

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Krebs	6
1.1.1	Tumorgenese.....	6
1.1.2	Krebs und das Immunsystem.....	8
1.2	Brustkrebs	10
1.2.1	Neue Therapiemöglichkeiten bei Brustkrebs	14
1.3	Tumorantigene	16
1.4	Das Brust Tumorantigen NY-BR-1	21
1.5	Zielsetzung der Arbeit	24
2	Material und Methoden	25
2.1	Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Chemikalien.....	25
2.1.1	Geräte	25
2.1.2	Puffer und Lösungen.....	26
2.1.3	Antikörper.....	26
2.1.4	Vektoren.....	27
2.1.5	Oligonukleotide.....	28
2.1.6	Bakterienstämme und Kulturbedingungen	31
2.1.7	Zelllinien	31
2.1.8	Patientenmaterial/Gewebeproben	32
2.1.9	Software/computergestützte Analysen	32
2.2	Methoden	33
2.2.1	Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> Zellen	33
2.2.2	Transformation kompetenter <i>E.coli</i> Zellen.....	33
2.2.3	Plasmidisolierung aus <i>E.coli</i>	34
2.2.4	DNA-Restriktion und Agarose-Gelelektrophorese	34
2.2.5	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	34
2.2.6	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten.....	34
2.2.7	Dephosphorylierung der 5'-Enden	34
2.2.8	Auffüllen 5'-überhängender Enden mit der T4 Polymerase.....	35
2.2.9	„Oligoannealing“	35
2.2.10	DNA-Ligation	35
2.2.11	Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	35
2.2.12	DNA-Amplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	35
2.2.13	Sequenzanalyse.....	36
2.2.14	RNA-Isolierung mit dem RNeasy Mini Kit.....	36
2.2.15	Reverse Transkription PCR (RT PCR).....	36
2.2.16	RACE-PCR.....	36

2.2.17	quantitative PCR („Real Time“ PCR Analyse)	37
2.2.18	„Northern-Blot“	37
2.2.19	Fixierung von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen	38
2.2.20	Synthese radioaktiv markierter DNA-Sonden	38
2.2.21	Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden	38
2.2.22	Heterologe Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	39
2.2.23	Reinigung von GST-Fusionsproteinen	39
2.2.24	Reinigung von His-Fusionsproteinen	40
2.2.25	Reinigung von Einschlusskörpern („Inclusion bodies“)	40
2.2.26	Proteinquantifizierung nach Bradford	40
2.2.27	SDS-PAGE und „Western Blot“	41
2.2.27.1	SDS-PAGE	41
2.2.27.2	„Western Blot“/„Immunoblot“	41
2.2.28	Entfernen von an Membranen gebundenen Antikörpern	42
2.2.29	Erzeugung polyklonaler Antikörperseren	42
2.2.30	Prä-Absorption polyklonaler Antiseren gegen GST-GFP-Protein	42
2.2.31	Kultivierung von Säugerzellen	43
2.2.32	Behandlung eukaryontischer Zellen mit Proteasomeninhibitoren	43
2.2.33	Transfektion eukaryontischer Zellen	43
2.2.34	Herstellung von Gesamtzellextrakten von adhärennten Zellen und Gewebeproben	44
2.2.35	Immunpräzipitation	45
2.2.36	Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen	45
2.2.37	Immunhistochemie	45
2.2.38	Fluoreszenzmikroskopie	46
2.2.39	Direkte und indirekte Immunfluoreszenz	46
2.2.40	Mikroinjektion	47
2.2.41	Durchflusszytometrie (FACS)	48
2.2.42	Weichagar Versuch/„Soft Agar Assay“	48
2.2.43	Proliferationsnachweis mittels XTT	49
2.2.44	Adhäsionsversuch	49
2.2.45	Hefe-Zwei-Hybrid-System	50
3	Ergebnisse	51
3.1	Klonierung des Vollängen-NY-BR-1-Konstrukts	51
3.2	„In silico“ Sequenzanalyse	54
3.3	Erzeugung eines polyklonalen Antiserums gegen NY-BR-1	56
3.3.1	Klonierung und Expression des NY-BR-1 Konstrukts in <i>E. coli</i> BL21	56
3.3.2	Testen des Antiserums	57
3.4	Expressionsanalyse auf Transkriptebene	60
3.4.1	NY-BR-1 mRNA Expression in Zelllinien	62
3.4.2	NY-BR-1 mRNA Expression in Gewebeproben	63

3.4.3	“Microarray” Analyse	65
3.5	NY-BR-1 Proteinexpression	66
3.5.1	Evaluierung des monoklonalen anti-NY-BR-1 Antikörpers	66
3.5.2	NY-BR-1 Expression in Zelllinien	70
3.5.3	NY-BR-1 Expression in Gewebeproben und Pleuralergüssen	70
3.5.4	Immunhistochemie	73
3.6	Herrunterregulation von NY-BR-1 über "RNA interference"	75
3.7	Subzelluläre Lokalisation des NY-BR-1 Proteins und „Domain-Mapping“	77
3.7.1	Potentielle Kernlokalisationssignale (NLS).....	78
3.7.2	Expression des Vollängen-NY-BR-1 Konstruktes	81
3.8	NY-BR-1 ist ein Membranprotein	85
3.8.1	Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen	85
3.8.2	NY-BR-1 wird an der Zelloberfläche exprimiert (FACS Analyse)	86
3.8.3	NY-BR-1 ist ein Transmembranprotein	87
3.9	Lokalisation von endogenem NY-BR-1	96
3.10	NY-BR-1 Interaktionspartner	96
3.10.1	NY-BR-1 hat das Potential zur Dimerisierung bzw. Multimerisierung	97
3.10.2	Hefe-Zwei-Hybrid-System	99
3.11	Analyse der spontanen anti-NY-BR-1 Antikörper Reaktivität in Patientenseren	102
3.11.1	Funktionelle Studien	103
3.11.2	Weichagar Versuch.....	105
3.11.3	Adhäsionsversuch.....	106
4	Diskussion	108
4.1	NY-BR-1: Klonierung und Antikörperherstellung	108
4.2	Endogenes NY-BR-1	109
4.3	Analyse der endogenen NY-BR-1 Expression	110
4.4	Studien zur subzellulären Lokalisation von NY-BR-1	113
4.5	NY-BR-1 ist ein Membranprotein	114
4.6	NY-BR-1 Interaktionspartner/Dimerisierung	117
4.7	Studien zur NY-BR-1 Funktion	119
4.7.1	Weichagar-Versuch.....	119
4.7.2	Adhäsionsversuch	120
4.8	Klinische Relevanz des Brust Tumorantigens NY-BR-1	121
4.8.1	NY-BR-1 als diagnostischer und prognostischer Marker für Brustkrebs.....	123
4.8.2	NY-BR-1 als neues Target für die Immuntherapie?	123
4.8.2.1	NY-BR-1: Antikörper basierte Therapien?.....	125
4.8.2.2	NY-BR-1: Vakzinestudien?	130
5	Literaturverzeichnis	133
6	Abkürzungsverzeichnis	150

7 Anhang	153
8 Veröffentlichungen	155
9 Zusammenfassung	173
Lebenslauf	175
Danksagung	176
Eidesstattliche Erklärung.....	177

1 Einleitung

1.1 Krebs

Die Bezeichnung "Karzinom" bzw. "Krebs" geht auf den griechischen Arzt Hippokrates zurück. Er prägte diesen Namen, da seiner Meinung nach die Auswüchse eines soliden Tumors wie die Beine eines Krebses (*griechisch*: "karkinoma") aussahen. In Europa sind Krebserkrankungen nach Herz-Kreislauf Krankheiten die zweithäufigste Todesursache (WHO-Europe 2004). Allein im Jahr 2004 gab es in der Europäischen Union 2.8 Millionen neue Krebserkrankungen und über 1 Millionen Krebstote (BOYLE UND FERLAY, 2005). Zu der häufigsten Krebserkrankung bei Männern gehört Prostatakrebs (18%), dicht gefolgt von Lungenkrebs mit 17% und kolorektalen Krebserkrankungen (13%). Bei Frauen, ist Brustkrebs mit 29% die am häufigsten auftretende Krebserkrankung mit einer Erkrankungswahrscheinlichkeit von 8%. An zweiter Stelle stehen kolorektale Tumoren (13%), gefolgt von Uteruskrebs (8.6%) und Lungenkrebs (6.5%) (BOYLE UND FERLAY, 2005). Die höchste Mortalitätsrate tritt beim Mammakarzinom auf (17.4%), gefolgt von kolorektalem Krebs (13.2%) und Lungenkrebs (11%). Da das Risiko, an Krebs zu erkranken mit dem Alter steigt, werden die Zahlen aufgrund der Veralterung der Gesellschaft noch steigen. Krebs stellt somit ein schwerwiegendes Problem für das Gesundheitssystem dar.

1.1.1 Tumorgenese

Krebs ist auf die genetische Veränderung einer einzelnen somatischen Zelle und deren unkontrollierte Proliferation zurückzuführen. Eine einzelne Mutation im Genom einer Zelle ist hierfür jedoch nicht ausreichend. Vielmehr handelt es sich bei der Tumorgenese um einen komplexen Prozess, bei dem schrittweise akkumulierende Mutationen (HANAHAH UND WEINBERG, 2000; VOGELSTEIN UND KINZLER, 1993; VOGELSTEIN UND KINZLER, 2004) dazu führen, dass eine normale Zelle zu einer malignen, invasiven Tumorzelle transformiert. Mutationen, wie zum Beispiel Punktmutationen, Genamplifikation oder chromosomale Translokationen, die im Wesentlichen für die Krebsentstehung verantwortlich sind, werden in drei Klassen von Genen gefunden. Hierzu zählt die Gruppe der Onkogene, die der Tumor-Suppressorgene und die Gruppe der DNA-Reparaturgene. Zu den von Onkogenen und Tumor-Suppressorgenen kodierten Proteinen gehören Transkriptionsfaktoren, Regulatoren des Zellzyklus und diverser Signaltransduktionswege, wie z.B. Proteinkinasen (FUTREAL *et al.*, 2004). Neben erblich bedingten Mutationen und einer damit verbundenen Prädisposition, an Krebs zu erkranken, sind einige weitere

Risikofaktoren bekannt, zu denen unter anderem Rauchen, ionisierende/radioaktive Strahlung, UV-Strahlen, bestimmte Chemikalien und so genannte onkogene Viren gehören (AMES *et al.*, 1995).

Die von humanen Tumorarten schrittweise durch Mutationen erworbenen Eigenschaften werden in einem von Hanahan und Weinberg (2000) vorgeschlagenen Modell in Abbildung 1.1 zusammengefasst. Charakteristisch für den Prozess der Transformation ist die Wachstumsfaktor unabhängige Proliferation bzw. die verminderte Sensitivität gegenüber wachstumshemmenden Signalen und die Resistenz gegenüber apoptotischen Stimuli. Ihre Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen gewährleisten die proliferierenden Krebszellen durch Angiogenese. Ein weiteres Merkmal ist außerdem ein unendliches Replikationspotential bzw. Immortalität und die erworbene Fähigkeit, in umliegendes Gewebe einzuwandern und zu metastasieren.

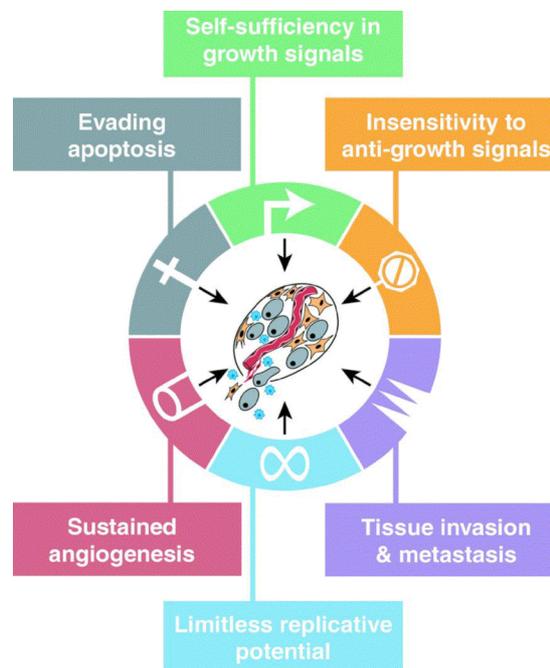


Abbildung 1.1 | Modell zur Tumorentstehung nach Hanahan und Weinberg (2000). Erklärungen siehe Text.

