Funktion noch erforscht wird (DKFZp564C2063, ,RP1- 144C9, KIAA0663, RP11432N13). Die niedrigeren Homologie- Prozentsätze von um die 90 % treten auf, wegen der teilweise schlechteren Lesbarkeit der Sequenzen, die durch das Sequenzierungsprogramm und den Vorgang der Sequenzierung ausgelöst werden.

### **3.3.3 Spezifität der gefundenen Antigene**

Um festzustellen ob auch andere Patienten Antikörper gegen die gefundenen Antigene der Hodgkin Reed- Sternberg- Zellen bilden, wurden die Klone mit weiteren Hodgkin- Patientenserum inkubiert. Als Referenzgruppe wurden die Seren gesunder Probanden eingesetzt. Es ist an dieser Stelle auch von Interesse zu überprüfen, ob die Antigene auch eine positive Serumreaktion bei Non- Hodgkin- Lymphomen Patienten oder bei einer Auswahl von Patientenserum von Tumorerkrankungen hervorrufen. Zu diesem Zweck werden die Klone ebenfalls gegen Non- Hodgkin- Lymphomen- Seren und Seren verschiedener Tumorpatienten (vorwiegend Mammakarzinom, aber auch Hoden-, Pankreas-, Magen-, Rektum- und Bronchialkarzinom Patienten) getestet (vergl. 2.3.1).

	Altersbereich der Probanden	Geschlechterverhältnis (m:w)
Hodgkin Patienten	21 - 65	2:1
Gesunde Probanden	25 - 40	1:1
NHL- Patienten	50 - 75	2:1
Andere Tumorpatienten (Mamma-, Hoden-, Pankreas-, Magen-, Rektum- und Bronchialkarzinome)	35 - 80	1:1

**Tabelle 3.3.4:** Vergleich der Altersbereiche und der Geschlechterverhältnisse der einzelnen Patientengruppen mit der der rekrutierten Hodgkin Patienten (m = männlich, w = weiblich)

Die ersten 5 gefunden unterschiedlichen Antigene wurden in einem ersten Screeningvorgang zusammen gegen die oben aufgeführten Referenzgruppen getestet, um zu erkunden, in welchem Bereich die Reaktivität dieser Antigene bei den anderen Seren liegt. Aufgrund dieser Ergebnisse soll festgelegt werden, ab wann es sinnvoll ist die Antigene mit der ganzen vorhandenen Auswahl an Seren der Referenzgruppen zu inkubieren und ab wann schon nach der Inkubation mit nur den gesunden Probanden eine Aussage über die Relevanz der Antigene gemacht werden kann. Wenn nämlich viele der gesunden Probanden mit einer positiven Antikörper- Reaktion auf die Antigene reagieren, ist die Wahrscheinlichkeit gering, das diese für die Lymphom- und Tumorguppen relevante Ergebnisse zeigen.

In der Tabelle 3.3.5 wird die Zahl der beim Screenen erhaltenen positiven Reaktionen gegenüber der Gesamtzahl der eingesetzten Seren dargestellt.

Klon	Anzahl reaktiver Seren / Anzahl getesteter Seren			
	Gesunde Probanden	Tumor-Patienten	NHL – Patienten	Hodgkin-Patienten
RanBP2	4/14	8/8	5/7	11/14
RBP-Jκ	4/12	7/8	5/7	10/13
Klon p564C2063	6/10	6/8	4/7	6/10
RBP1	8/10	7/8	5/7	7/10
cobW-ähnliches Protein	1/12	10/12	8/12	8/12

**Tabelle 3.3.5:** Zahl der positiven Reaktionen gegenüber der Gesamtzahl der eingesetzten Seren bei den ersten fünf identifizierten Antigenen

Dieser erste Versuch zeigte, dass zum Teil auch eine hohe Anzahl positiver Reaktionen der gesunden Referenzgruppe vorliegen. Nach diesen Ergebnissen wurde festgelegt, dass die Antigene zuerst gegen 12 gesunde Probanden- Seren getestet werden. Sollte sich hierbei eine Reaktivität der Antigene von weniger oder gleich 1/3 (4 von 12 Seren positiv) der getesteten Seren ergeben, werden diese betroffenen Klone auch noch mit den 12 Hodgkin- Seren, 12 NHL- Seren und 12 Seren anderer Tumorpatienten inkubiert. Diese Auswahl wurde getroffen, da es unwahrscheinlich ist, dass wenn es bei gesunden Probanden zu einem hohen Anteil an positiven Serumreaktionen kommt, es zu einem signifikanten Ergebnis bei den Patientengruppen kommen kann. Aufgrund der Verfügbarkeit an Patientenserum zu diesem Testzeitpunkt wurden zwölf Seren bei den jeweiligen Testgruppen eingesetzt (detaillierte Testergebnisse siehe Tabelle 6.1 bis 6.10 unter Punkt 6.4 im Anhang).

Die Ergebnisse der übrigen Antigene bei diesem Screeningverfahren werden in der Tabelle 3.3.6 dargestellt.

Klon	Anzahl reaktiver Seren / Anzahl getesteter Seren			
	Gesunde Probanden	Tumor-Patienten	NHL – Patienten	Hodgkin-Patienten
Klon RP1-144C9	8/12			
hbrm	6/12			
Klon RP11432N13	10/12			
CYN2	5/12			
Inorganische Pyrophosphatase	10/12			
hSNF2a	7/12			
Mitochondriale Sequenz	6/12			
NY-CO-1	3/12	12/12	9/12	7/12
AMP Deaminase	4/12	9/12	9/12	9/12
HIRA interag. Protein 4	8/12			
Antigen No.55	4/12	11/12	8/12	7/12
Klon RP4-670F13	4/12	12/12	9/12	4/12
Klon KIAA0663	6/12			
p40	12/12			
MCM5	10/12			
Rabaptin- 4	7/12			

**Tabelle 3.3.6:** Zahl der positiven Reaktionen gegenüber der Gesamtzahl der eingesetzten Seren der restlichen gefundenen Antigene (Details siehe Anhang). Vergleich mit Tabelle 3.3.5

### 3.3.4 Statistische Auswertung

Um festzustellen ob ein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl der Farbreaktionen der Hodgkin-, Tumor- oder NHL- Patienten und der gesunden Referenzgruppe besteht, wird hier der Fischer „exakter Test“ (Fischer R.A., 1932) auf die Ergebnisse angewendet (vergl. 2.3.2). Das Ergebnis des Fischer- Tests ist die Signifikanzwahrscheinlichkeit P. Die errechneten Signifikanzwerte wurden in der Tabelle 3.3.7 zusammengefasst. Es gilt das die Werte von P kleiner gleich 1 bis P größer gleich 0,05 als nicht signifikant gelten, während die Werte von P kleiner gleich 0,05 bis P größer gleich 0,01 als signifikant bezeichnet werden. P- Werte von kleiner als 0,01 werden hingegen als hoch signifikant eingestuft.

Klon	Hodgkin- Patienten		NHL- Patienten		Tumor Patienten	
	Signifikanzwert P	reaktive Seren/ getestete Seren	Signifikanzwert P	reaktive Seren/ getestete Seren	Signifikanzwert P	reaktive Seren/ getestete Seren
RanBP2	P= 0,02	11/14	P= 0,76	5/7	P= 0,22	8/8
RBP-Jκ	P= 0,047	10/13	P= 0,76	5/7	P= 0,417	7/8
cobW- ähnliches Protein	P= 0,009	8/12	P= 0,009	8/12	P= 0,0006	10/12
NY-CO-1	P= 0,213	7/12	P= 0,039	9/12	P= 0,00033	12/12
Antigen No.55	P= 0,413	7/12	P= 0,22	8/12	P= 0,009	11/12
Klon RP4-670F13	P= 1	4/12	P= 0,099	9/12	P= 0,0013	12/12
AMP Deaminase	P= 0,099	9/12	P= 0,099	9/12	P= 0,099	9/12

**Tabelle 3.3.7:** Berechnete Signifikanzwerte P für die Antigene in den ausgewählten Patientengruppen (Signifikante Werte werden in Grün, hoch signifikante Werte in Pink dargestellt). Zum direkten Vergleich mit den Daten der Tabelle 3.3.6 und 3.3.5 sind ebenfalls die Anzahl positiver Serumreaktionen im Verhältnis zur Anzahl getesteter Seren angegeben.

Die Antigene RanBP2 und RBP-Jκ zeigen bei dem Fischer Test eine signifikante Reaktivität beim Morbus Hodgkin, während bei dem cobW ähnlichen Protein sogar ein hoch signifikantes Ergebnis erzielt wird. Die NHL- Patientenseren weisen gegen die Antigene NY-CO-1 und die des cobW ähnlichen Proteins (hoch signifikanter Wert) eine besondere Reaktivität auf. Bei den Patienten anderer Tumorerkrankungen zeigen die Seren sogar gegen vier Antigene eine hoch signifikante Reaktivität, nämlich das cobW ähnliche Protein, NY-CO-1, das nukleäre Antigen No.55 und den Klon RP4-670F13. Während das cobW ähnliche Protein eher nicht krankheitsspezifisch zu sein scheint, zeigen die Antigene RanBP2 und RBP-Jκ eine eher Hodgkin- spezifische Reaktivität.

## 4. Diskussion

Die Immuntherapie maligner Erkrankungen gewinnt aufgrund der teilweise begrenzten Wirksamkeit, sowie des hohen Nebenwirkungspotentials konventioneller Behandlungsmethoden immer mehr an Bedeutung. Dabei werden verschiedene Strategien verfolgt, die sich zum Großteil noch in der präklinischen Phase oder klinischen Phase I und II befinden. Therapien mit Tumorimpfstoffen oder mit Antigen- beladenen dendritischen Zellen zielen auf eine Aktivierung des patienteneigenen Immunsystems, welche sich zunächst in einer spezifischen Reaktion gegen die Tumorantigene richtet. Durch Zerstörung der Tumorzellen werden weitere Antigene frei, die in der Folge von antigenpräsentierenden Zellen exprimiert und so ebenfalls dem Immunsystem zugänglich gemacht werden (Rosenberg, 1999).

Auch die Therapie mit bispezifischen Antikörpern beinhaltet die Aktivierung des Immunsystems. Dies geschieht durch die Vernetzung Tumor- assoziierter Antigene mit zytotoxischen Effektorzellen wie T- Zellen, Makrophagen oder NK- Zellen. Andere Therapieformen nutzen tumorspezifische Antikörper, um zytotoxische Substanzen (Zytostatika, Toxine, radioaktive Isotope) gezielt zu den malignen Zellen zu transportieren und diese zu zerstören (Renner et al., 2001).

Bei den für die Krebstherapie bisher zugelassenen immuntherapeutischen Medikamenten handelt es sich hierbei um zwei monoklonale Antikörper. Der anti-CD20 Antikörper Rituximab wird in der Therapie des Non- Hodgkin- Lymphoms eingesetzt, während das anti- HER2 Konstrukt bei der Behandlung von Mammakarzinomen eine Anwendung findet (Raab et al., 2001).

Die optimale Immuntherapie wird voraussichtlich eine Kombination aus mehreren der oben genannten Strategien sein, um eine effektive Lyse der Tumorzellen zu erreichen. Alle bisher dargestellten Ansätze implizieren als notwendige Voraussetzung die Identifizierung geeigneter, tumorspezifischer Antigene, welche als Ziel für das humorale und/oder zelluläre Immunsystem dienen. Bisher wurde im Bereich der Immuntherapie für den Morbus Hodgkin in klinischen Studien ein anti-CD30 Antikörper eingesetzt, der wegen seiner geringen Wirkung durch einen bispezifischen

anti CD16/ anti CD30 Antikörper ersetzt wurde. Dieser bispezifische Antikörper zeigte immerhin eine Wirkungsrate von 30%, bei Patienten die auf keine andere Behandlungsmethode angesprochen haben (Renner et al., 2001; Engert et al., 2001).

Es ist deswegen wichtig beim Morbus Hodgkin nach neuen, wirkungsvolleren Antikörpern bzw. Antisera zu suchen, die nicht nur in Kombination mit anderen Antikörpern eingesetzt werden können und die Tumor-spezifisch sind.

Ein bereits gut etabliertes System zur Isolierung der Zielantigene von Antikörpern ist das Screening von  $\lambda$ - Phagen- cDNA- Expressionsbanken. Die aus RNA erstellten Bibliotheken enthalten im Idealfall die Gene aller Proteine und damit auch der Antigene einer Tumorzelle.

Das Screening einer solchen Expressionsbank führt mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Identifizierung Tumor- assoziierter Antigene. Bisher wurde ein System entwickelt, welches auf dem Screening Tumor- spezifischer  $\lambda$ - Phagen- Banken mit dem Serum von Patienten basiert (SEREX). Die Strategie zielt auf die Identifizierung zytoplasmatischer und membranständiger Antigene ab, um möglichst viele Proteine zu identifizieren, die im Tumorgeschehen eine Rolle spielen (Sahin et al., 1995).

Die Zielsetzung der Arbeit ist es, neue Tumor- spezifische Antigene beim Morbus Hodgkin zu definieren, unter Verwendung des SEREX- Systems.

#### **4.1 Screening der Hodgkin- spezifischen cDNA- Expressionsbank mit Patientenserum (SEREX)**

Der Morbus Hodgkin wurde für diese Forschungen ausgewählt, weil das Lymphom in der Behandlung eine besondere Herausforderung darstellt. Bei diesem Lymphom machen die malignen Zellen, nämlich die mononukleären Hodgkin und die bi- oder polynukleären Reed- Sternberg Zellen nur 0,1% bis 1% der totalen Population des betroffenen Gewebes aus. Diese malignen Zellen sind umgeben von reaktiven T- Zellen, Histiocyten, Eosinophile und Stromazellen (Haluska et al, 1994).

Mit der Zelllinie L1236, die in dieser Arbeit zur Herstellung der cDNA- Expressionsbank verwendet wurde, steht zum ersten Mal eine reine Reed-Sternberg

Population zur Verfügung. Diese etablierte Zelllinie L1236 wurde aus dem peripheren Blut eines Patienten mit dem Rezidiv eines Morbus Hodgkin vom gemischtzelligen Subtyp etabliert (Wolf et al, 1996; Kanzler et al. 1996).

Die Qualität einer Expressionsbank ist für ein erfolgreiches Screening von besonderer Bedeutung. Je mehr inserttragende Klone vorhanden sind, desto mehr tumorspezifische Proteine werden von den Phagen exprimiert. Alle in den Tabellen 3.1.2 und 3.1.3 genannten Qualitätsmerkmale werden von der in dieser Arbeit etablierten und zum Screening verwendeten Hodgkin- spezifischen cDNA- Expressionsbank erfüllt.

Das SEREX- System verwendet für das Screening von cDNA- Expressionsbanken Serum der zugehörigen Patienten. Da in dem hier untersuchten Fall der L1236 Zelllinie kein autologes Serum des Patienten vorliegt, aus dessen Blut die Zelllinie L1236 etabliert wurde, wurde das Serum anderer Hodgkinpatienten verwendet. Hierbei wurden Seren von Patienten mit fortgeschrittenen und frühen Erkrankungsstadien, die sich zumeist vor ihrer Therapie befanden, für das Screening eingesetzt, um ein möglichst breites Spektrum an möglichen Antikörpern einzusetzen. In  $1 \times 10^7$  gescreenten Klonen konnten nach der 3. Screening- Runde 36 Proteine identifiziert werden, die mit mindestens einem Serum eine positive Reaktion zeigten. Die Antikörper wurden hauptsächlich bei Hodgkin- Patienten gefunden, die sich in fortgeschrittenen Stadien ihrer Erkrankung und vor einer Therapie befanden. Es konnte über einen Homologievergleich mit der Datenbank des NCBI festgestellt werden, dass es sich bei den 36 ermittelten Sequenzhomologien um 21 unterschiedliche Proteine handelt.

Die ermittelten Proteine sind hauptsächlich nukleäre Proteine (12 von 21), die für die Transkription, Zell- Zyklus- Regulation, Gen- Rekombination oder für den Austausch von Proteinen und Nukleotiden zwischen Zellkern und Zytoplasma verantwortlich sind. Fünf der identifizierten Proteine haben ihre Funktion außerhalb des Nukleus, entweder beim Zellstoffwechsel, im Mitochondrion oder im intrazellulären Transport. Bei vier der gefundenen Sequenzhomologien konnte noch keine Funktion dokumentiert werden. Die häufigsten Patientenserum- Reaktionen bei dem Screening waren gegen das nukleäre Gen Rekombinationsprotein RBP-J $\kappa$  und den Klon RP11432N13 mit unbekannter Funktion gerichtet.

In einem weiteren Schritt wurde die Spezifität der Proteine gegenüber der Seren der Hodgkin-Patientengruppen ermittelt, indem sie mit dem Serum gesunder Probanden inkubiert wurden. Hierbei zeigten acht der nukleären Antigene eine hohe Antigenität bei den gesunden Probanden und sieben der zytoplasmatischen Antigene. Aus dem hohen Anteil an positiven Antigenreaktionen gegenüber den gesunden Probanden kann man schließen, dass diese Antigene unspezifische und nicht Hodgkin-spezifische Antigene sind, da sie vermehrt mit Proteinen reagieren, die im gesunden Organismus vorkommen.

Sieben der gefundenen Antigene zeigten hingegen eine geringe Reaktivität gegenüber den gesunden Probanden, was auf eine mögliche Spezifität hindeutet. Von diesen Antigenen sind fünf nukleäre Proteine und haben ihre Funktion bei der Transkription, Zell-Zyklus-Regulation, bei der Gen Rekombination oder bei dem Transport von Proteinen und Nukleotiden zwischen Zellkern und Zytoplasma. Nur zwei der möglicherweise spezifischen Proteine sind zytoplasmatische Proteine, die ihre Funktion im Zellstoffwechsel haben.

Diese sieben möglicherweise spezifischen Antigene wurden in der Folge auch mit dem Serum von weiteren Hodgkinpatienten, NHL-Patienten und mit dem Serum von anderen Krebspatienten inkubiert (vergl. Punkt 3.3.3). Die Zahlenergebnisse (dargestellt in Tabelle 3.3.5 und 3.3.6) belegen, dass die Antigene nicht nur eine niedrige Reaktivität gegen Proteine gesunder Probanden aufweisen, sondern auch eine hohe Reaktivität gegen Proteine der verschiedenen, oben genannten Patientengruppen zeigen. Diese interessanten Ergebnisse der Serumreaktionen wurden einem Signifikanztest unterzogen (vergl. Punkt 3.3.7).

Als Erschwernis bei der Suche nach Hodgkin-spezifischen Antigenen mittels der SEREX-Methode ergaben sich, dass mit der SEREX-Methode nie das komplette Spektrum der Antigene in einem Tumor detektiert werden kann, da die in den Sequenzen kodierten Proteine von Bakterien synthetisiert werden. Dies kann dazu führen, dass manche Proteine, auch auf Grund veränderter Leserahmen, Konformationsänderungen aufweisen, da sie von Bakterien anders gefaltet werden. Sie können ebenfalls glycosylierte Epitope aufweisen. So werden manche Antigenstrukturen nicht von den Antikörpern erkannt, obwohl sie im eukaryontischen

Organismus eventuell eine Rolle im Krankheitsverlauf spielen würden (Türeci Ö. et al., 1997).

Weiterhin kann die fehlende Reaktivität der Antikörper auf bestimmte Antigene daher rühren, das die in der cDNA- Bank enthaltenen Sequenzen nicht während der lytischen Infektion der Bakterien exprimiert werden und so nicht auf die Nitrocellulosemembran übertragen werden können. Ebenfalls können Antigene nicht detektiert werden, für die zum Zeitpunkt der Serumentnahme keine Antikörper im Serum des Patienten vorliegen (Türeci Ö. et al., 1996).

Eine weitere Limitierung der SEREX- Methode ist, das durch den Gebrauch von verdünntem Patientenserum nur oft vorkommende IgG Antikörper im initialen Screening gefunden werden. Das engt das Screening auf solche Antikörper ein, die eine starke Immunantwort im Patienten hervorrufen. So können möglicherweise Tumor- relevante Antikörper auf Grund ihres vereinzelt Vorkommens oder schwachen Immunreaktion nicht detektiert werden.

Es muß ebenfalls in Betracht gezogen werden, das die mRNA einer Zelllinie für die Analyse mittels SEREX- System genommen wurde, die neben den möglichen Ziel-Oberflächenantigenen auch ein komplettes Repertoire an Proteinstrukturen aufweist. Die Zelllinie L1236, die zwar zum ersten Mal eine stabile Hodgkin- Zellpopulation für diese Untersuchung liefert, hat aber auch den Nachteil, das es bei Langzeitkulturen, anders als bei frisch entnommenem Tumorgewebe, zu Kulturartefakten wie Verlust von Antigenen kommen kann (Türeci Ö. et al., 1997).

Die Serologie, die eine wichtige Rolle in der Einordnung der gefundenen Antigene spielt, hat gewisse Limitierungen. Sie erfordert eine große Menge an Serum, das präabsorbiert sein muß, um unspezifische Reaktionen zu vermeiden und es lassen sich nur geringe Mengen an verschiedenen Seren gleichzeitig testen (Chen, Y-T, 2000).

Dennoch wurden mit der SEREX- Methode bereits einige interessante Antigene identifiziert.

## 4.2 Relevante Antigene

In dieser Arbeit wurde mit dem Fischer Test (vergl. Punkt 3.3.7), einem mathematischen Test mit dem sich für kleine Mengen Signifikanzen bestimmen lassen, die Signifikanz der Ergebnisse der Serumreaktionen bei den verschiedenen Patientengruppen im Vergleich zu den Ergebnissen der jeweiligen gesunden Referenzgruppe ermittelt.

So hat sich aus den Berechnungen des Fischer Tests ergeben, dass das Protein mit der Bezeichnung **NY-CO-1** bei der NHL- Population eine signifikante Anzahl an Serumreaktionen hervorgerufen hat. Das NY-CO-1 Protein spielt eine Rolle in der Zell Zyklus Regulation als Targeting- Protein und als nukleäres Targeting- Signal. Dieses Protein wurde ursprünglich mit der SEREX- Methode als Colon- assoziiertes Antigen identifiziert (Scanlan et al., 1998). Daher ist es nicht verwunderlich, dass das NY-CO-1 Protein auch bei der hier untersuchten Patienten- Population mit anderen Krebsarten, unter denen auch Colon Patienten getestet wurden, als hoch signifikant erkannt wird. Die „Wiederentdeckung“ des Proteins mit der SEREX- Methode vor diesem Versuchshintergrund dient als Beweis dafür, dass man mit SEREX auch unter diesen Versuchsbedingungen in der Lage ist Tumor-assoziierte Antigene zu identifizieren.

Das Protein des Klons **RP4-670F13** wurde bei der Patientengruppe mit unterschiedlichen Tumoren (Colon-, Testis-, Mamma-, Pankreas-, Magen- und Bronchialkarzinome) als hoch signifikant identifiziert. Das vom Klon RP4-670F13 exprimierte Protein ist ein zytoplasmatisches Protein, das im Zellstoffwechsel eine Rolle spielt und dem Galektin 8 ähnlich ist. Die Sequenz des Proteins besitzt zwei Lektin Domänen, die eine Galaktosid- Bindungskapazität besitzen und die charakteristisch für alle Galektine sind. Galektine sind lösliche  $\beta$ - Galaktosidase Bindungsproteine und spielen eine Rolle in der Interaktion von Zell- Zell oder/ und Zell- Matrix Interaktionen (Türeci Ö. et al., 1997). So sind Galektine in eine Reihe von Prozessen verwickelt, wie die Adhäsion maligner Zellen (Ohannesian D. W., et al. 1995), die Aktivierung und Proliferation von Immunzellen (Jeng K. C. et al., 1995) und die Induktion des programmierten Zelltods (Yang R.Y. et al., 1996). Es wurde schon einmal bei einem Hodgkinpatienten mit der SEREX- Methode ein Galektin

(Galektin 9) als mögliches Tumor- assoziiertes Antigen identifiziert. Im Zuge dieser Untersuchungen wurde mittels Northernblot und Densitometrie festgestellt, dass das Galektin 9 in mit M. Hodgkin erkrankten Patienten im Nieren- und Lymphknoten-Gewebe zehn mal mehr exprimiert wird als in gesundem lymphatischem Gewebe. Dieses Ergebnis konnte in 50% aller untersuchten Hodgkinpatienten verifiziert werden (Türeci Ö. et al., 1997).

Das zytoplasmatische Protein (**cobW**), das bei der Hodgkin- Population als zu einer hoch signifikanten Anzahl an positiven Serumreaktionen geführt hat, scheint eine Rolle beim Zellstoffwechsel zu spielen, da ein Teil der Sequenz am 3'Ende Ähnlichkeit mit einer NAD(H) Bindungsdomäne einer Nicotinamid Nukleotid Transhydrogenase hat. Dieser Umstand lässt vermuten, dass das cobW Protein eine NAD(H) Bindungsstelle aufweist. Es wurde aber ebenfalls eine ATP- Bindungs-Konsensussequenz gefunden, was wiederum vermuten lässt, dass das Protein ATP braucht um zu funktionieren (Crouzet, J. et al., 1991). Die tatsächliche Funktion des Proteins ist noch nicht hinlänglich bekannt. Was dieses Protein jedoch interessant als Tumor- Antigen macht, ist das Ergebnis des Fischer Tests in Bezug auf die anderen Testgruppen. Diese zeigen, dass das cobW- Protein auch bei der NHL- und bei der Patientengruppe mit anderen Krebserkrankungen eine hoch signifikante Anzahl an positiven Serumreaktionen aufweist. Dieses Ergebnis lässt die Vermutung zu, dass es sich bei dem Protein nicht um ein Hodgkin- spezifisches Antigen, sondern eher um ein universelles Tumor- Antigen handelt.