Dieses bestehende Modell ergänzen Trosko *et al.* dadurch, dass sie die funktionelle Bedeutung pluripotenter Stammzellen sowie die interzelluläre Kommunikation via „gap junctions“ („gap junctional intercellular communication“, GJIC) bei der Tumorentstehung einbeziehen (TOSKO *et al.*, 2004). Da GJIC für Prozesse wie Differenzierung, Wachstumskontrolle und Kontaktinhibition essentiell ist, gehen die Autoren davon aus, dass die Unterbrechung der interzellulären Kommunikation maßgeblich an der Transformation einer Zelle beteiligt ist. Die Autoren stellen die Hypothese auf, dass der erste Schritt der Tumorentstehung die Verhinderung der Sterblichkeit oder der terminalen

Differenzierung einer natürlicherweise immortalen (Stamm-) Zelle ist (Initiationsschritt). Der nächste Schritt ist ein potentiell reversibler oder unterbrechbarer Prozess der klonalen Expansion, ausgelöst durch Wachstumsstimulation und Apoptoseinhibierung. Wenn Mutationen und epigenetische Veränderungen akkumulieren, werden die Zellen unempfindlich gegenüber Wachstumsfaktoren und resistent gegenüber Wachstumsinhibitoren und Apoptose. Sie sind immortal und werden invasiv bzw. metastasieren. Im Gegensatz zu Hanahan und Weinbergs Modell wird Krebs als eine "Differenzierungs-krankheit" gesehen, bei der nicht etwa eine normale somatische Zelle neoplastisch transformiert, sondern vielmehr die Differenzierung einer Vorläuferzelle bzw. pluripotenten Stammzelle verhindert wird (siehe auch HARRIS, 2005).

Die Progression eines soliden Tumors auf dem Weg zu Invasivität und Metastasierung ist als ein weiterer komplexer Schritt zu betrachten, der nicht nur durch die erworbenen Eigenschaften der entarteten Zellen, sondern auch durch deren Einfluss auf das Stroma gekennzeichnet ist. Tumorzellen befinden sich im ständigen Austausch mit ihrer Umgebung, zu der neben Stromazellen auch Immunzellen und die extrazelluläre Matrix gehören. Veränderungen im Tumor haben Veränderungen im umliegenden Stroma zur Folge. Sowohl klinische als auch experimentelle Daten unterstützen die Ansicht, dass Faktoren der Mikroumgebung die Invasivität eines Tumors steuern und dass das Metastasierungsverhalten maßgeblich vom Ort des Primärtumors bestimmt wird (zur Übersicht siehe DE WEVER UND MAREEL, 2003).

1.1.2 Krebs und das Immunsystem

Neben einem komplexen Netzwerk an DNA-Reparaturenzymen, das Veränderungen in der Integrität und Stabilität des Genoms verhindert, spielt das Immunsystem bei der körpereigenen Bekämpfung von Tumorzellen eine zentrale Rolle. Das Immunsystem hat die Aufgabe, toxische Moleküle zu beseitigen, entartete Zellen zu eliminieren und den Körper gegen Angriffe durch Viren, Bakterien, ein- oder mehrzellige Pathogene durch Zerstörung selbiger zu schützen und zu verteidigen (GOLDSBY *et al.*, 2002).

Der Philosoph Parmenides hat bereits vor mehr als 2000 Jahren beobachtet, dass sich bei Patienten mit Sarkomen, die bedingt durch eine Infektion Fieber bekamen, Tumoren zurück gebildet hatten und gelegentlich sogar ganz verschwanden (RADVANYI *et al.*, 2005; HAUX, 2001; HOBÖHM, 2001). Schon Anfang des 20. Jahrhunderts wurde die „immune surveillance“-Theorie von Paul Ehrlich geprägt. Er postulierte, dass Tumorzellen ständig im Körper vorkommen, aber vom Immunsystem erkannt und eliminiert werden können (EHRlich, 1909). Lewis Thomas hat 50 Jahre später die Hypothese aufgestellt, dass der zelluläre Arm des Immunsystems sich entwickelt hat, um den Körper zu überwachen und Tumorzellen zu eliminieren (BURNET, 1970).

Die Kombination aus $CD8^+$ T-Zellen und Interferon γ sekretierenden $CD4^+$ T-Helferzellen (T_H1) wird als der effektivste Abwehrmechanismus bei der Bekämpfung von Tumorzellen angesehen (siehe Abb. 1.2). Tumorspezifische $CD8^+$ T-Zellen werden durch dendritische Zellen (DC), die Tumorantigene präsentieren, aktiviert und können direkt Tumorzellen töten (GILBOA, 2004). Die Bildung von $CD8^+$ Gedächtniszellen und das Überleben der cytotoxischen T-Zellen (CTL) wird durch tumorspezifische $CD4^+$ T-Zellen reguliert. Die Interferon γ Sekretion durch $CD4^+$ und zum Teil auch durch $CD8^+$ T-Zellen sensitiviert den Tumor für $CD8^+$ T-Zellen. Durch Interferon γ werden zum einen in den Tumorzellen die MHC I („Major Histocompatibility Complex“) Expression und weitere Komponenten der Antigen Prozessierungsmaschinerie stimuliert, zum anderen werden natürliche Killerzellen (NK Zellen), Granulozyten oder Makrophagen rekrutiert und Angiogenese inhibiert. Außerdem kann das Tumorstroma auch durch eine T_H2 Immunantwort kontrolliert werden. Hierbei aktivieren DC Interleukin (IL) 5 sekretierende $CD4^+$ T-Zellen, die die Akkumulation von Eosinophilen induzieren und/oder als T-Helferzellen eine humorale Antikörper basierte B-Zellantwort unterstützen.

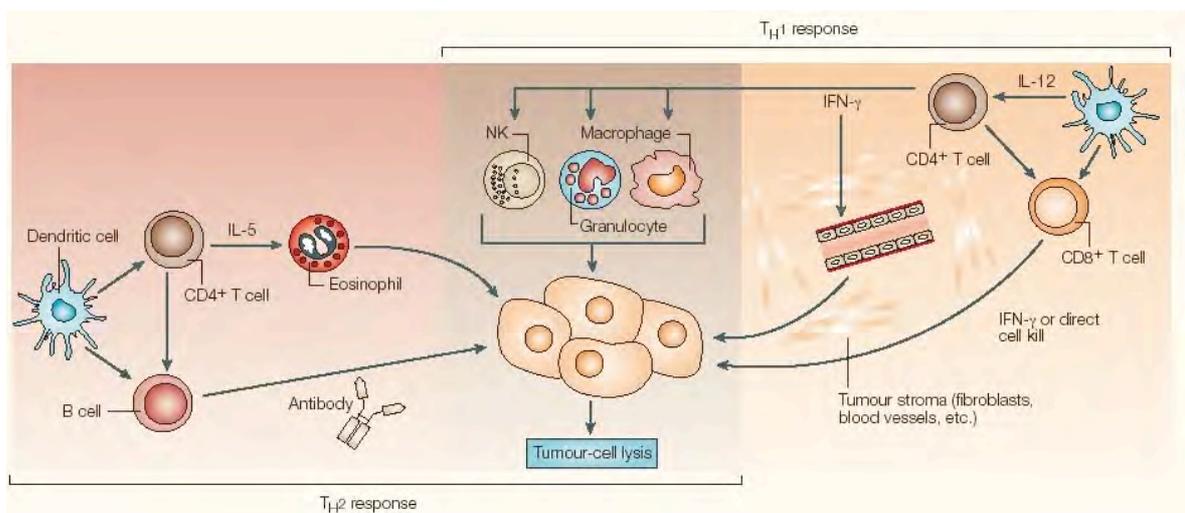


Abbildung 1.2 | Antitumor Effektorarme der Immunantwort. Erklärungen siehe Text (GILBOA, 2004).

Sowohl spontane, natürliche T-Zellantworten als auch B-Zellantworten gegen tumorassoziierte Antigene (TAA) werden regelmäßig bei Patienten beobachtet (NAGORSEN *et al.*, 2003; CORONELLA-WOOD UND HERSH, 2003). Die spontane Regression eines Tumors geschieht aber nur sehr selten, obwohl ca. 50% aller Patienten Serumantikörper gegen bestimmte Tumorantigene produzieren (LEE *et al.*, 1985; SHEIKH *et al.*, 1979). Warum also ist die Immunantwort nicht effizienter bei der Eliminierung von Krebszellen?

Tumoren haben diverse Strategien entwickelt, die zur Immuntoleranz führen (zur Übersicht siehe ZOU, 2005; BLATTMAN UND GREENBERG, 2004). Sie wirken z.B. nur schwach immunogen aufgrund reduzierter MHC-Komplex Expression oder verminderter Expression kostimulatorischer Signale, so dass sie von NK-Zellen nicht erkannt werden können. Einige Tumoren können sogar eine inflammatorische Reaktion unterbinden, indem sie Proteine wie IL-10 oder VEGF sekretieren, die mit der Aktivierung und Differenzierung von dendritischen Zellen (DC) interferieren, oder aber indem sie die Produktion pro-inflammatorischer Proteine durch erhöhte STAT3 Expression blockieren. Sogar wenn eine Immunantwort initiiert werden konnte, besteht die Möglichkeit, durch Antigen-Verlust oder Verursachen von Anergie den Effektoren der Immunantwort zu entgehen. Als Anergie wird der Zustand von Lymphozyten bezeichnet, in dem sie nicht auf Antigen spezifische oder unspezifische Stimulierung reagieren. Auch kann die Induktion regulatorischer T-Zellen (klassische regulatorische T-Zellen: CD4⁺CD25⁺) zur Inhibition der Funktion von Effektor T-Zellen in der Tumor Mikroumgebung führen. Ein weiterer Abwehrmechanismus seitens des Tumors besteht darin, gezielt T-Zellen zu eliminieren. Eine TAA spezifische Immunantwort ist also möglicherweise *in vivo* deshalb so schwach, weil es sich bei der „Toleranz“ um einen Prozess handelt, der aktiv im Tumor selbst und in der Mikroumgebung des Tumors abläuft.

1.2 Brustkrebs

Jährlich erkranken weltweit etwa 1 Million Menschen an Brustkrebs. Neben einer familiären, erblichen Prädisposition zählen zu den Hauptrisikofaktoren das Alter und eine erhöhte „Hormonbelastung“, wie sie zum Beispiel bei früher Menarche, später Menopause, übermäßigem Alkoholgenuß, Übergewicht und Hormonersatz-Therapien gegeben ist. Frühe Schwangerschaften, lange Stillzeiten und sportliche Betätigungen vermindern nachweislich das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken (FEIGELSON UND HENDERSON, 2000; BASELGA UND NORTON, 2002). In den 80er Jahren erreichte die Zahl der Brustkrebserkrankungen seinen Höhepunkt, blieb aber seither konstant. Bedingt durch konsequente Vorsorgeuntersuchungen und durch flächendeckend durchgeführte Mammographien sowie systemische, adjuvante Therapien ist die Sterblichkeitsrate leicht zurückgegangen (HOWE *et al.*, 2001; PETO *et al.*, 2000). Dennoch sterben etwa 15% aller an Brustkrebs erkrankten Patienten (American Cancer Society 2002).

Die konventionelle Klassifikation des Mammakarzinoms erfolgt nach der TNM-Klassifikation ("staging"). Die Abstufung je nach Differenzierungsgrad des Tumors („Grading“, G1 – G4) wird ebenfalls dokumentiert. Beide Klassifikationen dienen dazu, die Prognose zu erstellen und die individuelle Behandlungsstrategie festzulegen.

Brustkrebs ist eine sehr heterogene Erkrankung, die mit einem Carcinoma *in situ* beginnt, zu einem invasiven Karzinom wird und metastasiert. Orte, an denen vorwiegend Metastasen eines Brusttumors gefunden werden, sind die Lymphknoten, Haut, Knochen, Leber, Lunge, die contralaterale Brust und das Zentrale Nervensystem (WEIGELT *et al.*, 2005). Alle Tumoren der Brust lassen sich histologisch grob in Milchgangskarzinome (duktales Carcinoma *in situ*, DCIS) und in Läppchenkarzinome (lobuläres Carcinoma *in situ*, LCIS) unterteilen. Die meisten aller Mammakarzinome sind duktales Ursprungs (WEIGELT *et al.*, 2005). Eine besondere Form von Brustkrebs ist das inflammatorische (entzündliche) Karzinom. Unabhängig vom Tumortyp können dabei Tumorzellen in die unter der Haut gelegenen Lymphbahnen einbrechen und einen Lymphstau mit Schwellung ausgedehnter Hautareale verursachen.

Grundsätzlich wird zwischen sporadischem und erblichem Brustkrebs unterschieden. Gene, die bei der erblichen Form eine Rolle spielen, sind z.B. BRCA1 und 2, P53 und PTEN (NATHANSON *et al.*, 2001). Sporadische Brusttumoren werden entsprechend ihres Rezeptorstatus in Östrogenrezeptor positive (ER⁺), Östrogenrezeptor negative (ER⁻) sowie ErbB2 (Her2/neu) positive (ErbB2⁺) Tumoren eingeteilt (LACROIX *et al.*, 2004). Der ER-Status wird bei Brustkrebs seit über 30 Jahren bestimmt. Es gibt ER α und ER β (*ESR1* und *ESR2*). ER α wird in 60-80% aller Brusttumoren exprimiert, wohingegen ER β bei Brustkrebs eine untergeordnete Rolle spielt.