Für die Hodgkin- Patientengruppe ergab sich weiterhin, dass die SEREX- Ergebnisse eines nukleären, ein bei der Gen Rekombination des J $\kappa$ - Segments wichtigen Proteins, als signifikant eingestuft wurden. Dieses **RBP-J $\kappa$**  Protein ist ein Protein, das an die Rekombinationssignalsequenz des Immunglobulin J $\kappa$  Segments bindet. Die Sequenz des Proteins ist zu über 30 Prozent konserviert und die hohe Spezifität der Bindung zu der Bindungssequenz lässt vermuten, dass das Protein bei der V-(D)- J Rekombination eine Rolle spielt (Hamaguchi, Y. et al., 1989). Das Protein wurde bereits bei lymphoiden B- und T-Zelllinien gefunden, nicht aber bei nicht lymphoiden Zelllinien und es gehört als Rekombinase zur Familie der Integrasen. Es wird vermutet, dass das

Protein die V-(D)-J Rekombination entweder katalysiert oder stimuliert, wobei auch andere Faktoren neben dem RBP-J $\kappa$  Protein gleichzeitig für die effiziente Stimulation oder Katalyse der Rekombination eine Rolle spielen können (Mastunami, N. et al., 1989). Da das Protein auch in Hodgkin Reed-Sternberg Zellen exprimiert wird und an der Fertigung von Immunglobulinen beteiligt ist, könnte eine Fehlfunktion oder ein Fehlen zu partiell rearrangierten Immunglobulinen schweren Ketten Segmenten führen, wie schon bei verschiedenen lymphoiden Neoplasien beobachtet werden konnte, und so die Vielfalt und Funktionalität der Antigenrezeptoren herabsetzen (Pelicci P.G., et al., 1985).

Des Weiteren ist ein nukleäres Porenkomplexprotein (**Ran BP2**) in der Hodgkin Patientenpopulation nach dem Fischer Test als signifikant eingestuft worden (vergl. Tabelle 3.3.7). Hierbei handelt es sich um ein GTP- Bindungsprotein, das essentiell für die Translokation von nukleären Proteinen durch den nukleären Porenkomplex ist (Geyer M. et al., 1999). Ist dieser Mechanismus gestört, kommt es zur vorzeitigen Initiation einer Mitose (Seki T. et al., 1996).

Bei der Patientengruppe mit unterschiedlichen Tumoren ( Colon-, Testis-, Mamma-, Pankreas-, Magen- und Bronchialkarzinome ) wird noch ein weiteres Antigen als hoch signifikant identifiziert. Das **Antigen No.55**, ein nukleäres Protein, das im Interphasekern vorliegt. Das Protein No.55 wurde erstmals bei einer chronischen, inflammatorischen Blasenkrankheit (interstitiale cystitis) entdeckt. Die cDNA Expressionsbibliothek, die von einer aus einer Blasenkarzinom- Zelllinie extrahierten mRNA gewonnen wurde, wurde mit autologem Serum gescreent und mittels Restriktionskartierung und Sequenzierung analysiert. Das identifizierte Protein liegt im granulären Kompartiment im Interphasenukklus gleichmäßig verteilt vor, wurde jedoch assoziiert mit den Chromosomen, auf deren Oberfläche, während der Mitose aufgefunden (Ochs, R.L. et al., 1996).

Einige der oben genannten Proteine wurden bereits von anderen Arbeitsgruppen mit Hilfe der SEREX- Methode gefunden; diese Proteine sind in der Datenbank <http://www.licr.org> aufgeführt (Chen Y.- T., 2000). Hier finden sich auch neben dem

eben genannten Galektin (bei Patienten mit M. Hodgkin entdeckt; Türeci, Ö. et al. 1997) auch das NY-CO-1 Protein (bei Patienten mit Colon- Tumor entdeckt; Chen, Y.-T. et al., 1997) und das RBP-Jκ Protein (bei Patienten mit gastritischen Tumoren entdeckt; Obata, Y. et al., 2000) wieder.

Die oben aufgeführten, nach dem Fischer Test als relevant benannten sechs Antigene (Antigen No. 55, Klon RP4-670F13, NY-CO-1, cobW, Ran BP 2 und RBP-Jκ) wurden ursprünglich hauptsächlich in den Seren der Hodgkin- Patienten gefunden, die sich in fortgeschrittenen Stadien ihrer Erkrankung (vier der sechs Antigene wurden im Krankheitsstadium III und IV gefunden) und vor ihrer Therapie befanden. Nur das Antigen No.55 und das Protein cobW wurden bei Patienten gefunden die sich im Stadium II der Erkrankung, aber ebenfalls vor ihrer Therapie befanden. Diese Beobachtung ist ebenfalls als signifikant nach dem Fischer Test zu betrachten.

Diese Beobachtung lässt sich erklären, wenn man sich die Einteilung der Krankheitsstadien nach der Ann- Arbor Klassifikation vor Augen führt. In den Stadien I und II sind ein, beziehungsweise zwei Lymphknoten auf einer Seite des Zwerchfells betroffen, während in späteren Hodgkin- Krankheitsstadien (III und IV) lymphatische Organe auf beiden Seiten des Zwerchfells und später auch z.B. Knochenmark und Lunge befallen sind. Das bedeutet dass durch die größere Tumorlast und Ausbreitung in den fortgeschrittenen Krankheitsstadien mehr Tumor-Antigene im Patientenserum vorhanden sind, so auch die Wahrscheinlichkeit signifikant steigt diese mittels SEREX zu identifizieren.

Bei der Art der in dieser Arbeit gefundenen Antigene wird beobachtet, dass es sich hauptsächlich um nukleäre Antigene handelt. Keines der gefundenen Antigene war ein Oberflächenantigen. Der geringe Prozentsatz an Oberflächenantigenen in Patientenseren die eine T- Zell Antwort auslösen können und so als mögliche Kandidaten für die Immuntherapie in Frage kommen würden, erschweren hier die Suche nach Hodgkin- spezifischen Antigenen (Chen, Y.- T., 2000). So sind zum Beispiel nur ein Drittel aller Epstein- Barr- Virus negativer Hodgkin Lymphome HLA I positiv, was auf einen Defekt im Antigen präsentations- bzw. prozessierungs Pathway hinweist und eine Herabsetzung der Anzahl detektierbarer Oberflächenantigene zur Folge hat (Lee S.P. et al., 1998).

So sind in dieser Arbeit auch keine Oberflächenantigene in der Gruppe der signifikanten Antigene zu finden. Die Hälfte der signifikanten Antigene, sind in dieser Arbeit nukleären Ursprungs, während die andere Hälfte zellulären Ursprungs ist.

Obwohl keine Oberflächenantigene unter den hier gefundenen, signifikanten Antigenen sind, könnte ihre Entdeckung von Interesse für die Behandlung von Krebserkrankungen (wie z.B. Morbus Hodgkin, Mammakarzinomen oder NHL) sein, da ihre Immunogenität auch eine Konsequenz aus spezifischen strukturellen Veränderungen des Proteins oder deren Expressionsmuster sein könnte (Chen, Y.- T., 2000). So könnten Antigene mit Karzinom- restringierter Expression oder Immunogenität zur therapeutischen Behandlung als Tumorstoffe eingesetzt werden. Die mit Hilfe der Antikörper identifizierten Antigene müssten in einem nächsten Schritt auf Ihre Fähigkeit hin untersucht werden, zytotoxische T-Zellen zu aktivieren, um dann diese in vitro aktivierten, vom Patienten stammenden T- Zellen, dem Patienten wieder zuzuführen (Methode des T- Zell adaptiven Transfers) (Lee S.P. et al., 1998; Chapman A.L. et al., 2001). Das es möglich ist mit der SEREX- Methode Antigene, bzw. Peptide von Antigenen zu identifizieren, die als Ziele für CD8 positive T- Zellen eingesetzt werden können, wurde schon anhand der Tyrosinase, MAGE-1 und bei NY-ESO-1 bewiesen (Chen Y-T, 2000; Jäger E. et al., 2000).

Es wird allgemein angenommen, dass die meisten Tumore spezifische Antigene exprimieren, obwohl in den meisten Patienten keine entsprechende, klinisch signifikante Immunantwort zu detektieren ist. Es sind zahlreiche Defekte aufgedeckt, die der effizienten Tumorerkennung im Wege stehen, wie zum Beispiel Ignoranz, Toleranz und Immunsuppression (Schultze J., 1999).

Obwohl B- Zell Lymphome Tumor Antigene exprimieren ist der Expressionslevel der Tumor-Antigen-Peptide im Kontext von MHC Molekülen auf B- Zell Lymphomen oftmals zu niedrig, so dass die malignen B- Zellen ignoriert werden (T-Zell Ignoranz) (Miller J. F. und Heath W. R., 1993). Außerdem könnte der Mangel an costimulatorischen Molekülen die T- Zellen anergisch machen und so zu einer in vivo Toleranz führen, auch wenn es zu einer Lymphom- spezifischen T- Zell Erkennung der Antigenpeptide im Kontext von MHC- Molekülen kommt (Schultze J.L. et al., 1996). Des Weiteren könnte eine Depletion von Anti- Lymphom spezifischen T-

Zellen aus dem bestehenden Repertoire ebenfalls eine Toleranz auslösen (Bogen, B., 1996).

Es konnte in diesem Zusammenhang auch gezeigt werden, dass auch wenn maligne B-Zellen costimulatorische Moleküle exprimieren, der Expressionslevel zu niedrig sein kann, um T-Zellen effizient zu aktivieren. In diesem Fall wäre die Immunantwort insuffizient (Dorfman D.M. et al. 1997).

Es ist auch möglich, dass Tumorzellen Oberflächenmoleküle und lösliche Faktoren exprimieren, die die Aktivierung von T-Zellen verhindern (Bost K.L. et al., 1995). Es gibt bereits Hinweise, dass Lymphomzellen, die ein Modellantigen exprimierten T-Zell-Toleranz in naiven, antigen-spezifischen T-Zellen induzieren. Es wurde hier vermutet, dass die primäre Antigenstimulation die T-Zellen anergisch *in vitro* und tolerant *in vivo* machen (Staveley O.C.K. et al., 1998).

Die meisten B-Zell-Krankheiten induzieren keine profunde T-Zell-Antwort *in vitro*. Das liegt nicht an nicht vorhandenen MHC-Molekülen, sondern vielmehr an dem Fehlen von Adhäsions- und costimulatorischen Molekülen. In diesem Licht benehmen sich die meisten malignen B-Zellen wie ruhende B-Zellen, die diese Moleküle ebenfalls nicht aufweisen. Es konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass ruhende B-Zellen Toleranz bei T-Zellen *in vivo* induzieren (Lassila O., et al., 1988; Ho W.Y. et al., 1994).

Es gibt zur Zeit jedoch Untersuchungen, wie sich die T-Zell-Ignoranz gegenüber Antigenepitopen überwinden lässt und zwar mit Idiotyp-DNA-Vakzinen oder mit dendritischen Zellen, die die Protein-Idiotypen vermitteln (Hsu F. J., et al., 1996). Die schwierigste Aufgabe wird jedoch sein, die Toleranz *in vivo* zu überwinden, denn selbst die Immunisierung mit der effizientesten Antigen-präsentierenden Zelle kann nicht die Toleranz reversieren. Es ist am Wahrscheinlichsten, dass sich die Toleranz *ex vivo* durchbrechen lässt, wie man an Versuchen mit CD 40-aktivierten Lymphomzellen feststellen konnte. Diese aktivierten Lymphomzellen konnten autologe T-Zellen induzieren, die *ex vivo* zur Vermehrung mit Hilfe dieser aktivierten Zellen gebracht werden konnten. Diese T-Zellen waren dann in der Lage, unstimulierte Lymphomzellen zu erkennen und zu zerstören (Schultze J., 1999).

Die Antigene, die am besten den Tumor bekämpfen würden, wären solche, die eine starke T-Zell-Antwort auslösen würden, indem sie viele T-Zellen mit einer hohen

Diversität an T- Zell Rezeptoren herbeirufen und so eine lang anhaltende und breit gefächerte Immunantwort hervorrufen würden. Toleranz limitiert die Zahl der spezifischen T- Zellen und somit auch deren Häufigkeit und Diversität. Die spezifischen Tumorantigene sind entweder Neo- Antigene (z.B. basierend auf Mutationen) oder Antigene, die durch das Immunsystem ignoriert werden weil sie mit ihrem niedrigen Expressionslevel keine Toleranz induzieren (Schultze J.L. et al., 2001).

So müssen Proteine, die für diesen neoplastischen Prozeß essenziell sind, Epitope enthalten, die über die MHC- Moleküle den T- Zellen zugänglich gemacht werden. Zwei Klassen von Proteinen können hierbei erwartet werden: solche die bei der Tumorbiologie aller Tumore eine Rolle spielen oder Tumor- spezifische Proteine. Bisher wurden schon einige Proteine mit der Tumorentstehung allgemein in Verbindung gebracht. p53 und ras sind solche Beispiele. Da sie bei der Entstehung vieler Tumoren eine Rolle spielen, aber auch im normalen Gewebe exprimiert werden, konnte bei ihnen auch die Existenz von T- Zell Toleranz nachgewiesen werden (Sherman L.A, et al., 2000).

Ein solches universelles Tumorantigen könnte in dieser Arbeit das cobW Protein sein. Es wurde mittels Fischer Test bei allen Patientengruppen als hoch signifikant eingestuft (siehe Tabelle 3.3.7); es scheint eine Rolle beim Zellstoffwechsel zu spielen, obwohl seine genaue Funktion als Protein allerdings noch nicht geklärt ist. Es wäre nun von Interesse, ob und in welchem Ausmaß das Protein in lymphatischen, erkrankten Gewebe überexprimiert vorliegt, was einen weiteren Hinweis auf die Rolle des Proteins bei z.B. Morbus Hodgkin geben würde. Das cobW Protein ist in jedem Fall schon auf Grund der Serum- Ergebnisse ein interessanter Kandidat für weitere Nachforschungen, die in einer auf Antigenen basierende Therapie resultieren könnte. Im Zuge dessen müsste das Protein nach immunogenischen Epitopen untersucht werden, die mit einer auf HLA-Bindungsmotiv basierenden Methode vorhergesagt werden können. Die Kandidaten-Peptide können dann mittels Massenspektrometrie von Tumor- Zellen stammenden HLA-Molekülen identifiziert werden. Peptid-spezifische T- Zellen können dann qualitativ und quantitativ auf Einzelzellniveau mittels ELISPOT und Tetramer Technologien analysiert werden (Schultze J.L. et al., 2001).

Als Gegenstand weiterer, in diese Richtung gehender Untersuchungen wären zwei möglicherweise Hodgkin- Lymphom- assoziierter Proteine wie das RBP-J $\kappa$  und das Ran- BP2 von Interesse. Das Ran-BP2 als nukleäres Porenkomplexprotein, bei dessen Fehlfunktion es zur vorzeitigen Initiation einer Zellteilung kommen kann und das RBP-J $\kappa$ , ebenfalls ein nukleäres Protein, das bei der V-(D)-J Rekombination eine Rolle spielt und bei dessen Fehlfunktion es zu einer Herabsetzung der Vielfalt und Funktionalität der Antigenrezeptoren kommen kann. Bei diesen Proteinen müsste zunächst festgestellt werden, in wieweit ihre Funktionalität im lymphatischen, erkrankten Gewebe eingeschränkt vorliegt, um weitere Aussagen über ihre Relevanz beim Morbus Hodgkin zu treffen.

Als ein weiteres interessantes Protein im Hinblick auf ein Tumor- assoziiertes Antigen konnte in dieser Arbeit das Protein des Klons RP4-670F13 identifiziert werden. Dieses Protein wurde auf Grund der Serumreaktionen bei der Patientengruppe mit unterschiedlichen Tumoren als hoch signifikant eingestuft. Das zytoplasmatische Protein könnte, da es einem Galektin ähnlich ist, bei der Adhäsion maligner Zellen, der Aktivierung und Proliferation von Immunzellen oder der Induktion des programmierten Zelltods eine Rolle spielen. Es müsste nun untersucht werden, ob dieses Protein in den verschiedenen Tumorgeweben überexprimiert vorliegt, wie es bei dem Galektin 9 schon in mit M. Hodgkin erkranktem Patienten festgestellt werden konnte. Dies wäre ein weiterer wichtiger Hinweis darauf, das es sich bei dem Protein des Klons RP4-670F1 um ein mögliches Tumor- assoziiertes Antigen handeln könnte.

Langzeitstudien mit Seren während der Krebsprogression sind für mit SEREX gefundene Antigene noch nicht durchgeführt worden. Sollten diese durchgeführt werden, könnten mit den Tumorantigenen Vakzinierungsstrategien entwickelt werden, bei denen pure Antigen- Peptid Präparationen benutzt werden. Diese enthalten dann keine normalen Proteine, die eine Toleranz auslösen könnten, wie bereits an einigen Vorversuchen gezeigt werden konnte (Jäger, E. et al., 1996 und Yee, C. et al., 1996).

Die klinische Signifikanz der bereits gefundenen Tumorantigene ist noch bei vielen Krebsarten ungeklärt. Es müssen noch mehr Patienten und deren Reaktion auf bestimmte Antigene hin untersucht werden, um definitiv festzustellen ob die

Entwicklung der jeweiligen Antikörper gegen Tumorantigene mit klinisch relevanten Veränderungen im Zusammenhang stehen. So können die relevanten Antigene schließlich als Serodiagnose für Krebserkrankungen oder als prognostischer Marker eingesetzt werden (Sahin U. et al., 1997).

### 4.3 Ausblick

Im letzten Jahrzehnt wurden enorme Fortschritte gemacht in dem Verständnis um das Immunsystem im Umfeld verschiedener Krebserkrankungen. Dieses Verständnis wurde zum Großteil ermöglicht durch die Entwicklung neuer Untersuchungsmethoden, die es möglich machten Antigenziele auf Krebszellen zu identifizieren, die eine Immunantwort auslösen (Rosenberg S A, et al., 1999; Boon T, et al., 1996).

Im Zuge dieser Entwicklung wurde die SEREX- Methode entwickelt, mit der bereits über tausend Antigene in verschiedenen Tumorentitäten entdeckt werden konnten (Sahin U. et al., 1995).

Antigene können bei der SEREX- Methode leicht nach ihrer zellulären Lokalisierung eingeteilt werden und hierbei wird immer wieder festgestellt, dass hauptsächlich nukleäre Proteine gefunden werden. Man könnte die Immunantwort gegen die nukleären Antigene als unspezifisch betrachten und sie dem hohen Zell- internen Proteinabbau und der Nekrose zuschreiben, die mit der Krankheit einher gehen und bei dem die nukleären Antigene mit immunkompetenten Zellen in Kontakt kommen können. Es wäre jedoch voreilig die Möglichkeit auszuschließen, dass die Immunogenität dieser Proteine eine Folge spezifischer Strukturveränderungen oder ihrer Expressionsmuster ist.

Alternativ können die gefundenen Antigene auch nach ihrer Funktionalität eingeteilt werden. So wurde festgestellt, dass ein breites Spektrum an funktionell sich ähnelnden Proteinen gefunden werden kann, wie zum Beispiel Enzyme des Metabolismus, Transkriptions- und Translationsfaktoren, Strukturproteine oder Stressproteine. Einige der bisher schon gefundenen Proteine, die von diagnostischer und therapeutischer Relevanz sein könnten, fallen in eine dieser Gruppen (Chen, Y-T, 2000).

Die Tatsache, dass multiple Antigene, die von einem Tumor exprimiert werden, eine Immunantwort hervorrufen, hat gezeigt, dass die Erkennung von Tumor- assoziierten Antigenen nicht der limitierende Schritt in der Immunreaktion gegen den Tumor ist. Es ist vielmehr der Effektorarm des Immunsystems der für das Versagen verantwortlich ist. Mit dem Einsatz definierter Antigene kann dieser Effektorarm hochreguliert und redigiert werden, so dass eine effiziente zytotoxische Immunantwort eingeleitet werden kann. Die auf molekularer Ebene definierten

Antigene erleichtern die Identifizierung von T- Zell abhängigen Antigenen und bilden die Basis für peptid- und genterapeutische Vakzinierungsstrategien.

Diese Vakzinierungsstrategien basieren auf reinen Antigenstrukturen, ohne die Verunreinigung mit patienteneigenen Proteinen, die zu einer Toleranz gegenüber den Antigenen durch das Immunsystem des Patienten führen könnten (Sahin U.,et al., 1997).

Es ist zukunftsweisend, das mit dem SEREX- System bereits eine Reihe von für einige Krebsarten als relevant vermutete Tumor- assoziierte Antigene (wie zum Beispiel Onkogene und Supressorgene) identifiziert werden konnten. Es wurden mit dieser Methode somit potentielle Ziele für eine spätere Krebs- Vakzinierungsstrategie ermittelt (wie zum Beispiel Testiskrebs - und Differenzierungsantigene) (Chen, Y-T, 2000).

Die stetig wachsende Anzahl der mit der SEREX- Methode gefundenen Antigene macht es zu einer großen Herausforderung, die biologisch und immuntherapeutisch relevanten unter ihnen zu identifizieren. Die bisher angewandte, auch in dieser Arbeit gebrauchte Methode der krankheitsspezifischen, serologischen Erkennungsanalyse ist ein wichtiger Schritt in diese Richtung. Jedoch bieten neuerlich entwickelte Methoden, wie zum Beispiel die DNA Microchiparray Technologie, die Echtzeit- quantitative PCR und verbesserte serologische und T- Zell Assays einen weiteren Vorteil in der Identifizierung wichtiger tumorassoziierter, also universeller Antigene (Chen, Y-T, 2000).

Die Strategie der Zukunft im Kampf gegen Tumore und Lymphome sollte sich aber nicht nur auf die Identifikation neuer Antigene beschränken, sondern sollte mehrere immuntherapeutische Strategien miteinander zu verbinden, wobei nicht nur wichtig ist, welche Heilmethoden miteinander kombiniert werden, sondern auch wie. Nach den intensiven Forschungen im Bereich der Immuntherapie lautet die Frage heute nicht mehr ob sie funktioniert, sondern wann und wie (Schultze JL, et al., 1999).

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels der SEREX- Methode versucht Hodgkin-spezifische oder Hodgkin- assoziierte Antigene zu identifizieren.

Zu diesem Zweck wurde eine  $\lambda$ - Phagen- cDNA- Expressionsbank aus der Hodgkin-Zelllinie L1236 hergestellt. Die Identität der etablierte Zelllinie L1236 entspricht hierbei einer definierten, reinen Hodgkin Reed- Sternberg Zellpopulation.

Das SEREX- System verwendet für das angeschlossene Screening von cDNA- Expressionsbanken das Serum der zugehörigen Patienten. Hierbei wurden Seren von Patienten mit fortgeschrittenen und frühen Erkrankungsstadien, die sich zumeist vor ihrer Therapie befanden, für das Screening eingesetzt. Die Auswahl der Patienten stellt ein repräsentatives Hodgkin- Patientenkollektiv dar.

Die im initialen Screening als positiv erkannten, cDNA- enthaltenden Phagen wurden über zwei weitere Screening- Schritte aufgereinigt und deren extrahierte cDNA einer Sequenzierung unterzogen. Es wurden NCBI- Datenbankabfragen (BLAST) mit der Nukleotidsequenz durchgeführt, um Homologien zu bereits bekannten Genen zu ermitteln.

Auf diese Weise konnten 36 Proteine identifiziert werden. Es konnte über einen Homologievergleich mit der Datenbank NCBI festgestellt werden, dass es sich bei den 36 ermittelten Antigenreaktionen um 21 unterschiedliche Proteine handelt. 12 der gefundenen Proteine sind nukleären Ursprungs, fünf der Proteine spielen im Zytoplasma eine Rolle und vier der gefundenen Sequenzhomologien konnte sogar noch keine dokumentierte Funktion zugewiesen werden.

Um festzustellen welche Patienten spezifische Antikörper gegen Morbus Hodgkin bilden, wurden die Klone mit weiteren Hodgkin- Patientenserum inkubiert. Als Referenzgruppe wurden die Seren gesunden Probanden eingesetzt. Sieben der gefundenen Antigene zeigten hierbei eine zu vernachlässigende Reaktivität gegenüber den gesunden Probanden.

Zur Überprüfung der Antigene und ihrer möglichen, relevanten Rolle bei Non-Hodgkin- Lymphomen oder bei einer Auswahl von Tumorerkrankungen, wurden die Klone ebenfalls gegen Non- Hodgkin- Lymphomen- Seren und Seren verschiedener Tumorpatienten (vorwiegend Mammakarzinom, aber auch Hoden-, Pankreas-, Magen-, Rektum- und Bronchialkarzinom Patienten) getestet.

Um festzustellen ob ein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl der Serumreaktionen der Hodgkin-, Tumor- oder NHL- Patienten und der gesunden Referenzgruppe besteht, wird hier der Fischer „exakter Test“ (Fischer R.A., 1932) auf die bei den vorher genannten Versuchen erhaltenen Ergebnisse angewendet.

Als besonders interessante Antigene stellten sich hierbei unter anderem die Antigene RanBP2, RBP- $\kappa$  (Serumreaktionen signifikant beim Morbus Hodgkin), das cobW ähnliche Protein (Serumreaktionen hoch signifikant bei allen untersuchten Patientengruppen) und das Protein des Klons RP4-670F13 (Serumreaktionen hoch signifikant bei der Tumor- Patientengruppe) heraus. Die Antigene RanBP2 und RBP- $\kappa$ , bei denen das Erstere ein Porenkomplexprotein ist, bei dessen Fehlfunktion es zur vorzeitigen Initiation einer Zellteilung kommen kann und das Zweite, das bei der V-(D)-J Rekombination eine Rolle spielt und bei dessen Fehlfunktion es zu einer Herabsetzung der Vielfalt und Funktionalität der Antigenrezeptoren kommen kann, sind möglicherweise Hodgkin- Lymphom- spezifische Antigene. Weitere Untersuchungen in Bezug auf eine mögliche eingeschränkte Funktionalität im lymphatischen, erkrankten Gewebe sind jedoch nötig, um weitere Aussagen über ihre Relevanz beim Morbus Hodgkin zu treffen.