Gemäß dem Modell von Vogelstein (VOGELSTEIN UND KINZLER, 1993) für die Entstehung von Kolonkarzinomen ging man auch bei Brustkrebs von einer schrittweisen Tumorgenese aus, die über progressive Veränderungen von Normalgewebe zu Hyperplasie mit und ohne Atypie, Carcinoma *in situ*, invasives Karzinom und letztendlich zu Metastasenbildung führt. Mittlerweile jedoch wurde diese Sichtweise dahingehend modifiziert, dass der Begriff "Brustkrebs" zwei distinkt verlaufende Erkrankungen zusammenfasst: eine, die die gut differenzierten DCIS umfasst, die sich zu Grad I invasiven duktales Karzinomen (IDC) entwickeln ("low grade") und eine weitere, der die schwach differenzierten DCIS zugehörig sind, und die zu Grad III IDC werden können („high grade“). In dem „low grade“ Arm sind die Tumoren meistens durch ER- und Progesteron Rezeptor (PR)-Expression, fehlende ErbB2- und Basalmarker-Expression, geringe genetische Instabilität und häufig fehlendes 16q Chromosom charakterisiert. Die Gruppe der „high grade“ Tumoren hingegen zeigt vermehrt atypisch veränderte Nuklei, ist häufig Hormonrezeptor negativ, ErbB2 und/oder Basalmarker positiv, und die Tumorzellen zeigen gravierende Chromosomenaberrationen. Gemäß ihrer pathologischen und genetischen Charakteristika gehören die LCIS und ILC eher zu den „low grade“ Tumoren (zur Übersicht siehe SIMPSON *et al.*, 2005).

Zur Risikoabschätzung der Metastasierung dienen verschiedene prognostische Marker. Eine geringe TumorgroÙe, ein negativer Status der axillären Lymphknoten und eine histologische Grad I Differenzierung sind etablierte prognostische Marker für ein geringes Metastasierungsrisiko. Neben der Angioinvasion sehr kleiner Tumoren (bei Lymphknoten negativen Patienten), einem hohen uPA/PAI1 ("urokinase-type plasminogen activating factor"/"plasminogen activator inhibitor 1") Proteinspiegel sowie geringer Steroidrezeptor Expression birgt auch ErbB2 Überexpression ein höheres Risiko dafür, dass ein Tumor metastasiert (WEIGELT *et al.*, 2005).

Die Möglichkeit, Vorhersagen über das Metastasierungsrisiko eines Tumors zu treffen, würde für viele Patienten bedeuten, dass unnötige Übertherapiierungen mit oft starken Nebenwirkungen vermieden werden könnten. Dies gilt für Patienten, deren Lymphknoten bei Diagnosestellung frei von Tumorbefall waren und bei denen eine systemische adjuvante Chemotherapie zusätzlich zur Radiotherapie nicht vorgeschrieben, aber häufig in Erwägung gezogen wird. Derzeit werden Genexpressionsprofile ("signature") bezüglich ihrer Verlässlichkeit getestet, das Risiko für die Metastasenbildung vorherzusagen. So kann z.B. zwischen einer Signatur mit guter Prognose und einer mit schlechter Prognose anhand der Expression von 70 Genen unterschieden werden (VAN DE VIJVER, 2005; VAN DE VIJVER *et al.*, 2002; VAN 'T VEER *et al.*, 2002). Bemerkenswerterweise waren bei der "poor prognosis signature" auch Marker des Stromas repräsentiert. Der Rolle des Tumorstromas wird bei der Metastasierung eine große Bedeutung beigemessen (siehe Kapitel 1.1.1).

Interessanterweise konnten anhand der Expressionsprofile kaum valide Marker für Progression von der *in situ* Situation hin zur Invasivität identifiziert werden. Das Transkriptom eines Brusttumors bei der Progression eines Carcinoma *in situ* zur Metastase verändert sich in den meisten Fällen (65-95%) nicht signifikant (RAMASWAMY *et al.*, 2003). Da für die Stadien atypische Hyperplasie, Carcinoma *in situ* und invasives Karzinom ein weitgehend gleiches Transkriptom festgestellt werden konnte, scheinen "genetische Veränderungen" bereits in der prä-invasiven Phase angelegt zu sein (LACROIX *et al.*, 2004). Bei Expressionsanalysen und den oben beschriebenen Signaturen bleiben jedoch Veränderungen auf Proteinebene, wie z.B. in Form von Punktmutationen, die im Verlauf der Krankheit auch später auftreten können, unberücksichtigt.

Eine wissenschaftlich und klinisch relevante Frage ist, ob bestimmte Tumorphänotypen bereits in der ursprünglich transformierenden Tumorzelle angelegt sind oder ob sich unterschiedliche Phänotypen später während der Tumorgenese ausbilden, die von einer gemeinsamen Vorläuferzelle ausgehen? Experimentellen Beobachtungen zu Folge ist nur eine geringe Zellpopulation eines Tumors in der Lage, nach Transplantation diesen Tumor zu rekonstituieren und/oder Metastasen zu bilden (GANGNUS *et al.*, 2004). Al Hajj *et al.*

haben eine Subpopulation von Tumorzellen identifiziert, bei der es sich möglicherweise um Brusttumor Stammzellen (BCSC, „breast cancer stem cells“) handeln könnte (AL-HAJJ *et al.*, 2003). Diese Zellen exprimieren einige Marker sowohl für basale/myoepitheliale Zellen als auch für luminale Epithelzellen (CD44⁺/CD24⁻, ESA⁺ („Epithelial surface antigen“)), was ihre Differenzierung zu einem dieser Phänotypen ermöglicht. Studien mit normalem Brustgewebe haben gezeigt, dass eine Subpopulation supra-basaler Zellen existiert, die in der Lage ist, sowohl sich selbst als auch differenzierte luminale Epithelzellen und Myoepithelzellen zu generieren. Diese Zellen sind langlebig, haben ein hohes Replikationspotential und könnten als Brust-Stammzellen angesehen werden (STINGL *et al.*, 2001; BOECKER UND BUERGER, 2003; CLARKE *et al.*, 2003; DONTU *et al.*, 2003; PETERSEN *et al.*, 2003; SMALLEY UND ASHWORTH, 2003).

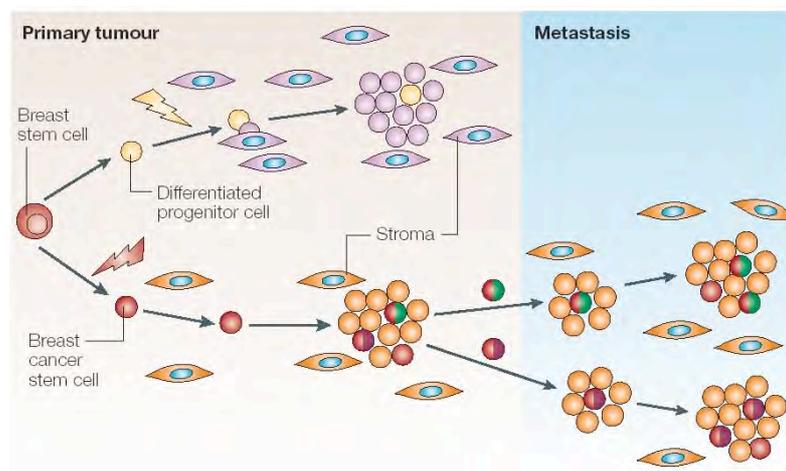


Abbildung 1.3 | Integratives Modell der Brustkrebs Metastasierung. Erklärungen siehe Text (nach WEIGELT *et al.*, 2005).

Diese Erkenntnisse sind in Abbildung 1.3 in einem integrativen Modell der Metastasierung bei Brustkrebs zusammengefasst dargestellt. Onkogene Mutationen einer Brust Stammzelle (rot) führen zur Transformation derselben zu einer Brusttumor Stammzelle, die "poor prognosis" Tumoren generiert. Mutationen, die in differenzierten Vorläuferzellen auftreten (gelb) haben "good prognosis" Tumoren zur Folge. Unter dem Einfluss der Fibroblasten des Tumorstromas gelingt es den Tumor Stammzellen zu metastasieren und an anderen Orten im Körper dieselbe Stroma Antwort zu induzieren. Möglicherweise existieren unterschiedliche Tumor Stammzellen, die zusätzliche gewebespezifische Profile exprimieren und somit deren Selektivität für bestimmte Gewebe bei der Metastasierung erklären (grün, Knochen; lila, Lunge). Das würde bedeuten, dass nur Tumorzellen, die aus entarteten Brust Stammzellen entstanden sind, metastasieren.

1.2.1 Neue Therapiemöglichkeiten bei Brustkrebs

Beim Mammakarzinom besteht die primäre Therapie aus einem chirurgischen Eingriff, der die Entnahme einiger axillärer Lymphknoten einschließt und im Anschluss daran eine Radiotherapie vorsieht. Eine systemische adjuvante Therapie, d.h. Chemotherapie und/oder endokrine Therapie nach einer Operation, hat eine deutliche Verminderung des Wiederauftretens des Tumors und eine höhere Überlebenschance zur Folge. Für eine adjuvante hormonelle Therapie bzw. den Einsatz von Aromatase-Inhibitoren kommen diejenigen Patienten in Frage, deren Tumoren Hormonrezeptor positiv sind (HORTOBAGYI, 1998). Weitere Therapiemöglichkeiten, die zunehmend Anwendung in der Klinik finden, bietet der Einsatz von Tyrosinkinase-Inhibitoren, z.B. Iressa, welches das "signaling" des EGF Rezeptors inhibiert, sowie die Immuntherapie.

Letztere basiert auf der Tatsache, dass das Immunsystem an der Zerstörung und Bekämpfung von Tumorzellen beteiligt ist, und zielt darauf ab, diese natürliche Immunantwort zu verstärken bzw. zu aktivieren. Für immuntherapeutische Ansätze sind potentiell alle Effektorebenen des Immunsystems für die Eliminierung der Krebszellen klinisch relevant. So finden gezielte Antikörper basierte Therapien, wie zum Beispiel mit Trastuzumab (Herceptin) bei Brustkrebs in der Klinik bereits Anwendung (KLAPPER *et al.*, 2000a; KLAPPER *et al.*, 2000b; CASTILLEJA *et al.*, 2001; ZUM BUSCHENFELDE *et al.*, 2002). Trastuzumab ist ein gegen die extrazelluläre Domäne der ErbB2 Rezeptortyrosinkinase gerichteter humanisierter Antikörper, der einerseits durch das Binden an ErbB2 die Prozessierung des Rezeptors verhindert sowie mit der Homodimer- bzw. Heterodimerbildung interferiert und andererseits folgende intrazelluläre Effekte hat: die Bindung von Trastuzumab induziert Apoptose, hat eine anti-proliferative Wirkung, führt zu einer verringerten ErbB2 Proteinmenge an der Zelloberfläche durch Rezeptor vermittelte Endozytose und moduliert die nachgeschaltete Signaltransduktion (BURSTEIN, 2005).

Experimentelle T-Zell basierte Immuntherapien schließen den Transfer autologer tumorspezifischer Effektorzellen und den genetischen Transfer tumorspezifischer T-Zellrezeptoren in die Lymphozyten der Patienten ein (HUBER UND WOLFEL, 2004). Alternativ werden Tumor Vakzine eingesetzt, die das Immunsystem des Patienten aktivieren sollen, Tumorzellen zu beseitigen (EMENS UND JAFFEE, 2003). Diese "aktive Immuntherapie" hat konzeptionell viele Vorteile, wie zum Beispiel geringe Toxizität, hohe Spezifität und die Aussicht auf die Etablierung eines "immunologischen Gedächtnisses". Die ersten Tumorimpfstoffe waren bestrahlte autologe und allogene Tumorzellen, deren Anti-Tumorwirkung sich jedoch als marginal erwies und auch durch Adjuvans-Zugabe nicht verstärkt werden konnte (ESPINOZA-DELGADO, 2002). Weitere Vakzinierungsstrategien, wie zum Beispiel Plasmid basierte Vakzine, rekombinante virale Vektoren, Tumorantigen exprimierende Bakterien und Hitzeschock Protein basierte Impfstoffe

befinden sich in der Entwicklung. Eine Möglichkeit, direkt die humorale Immunantwort zu stimulieren, ist die Vakzinierung mit tumorspezifischen Kohlenhydraten, die entweder von genetisch manipulierten Tumorzellen exprimiert werden oder mit KLH ("keyhole limpet hemocyanin") konjugiert werden. T-Zellen können direkt durch die Vakzinierung mit genetisch manipulierten Tumorzellen stimuliert werden, die kostimulierende Faktoren und immunaktivierende Zytokine exprimieren. Alternativ werden auch APC (Antigen präsentierende Zellen) genetisch so modifiziert, dass sie Tumorantigene exprimieren. Die lokale Gabe von Zytokinen hat nach Rekrutierung von APCs zur Vakzinierungsstelle hin, die indirekte Aktivierung von T-Zellen zur Folge. Unter den immunaktivierenden Zytokinen gilt GM-CSF ("Granulocyte and Macrophage colony stimulating factor") als das potenteste Zytokin. Für eine Reihe von Tumorentitäten wurde für Phase I Studien die Anwendung von GM-CSF sekretierenden Tumorzellen beschrieben (SOIFFER *et al.*, 1998; SOIFFER *et al.*, 2003; SIMONS *et al.*, 1997; SIMONS *et al.*, 1999; SALGIA *et al.*, 2003; NEMUNAITIS *et al.*, 2004). Auch bei metastasierendem Brustkrebs werden Vakzinierungen derzeit in Phase I und II Studien erprobt (Tabelle 1.1, EMENS *et al.*, 2005).