Als ein interessantes Protein im Hinblick auf ein Tumor- assoziiertes Antigen konnte in dieser Arbeit das Protein des Klons RP4-670F13 identifiziert werden. Das zytoplasmatische Protein könnte, da es einem Galektin ähnlich ist, bei der Adhäsion maligner Zellen, der Aktivierung und Proliferation von Immunzellen oder der Induktion des programmierten Zelltods eine Rolle spielen. Eine Untersuchung, ob dieses Protein in den verschiedenen Tumorgeweben überexprimiert vorliegt müsste als Folge dieser Arbeit unternommen werden, um einen weiteren wichtigen Hinweis zu erhalten, ob es sich bei dem Protein des Klons RP4-670F1 um ein Tumor- assoziiertes Antigen handelt.

Als ein weiteres interessantes Antigen, das ein universelles Tumorantigen sein könnte, wurde in dieser Arbeit das cobW ähnliche Protein identifiziert. Es scheint eine Rolle beim Zellstoffwechsel zu spielen, obwohl die genaue Funktion des Proteins noch nicht geklärt ist. Weitere anschließende Untersuchungen, ob und in welchem Ausmaß das Protein in erkranktem Gewebe überexprimiert vorliegt, würden weiter Aufschluss geben über seine Rolle als mögliches universelles Tumorantigen. Das cobW Protein ist

in jedem Fall schon auf Grund der Serum- Ergebnisse ein interessanter Kandidat für weitere Nachforschungen im Hinblick auf eine mögliche T-Zell Aktivierung, die in einer auf Antigenen basierenden Therapie resultieren könnte.

## 6. Anhang

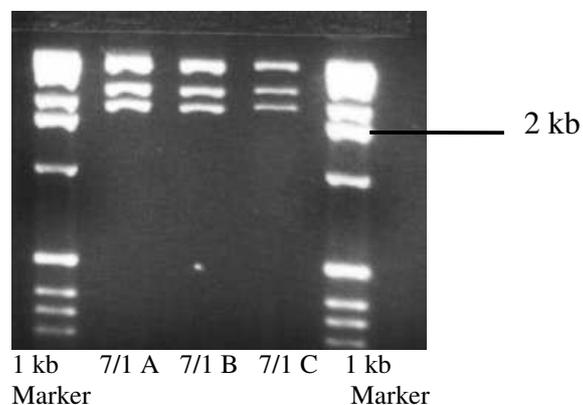
### 6.1. Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Anti Sense (Gegenrichtung)
ATP	Adenosin- Triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre DNA (DNA- Kopie der m- Ribonukleinsäure)
cm	Zentimeter
dCTP	Desoxyribonukleosid- Cytosin- Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DMF	N,N- Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	und andere
Fab	Antigen- bindendes Fragment
Fc	kristallisierbares Fragment
FDA	Food and Drug Administration
FKS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
GTP	Guanidin- Triphosphat
h	Stunde

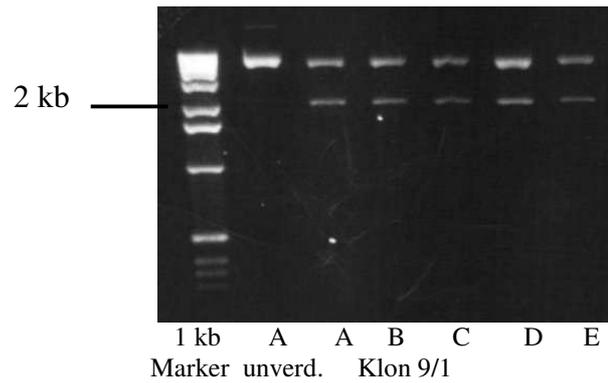
HD	Hodgkin
i.d.	in der
I.E.	Internationale Einheit(en)
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- $\beta$ - D- Thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria- Bertani
M	Mol
mM	Millimol
mm	Millimeter
MCS	Multiple Cloning Site (Multiple Klonierungsstelle)
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
Min.	Minuten
ml	Milliliter
MMLV	Moloney muriner Leukämie Virus
mRNA	messenger RNA (Boten RNA)
$\mu$	Micro
n	Nano
NHL	Non- Hodgkin- Lymphom
nm	Nanometer (Wellenlänge)
OD	Optische Dichte
p	Pico
PCR	Polymerase Kettenreaktion
Pfu	Plaque forming units (Plaque bildende Einheiten)
rATP	ribosomales ATP
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
S	Sense (in Leserichtung)

SDS	Sodium Dodezylsulfat
Sec.	Sekunden
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Units (Einheiten)
UV	Ultra Violett
V	Volt
VT	Volumenteile
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
x	Multiplikator
x- gal	5-Brom-4-Chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosidase

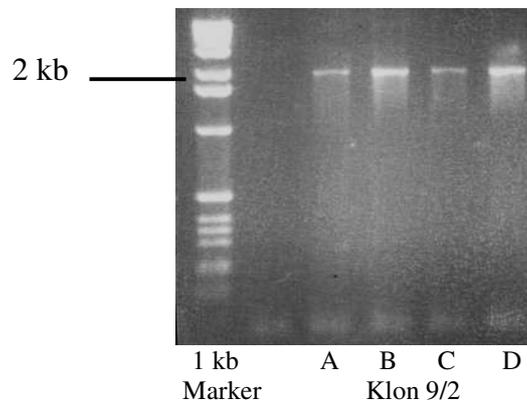
## 6.2. Analyse des Inserts positiver Klone des 3. Screenings durch XhoI/ EcoRI Restriktionsenzym- Verdau



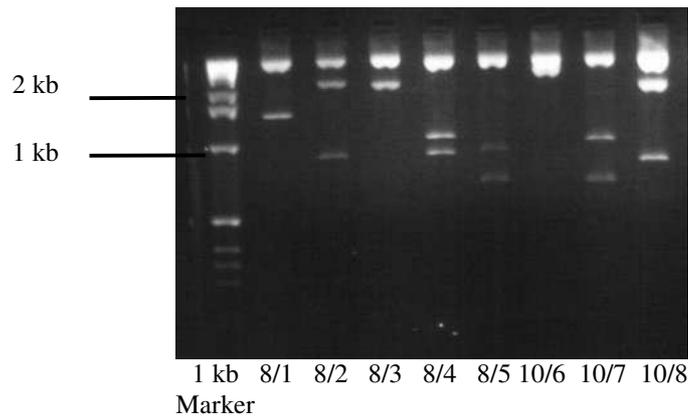
**Abb. 6.2.1:** Inserts der positiven Klone des 3. Screenings, die mittels XhoI/ EcoRI Verdau aus dem Phagen- Vektor geschnitten wurden. Hier ist der Klon 7/1 dargestellt. Die Buchstaben bezeichnen die Plaques, die nach der dritten Plattierung gepickt wurden.



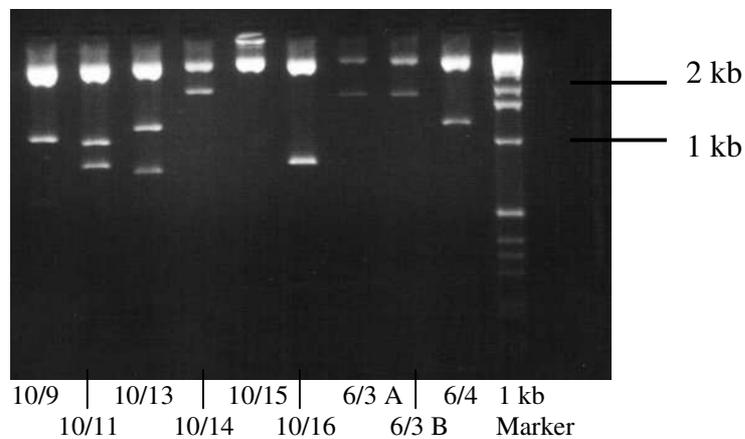
**Abb. 6.2.2:** Inserts der positiven Klone des 3. Screenings, die mittels XhoI/ EcoRI Verdau aus dem Phagen- Vektor geschnitten wurden. Hier ist der Klon 9/1 dargestellt. Die Buchstaben bezeichnen die Plaques, die nach der dritten Plattierung gepickt wurden.



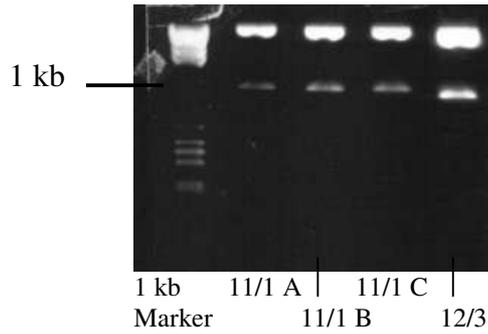
**Abb. 6.2.3:** Inserts der positiven Klone des 3. Screenings, die mittels XhoI/ EcoRI Verdau aus dem Phagen- Vektor geschnitten wurden. Hier ist der Klon 9/2 dargestellt. Die Buchstaben bezeichnen die Plaques, die nach der dritten Plattierung gepickt wurden.



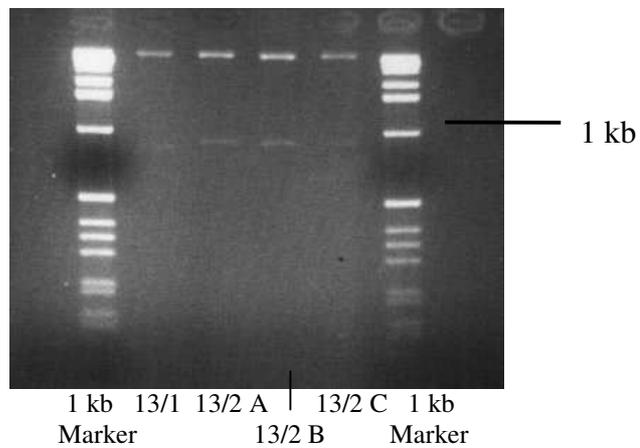
**Abb. 6.2.4:** Inserts der positiven Klone des 3. Screenings, die mittels XhoI/ EcoRI Verdau aus dem Phagen- Vektor geschnitten wurden. Hier sind die Klone 8/1 bis 8/5 und die Klone 10/6 bis 10/8 dargestellt.



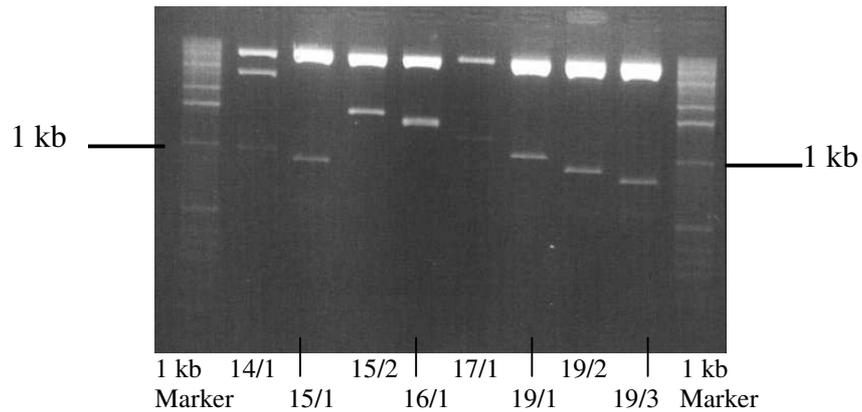
**Abb. 6.2.5:** Inserts der positiven Klone des 3. Screenings, die mittels XhoI/ EcoRI Verdau aus dem Phagen- Vektor geschnitten wurden. Hier sind die Klone 10/9, 10/11, 10/13 bis 10/16 und die Klone 6/3 und 6/4 dargestellt. Die Buchstaben bezeichnen die Plaques, die nach der dritten Plattierung gepickt wurden.



**Abb. 6.2.6:** Inserts der positiven Klone des 3. Screenings, die mittels XhoI/ EcoRI Verdau aus dem Phagen- Vektor geschnitten wurden. Hier sind die Klone 11/1 und 12/3 dargestellt. Die Buchstaben bezeichnen die Plaques, die nach der dritten Plattierung gepickt wurden.



**Abb. 6.2.7:** Inserts der positiven Klone des 3. Screenings, die mittels XhoI/ EcoRI Verdau aus dem Phagen- Vektor geschnitten wurden. Hier sind die Klone 13/1 und 13/2 dargestellt. Die Buchstaben bezeichnen die Plaques, die nach der dritten Plattierung gepickt wurden.



**Abb. 6.2.8:** Inserts der positiven Klone des 3. Screenings, die mittels XhoI/ EcoRI Verdau aus dem Phagen- Vektor geschnitten wurden. Hier sind die Klone 14/1, 15/1, 15/2, 16/1, 17/1 und die Klone 19/1 bis 19/3 dargestellt. Die Buchstaben bezeichnen die Plaques, die nach der dritten Plattierung gepickt wurden.

### 6.3 Sequenzen der identifizierten Inserts

Die folgenden Sequenzen wurden in die Genbank mit Hilfe des Zugangs von BankIt eingestellt. Angegeben sind hier die Eingangsnummern, unter denen die Sequenzen in der Gen- Datenbank von NCBI zu finden sind.

1/1 = 592891

1/2 = 592088

1/3 = 592524

5/1 = 592520

5/2 = 592528

6/3 = 534816

6/4 = 534818  
7/1 = 592530  
8/1 = 534636  
8/2 = 543535  
8/3 = 534637  
8/4 = 534640  
8/5 = 534814  
9/1 = 534816  
9/2 = 592524  
10/6 = 592520  
10/7 = 593207  
10/8 = 593211  
10/9 = 592540  
10/11 = 593213  
10/13 = 592543  
10/14 = 593215  
10/15 = 544081  
10/16 = 592534  
11/1 = 593205  
12/3 = 615121  
13/1 = 592514  
13/2 = 592532  
14/1 = 615123  
15/1 = 623092  
15/2 = 623094  
16/1 = 615127  
17/1 = 592518  
19/1 = 623096  
19/2 = 615131  
19/3 = 615133

**6.4 Primärdaten des Screenings der Antigen- Klone mit Seren von gesunden Probanden, NHL- Patienten, Tumor- Patienten und Hodgkin- Patienten (vergl. 3.3.3)**

Gesunde Probanden:	Antigene				
	Ran BP2	RBP-Jk	Klon p564C2063	RBP1	Antigen No.55
Jürgen	positiv	positiv		positiv	
Andreas	positiv	<i>negativ</i>		positiv	
Marc	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	positiv	positiv
Olli	positiv	<i>negativ</i>	positiv	positiv	<i>negativ</i>
Sabine	<i>negativ</i>		positiv	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>
Nini	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	positiv	<i>negativ</i>
Lena	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	positiv	positiv	<i>negativ</i>
Peter	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>			<i>negativ</i>
Karin	<i>negativ</i>	positiv	<i>negativ</i>		positiv
Clemens	positiv	<i>negativ</i>	positiv		positiv
Nadia	<i>negativ</i>	positiv	positiv	positiv	<i>negativ</i>
Julia	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>
Katja	<i>negativ</i>	positiv	positiv	positiv	<i>negativ</i>
Teresa	<i>negativ</i>				positiv

**Tabelle 6.1:** Ergebnisse der Inkubation einer Reihe von identifizierten Antigenen mit Seren gesunder Probanden

Gesunde Probanden:	Antigene				
	Klon RP1-144C9	hbrm	Klon RP11432N13	CYN2	cobW
Olli	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>
Marc	positiv	<i>negativ</i>	positiv	positiv	<i>negativ</i>
Nadia	<i>negativ</i>	positiv	positiv	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>
Nini	positiv	<i>negativ</i>	positiv	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>
Katja	positiv	positiv	positiv	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>
Julia	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	positiv	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>
Sabine	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>
Lena	positiv	<i>negativ</i>	positiv	positiv	positiv
Peter	positiv	positiv	positiv	positiv	<i>negativ</i>
Karin	positiv	positiv	positiv	positiv	<i>negativ</i>
Clemens	positiv	positiv	positiv	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>
Teresa	positiv	positiv	positiv	positiv	<i>negativ</i>

**Tabelle 6.2:** Ergebnisse der Inkubation einer Reihe von identifizierten Antigenen mit Seren gesunder Probanden

Gesunde Prob.:	Antigene					
	Inorganische Pyrophosphat.	SNF2a	Mitochond. Sequenz	NY-CO-1	AMP deamin.	HIRA protein
Olli	positiv	positiv	<i>Negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	positiv
Marc	positiv	positiv	positiv	<i>negativ</i>	positiv	positiv
Nadia	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>
Nini	<i>negativ</i>	positiv	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>
Katja	positiv	<i>negativ</i>	positiv	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	positiv
Julia	positiv	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	positiv
Sabine	positiv	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>
Lena	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
Peter	positiv	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>
Karin	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
Clemens	positiv	positiv	positiv	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	positiv
Teresa	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv

**Tabelle 6.3:** Ergebnisse der Inkubation einer Reihe von identifizierten Antigenen mit Seren gesunder Probanden

Gesunde Probanden:	Antigene				
	p40	MCM5	Rabaptin-4	Klon KIAA0663	Klon RP4- 670F13
Olli	positiv	positiv	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>
Marc	positiv	<i>negativ</i>	positiv	positiv	positiv
Nadia	positiv	positiv	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>
Nini	positiv	positiv	positiv	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>
Katja	positiv	positiv	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>
Julia	positiv	positiv	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>
Sabine	positiv	positiv	positiv	positiv	<i>negativ</i>
Lena	positiv	positiv	positiv	<i>negativ</i>	positiv
Peter	positiv	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	positiv	<i>negativ</i>
Karin	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
Clemens	positiv	positiv	positiv	positiv	<i>negativ</i>
Teresa	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv

**Tabelle 6.4:** Ergebnisse der Inkubation einer Reihe von identifizierten Antigenen mit Seren gesunder Probanden

Tumorpatienten:	Antigene			
	Ran BP2	RBP- Jk	Klon p564C2063	RBP1
Mamma Ca 1	positiv	positiv	positiv	positiv
Bronchial Ca 1	positiv	positiv	positiv	positiv
Mamma Ca 2	positiv	positiv	positiv	positiv
Mamma Ca 3	positiv	positiv	<i>negativ</i>	positiv
Mamma Ca 4	positiv	positiv	positiv	positiv
Hoden Ca 1	positiv	positiv	positiv	positiv
Mamma Ca 5	positiv	positiv	positiv	positiv
Mamma Ca 6	positiv	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>

**Tabelle 6.5:** Ergebnisse der Inkubation einer Reihe von identifizierten Antigenen mit Seren verschiedener Tumorpatienten

Tumorpatienten:	Antigene				
	Antigen No.55	cobW	NY-CO-1	AMP-Deamin.	Klon RP4-670F13
MammaCa 1	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
MammaCa 2	positiv	positiv	positiv	<i>negativ</i>	positiv
MammaCa 3	positiv	<i>negativ</i>	positiv	positiv	positiv
MammaCa 4	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
MammaCa 5	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
Mamma Ca 6	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	positiv	<i>negativ</i>	positiv
Hoden Ca 1	positiv	positiv	positiv	<i>negativ</i>	positiv
Bronchial Ca 1	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
Rectum Ca 1	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
Pankreas Ca 1	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
Magen Ca 1	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
Pankreas Ca 2	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv

**Tabelle 6.6:** Ergebnisse der Inkubation einer Reihe von identifizierten Antigenen mit Seren verschiedener Tumorpatienten

NHL- Patienten:	Antigene			
	Ran BP2	RBP- Jk	Klon p564C2063	RBP1
NHL 1	positiv	positiv	positiv	positiv
NHL 2	positiv	positiv	positiv	positiv
NHL 3	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>
NHL 4	positiv	positiv	positiv	positiv
NHL 5	positiv	positiv	<i>negativ</i>	positiv
NHL 6	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>
NHL 7	positiv	positiv	positiv	positiv

**Tabelle 6.7:** Ergebnisse der Inkubation einer Reihe von identifizierten Antigenen mit Seren verschiedener NHL- Patienten

NHL- Patienten:	Antigene				
	Antigen No.55	cobW	NY-CO-1	AMP- Deaminase	Klon RP4- 670F13
NHL 1	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
NHL 2	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
NHL 3	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>
NHL 4	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
NHL 5	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
NHL 6	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>
NHL 7	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
NHL 8	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
NHL 9	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
NHL 10	positiv	<i>negativ</i>	positiv	<i>negativ</i>	positiv
NHL 11	<i>negativ</i>	positiv	<i>negativ</i>	positiv	positiv
NHL 12	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	positiv	positiv	<i>negativ</i>

**Tabelle 6.8:** Ergebnisse der Inkubation einer Reihe von identifizierten Antigenen mit Seren verschiedener NHL- Patienten

Hodgkin-Patienten:	Antigene			
	Ran BP2	RBP- Jk	Klon p564C2063	RBP1
1580	positiv	positiv	<i>negativ</i>	positiv
1647	positiv	positiv	positiv	<i>negativ</i>
1745	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>
1595	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>
1601	positiv	positiv	positiv	positiv
1744		positiv	positiv	positiv
1649	positiv	positiv	positiv	positiv
1753	positiv	positiv	<i>negativ</i>	positiv
1577	positiv		positiv	positiv
1594	positiv	positiv		
1597	positiv	positiv	positiv	positiv
1690	positiv	positiv		
1743	<i>negativ</i>	positiv		
1632	positiv	<i>negativ</i>		
1576	positiv			

**Tabelle 6.9:** Ergebnisse der Inkubation einer Reihe von identifizierten Antigenen mit Seren verschiedener Hodgkin- Patienten

Hodgkin-Patienten:	Antigene				
	Antigen No.55	cobW	NY-CO-1	AMP-Deaminase	Klon RP4-670F13
1580	<i>negativ</i>			positiv	
1647	positiv	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>
1745		positiv	<i>negativ</i>		positiv
1595	positiv	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>		positiv
1601	positiv	positiv	positiv	positiv	<i>negativ</i>
1744		positiv			
1649	positiv	positiv	positiv	positiv	<i>negativ</i>
1753	positiv		<i>negativ</i>	positiv	positiv
1577	positiv	positiv	positiv	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>
1594	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	positiv	positiv	positiv
1597	<i>negativ</i>	positiv	<i>negativ</i>	positiv	
1690	positiv	positiv	positiv	positiv	<i>negativ</i>
1743	<i>negativ</i>	positiv	positiv	positiv	<i>negativ</i>
1632	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	positiv	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>
1576				positiv	<i>negativ</i>

**Tabelle 6.10:** Ergebnisse der Inkubation einer Reihe von identifizierten Antigenen mit Seren verschiedener Hodgkin- Patienten

## 7. Literaturverzeichnis

- Arbor, A. Ann Arbor Classification: Symposium on staging of Hodgkin's disease. *Cancer Res.* (1979), 31: 1707- 1870
- Behring, E.K. Über das Zustandekommen der Diphtherie- Immunität und der Tetanus-Immunität bei Tieren. (1890) *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 14: 1113- 1114
- Berek C, Milstein C. Mutation drift and repertoire shift in the maturation of the immune response. *Immunol Rev.* (1987), 96: 23-41
- Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* (1979), 7(6): 1513-1523
- Bogen B. Peripheral T cell tolerance as a tumor escape mechanism: deletion of CD4+ T cells specific for a monoclonal immunoglobulin idiotype secreted by a plasmacytoma. *Eur J Immunol.* (1996), 26(11): 2671-2679
- Boon T, van der Bruggen P. Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J Exp Med.* (1996), 183(3): 725-729
- Boon T, Coulie P, Marchand M., et al. Genes coding for Tumor Rejection Antigens. *Important Advances in Oncology* (1994),12: 53-69
- Bost KL, Bieligk SC, Jaffe BM. Lymphokine mRNA expression by transplantable murine B lymphocytic malignancies. Tumor-derived IL-10 as a possible mechanism for modulating the anti-tumor response. *J Immunol.* (1995), 154(2): 718-729
- Boulnois GJ, Roberts IS, Hodge R, et al. Analysis of the K1 capsule biosynthesis genes of *Escherichia coli*: definition of three functional regions for capsule production. *Mol Gen Genet.* (1987), 208(1-2): 242-246
- Burke JS. Hodgkin's disease: histopathology and differential diagnosis. *Neoplastic hematopathology* (1992) Baltimore (Williams & Wilkins): 497- 533
- Canellos GP, Anderson JR, Propert KJ, et al. Chemotherapy of advanced Hodgkin's disease with MOPP, ABVD, or MOPP alternating with ABVD. *N Engl J Med.* (1992), 327(21): 1478-1484
- Cao J, Gao T, Giuliano AE, Irie RF. Recognition of an epitope of a breast cancer antigen by human antibody. *Breast Cancer Res Treat.* (1999), 53(3): 279-290
- Chen YT. Cancer vaccine: identification of human tumor antigens by SEREX. *Cancer J.* (2000), 6 Suppl 3: S208-217
- Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, et al. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1997), 94(5): 1914-1918