Tabelle 1.1 | Übersicht über Phase I und II Vakzinestudien bei Brustkrebs (aus EMENS *et al.*, 2005).

Antigen	Adjuvant	Antigen-specific immune response	Clinical benefit	Reference
MUC-1 peptide-KLH	DETOX-B, CY	MUC-1-specific IgG, T cells	NR	Reddish <i>et al.</i> 1998
MUC-1 peptide-KLH	QS-21	IgM, IgG, ADCC KLH-specific T cells No MUC-1-specific T cells	No	Adhuri <i>et al.</i> 1999 Gilewski <i>et al.</i> 2000 Snijder <i>et al.</i> 2001 Muselli <i>et al.</i> 2002 Reece <i>et al.</i> 2003
α -idiotype 11D10 (HMFg)	HDC/ASCT	Idiotype-specific antibody and T cells	No	Diaz <i>et al.</i> 2003
α -idiotype 1E10 (NeuGcGM3)	None	Idiotype/NeuGcGM3-specific antibody	NR	Carr <i>et al.</i> 2003
NeuGcGM3-VSSP	None	IgA, IgG, IgM	10% SD for 18 and 40 months ($n=21$)	Gilewski <i>et al.</i> 2001
GLOBO-H-KLH	QS-21	IgM, CDC, ADCC No IgG	56% 2-year disease-free progression ($n=27$)	Miles <i>et al.</i> 1996 Ibrahim & Murray 2003, Ibrahim <i>et al.</i> 2004 Mayordomo <i>et al.</i> 2004 Disis <i>et al.</i> 1999, 2000, 2002 Knutson <i>et al.</i> 2001, 2002 Salazar <i>et al.</i> 2004 Murray <i>et al.</i> 2002
THERATOPE	DETOX-B, CY	IgM, IgG	Improved median survival with i.v. CY pretreatment at 26.5 months vs 12.3–14.4 months	Disis <i>et al.</i> 2004
HER-2 peptide	GM-CSF (Flt-3)	IgG, T cell, DTH	NR	Ahler <i>et al.</i> 1997
HER-2 peptide	GM-CSF	T cell, DTH	Prolonged TTP (trend $P=0.06$)	Dees <i>et al.</i> 2004
HER-2 ICD protein	GM-CSF	IgG, T cell	NR	Svane <i>et al.</i> 2004
HER-2-dendritic cell	None	T cell	20% PR ($n=10$)	Avigan <i>et al.</i> 2004
p53-dendritic cell	None	T cell	33% SD	Wiseman <i>et al.</i> 1995
NDV-autologous tumor	None	NR	Trend toward improved survival	Dols <i>et al.</i> 2003a,b
Allogeneic tumor	BCG	NR	31% 10-year DFS	Avigan <i>et al.</i> 2004
CD80:MDA-MBA231	GM-CSF or BCG	Inconsistent	No	
DC-tumor fusion	None	T cell	43% SD/PR ($n=23$)	

MUC-1 = mucin-1; KLH = keyhole limpet hemocyanin; ADCC = antibody-dependent cellular cytotoxicity; HMFg = human milk fat globule; HDC/ASCT = high dose chemotherapy with autologous stem cell transplant; CDC = complement-mediated cytotoxicity; CY = cyclophosphamide; GM-CSF = granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; Flt-3 = flt ligand-3; DTH = delayed type hypersensitivity; ICD = intracellular domain; BCG = bacillus *Calmette guerin*; NR = not reported; SD = stable disease; PR = partial response; DFS = disease-free survival; TTP = time to progression.

Eine erfolgreiche Immuntherapie gegen Mikrometastasen oder fortgeschrittene Brusttumoren wird durch Mechanismen wie Immuntoleranz und antigene Variabilität des Tumors bestimmt bzw. limitiert. Erschwerend kommt hinzu, dass bei Brustkrebspatienten weniger periphere Blutlymphozyten, dafür aber vermehrt $CD4^+CD25^+$ regulatorische T-Zellen in der Mikroumgebung des Tumors festgestellt werden und dendritische Zellen aus dem peripheren Blut und den Lymphknoten oft nicht funktionell sind (LIYANAGE *et al.*, 2002; WOLF *et al.*, 2003; POCKAJ *et al.*, 2004). Meist exprimieren diese DC nur geringe Mengen an MHC II und dem ko-stimulatorischen B7 Protein, was eine effiziente Aktivierung $CD4^+$ T-Zellen verhindert.

1.3 Tumorantigene

Obwohl das Carcinoma *in situ* operativ entfernt werden kann, ist die fortgeschrittene Krankheitsform, bei der der Primärtumor bereits metastasiert hat, dennoch meistens tödlich. Die Früherkennung (im Idealfall bevor sich Metastasen gebildet haben) ist somit entscheidend für einen positiven Krankheitsverlauf und für verbesserte Heilungschancen. Die Identifizierung weiterer Markerproteine sowohl für neue therapeutische Ansatzpunkte als auch für die Diagnostik, Prognostik und Verlaufsbeurteilung der Krankheit ist dementsprechend von großem Interesse. Ideale Zielproteine sind die sogenannten tumorassoziierten Antigene. Ein ideales Tumorantigen ist ein tumorspezifisch stabil und homogen exprimiertes immunogenes Protein, das nicht im Normalgewebe detektierbar ist und dessen konstitutive Expression essentiell für das Überleben der Krebszelle ist (SIMPSON *et al.*, 2005a). Innerhalb der vergangenen Jahre konnte eine Vielzahl dieser tumorassoziierten Antigene identifiziert werden, die sowohl in der aktiven als auch in der passiven Immuntherapie immer mehr Anwendung in der Klinik finden (zur Übersicht siehe CHEN, 2004). Die Suche nach weiteren, geeigneten Tumorantigenen, die dafür genutzt werden können, um das zytolytische Potential des Immunsystems gegen Krebs auszunutzen und die Mechanismen der Immuntoleranz zu überwinden, wird kontinuierlich fortgesetzt (OLD, 1981; SIMPSON *et al.*, 2005a; BOON UND OLD, 1997).

Im Laufe der Zeit wurden unterschiedliche Techniken benutzt und entwickelt, um für die Immuntherapie geeignete Tumorantigene zu identifizieren (BOON *et al.*, 1994; ROSENBERG, 1997; CHEN, 2004; CARTER *et al.*, 2004). Einen entscheidenden Wendepunkt stellte die autologe Typisierung ("autologous typing") dar, die anhand parallel durchgeführter serologischer Tests und Adsorptionsmethoden die Identifizierung von Zelloberflächenantigenen ermöglichte (OLD, 1981). Die Analysen wurden mit autologem Material (Serum, Tumorzellen, normale Fibroblasten und Lymphozyten desselben Patienten) durchgeführt, um den Einfluss von Alloantigenen (Produkte des HLA Komplexes und ABO Locus) zu eliminieren und die Spezifität zu erhöhen. Hierfür mussten

jedoch zuerst Zelllinien aus dem Tumorgewebe etabliert werden, so dass diese Technik auf diejenigen Tumorentitäten beschränkt ist, die sich *in vitro* kultivieren lassen (z.B. Melanom und Nierenkarzinom) (CAREY *et al.*, 1976; SHIKU *et al.*, 1976; UEDA *et al.*, 1979). Die anschließende Charakterisierung des identifizierten Antigens war meist nicht möglich, weil geringe Antikörpertiter für das Überprüfen der biochemischen Reinigung und Klonierung limitierend waren (CAREY *et al.*, 1979; WATANABE *et al.*, 1982; REAL *et al.*, 1984). Der nächste entscheidende Schritt war die Entwicklung der SEREX Technologie, die eine sehr erfolgreiche Methode zur Identifikation von Tumorantigenen repräsentiert (SAHIN *et al.*, 1995). SEREX ist die Abkürzung für „Serological analysis of recombinant cDNA expression libraries“. Diese Technik ist nicht beschränkt auf Tumoren, die in Zellkultur wachsen, und sie ist unabhängig von CD8⁺ T-Zellklonen, die den autologen Tumor erkennen. Unter der Annahme, dass eine T_H-Zellantwort während der Krebserkrankung stattgefunden hat, können mit SEREX Antigene identifiziert werden, die eine spontane humorale Immunantwort ausgelöst haben. Hierzu wird eine bakteriell exprimierte Bakteriophagen-cDNA-Bank, die aus der RNA eines Tumors kloniert wurde, mit dem autologen Serum eines Krebspatienten analysiert (Abbildung 1.4).

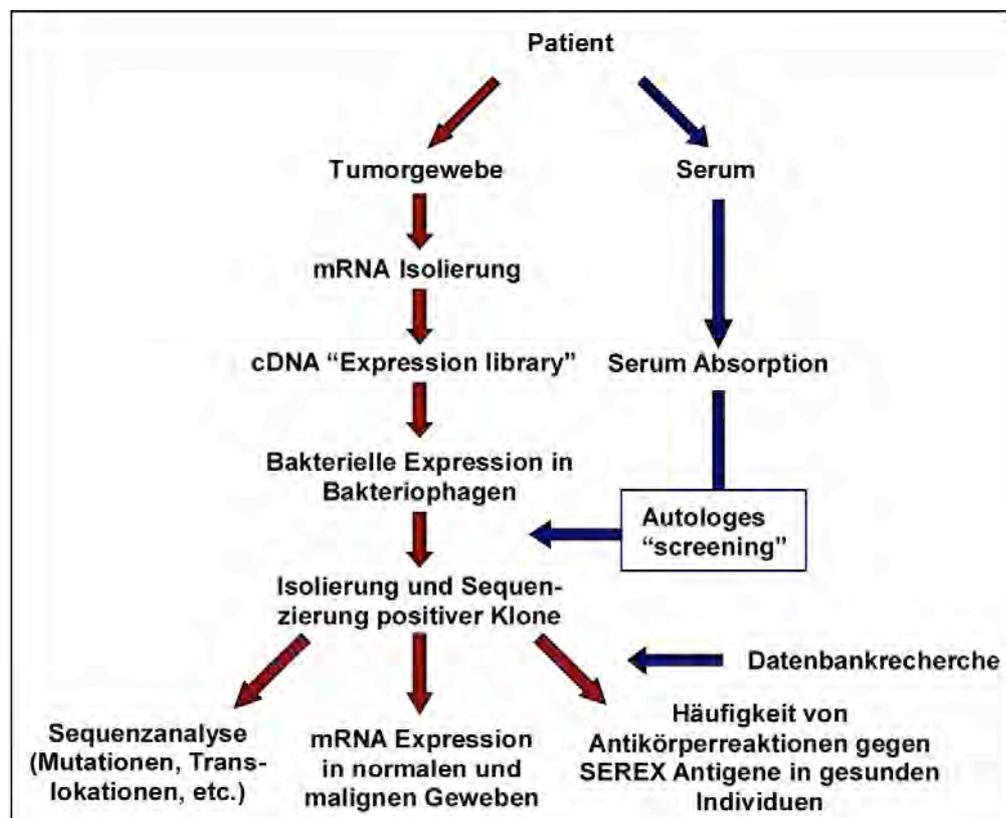


Abbildung 1.4 | Schematische Darstellung der SEREX ("Serological analysis of recombinant tumor cDNA expression libraries") Technik. Erklärungen siehe Text (adaptiert nach CHEN, 2004).

Der große Vorteil dieser Methode besteht auch darin, dass sofort mindestens eine Teilsequenz für die Klonierung des Antigens und für die Herstellung rekombinanter Proteine zur Antikörper Herstellung zur Verfügung steht. Außerdem ermöglicht diese Methode, dass die humorale Immunantwort gegen intrazelluläre Tumorantigene direkt untersucht werden kann. Da die Produktion von Antikörpern CD4⁺ T-Zellhilfe erfordert, dient die SEREX Analyse dazu, das CD4⁺ T-Zellrepertoire gegen humane Tumorantigene zu untersuchen. Sahin *et al.* (1997) beschreiben, dass häufig sowohl Antigen spezifische CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen und B-Zellen auftreten. Beispielsweise wurde das "Cancer Testis" Antigen "Melanoma Antigen 1" (MAGE-1) ursprünglich durch T-Zell Epitopklonierung für CD8⁺ T-Zellen identifiziert (VAN DER BRUGGEN *et al.*, 1991), es ist aber später ebenfalls über SEREX gefunden worden. Diese Tatsache eröffnet die Perspektive, durch SEREX identifizierte Antigene parallel bezüglich potentieller CD8⁺ T-Zellepitope zu analysieren (SAHIN *et al.*, 1997).