- Chen W, Yu Y, Shao C, et al. Enhancement of antigen-presenting ability of B lymphoma cells by immunostimulatory CpG-oligonucleotides and anti-CD40 antibody. *Immunol Lett.* (2001), 77(1): 17-23
- Clark JI, Weiner LM. Biologic treatment of human cancer. *Curr Probl Cancer.* (1995), 19(4): 185-262
- Cohen SS. Further discussion of ineffective single agents in combination chemotherapy. *Cancer Chemother Rep.* (1975), 59(2 Pt 1): 259-260
- Coiffier B, Haioun C, Ketterer N, et al. Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) for the treatment of patients with relapsing or refractory aggressive lymphoma: a multicenter phase II study. *Blood.* (1998), 92(6):1927-1932
- Croce MV, Price MR, Segal-Eiras A. Expression of monoclonal-antibody-defined antigens in fractions isolated from human breast carcinomas and patients' serum. *Cancer Immunol Immunother.* (1995), 40(2):132-137
- Crouzet J, Levy-Schil S, Cameron B, et al. Nucleotide sequence and genetic analysis of a 13.1-kilobase-pair *Pseudomonas denitrificans* DNA fragment containing five cob genes and identification of structural genes encoding Cob(I)alamin adenosyltransferase, cobyrinic acid synthase, and bifunctional cobinamide kinase-cobinamide phosphate guanylyltransferase. *J Bacteriol.* (1991), 173(19): 6074-6087
- Davis TA, White CA, Grillo-Lopez AJ, et al. Single-agent monoclonal antibody efficacy in bulky non-Hodgkin's lymphoma: results of a phase II trial of rituximab. *J Clin Oncol.* (1999), 17(6): 1851-1857
- de Gast GC, van de Winkel JG, Bast BE. Clinical perspectives of bispecific antibodies in cancer. *Cancer Immunol Immunother.* (1997), 45(3-4): 121-123
- Diehl V, Franklin J, Hasenclever D, et al. BEACOPP: a new regimen for advanced Hodgkin's disease. German Hodgkin's Lymphoma Study Group. *Ann Oncol.* (1998), 9 Suppl 5: S67-71
- Dorfman DM, Schultze JL, Shahsafaei A, et al. In vivo expression of B7-1 and B7-2 by follicular lymphoma cells can prevent induction of T-cell anergy but is insufficient to induce significant T-cell proliferation. *Blood.* (1997), 90(11): 4297-4306
- Drexler HG, Minowada J. Hodgkin's disease derived cell lines: a review. *Hum Cell.* (1992), 5(1): 42-53
- Ehrlich, P. On Immunity with Special Reference to Cell Life. (1900) *Proc. R. Soc.* 66 : 424- 448
- Fischer R.A. Statistical Methods for research workers. Edinburgh (Oliver& Boyd) (1932)

- Geyer M, Assheuer R, Klebe C, et al. Conformational states of the nuclear GTP-binding protein Ran and its complexes with the exchange factor RCC1 and the effector protein RanBP1. *Biochemistry*. (1999), 38(35): 11250-11260
- Goldenberg DM. The role of radiolabeled antibodies in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: the coming of age of radioimmunotherapy. *Crit Rev Oncol Hematol*. (2001), 39(1-2): 195-201
- Goldenberg DM, Larson SM, Reisfeld RA, Schlom J. Targeting cancer with radiolabeled antibodies. *Immunol Today*. (1995), 16(6): 261-264
- Haluska FG, Brufsky AM, Canellos GP. The cellular biology of the Reed-Sternberg cell. *Blood*. (1994), 84(4): 1005-1019
- Hamaguchi Y, Matsunami N, Yamamoto Y, Honjo T. Purification and characterization of a protein that binds to the recombination signal sequence of the immunoglobulin J kappa segment. *Nucleic Acids Res*. (1989), 17(22): 9015- 9026
- Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*. (1994), 84(5): 1361-1392
- Hartmann F, Renner C, Jung W, Pfreundschuh M. Anti-CD16/CD30 bispecific antibodies as possible treatment for refractory Hodgkin's disease. *Leuk Lymphoma*. (1998), 31(3-4): 385-392
- Hartmann F, Renner C, Jung W, Sahin U, Pfreundschuh M. Treatment of Hodgkin's disease with bispecific antibodies. *Ann Oncol*. (1996), 7 Suppl 4:143-146
- Healy RJ, Amory HT, Friedmann M. Hodgkin's disease - a review of two hundred and sixteen cases. *Radiology* (1955), 64: 51 - 55
- Ho WY, Cooke MP, Goodnow CC, Davis MM. Resting and anergic B cells are defective in CD28-dependent costimulation of naive CD4+ T cells. *J Exp Med*. (1994), 179(5): 1539-1549
- Hodgkin T. On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen. *Med. Chir. Trans*. (1832), 17: 68- 114
- Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, et al. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med*. (1996), 2(1): 52-58
- Hudson MM, Poquette CA, Lee J, et al. Increased mortality after successful treatment for Hodgkin's disease. *J Clin Oncol*. (1998) Nov;16(11), p.3592-3600
- Jaeger E, Bernhard H, Romero P, et al. Generation of cytotoxic T-cell responses with synthetic melanoma-associated peptides in vivo: implications for tumor vaccines with melanoma-associated antigens. *Int J Cancer*. (1996), 66(2): 162-169

- Jaeger E, Chen YT, Drijfhout JW, et al. Simultaneous Humoral and cellular Immune response against Cancer-Testis Antigen NY-ESO-1: Definition of Human Histocompatibility Leucocyte Antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *J. Exp. Med.* (1998), 187(2): 265- 270
- Jeng KC, Liu MT, Lan JL, et al. Collagen induces cytokine production by synovial fluid mononuclear cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Lett.* (1995), 45(1-2): 13-17
- Kanzler, H. ; Hansmann, M.L.; Kapp, U., et al. Molekular Single Cell Analysis Demonstrates the Derivation of a Peripheral Blood Derived Cell Line L1236 from the Hodgkin/ Reed Sternberg Cells of a Hodgkin's Lymphoma Patient. (1996) *Blood*, Vol. 87, No. 8: 3429- 3436
- Kaplan HS. Hodgkin's disease: unfolding concepts concerning its nature, management and prognosis. *Cancer.* (1980), 45(10): 2439-2474
- Kay NE, Kaplan ME. Defective T cell responsiveness in chronic lymphocytic leukemia: analysis of activation events. *Blood.* (1986), 67(3): 578-581
- Kindt, T.J.; Capra, J.D. *The Antibody Enigma.* New York (Plenum Press) (1984)
- Knight, S.C.; Stagg, A.J. Antigen presenting Cell Types. (1993) *Curr.Opin. Immunol.* 5: 374- 382
- Korsmeyer, S.J. B- Lymphoid Neoplasms. (1993) *Adv. Intern. Med.* 33: 1- 15
- Krieg J, Oelgeschlager M, Janknecht R, Luscher B. High affinity DNA binding of native full length c-Myb and differential proteolytic sensitivity of its N- and C-terminal domains. *Oncogene.* (1995), 10(11): 2221-2228
- Küppers R, Willenbrock K, Rajewsky K, Hansmann ML. Detection of clonal lambda light chain gene rearrangements in frozen and paraffin-embedded tissues by polymerase chain reaction. *Am J Pathol.* (1995), 147(3): 806-814
- Küppers R, Rajewsky K, Zhao M, et al. Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1994), 91(23): 10962-10966
- Küppers R, Zhao M, Hansmann ML, Rajewsky K. Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *EMBO J.* (1993),12(13): 4955-4967
- Landsteiner, K. *The Specificity of Seriological Reaktionen.* 3. Aufl. Boston (Harvard University Press) (1964)
- Lassila O, Vainio O, Matzinger P. Can B cells turn on virgin T cells? *Nature.* (1988), 334(6179): 253-255

- Lazarus AH, Crow AR, Freedman J, Blanchette V, Hannach B. Inhibition of a secondary human alloimmune response via the soluble active component of CD154 (CD40L) in severe combined immune-deficient mice engrafted with human lymphocytes. *Transfusion*. (1999), 39(8): 818-823
- Lenhard RE Jr, Prentice RL, Owens AH Jr, et al. Combination chemotherapy of the malignant lymphomas: a controlled clinical trial. *Cancer*. (1976), 38(3): 1052-1059
- Linch DC, Winfield D, Goldstone AH, et al. Dose intensification with autologous bone-marrow transplantation in relapsed and resistant Hodgkin's disease: results of a BNLI randomised trial. *Lancet*. (1993), 341(8852): 1051-1054
- Matsunami N, Hamaguchi Y, Yamamoto Y, et al. A protein binding to the J kappa recombination sequence of immunoglobulin genes contains a sequence related to the integrase motif. *Nature*. (1989), 342(6252): 934- 937
- McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK, et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol*. (1998),16(8): 2825-2833
- Miller JF, Heath WR. Self-ignorance in the peripheral T-cell pool. *Immunol Rev*. (1993), 133: 131-150
- Moore GE, Gerner RE, Franklin HA. Culture of normal human leukocytes. *JAMA*. (1967), 199(8): 519-524
- Neefjes, J.J.; Mombourg, F. Cell Biology of Antigen Presentation. (1993), *Curr. Opin. Immunol*. 5: 27- 34
- Obata Y, Takehashi T, Sakamoto J, et al. Serex analysis of gastric cancer antigens. *Cancer Chemother. Pharmacol*. (2000), 46 (suppl.): S37- S42
- Ochs RL, Stein TW Jr, Chan EK, et al. cDNA cloning and characterization of a novel nucleolar protein. *Mol Biol Cell*. (1996), 7(7): 1015-1024
- Ohannesian DW, Lotan D, Thomas P, et al. Carcinoembryonic antigen and other glycoconjugates act as ligands for galectin-3 in human colon carcinoma cells. *Cancer Res*. (1995), 55(10): 2191-2199
- Old LJ. Cancer immunology: the search for specificity. *Cancer Res*. (1981), 41(2): 361-375
- Onrust SV, Lamb HM, Balfour JA. Rituximab. *Drugs*. (1999), 58(1):79-88; discus.: 89-90
- Pelicci PG, Knowles DM, Della-Favera RJ, et al. Lymphoid tumors displaying rearrangements of both immunoglobulin and T cell receptor genes. *J.Exp.Med*. (1985), 162: 1015- 1024
- Raab, G.; Eiermann, W. Trastuzumab, ein neuer Behandlungsansatz beim Mammakarzinom. (2001), *Internist* 42: 835- 842

- Reed D.M. On the pathological changes in Hodgkin`s disease. Johns Hopkin` Hosp. Rep. (1902), 10: 133- 196
- Renner C, Hartmann F, Pfreundschuh M. The future of monoclonal antibody engineering. Ann Hematol. (2001), 80 Suppl 3: B127-129
- Renner C, Kubuschok B, Trumper L, Pfreundschuh M. Clinical approaches to vaccination in oncology. Ann Hematol. (2001), 80(5): 255-266
- Reth, M.B. B Cell Antigen Receptors. (1994), Curr. Opin. Immunol. 6 : pp. 3
- Rosenberg SA. A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. Immunity. (1999),10(3): 281-287
- Sahin U, Tureci O, Pfreundschuh M. Serological identification of human tumor antigens. Curr Opin Immunol. (1997), 9(5): 709-716
- Sahin U, Tureci O, Schmitt H, et al. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. Proc Natl Acad Sci U S A. (1995), 92(25): 11810-11813
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A. (1977), 74(12): 5463-5467
- Scanlan MJ, Chen YT, Williamson B, et al. Characterization of human colon cancer antigens recognized by autologous antibodies. Int J Cancer. (1998), 76(5): 652-658
- Schatz, D.G.; Oettinger, M.A.; Schlissel, M.S. Molekular Biology and Regulation. (1992), Ann. Rev.Immunol. 10: pp. 359
- Schnell, R.; Hiddemann, W.; Diehl, V.; Engert, A. Klinischer Einsatz monoklonaler Antikörper bei malignen Lymphomen. (2001), Internist 42: 815- 826
- Schultze JL, Vonderheide RH. From cancer genomics to cancer immunotherapy:toward second-generation tumor antigens. Trends in Immunol. (2001), 22(9): 516- 523
- Schultze JL, Maecker B, von Bergwelt-Baildon MS, et al. Tumour immunotherapy: new tools, new treatment modalities and new T-cell antigens. Vox Sang. (2001), 80(2): 81-89
- Schultze JL, Nadler LM. T cell mediated immunotherapy for B cell lymphoma. J Mol Med. (1999), 77(3): 322-331
- Schultze JL. Why do B cell lymphoma fail to elicit clinically sufficient T cell immune responses? Leuk Lymphoma. (1999), 32(3-4): 223-236
- Schultze JL, Gribben JG. Minimal residual disease in non-Hodgkin's lymphoma. Biomed Pharmacother. (1996), 50(9): 451-458