Es stellt sich bei der Analyse der durch SEREX identifizierten Klone zunächst die Frage, weshalb ein identifiziertes Antigen immunogen wirkt. Der erste Schritt ist die Klonierung und Sequenzanalyse der cDNA eines solchen Antigens, um das Gen zu identifizieren, Homologien zu bekannten Genen zu finden, den chromosomalen Lokus zu bestimmen und strukturelle oder funktionelle Modifikationen des Gens (Mutationen, Translokationen, Genamplifikationen) aufzuklären. Der nächste Schritt ist die Analyse des mRNA Expressionsmusters in normalen und malignen Geweben. Dann folgt die Analyse der Expression auf Proteinebene, die die biochemische Charakterisierung des Proteins sowie die Immunhistochemie einschließt. Weitere Untersuchungen zur Serologie gesunder Individuen, Krebspatienten und Patienten mit nicht neoplastischen Krankheiten sind essentiell für die Evaluierung eines SEREX Antigens als tumorassoziertes Antigen. Da ein Großteil der identifizierten TAA neue, nicht charakterisierte Proteine sind, ist es darüber hinaus wünschenswert, die biologische Funktion des Antigens zu klären. Zu den ersten über SEREX identifizierten Antigenen gehören "synaptonemal complex protein 1" (SCP-1) (TURECI *et al.*, 1998) und "New York oesophageal squamous cell carcinoma 1" (NY-ESO-1) (CHEN *et al.*, 1997). Das Tumorantigen NY-ESO-1 wird zwar seit Jahren in klinischen Studien eingesetzt (SUGITA *et al.*, 2004; DAVIS *et al.*, 2004; JÄGER *et al.*, 2000b) die Funktion ist jedoch noch nicht aufgeklärt. Dennoch sollte die Charakterisierung der biologischen Funktion vor allem aus Sicherheitsgründen forciert werden und um abzuklären, ob das Antigen selbst (oder damit interagierende Proteine) als "Drug Target" in Frage kommt.

Bei den meisten der mittels SEREX identifizierten Antigene handelt es sich um zytosolische Proteine. Das liegt zum einen daran, dass Membranproteine in Bakterien nicht glykosyliert (oder entsprechend modifiziert) und deshalb von Serumantikörpern unter

Umständen nicht detektiert werden können. Zum anderen liegen Membranproteine in vergleichsweise geringen Kopienzahlen vor, die einen geringeren „Turnover“ als die meisten zytosolischen Proteine aufweisen und deshalb nicht in vergleichbarem Ausmaß für die Proteolyse und anschließende MHC-I Präsentation bereitstehen. Zu den wenigen Membranproteinen, die mittels SEREX gefunden werden konnten, gehören die in Mammakarzinomen überexprimierten Proteine ErbB2 und MUC-1 (ZOTTER *et al.*, 1988; zur Übersicht siehe ACRES UND LIMACHER, 2005). Eine Variation der SEREX Technik nutzt als Expressionssystem Hefen, in denen entsprechende Glykosylierungen und posttranslationelle Modifikationen möglich sind und somit die Voraussetzungen für die Identifizierung von Zelloberflächenproteinen optimiert werden (MISCHO *et al.*, 2003). Auch kann für die herkömmliche Analyse Urin anstatt Serum eingesetzt werden. Auf diese Weise ist der Hintergrund minimiert, und die Präabsorption gegen *E.coli* Lysat und Phagen entfällt (JÄGER *et al.*, 2002a).

Die tumorassoziierten Antigene werden gemäß ihrer Relevanz für die Tumorbiologie, ihres tumorspezifischen Expressionsmusters insgesamt 6 verschiedenen Gruppen zugeordnet (CHEN, 2004; Tabelle 1.2): Die erste Gruppe ist die der so genannten „Cancer/Testis“ (CT) Antigene. Charakteristisch für sie ist ihre Expression in Testis und in Tumoren. Die meisten CT-Gene sind auf dem X-Chromosom lokalisiert und existieren als Multigenfamilie. Sie sind immunogen in Krebspatienten, zeigen eine heterogene Expression in Tumoren und ihre Expression lässt sich *in vitro* in Zelllinien durch Hypomethylierung und/oder Histon-Deacetylase-Inhibition aktivieren (SIMPSON *et al.*, 2005a; CHEN, 2000). Als prominenteste Beispiele sind hier NY-ESO-1, SCP-1 und MAGE-1 zu nennen. Die zweite Gruppe umfasst die Mutationsantigene. Hierzu zählen Proteine, die in Tumorzellen mutiert vorliegen und sich dadurch von der Wildtypversion im Normalgewebe unterscheiden. Ein klassisches Beispiel für Vertreter dieser Gruppe ist das Tumor-Suppressorprotein P53, das initial als Tumorantigen identifiziert wurde (DELEO *et al.*, 1979). Eine weitere Gruppe bilden die Differenzierungsantigene, von denen die melanozytenspezifische Protein-Tyrosinase das prominenteste Antigen ist (SAHIN *et al.*, 1995). Weitere Beispiele für Differenzierungsantigene sind rab38 (Melanom) (JÄGER *et al.*, 2000a), Galektin-4 (Kolonkrebs) (SCANLAN *et al.*, 1998) und NY-BR-1 (Brustkrebs) (JÄGER *et al.*, 2001).

Per Definition gehören CT Antigene ebenfalls zu den Differenzierungsantigenen, da sie nur in differenziertem Hodengewebe exprimiert werden. Viele weitere durch SEREX identifizierte Antigene zeigen zwar eine gewebespezifische Expression hauptsächlich in einem oder wenigen Geweben, man findet sie aber trotzdem auch in weiteren Normalgeweben sehr schwach exprimiert. Einige dieser Antigene sind im Tumor entweder amplifiziert bzw. überexprimiert (Gruppe 4) oder aber existieren als aberrante Tumor-

Spleißvarianten (Gruppe 5). Die Amplifikation/Überexpression könnte ein Hauptgrund für die Immunogenität dieser Tumorantigene in Krebspatienten sein. Als Beispiele seien hier AKT1 (OBATA *et al.*, 1999) und Her2/neu (SCANLAN UND JÄGER, 2001) in Brustkrebs sowie Aldolase A (GURE *et al.*, 1998) bei Lungenkrebs genannt.

Zu den Spleißvarianten Antigenen gehören Proteine, die in einem oder mehreren Geweben exprimiert werden, von denen eine Spleißvariante aber speziell im Tumor vorkommt. Für NY-CO-37 wurden zum Beispiel 5 Spleißvarianten beschrieben, von denen PDZ-54 in allen getesteten Kolonkarzinomen nicht aber in normalem Kolongewebe exprimiert wird (SCANLAN *et al.*, 1998).

Die letzte Gruppe ist die der viralen Antigene, zu denen beispielsweise HERV-K ("Human endogenous Retrovirus related sequences") zählt. Antikörper gegen HERV-K werden in 60-85% der Patienten mit Keimbahnkrebs detektiert (BOLLER *et al.*, 1997).

Tabelle 1.2 | Kategorien der SEREX Tumorantigene (nach CHEN *et al.*, 2004).

Antigen Category	Examples	Serum Source for Initial Isolation
Cancer-testis	NY-ESO-1	Esophageal cancer
	SSX	Melanoma
	SCP1	Renal cancer
	CT7	Melanoma
	CAGE-1	Lung cancer
	cTAGE-1	T cell lymphoma
Mutational	p53	Colon cancer
	CDX2	Colon cancer
Differentiation	Tyrosinase	Melanoma
	NY-BR-1	Breast cancer
	SOX group B	Small cell lung cancer
Amplified/overexpressed	HER-2/ <i>neu</i>	Breast cancer
	eIF-4 gamma	Lung cancer
	TOP2A	Neuroblastoma
Splice variant	Restin	Hodgkin's disease
	NY-CO-37/38	Colon cancer
Retroviral	HERV-K ₁₀	Renal cancer
	HERV-K gag	Prostate cancer

1.4 Das Brust Tumorantigen NY-BR-1

In brustspezifischen SEREX Analysen konnte das Brust Tumorantigen NY-BR-1 identifiziert werden (JÄGER *et al.*, 2001; JÄGER *et al.*, 2002b). NY-BR-1 ist die Abkürzung für "New York-Breast-1". Ersten Expressionsanalysen zu Folge ist die *NY-BR-1* mRNA Expression in Normalgewebe auf Mamma- und Hodengewebe beschränkt. Es wurde beschrieben, dass das Differenzierungsantigen *NY-BR-1* in 21 der 25 untersuchten Brusttumoren exprimiert und von 82 getesteten Nicht-Brusttumoren nur in 2 Melanomen schwach exprimiert ist. Dieses Expressionsmuster suggeriert einerseits eine signifikante Rolle für NY-BR-1 bei der Tumorentstehung, und andererseits macht es NY-BR-1 zu einem attraktiven Zielprotein für immuntherapeutische Ansätze. Durch bioinformatische Analysen wurden eine Reihe von potentiellen funktionellen Proteinmotiven vorhergesagt (z.B. Kernlokalisierungssignal, repetitive Tandem-Ankyrin-Motive, bZIP-DNA-Bindungs- und Multimerisierungsmotiv), welche andeuten, dass es sich bei NY-BR-1 um einen Transkriptionsfaktor handeln könnte (JÄGER *et al.*, 2001).

MTRKKTINLNIQDAQKRTALHWACVNGHEEVVTFVLVDRKCQLDVLVDGEHRTPLMKALQC	60
HQEACANILIDSGADINLVDVYGNMALHYAVYSEILSVVAKLLSHGAVIEVHNKASLTPL	120
LLSITKRSEQIVEFLLIKNANANAVNKYKCTALMLAVCHGSSSEIVGMLLQQNVDFVAADI	180
CGVTAEHYAVTCGFHHIHEQIMEYIRKLSKNHQNTNPEGTSAG	223
TPDEAAPLAER	234
TPDTAESLVEK	245
TPDEAAPLVER	256
TPDTAESLVEK	267
TPDEAASLVEG	278
TSDKIQCLEKA	289
TSGKFEQSAAE	300
TPREITSPAKETSEKFTWPAKGRPRKIAWEKKED	334
TPREIMSPAKETSEKFTWAAKGRPRKIAWEKKET	368
PVKTGCVARVTSNKTQVLEKGRSKMIACPTKESSTKASANDQRFPSESKQEEDDEEYSCDS	428
RSLFESSAKIQVCIPESIQKVMIEINREVE	458
EPPKKSAPFKPAIEMQNSVFNKAFELKNEQTLRADPMFPPESKQKDYEENSWDSESLCET	518
VSQKDVCLPKATHQKEIDKINGKLEESPNKDGLLKATCGMKVSIPTKALELMDMOTFKA	577
EPPGKPSAFEPAIEMQKSVFNKALELKNEQTLRADEILPSESKQKDYEENSWDTESLCET	637
VSQKDVCLPKAAHQKEIDKINGKLEGSPVKDGLLKANCGRMKVSIPTKALELMDMOTFKA	696
EPPEKPSAFEPAIEMQKSVFNKALELKNEQTLRADEILPSESKQKDYEESSWDSESLCET	756
VSQKDVCLPKATHQKEIDKINGKLEESPDNDGFLKAPCRMKVSIPTKALELMDMOTFKA	815
EPPEKPSAFEPAIEMQKSVFNKALELKNEQTLRADQMFPSKQKKEENSWDSESLRET	875
VSQKDVCLPKATHQKEMDKISGKLEDS	902
TSLSKILDVHSCERARELQKDHCEQRTGKMEQMKKFCVLKKLSEAKEIKSQLENQKV	962
KWEQELCSVRLTLNQEEEEKRRNADILNEKIREELGRIEEQHRKELEVKQQLAQALRIQDI	1022
ELKSVESNLNQVSHTHENENYLLHENCMLKKEIAMLKLEIATLKHQYQEKENKYFEDIKI	1082
LKEKNAELQMTLKLKEESLTKRASQYSGQLKVLIAENTMLTSLKLEKQDKEILEAEIESH	1142
HPRLASAVDQHDQIVTSRKSQEPAFHIAAGDAQLQRKMNVDSSTIYNNEVLHQPLSEAQR	1202
KSKSLKINLNYAGDALRENTLVSEHAQRDQRETQCQMKAEHMYQNEQDNVNHTEQQES	1262
LDQKLFQLQSKNMWLQQQLVHAHKKADNKSKITIDIHFLEKRMQHLLKKEKNEEIFNYNN	1322
HLKNRIYQYEKEKAETENS	1341

Abbildung 1.5 | Aminosäuresequenz des NY-BR-1 Proteins. Alternierend schwarz/grau sind die Exone dargestellt. Sequenzabschnitt aa 923-1009 ist in einer der beiden Spleißvarianten vorhanden. Gelb unterlegt sind nahezu identische Wiederholungsbereiche der Exone 10-15. Rechts sind die Aminosäurepositionen angegeben (adaptiert von JÄGER *et al.*, 2001).

In verschiedenen SEREX Analysen wurden jeweils mehrere Teilkclone von NY-BR-1 gefunden (JÄGER *et al.*, 2001; JÄGER *et al.*, 2002b). Anhand von überlappenden EST-Klonen und den gefundenen Teilklonen konnte elektronisch eine vorläufige Sequenz erstellt werden, die einen offenen Leserahmen besitzt, der für 1341 Aminosäuren (aa) kodiert (Acc. No.: AF269087). Der Sequenzvergleich mit genomischer DNA zeigte, dass das *NY-BR-1* Gen auf dem Chromosom 10p11.21 lokalisiert ist und aus 37 Exons besteht. In Abbildung 1.5 sind die Aminosäuresequenz und die Exonverteilung des NY-BR-1 Proteins (aa 1-1341) dargestellt. Da Exone 10-15 insgesamt vier Mal wiederholt nacheinander vorliegen und bis auf einzelne Aminosäuren identisch sind, ist es nicht ausgeschlossen, dass möglicherweise in der reifen mRNA nicht alle Exone enthalten sind, sondern dieser Bereich alternativ gespleißt wird (JÄGER *et al.*, 2001).

Interessanterweise wurde NY-BR-1 auch von einer weiteren Gruppe in einem anderen experimentellen Ansatz identifiziert. Jiang *et al.* (JIANG *et al.*, 2002) haben differenziell exprimierte Gene in Brusttumoren mittels „subtrahierten cDNA Banken“ (SSH) identifiziert. Sie bestimmten anschließend deren Expressionsniveau unter Verwendung von „cDNA microarrays“, die mit RNA aus verschiedenen Normalgeweben, aus Brusttumorgeweben sowie RNA aus Brustmetastasen hybridisiert wurden. Unter anderem fanden sie ein Protein (B726P), das eine Spleißvariante von NY-BR-1 ist. B726P ist mit der NY-BR-1-Teilsequenz aa 395-1397 identisch. Die „Microarray“ Studien zeigten, dass *B726P* mRNA im Tumorgewebe durchschnittlich 3.6-fach überexprimiert wurde im Vergleich zu Normalgewebe. Mittels quantitativer PCR Analysen wurde *B726P* Expression in 50% aller Brusttumoren detektiert und in 44% der Tumoren sogar überexprimiert verglichen mit Normalgewebe, wobei 36% der Proben sogar eine mindestens 3-fache Überexpression von *B726P* zeigten. Der Prozentsatz an NY-BR-1 positiven Brusttumormetastasen lag bei 52%. Alle übrigen Normalgewebe waren negativ für *NY-BR-1* mRNA Expression. In einer weiteren „Microarray“ Analyse mit einem "custom designed" Affymetrix GeneChip wird *NY-BR-1* ebenfalls als überexprimiertes Gen beschrieben. Die „Arrays“ wurden mit RNA aus 54 Brusttumoren und 289 Normalgeweben durchgeführt. Dabei ergab sich für *NY-BR-1* im Durchschnitt ein Tumor/Normalgewebe Expressionsverhältnis von 52.4 (RADVANYI *et al.*, 2005).

Im Rahmen eines Multigen RT-PCR „Assays“ wurde die Eignung von *NY-BR-1* (*B726P*) als Tumormarker untersucht. Zusammen mit den potentiellen Brusttumormarkern *B305D* und *GABA π* sowie mit dem in 80% aller Brusttumoren exprimierten *Mammaglobin* wurde in RT-PCR Analysen das Expressionsprofil dieser Gene in primären Brusttumoren und in Lymphknotenmetastasen bestimmt. Wegen der Sensitivität dieser Analyse konnten 100% der Brusttumoren und Metastasen im Vergleich zu normalem Lymphknotengewebe, Kolontumoren und verschiedenen Normalgeweben detektiert werden. Mit *NY-BR-1* als

einzigem Tumormarker wurden 52% der Tumorproben identifiziert (ZEHENTNER *et al.*, 2002). Auch bei der Detektion von im Blut zirkulierende Brusttumorzellen erwies sich dieser Multigen-„Assay“ mit *NY-BR-1* als geeignet (REINHOLZ *et al.*, 2005).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Brustkrebs ist in der westlichen Welt die häufigste Krebserkrankung bei Frauen. Auch wenn das Carcinoma *in situ* operativ gut behandelt werden kann, gibt es für die fortgeschrittene Erkrankung (Metastasierung) nur geringe Heilungschancen (Kapitel 1.2). Deshalb ist es zum einen wichtig, die molekularen Mechanismen der Tumorgenese besser zu verstehen. Zum anderen ist es unerlässlich, weitere Therapie-"Targets" zu identifizieren und alternative Behandlungsstrategien zu entwickeln. Vielversprechende neue "Targets" repräsentieren tumorassoziierte Antigene, von denen bis heute eine Vielzahl identifiziert werden konnte (s.o.), die zum Teil mittlerweile innerhalb klinischer Vakzinestudien bei Tumorpatienten als Zielantigene eingesetzt werden. Es existieren jedoch nur vereinzelt Daten über die Funktion und Bedeutung der tumorassoziierten Antigene bei der Krebsentstehung.

Aufgrund des gewebespezifischen Expressionsmusters von NY-BR-1 und dessen erhöhter Expression in fast allen Mammakarzinomen ist dieses Gen in zweierlei Hinsicht von Interesse: Zum einen könnte es als neuer Marker für die Diagnose und Verlaufsbeurteilung bei Mammakarzinomen fungieren. Zum anderen repräsentiert es ein mögliches Zielantigen für aktive spezifische Immuntherapieansätze bei Brustkrebs-erkrankungen. Die Überexpression in relativ gut differenziertem Tumorgewebe deutet außerdem darauf hin, dass die Expression von NY-BR-1 eine wichtige Rolle bei der Tumorgenese spielt.

Wie bei jedem neu identifizierten Protein stellt sich auch bei NY-BR-1 die Frage nach der biologischen Funktion. Ziel des Projektes war deshalb vor allem die molekularbiologische und biochemische Charakterisierung dieses Tumorantigens.

Zunächst sollte die Vollängen cDNA kloniert und ein anti-NY-BR-1 Antikörper hergestellt werden. Da es sich bei dem Vollängenklon um einen elektronisch konstruierten Leserahmen (nach *in silico* Analyse) handelte, war es wichtig, die NY-BR-1 Expression auf Proteinebene in Tumor- und Normalgeweben sowie in Zelllinien zu untersuchen. Die NY-BR-1 cDNA diente als Grundlage für eine eingehende Analyse im Zellkultursystem. Dabei war vor allem die subzelluläre Lokalisation des Proteins sowie die Identifikation und Charakterisierung funktioneller Domänen von Interesse. Außerdem sollte in Patientenseren die Antikörper Reaktivität gegen überexprimiertes und endogenes NY-BR-1 bestimmt werden, um weitere Hinweise auf die Tauglichkeit von NY-BR-1 als Tumormarker zu erlangen, und um diejenigen Patienten zu identifizieren, die bereits eine spontane humorale Immunantwort gegen NY-BR-1 entwickelt haben.

2 Material und Methoden

2.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Grundchemikalien wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Restriktionsenzyme, weitere Enzyme und „Kits“ der Molekularbiologie sowie Größenstandards für DNA-Fragmente stammen von New England BioLabs (NEB, Schwalbach), BioRad (München), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Amersham Pharmacia (Freiburg), Qiagen (Hilden) oder Roche (Penzberg). Molekulargewichtsmarker für Proteine sowie der Protein „Assay Kit“ zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurden bei Peqlab (Erlangen) und BioRad (München) erworben. Plastikwaren für die Zellkultur wurden von den Firmen Greiner (Frickenhäuser), Costar, BD Biosciences Clontech (Heidelberg), Nalgene (Rochester, NY, USA) oder Schleicher&Schuell (Dassel) bezogen. Schälchen für die Fluoreszenzmikroskopie stammen von der Firma MatTek (Ashland, MA, USA).

2.1.1 Geräte

Nachfolgend sind einige der benutzten Standardlaborgeräte aufgelistet. Weitere Geräte sind an entsprechender Stelle aufgeführt.

Tabelle 2.1 | Laborgeräte

Geräte	Hersteller/Vertrieb
Autoklav	Tuttnauer 2540 EL, Tel Aviv, Israel
Bakterienbrutschrank	Binder, Tuttlingen
Geldokumentation	BioRad, Hercules, CA, USA
ELISA Reader	MWG Biotech, Ebersberg
pH-Meter MP200	Mettler-Toledo GmbH Prozeßanalytik, Steinbach
Photometer	Biophotometer, Eppendorf
Saugschwein	Qiagen, Hilden
Schüttelinkubator	Infors AG, Bottmingen
Sterilbank	Geclair Lamina Air Flow, Gelman Sciences, Dreieich
Ultraschallstab	Heinemann Ultraschall und Labortechnik, Schwäbisch Gmünd
Vortexer	Scientific Industries, Bohemia, N.Y., USA
Waagen	Sartorius excellence GmbH, Göttingen
Wasserbad	2019 Multiheat, Thermostatic Criculator, Bromma
Zellkulturbrutschrank	Binder, Tuttlingen
Zentrifugen	Tischzentrifuge, Hettich, Tuttlingen; Beckmann Avanti J-20 Centrifuge Rotor Ja-12, Beckmann Instruments Inc. CA, USA Tischzentrifugen, Eppendorf, Hamburg

2.1.2 Puffer und Lösungen

PBS:	("Phosphate buffered saline") 4.3mM Na ₂ HPO ₄ ; 1.4mM KH ₂ PO ₄ ; 137mM NaCl; 2.7mM KCl, pH 7.4
DPBS:	Dulbecco's PBS, entspricht PBS + 8.1mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7.4
EDTA:	0.5M, pH 8.0
TE (1x):	10mM Tris-HCl pH 7.4, 1mM EDTA

Weitere verwendete Puffer und Lösungen sind zu den jeweiligen Methoden in den nachfolgenden Abschnitten aufgelistet.

2.1.3 Antikörper

Tabelle 2.2 | Primärantikörper

Antigen	Ursprung	Hersteller/Referenz
FLAG Epitop (M2)	Maus	Sigma Aldrich, Taufkirchen
GFP	Kaninchen	BD Biosciences/Clontech, Heidelberg
β-Aktin	Kaninchen	Sigma Aldrich, Taufkirchen
β-Tubulin	Kaninchen	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Myc Epitop	Maus	Cell Signaling Technology, Frankfurt
NY-BR-1	Maus	D. Jäger, NCT, Heidelberg
NY-BR-1	Huhn	diese Arbeit
Survivin	Maus	NOVUS Biologicals, Littleton CO
Vimentin	Maus	K. Engels, Pathologie, Uniklinik Frankfurt
ErbB2 (extra) FSP77	Maus	HARWERTH <i>et al.</i> , 1992
ErbB2 (intra)	Kaninchen	Santa Cruz, USA
IgG1	Maus	Molecular Probes (Invitrogen), Karlsruhe

Tabelle 2.3 | Sekundärantikörper

Antigen	Ursprung	Fluorochrom/enzymatische Aktivität	Hersteller/Referenz
IgG	Maus	Cy3 (Carbocyanin 3)	Dianova, Hamburg
IgG	Maus	FITC (Fluorescein-Isothiocyanat)	Dianova, Hamburg
IgG	Maus	PE (Phycoerythrin)	Caltag, Hamburg
IgG	Maus	Biotin	K. Engels, Pathologie, Uniklinik Frankfurt
IgG	Maus	HRP (Horseradish peroxidase)	Amersham, Freiburg
IgG	Kaninchen	Cy3 (Carbocyanin 3)	Dianova, Hamburg
IgG	Kaninchen	HRP (Horseradish peroxidase)	Amersham, Freiburg
IgY	Huhn	HRP (Horseradish peroxidase)	Dianova, Hamburg
IgG	Mensch	HRP (Horseradish peroxidase)	Sigma Aldrich, Taufkirchen

2.1.4 Vektoren

Im Folgenden sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Klonierungsvektoren und die konstruierten Expressionsvektoren aufgeführt.