- Scott AM, Welt S. Antibody-based immunological therapies. *Curr Opin Immunol.* (1997), 9(5): 717-722
- Seki T, Hayashi N, Nishimoto T. RCC1 in the Ran pathway. *J Biochem (Tokyo).* (1996), 120(2): 207-214
- Siegall CB. Targeted toxins as anticancer agents. *Cancer.* (1994), 74(3 Suppl): 1006-1012
- Silverstein, A.M. *History of Immunology.* 1.Aufl. London (Academic Press) (1989)
- Sherman LA, Morgan DJ, Nugent CT, et al. Self-tolerance and the composition of T cell repertoire. *Immunol Res.* (2000), 21(2-3): 305-313
- Staveley O.C.K., Sotomayor J., Montgomery I., et al. Induction of an antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1998), 95: 1178- 1183
- Sternberg C. Über eine eigenartige unter dem Bilde der Pseudoleukämie verlaufende Tuberkulose des lymphatischen Apparates. *Z. Heilkunde* (1898), 19: 21- 90
- Sweetenham J. Trials in advanced Hodgkin's disease: asking the right questions at the right time. *Br J Cancer.* (2001), 84(10):1291-1292
- Sweetenham JW, Taghipour G, Milligan D, et al. High-dose therapy and autologous stem cell rescue for patients with Hodgkin's disease in first relapse after chemotherapy: results from the EBMT. Lymphoma Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* (1997), 20(9): 745-752
- Thangavelu M, Le Beau MM. Chromosomal abnormalities in Hodgkin's disease. *Hematol Oncol Clin North Am.* (1989), 3(2): 221-236
- Traversari C, van der Bruggen P, Van den Eynde B, et al. Transfection and expression of a gene coding for a human melanoma antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes. *Immunogenetics.* (1992), 35(3): 145-152
- Türeci O, Sahin U, Pfreundschuh M. Serological analysis of human tumor antigens: molecular definition and implications. *Mol Med Today.* (1997), 3(8): 342-349
- Türeci O, Schmitt H, Fadle N, Pfreundschuh M, Sahin U. Molecular definition of a novel human galectin which is immunogenic in patients with Hodgkin's disease. *J Biol Chem.* (1997), 272(10): 6416-6422
- Türeci O, Sahin U, Schobert I, et al. 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.* (1996), 56(20): 4766-4772
- Vonderheide RH, Dutcher JP, Anderson JE, et al. Phase I study of recombinant human CD40 ligand in cancer patients. *J Clin Oncol.* (2001), 19(13): 3280- 3287

- Wolf J, Kapp U, Bohlen H, et al. Peripheral blood mononuclear cells of a patient with advanced Hodgkin's lymphoma give rise to permanently growing Hodgkin-Reed Sternberg cells. *Blood*. (1996), 87(8): 3418-3428
- Yang RY, Hsu DK, Liu FT. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (1996), 93(13): 6737-6742
- Yee C, Gilbert MJ, Riddell SR, et al. Isolation of tyrosinase-specific CD8+ and CD4+ T cell clones from the peripheral blood of melanoma patients following in vitro stimulation with recombinant vaccinia virus. *J Immunol*. (1996), 157(9): 4079-4086
- Yuen AR, Horning SJ. Recent advances in the treatment of Hodgkin's disease. *Curr Opin Hematol*. (1997), 4(4): 286-290

## **Abstract**

Hodgkin's disease is a complex lymphoproliferative malign disorder where the malignant cells, the mononuclear Hodgkin and the bi-or polynuclear Reed Sternberg cells, comprise of only 0,1% to 1% of the total population of cells in the affected tissue.

Currently patients are treated with a combination therapy consisting of Radio- and Chemotherapy. In addition to numerous side effects, not all patients show complete remission and studies testing a therapy with bispecific antibodies have not yet shown favourable results.

The screening of cDNA expression libraries derived from human tumors with autologous antibody (SEREX) has proven to be a powerful method for defining the structure of tumor antigens recognised by the humoral immune system, while efforts to identify such antigens by the analysis of T-cell repertoire have yielded few antigens.

Several specific antigens have been identified in a host of tumors, suggesting that many human tumors elicit multiple immune responses in the autologous host.

The frequency of human tumors, which can be readily defined at the molecular level, facilitates the identification of T-cell dependent antigens and provides basis for peptide and gene-therapeutic vaccine strategies.

In the present study we screened a L1236 cDNA expression library with Sera from different Hodgkin patients. Subsequently the identified Antigens were tested against sera of other Hodgkin patients, patients with other lymphomas (NHL), patients with other tumors (e.g. Testis-, colon- and breastcancer) and healthy individuals. We have identified several possibly Hodgkin- associated Antigens, such as the RanBP2 (a nucleolar porecomplex protein) and RBP-Jκ (a protein that has its role during V-D-J recombination). Furthermore we discovered a possible tumor- associated antigen, the protein of the clone RP4-670F13, which is a protein located in the cytoplasm with a role similar to the Galektines. These proteins play their part in cell adhesion, activation and proliferation of immunocompetent cells and programmed cell death. In addition we have identified a possible universal tumorantigen. It is a cytoplasmic protein that has its function in cell metabolism and is overexpressed in malignant tissue. All of these interesting proteins need to be further investigated on to define their possible role in an Antibody based therapy.

## **Zusammenfassung**

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels der SEREX- Methode versucht Hodgkin-spezifische oder Hodgkin- assoziierte Antigene zu identifizieren.

Zu diesem Zweck wurde eine  $\lambda$ - Phagen- cDNA- Expressionsbank aus der Hodgkin-Zelllinie L1236 hergestellt. Die Identität der etablierte Zelllinie L1236 entspricht hierbei einer definierten, reinen Hodgkin Reed- Sternberg Zellpopulation.

Das SEREX- System verwendet für das angeschlossene Screening von cDNA- Expressionsbanken das Serum der zugehörigen Patienten. Hierbei wurden Seren von Patienten mit fortgeschrittenen und frühen Erkrankungsstadien, die sich zumeist vor ihrer Therapie befanden, für das Screening eingesetzt. Die Auswahl der Patienten stellt ein repräsentatives Hodgkin- Patientenkollektiv dar.

Die im initialen Screening als positiv erkannten, cDNA- enthaltenden Phagen wurden über zwei weitere Screening- Schritte aufgereinigt und deren extrahierte cDNA einer Sequenzierung unterzogen. Es wurden NCBI- Datenbankabfragen (BLAST) mit der Nukleotidsequenz durchgeführt, um Homologien zu bereits bekannten Genen zu ermitteln.

Auf diese Weise konnten 36 Proteine identifiziert werden. Es konnte über einen Homologievergleich mit der Datenbank NCBI festgestellt werden, dass es sich bei den 36 ermittelten Antigenreaktionen um 21 unterschiedliche Proteine handelt. 12 der gefundenen Proteine sind nukleären Ursprungs, fünf der Proteine spielen im Zytoplasma eine Rolle und vier der gefundenen Sequenzhomologien konnte sogar noch keine dokumentierte Funktion zugewiesen werden.

Um festzustellen welche Patienten spezifische Antikörper gegen Morbus Hodgkin bilden, wurden die Klone mit weiteren Hodgkin- Patientenserum inkubiert. Als Referenzgruppe wurden die Seren gesunden Probanden eingesetzt. Sieben der gefundenen Antigene zeigten hierbei eine zu vernachlässigende Reaktivität gegenüber den gesunden Probanden.

Zur Überprüfung der Antigene und ihrer möglichen, relevanten Rolle bei Non-Hodgkin- Lymphomen oder bei einer Auswahl von Tumorerkrankungen, wurden die Klone ebenfalls gegen Non- Hodgkin- Lymphomen- Seren und Seren verschiedener Tumorpatienten (vorwiegend Mammakarzinom, aber auch Hoden-, Pankreas-, Magen-, Rektum- und Bronchialkarzinom Patienten) getestet.

Um festzustellen ob ein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl der Serumreaktionen der Hodgkin-, Tumor- oder NHL- Patienten und der gesunden

Referenzgruppe besteht, wird hier der Fischer „exakter Test“ (Fischer R.A., 1932) auf die bei den vorher genannten Versuchen erhaltenen Ergebnisse angewendet.

Als besonders interessante Antigene stellten sich hierbei unter anderem die Antigene RanBP2, RBP-J $\kappa$  (Serumreaktionen signifikant beim Morbus Hodgkin), das cobW ähnliche Protein (Serumreaktionen hoch signifikant bei allen untersuchten Patientengruppen) und das Protein des Klons RP4-670F13 (Serumreaktionen hoch signifikant bei der Tumor- Patientengruppe) heraus. Die Antigene RanBP2 und RBP-J $\kappa$ , bei denen das Erstere ein Porenkomplexprotein ist, bei dessen Fehlfunktion es zur vorzeitigen Initiation einer Zellteilung kommen kann und das Zweite, das bei der V-(D)-J Rekombination eine Rolle spielt und bei dessen Fehlfunktion es zu einer Herabsetzung der Vielfalt und Funktionalität der Antigenrezeptoren kommen kann, sind möglicherweise Hodgkin- Lymphom- spezifische Antigene. Weitere Untersuchungen in Bezug auf eine mögliche eingeschränkte Funktionalität im lymphatischen, erkrankten Gewebe sind jedoch nötig, um weitere Aussagen über ihre Relevanz beim Morbus Hodgkin zu treffen.

Als ein interessantes Protein im Hinblick auf ein Tumor- assoziiertes Antigen konnte in dieser Arbeit das Protein des Klons RP4-670F13 identifiziert werden. Das zytoplasmatische Protein könnte, da es einem Galektin ähnlich ist, bei der Adhäsion maligner Zellen, der Aktivierung und Proliferation von Immunzellen oder der Induktion des programmierten Zelltods eine Rolle spielen. Eine Untersuchung, ob dieses Protein in den verschiedenen Tumorgeweben überexprimiert vorliegt müsste als Folge dieser Arbeit unternommen werden, um einen weiteren wichtigen Hinweis zu erhalten, ob es sich bei dem Protein des Klons RP4-670F1 um ein Tumor- assoziiertes Antigen handelt.

Als ein weiteres interessantes Antigen, das ein universelles Tumorantigen sein könnte, wurde in dieser Arbeit das cobW ähnliche Protein identifiziert. Es scheint eine Rolle beim Zellstoffwechsel zu spielen, obwohl die genaue Funktion des Proteins noch nicht geklärt ist. Weitere anschließende Untersuchungen, ob und in welchem Ausmaß das Protein in erkranktem Gewebe überexprimiert vorliegt, würden weiter Aufschluss geben über seine Rolle als mögliches universelles Tumorantigen. Das cobW Protein ist in jedem Fall schon auf Grund der Serum- Ergebnisse ein interessanter Kandidat für weitere Nachforschungen im Hinblick auf eine mögliche T-Zell Aktivierung, die in einer auf Antigenen basierenden Therapie resultieren könnte.

## Danksagungen

Frau Prof. Dr. A.A. Noegel danke ich dafür, dass sie die Betreuung dieser Arbeit übernommen hat und für ihre freundliche Unterstützung.

Bei Prof. Dr. J.C. Brüning bedanke ich mich für die Erstellung eines Gutachtens zu meiner Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Wolf danke ich für die Bereitstellung des Themas und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Frau Dr. Andrea Staratschek- Jox danke ich für die wissenschaftliche Betreuung der Dissertation und für das kritische Lesen dieser Arbeit.

Herrn Dr. Oliver Gresch danke ich für die psychische Unterstützung während und nach der wissenschaftlichen Arbeit und für seine zahlreichen hilfreichen Ratschläge.

## Publikationsliste

Lautscham G, Mayrhofer S, Taylor G, Haigh T, Leese A, Rickinson A, Blake N. Processing of a multiple membrane spanning Epstein-Barr virus protein for CD8(+) T cell recognition reveals a proteasome-dependent, transporter associated with antigen processing-independent pathway.

J Exp Med. 2001;194(8):1053-68.

Lautscham G, Haigh T, Mayrhofer S, Taylor G, Croom-Carter D, Leese A, Gadola S, Cerundolo V, Rickinson A, Blake N. Identification of a TAP-independent, immunoproteasome-dependent CD8+ T-cell epitope in Epstein-Barr virus latent membrane protein 2.

J Virol. 2003;77(4):2757-61.

# Curriculum Vitae

Name: Sabine Mayrhofer

Wohnort: Münstereifelerstr. 51, 50937 Köln

Geburtsdatum und - ort: 22.06.1069 in Wels (A)

Staatsangehörigkeit: österreichische

Familienstand: verheiratet

## Schulischer Werdegang:

1975 – 1979	Grundschule an der DSB (Deutsche Schule Brüssel)
1979 – 1982	Gymnasium an der DSB
1982 – 1985	Humboldtgynasium (Bad Homburg, D)
1985 – 1989	Gymnasium an der DSB mit Abschluss

## Beruflicher Werdegang:

1989 – 1996	Diplomstudiengang Biologie an der Universität Salzburg (A), Fakultät für Biologie, Biophysik und Biochemie. Studienzweig Genetik (mit Spezialisierung auf Immunologie) Abschluss mit Auszeichnung
1994 – 1995	Diplomarbeit am Institut für Immunologie und Virologie (Würzburg, D) unter Leitung von Prof. Dr. A. Schimpl (Thema: T- Zell Aktivierung und Terminierung in IL-2 defizienten Mäusen)
1996 – 1998	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Krebsforschungsinstitut der Universität Birmingham, Medical School (Birmingham, GB) unter der Leitung von Prof. A.B. Rickinson (Thema: Prozessierung und T- Zell Präsentation des Epstein- Barr Virus assoziierten latenten Membranproteins 2)
1998 – 2001	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Hodgkin- Labor der Universität Köln, Abteilung für Onkologie unter der Leitung von Prof. V. Diehl und Prof. Jürgen Wolf (Thema: Detektion neuer, tumor- assoziierter Antikörper beim Morbus Hodgkin mittels SEREX ( <u>ser</u> ological identification of antigens by <u>r</u> ecombinant <u>e</u> xpression screening)
10/2001 – 1/2003	Wissenschaftlicher Außendienst bei Invitrogen GmbH
2/2003 – heute	Angestellte im Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (Bonn, D), Abteilung für Europäische und Internationale Zulassungsverfahren