Tabelle 2.4 | Klonierungsvektoren/Ausgangsvektoren

Plasmid	Relevante Merkmale	Referenz
pGEMTeasy	amp ^r , Klonierungsvektor	Promega, Mannheim
pCDNA3 (+)	amp ^r , eukaryontischer Expressionsvektor; neo ^r	Invitrogen, Karlsruhe
pCDNA3 (-)	amp ^r , eukaryontischer Expressionsvektor, neo ^r	Invitrogen, Karlsruhe
pC3_GFP	amp ^r , eukaryontischer Expressionsvektor, neo ^r , zur Klonierung C-terminaler GFP-Fusionsproteine	ROSORIUS <i>et al.</i> , 1999
pGEX_3_GFP	amp ^r , prokaryontischer Expressionsvektor, zur Klonierung N-terminaler GST- und C-terminaler GFP-Fusionsproteine	ROSORIUS <i>et al.</i> , 1999
pQE-32	amp ^r , prokaryontischer Expressionsvektor, zur Klonierung N-terminaler 6His-Fusionsproteine	Qiagen, Hilden
pBTM117c	amp ^r , Köder/"bait"-Vektor für Hefe Zwei Hybrid System	U. Stelzl, MDC, Berlin
pGAD426	amp ^r , Beute/"prey"-Vektor für Hefe Zwei Hybrid System	U. Stelzl, MDC, Berlin
pSUPER	amp ^r , Vektor zur Expression von siRNA, H1 Promoter	BRUMMELKAMP <i>et al.</i> , 2002

Tabelle 2.5 | Prokaryontische Expressionsvektoren

Plasmid	Relevante Merkmale	Referenz
pGEX_NY1125-1397_GFP	Kodiert für GST_NY-BR-1aa1125-1397_GFP	diese Arbeit
pGEX_NY1125-1397	Kodiert für GST_NY-BR-1aa1125-1397	diese Arbeit
pGEX_NY56-62_GFP	Kodiert für GST_NY-BR-1aa 56-62_GFP	diese Arbeit
pGEX_NY57-74_GFP	Kodiert für GST_NY-BR-1aa 57-74_GFP	diese Arbeit
pGEX_Nukl.NLS_GFP	Kodiert für GST_Nukleoplasmin NLS_GFP	diese Arbeit

Tabelle 2.6 | Eukaryontische Expressionsvektoren

Plasmid	Relevante Merkmale	Referenz
pC3_NY609-1397_GFP	Kodiert für NY-BR-1aa 609-1397_GFP	U. Krach, GSH, Frankfurt
pC3_NY173-1125_GFP	Kodiert für NY-BR-1 aa 173-1125_GFP	U. Krach, GSH, Frankfurt
pC3_NY111-173_GFP	Kodiert für NY-BR-1 aa 111-173_GFP	R. Stauber, GSH, Frankfurt
pC3_NY609-1125_GFP	Kodiert für NY-BR-1 aa 609-1125_GFP	U. Krach, GSH, Frankfurt
pC3_NY56-1397_GFP	Kodiert für NY-BR-1 aa 56-1397 (1-1341)_GFP	diese Arbeit
pC3_NY1125-1397_GFP	Kodiert für NY-BR-1 aa 1125-1397_GFP	diese Arbeit
pC3_NY908-1397_GFP	Kodiert für NY-BR-1 aa 908-1397_GFP	diese Arbeit
pC3_NY908-1171_GFP	Kodiert für NY-BR-1 aa 908-1171_GFP	diese Arbeit
pC3_NY56-369_GFP	Kodiert für NY-BR-1 aa 56-396_GFP	diese Arbeit
pC3_NY111-369_GFP	Kodiert für NY-BR-1 aa 111-369_GFP	diese Arbeit
pC3_NY56-173_GFP	Kodiert für NY-BR-1 aa 56-173_GFP	diese Arbeit
pC3_GST_NY56-173_GFP	Kodiert für GST_NY-BR-1 aa 56-173_GFP	diese Arbeit
pC3_GST_NY62-173_GFP	Kodiert für GST_NY-BR-1 aa 62-173_GFP	diese Arbeit
pC3_GST_NY74-173_GFP	Kodiert für GST_NY-BR-1 aa 74-173_GFP	diese Arbeit
pC3_GST_NY56-62_GFP	Kodiert für GST_NY-BR-1 aa 56-62_GFP	diese Arbeit
pC3_GST_NY57-74_GFP	Kodiert für GST_NY-BR-1 aa 57-74_GFP	diese Arbeit
pC3_FLAG_NY 1-367	Kodiert für FLAG_NY-BR-1 aa 1-367	diese Arbeit
pC3_FLAG_NY 56-367	Kodiert für FLAG_NY-BR-1 aa 56-367	diese Arbeit
pC3_FLAG_NY 56-169	Kodiert für FLAG_NY-BR-1 aa 56-169	diese Arbeit
pC3_NY1-852	Kodiert für NY-BR-1 aa 1-852	diese Arbeit
pC3_FLAG_NY 1-1120	Kodiert für FLAG_NY-BR-1 aa 1-1120	diese Arbeit
pC3(-)_NY445-1397	Kodiert für NY-BR-1 aa 445-1397	diese Arbeit

pC3_NY609-1125_myc	Kodiert für NY-BR-1 aa 609-1125_myc	diese Arbeit
pC3(-)_NY-BR-1*	Kodiert für NY-BR-1 aa 1-1397	D. Jäger, NCT, Heidelberg
pC3_NY-BR-1_GFP*	Kodiert für NY-BR-1 aa 1-1397_GFP	diese Arbeit
pC3(-)_FLAG_NY-BR-1*	Kodiert für FLAG_NY-BR-1 aa 1-1397	diese Arbeit
pC3_SV40NLS_NY1-1397_GFP	Kodiert für SV40NLS_NY-BR-1 aa 1-1397_GFP	diese Arbeit
pC3_GST_Nukl.NLS_GFP	Kodiert für GST_Nukleoplasmin NLS_GFP	diese Arbeit
pSUPER_siNY1	Kodiert für siRNA_NY1	diese Arbeit
pSUPER_siNY2	Kodiert für siRNA_NY2	diese Arbeit
pF143	pCDNA3.1-Vektor, der für GFP kodiert	ROSORIOUS <i>et al.</i> , 1999
pC3_Survivin_GFP	Kodiert für Survivin_GFP	KNAUER <i>et al.</i> , in Vorbereitung
pC3_FLAG_FasL	Kodiert für FLAG_FasLigand	M. Zörnig, GSH, Frankfurt
pCi_NK-1R	Kodiert für den FLAG_Neurokinin-1 Rezeptor	MONASTYRSKAYA <i>et al.</i> , 2005

* Plasmidkarten siehe Anhang

Tabelle 2.7 | Hefe-Vektoren für das Hefe-Zwei-Hybrid System

Plasmid	Relevante Merkmale	Referenz
pBTM_NY56-369	Kodiert für LexA_NY-BR-1 aa 56-369	diese Arbeit
pBTM_NY396-609	Kodiert für LexA_NY-BR-1 aa 396-609	diese Arbeit
pBTM_NY609-1397	Kodiert für LexA_NY-BR-1 aa 609-1397	diese Arbeit
pBTM_NY1125-1397	Kodiert für LexA_NY-BR-1 aa 1125-1397	diese Arbeit
pBTM_NY608-853	Kodiert für LexA_NY-BR-1 aa 608-853	diese Arbeit
pGAD_NY56-369	Kodiert für Gal4_NY-BR-1 aa 56-369	diese Arbeit
pGAD_NY396-609	Kodiert für Gal4_NY-BR-1 aa 396-609	diese Arbeit
pGAD_NY609-1397	Kodiert für Gal4_NY-BR-1 aa 609-1397	diese Arbeit
pGAD_NY1125-1397	Kodiert für Gal4_NY-BR-1 aa 1125-1397	diese Arbeit
pGAD_NY608-853	Kodiert für Gal4_NY-BR-1 aa 608-853	diese Arbeit

2.1.5 Oligonukleotide

Die synthetisch hergestellten Oligonukleotide wurden von der Firma BioSpring (Frankfurt) oder von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Folgende Oligonukleotide wurden für Sequenzanalysen (Tabelle 2.8), für „Oligoannealing“ (Kapitel 2.2.9), als Primer für die Polymerasekettenreaktion (PCR, qPCR, RACE) (Tabelle 2.9, Tabelle 2.10, Tabelle 2.11) bzw. für die Transfektion (siRNA-Oligos) (Tabelle 2.12) verwendet:

Tabelle 2.8 | Primer für Sequenzanalyse

Name	Sequenz
pC3 5'sequ	5'-GGAGGTCTATATAAGCAGAGCTC-3'
pC3 3'sequ	5'-CAACTAGAAGGCACAGTCGAG-3'
GST 3'sequ	5'-GCCTTTGCAGGGCTGGCAAG-3'
GFP 5'sequ	5'-GTGGCATCGCCCTCGCCCTC-3'
pGAD426 GAL4-AD	5'-CGCGTTTGAATCACTACAGGG-3'
pGAD426 sequ rev	5'-GGCCAAGATTGAACTTAGAGG-3'
pBTM117c sequ LEXA	5'-GCGAGTTTAAACCAATTGTCGTAG-3'
pBTM117c sequ rev	5'-GCAACCTGACCTACAGGAAAGAG-3'
T7 Promoter	5'-TAATACGACTCACTATAG-3'
SP6	5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3'
5'NY-BR-1 sequ aa 969	5'-CATTCTTGTGAAAGAGCAAGGG-3'
3'NY-BR-1 sequ aa 975	5'-CCCTTGCTCTTTCACAAGAATG-3'

Primer für „Oligoannealing“

Doppelsträngiges Oligonukleotid, das für das FLAG-Epitop (DYKDDDDK) und eine SacII Schnittstelle kodiert und mittels Schnittstellenüberhängen (EcoRI/BamHI) in den entsprechend aufgeschnittenen pC3(-)_NY-BR-1 Vektor kloniert wurde; durch „Annealing“ produziert:

FLAG EcoRI (sense)	5'-GAATTCCC GCGGCCACCATGGATTACAAGGACGACGATGACAAGG-3'
FLAG BamHI (antisense)	5'-GATCCCTTGT CATCGTCGTCCTTGT AATCCATGGTGGCCGCGGG-3'

Doppelsträngiges Oligonukleotid, das für das myc-Epitop (EQKLISEEDL) kodiert und mittels Schnittstellenüberhängen (NheI/EcoRI) in den entsprechend aufgeschnittenen pC3_NY609-1397 Vektor kloniert wurde; durch „Annealing“ produziert:

myc NheI (sense)	5'-CTAGCGAACAGAACTGATCAGCGAAGAGGATCTGTGAG -3'
myc EcoRI (antisense)	5'-AATTCTCACAGATCCTCTTCGCTGATCAGTTTCTGTTCG-3'

Doppelsträngiges Oligonukleotid, das für das SV40NLS (MPPKKRKRKVEDPG) kodiert und mittels Schnittstellenüberhängen (HindIII/BamHI) in den entsprechend aufgeschnittenen pC3_GFP Vektor kloniert wurde; durch „Annealing“ produziert:

SV40NLS HindIII (sense)	5'-AGCTTATGCCACCTAAGAAAAAAGAAAGTTGAAGATCCTGGTAG-3'
SV40NLS BamHI (antisense)	5'-GATCCTACCAGGATCTTCAACCTTTCTTTTTTCTTAGGTGGCATA-3'

Doppelsträngiges Oligonukleotid, das für das „bipartite“ NLS (KRPAATKKAGQAKKKLDDK) des Nucleoplasmins kodiert und mittels Schnittstellenüberhängen (BamHI/NheI) in den entsprechend aufgeschnittenen pGEX_GFP Vektor kloniert wurde; durch „Annealing“ produziert:

N.NLS BamHI (sense)	5'-GATCCACAAGAGGCTGCGGCTACCAAAAAAGCAGGCCAGGCAAAGAAGAAGAACTTGACAAAAG-3'
N.NLS NheI (antisense)	5'-CTAGCTTTGTCAAGTTTCTTCTTCTTTCGCTGGCCTGCTTTTTTGGTAGCCGAGGCCTCTTGTG-3'

Doppelsträngiges Oligonukleotid, das für die aa 56-62 von NY-BR-1 kodiert und mittels Schnittstellenüberhängen (BamHI/NheI) in den entsprechend aufgeschnittenen pC3_GST-GFP Vektor sowie in den pGEX_GFP Vektor kloniert wurde; durch „Annealing“ produziert:

BamHI NY aa 56-62 (sense)	5'-GATCCACATGACAAAGAGGAAGAAGG-3'
NheI NY aa 56-62 (antisense)	5'-CTAGCCTTCTCCTCTTTGT CATGTG-3'

Doppelsträngiges Oligonukleotid, das für die aa 57-74 von NY-BR-1 kodiert und mittels Schnittstellenüberhängen (BamHI/NheI) in den entsprechend aufgeschnittenen pC3_GST-GFP Vektor sowie in den pGEX_GFP Vektor kloniert wurde; durch „Annealing“ produziert:

BamHI NY aa 57-74 (sense)	5'-GATCCACACAAAGAGGAAGAAGACCATCAACCTTAATATACAAGACGCCAGAAAGAGGG-3'
NheI NY aa 57-74 (antisense)	5'-CTAGCCCTCTTCTGGCGTCTTGATATTAAGGTTGATGGTCTTCTCTCTTTGTGTG-3'

Tabelle 2.9 | qPCR-/"Real-Time"-PCR-Primer

Name	Sequenz
NY-BR-1 sense (#1048)	5'-CAAGAGCTCTGCAGTGTGAGATTG-3'
NY-BR-1 antisense (#1049)	5'-CTGGTATTGGTGTTCAGTGTGGC-3'
NY-BR-1 sense (#715)	5'-AACATGCACAAAGAGACCAACGT-3'
NY-BR-1 antisense (#716)	5'-TGTTTGTTCACATTATCTTGTTCGTTT-3'
β-Aktin sense	5'-GCGGGAAATCGTGCCTGACATT-3'
β-Aktin antisense	5'-GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGTG-3'

Tabelle 2.10 | PCR-Primer

Name	Sequenz
5'NY-BR-1 BamHI	5'-AAAGGATCCACATGGAGGAGATCTCTGCC-3'
5'NY-BR-1 BamHI aa 56	5'-AAAGGATCCACATGACAAAGAGGAAGAAGACCATC-3'
5'NY-BR-1 BamHI aa 111	5'-AAAGGATCCACATGAAGGCTCTACAATGCCATC-3'
5'NY-BR-1 KpnI aa 56	5'-AAAGGTACCACATGACAAAGAGGAAGAAGACCATC-3'
5'NY-BR-1 BamHI aa 62	5'-AAAGGATCCACATGACCATCAACCTTAATATACAA-3'
5'NY-BR-1 BamHI aa 73	5'-AAAGGATCCACAAGAGGACTGCTCTACACTGG-3'
3'NY-BR-1 BamHI aa 173	5'-AAAGGATCCTGTTGTGCACTTCGAT-3'
3'NY-BR-1 NheI aa 173	5'-AAAGCTAGCCTTGTGTG-3'
5'NY-BR-1 BamHI aa56	5'-AAAGGATCCATGACAAAGAGGAAGAAGACCATC-3'
3'NY-BR-1 KpnI aa169	5'-AAAGGTACCTCACTTGTGTGCACTTCGATGACTGC-3'
3'NY-BR-1 KpnI aa367	5'-AAAGGTACCTCATGTTTCTTCTGCTGACTGTTC-3'
5'NY-BR-1 BamHI aa 852	5'-AAAGGATCCACATGTTCCCTTCAGAATCAAAAC-3'
5'NY-BR-1 BamHI aa 1125	5'-AAAGGATCCACATGGAAATAGCCACACTGAAACACCAATAC-3'
3'NY-BR-1 NheI aa 1397	5'-AAAGCTAGCTGAGTTTTCTGTTTCTGCTTTCTCTTTTTC-3'
3'NY-BR-1 NheI aa 1125	5'-AAAGCTAGCGTATTGGTGTTCAGTGTGGCTATTTC-3'
5'NY-BR-1 BamHI aa 173	5'-AAAGGATCCACATGCTCACACCACTTTTACTATCC-3'
5'NY-BR-1 BamHI aa 609	5'-AAAGGATCCACATGAAGGCTACCTGCGGAATG-3'
3'NY-BR-1 NheI aa 1171	5'-AAAGCTAGCCAGAACTTTAAGCTGCCC-3'
5'NY-BR-1 Sall aa 56 YTH	5'-AAAGTCGACGACAAAGAGGAAGAAGACC-3'
3'NY-BR-1 NotI aa 396 YTH	5'-AAAGCGGCCGCTCAAATTTCCCTAGGTGT-3'
3'NY-BR-1 NotI aa 609 YTH	5'-AAAGCGGCCGCTCACAGAAGACCATC-3'
5'NY-BR-1 Sall aa 396 YTH	5'-AAAGTCGACGAGTCCCGCAAAGAAACATC-3'
3'NY-BR-1 NotI aa 853 YTH	5'-AAAGCGGCCGCTCACATTCTGCAGGGAGCC-3'
5'NY-BR-1 Sall aa 608 YTH	5'-AAAGTCGACGAAGGCTACCTGCGGAATGAAAG-3'
3'NY-BR-1 NotI aa 1397 YTH	5'-AAAGCGGCCGCTCATGAGTTTTCTGTTTC-3'
5'NY-BR-1 Sall aa 853 YTH	5'-AAAGTCGACGAAAGTTTCTATTCCAAC-3'

Tabelle 2.11 | RACE-PCR Primer

Name	Sequenz
3'NY-BR-1 BglII aa 325	5'-CTTAGATCTTCTTTTCCAAAAC-3'
3'NY-BR-1 PvuII aa 225	5'-TTTCAGCTGTGTCAGGTGTTCTTTC-3'
3'NY-BR-1 NcoI aa 157	5'-GATGACTGCACCATGGGACAGCAG-3'

Tabelle 2.12 | siRNA Oligos

Name	Sequenz
NYsiRNA1 (aa 748)	5'-AACUUUCAAGCAGAGCCUCCdTdT-3' und 5'-GGAGGCUCUGCUUUGAAAGdTdT-3'
NYsiRNA2 (aa 1022)	5'-CAAGAGCUCUGCAGUGUGAdTdT-3' und 5'-UCACACUCGAGAGCUCUUGdTdT-3'
5'siRNA1 pSuper B/H	5'-GATCCCCCTTTCAAAGCAGAGCCTCCTCAAGAGAGGAGGCTCTGCTTTGAAAGTTTTGGAAA-3'
3'siRNA1 pSuper H/B	5'-AGCTTTTCCAAAACTTTCAAAGCAGAGCCTCCTCCTTGAAGGAGGCTCTGCTTTGAAAGGGGGATC-3'
5'siRNA2 pSuper B/H	5'-GATCCCCCAAGAGCTCTGCAGTGTGATTCAAGAGATCACACTGCAGAGCTCTGTTTTGGAAA-3'
3'siRNA2 pSuper H/B	5'-AGCTTTTCCAAAAACAAGAGCTCTGCAGTGTGATCTCTTGAATCACACTGCAGAGCTCTTGGGG-3'

Die siRNA Oligos (Tabelle 2.12) wurden als doppelsträngige Oligonukleotide mittels Schnittstellenüberhängen (HindIII/BglII) in den entsprechend aufgeschnittenen pSUPER-Vektor kloniert; durch „Annealing“ produziert.

2.1.6 Bakterienstämme und Kulturbedingungen

Bakterienstamm	Genotyp	Hersteller/Referenz
<i>E. coli</i> XL2-BlueTM	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F0 proAB lacqZ_M15 Tn10 (Tetr) Amy Cam ^r]	Stratagene (Heidelberg)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	<i>E. coli</i> B F- <i>dcm ompT hsdS</i> (rB- mB-) <i>gal</i> λ.(DE3) [pLysS Cam ^r]	Stratagene (Heidelberg)

Zur Vermehrung von Plasmidvektoren diente ausschließlich der *E. coli* Stamm XL2 blue (Stratagene, Heidelberg) und zur heterologen Expression im bakteriellen System der *E. coli* Stamm BL21 (DE3) pLysS (Stratagene, Heidelberg). Bakterienmedien wurden von der Firma GIBCO/Invitrogen (Karlsruhe) oder der Firma Difco (Augsburg) bezogen.

2.1.7 Zelllinien

Zelllinie	Organismus/Gewebe/Charakteristika	ATCC Nr./Referenz
HeLa	Cervix Adenokarzinom, <i>Homo sapiens</i>	CCL-2
293T	Embryonales Nierengewebe, <i>Homo sapiens</i>	CRL-11268
MDA MB 453	Epitheliales Brustkarzinom, perikardiale und pleurale Effusion, <i>Homo sapiens</i>	HTB-131
MDA MB 435	Duktales Brustkarzinom, pleurale Effusion, <i>Homo sapiens</i>	HTB-129
MDA MB 468	Epitheliales Brust Adenokarzinom, pleurale Effusion <i>Homo sapiens</i>	HTB-132
BT474	Duktales Brustkarzinom, pleurale Effusion, <i>Homo sapiens</i>	HTB-20
SK-BR-3	Epitheliales Brust Adenokarzinom, pleurale Effusion, <i>Homo sapiens</i>	HTB-30
MCF-7	Epitheliales Brust Adenokarzinom, pleurale Effusion, <i>Homo sapiens</i>	HTB-22
MCF-10A	Brust Epithelzellen, Milchdrüse, Zyste, <i>Homo sapiens</i>	CRL-10317
HBL-100	Brust, benigne Epithelzellen aus Milch isoliert, <i>Homo sapiens</i>	ICLC HTL00004
A431	Epidermoides Karzinom, <i>Homo sapiens</i>	DSMZ ACC 91
Vero	Normales Nierengewebe, <i>Cercopithecus aethiops</i>	CCL-81
HC-11	Murine Mammaepithelzelllinie, <i>Mus musculus</i>	BALL <i>et al.</i> , 1988
Cates-1B	Testis, embrionales Karzinom, Lymphmetastase, <i>Homo sapiens</i>	HTB-104
PC3	Prostata Adenokarzinom, Knochenmetastase, <i>Homo sapiens</i>	CRL-1435
LnCaP	Prostatacarcinom, Lymphknotenmetastase, <i>Homo sapiens</i>	CRL-1740
BPH1	Benigne Prostatahyperplasie, <i>Homo sapiens</i>	DSMZ ACC 143
DU-145	Prostatakarzinom, Hirnmetastase, <i>Homo sapiens</i>	HTB-81
MDCK	Nierenepithelzellen, <i>Canis familiaris</i>	CCL-34
NIH 3T3	Fibroblasten, <i>Mus musculus</i>	CRL-1658
NIH 3.7	NIH3T3Zellen, die stabil hErbB2 exprimieren; konstitutiv aktiver ErbB2 Rezeptor (aktiv durch Punktmutation der Transmembrandomäne)	HARWERTH <i>et al.</i> , 1993
HUVEC	humane Nabelschnurendothelzellen	Urologie, Uniklinik Frankfurt

2.1.8 Patientenmaterial/Gewebeproben

Gewebeprobe	Herkunft
Normales Brustgewebe	Krankenhaus Nordwest, Frankfurt
Brusttumor Metastasen	Krankenhaus Nordwest, Frankfurt
Brust Primärtumoren	Krankenhaus Nordwest, Frankfurt
Prostata Normalgewebe und Tumor	Urologie, Uniklinik Frankfurt
Testis/Seminom	Urologie, Uniklinik Frankfurt

Patientenseren	Herkunft
Seren von Brusttumorpatienten	Krankenhaus Nordwest, Frankfurt; Universitätsklinik Homburg
Seren von gesunden Individuen	Georg-Speyer-Haus, Frankfurt

Die zur Verfügung gestellten Gewebeproben wurden nach Entnahme sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Die Seren wurden ebenfalls bei -80°C gelagert.

2.1.9 Software/computergestützte Analysen

Programm	Referenz/Internetseite
BLAST	www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/
Ensembl	www.ensembl.org
PSortII	http://psort.nibb.ac.jp/form2.html
Pfam	http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/
ScanProsite	via ExPASy server
ProtScale	via ExPASy server
InterPro scan	via ExPASy server
ConPred II	ARAI <i>et al.</i> , 2004
Kyte und Doolittle	KYTE AND DOOLITTLE, 1982
big-PI Predictor	ExPASy server
coiled coil predictions	http://www.russell.embl.de/cgi-bin/coils-svr.pl
NetNGlyc/NetOGlyc	via ExPASy server
GeneCards	http://www.nbn.ac.za/genecards/index.shtml
ExPASy Server	www.expasy.org
CGH-Datenbank	Analyse durchgeführt von Dr. S. Joos, DKFZ, Heidelberg

DNA-Sequenzen wurden mit den Programmen BioEdit und Gene Construction Kit analysiert. Homologierecherchen mit DNA- und Proteinsequenzen sowie Vergleiche mit genomischer DNA erfolgten mit der Ensembl Datenbank und mit dem BLAST Programm. Für die Analyse der Proteinsequenz (Motive, Domänen, etc.) wurden die in der Tabelle aufgeführten Algorithmen verwendet. Neben den Standard-Office-Programmen wurden außerdem CellQuestPro, AxioVision 3.0, Leica „Confocal Software“, PhotoShop 5 und Canvas 9 zur Datenauswertung und Bildbearbeitung benutzt.

2.2 Methoden

Standardmethoden und Herstellungsanweisungen für Reagenzien und Lösungen wurden den Handbüchern "Molecular Cloning" (SAMBROOK *et al.*, 1989) oder "Current Protocols in Molecular Biology" (GOLEMIS *et al.*, 2001) entnommen.

2.2.1 Herstellung kompetenter *E.coli* Zellen

TBjap ("Transformation Buffer Japanese"):	10mM Pipes (M 302,4g), 15mM CaCl ₂ (M 147,02g), 250mM KCl (M 74,56g) Einstellen mit KOH auf pH 6,7
---	--

Die Methode zur Herstellung kompetenter Zellen und deren Transformation geht auf Hanahan (HANAHAN, 1983) zurück. Eine *E.coli* XL2-Blue Kolonie wurde in LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C im Bakterienschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Kultur bei Raumtemperatur bis zu einer optischen Dichte (600nm) von 0.6 kultiviert, anschließend durch Zentrifugation geerntet (4°C, 10min, 4000rpm) und in 80ml TBjap, 2% DMSO (v/v) resuspendiert. Die Zellen wurden nochmals zentrifugiert (4°C, 10min, 4000 rpm) und das Pellet in 19ml TBjap, 2% DMSO resuspendiert. Nach Zugabe von 1ml DMSO (EK 7% (v/v)) wurden die Bakterien in Eppendorf-Reaktionsgefäßen zu 100µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.2 Transformation kompetenter *E.coli* Zellen

Ampicillin:	Stammlösung 100mg/ml
Luria-Bertani (LB) Medium:	5g NaCl, 5g Hefeextrakt, 10g Trypton, in 1l H ₂ O, sterilisiert durch Autoklavieren
LB-amp-Medium:	LB-Medium, 100µg/ml Ampicillin
LB-amp-Agar:	5g NaCl, 5g Hefeextrakt, 10g Trypton, 1.5% (w/v) Agar, in 1l H ₂ O; sterilisiert durch Autoklavieren; nach Abkühlen auf 50-60°C Zugabe von 100µg/ml Ampicillin

Kompetente *E.coli* Zellen (100µl Bakteriensuspension) wurden zunächst auf Eis aufgetaut, mit dem Ligationsansatz bzw. einem Plasmid gemischt und 30min auf Eis inkubiert. Für *E.coli* BL21 Zellen erfolgte eine Inkubation von 20s, für XL2 blue Zellen eine Inkubation von 30s bei 42°C gefolgt von einer zweiminütigen Inkubation auf Eis. Nach 45min Inkubation in LB-Medium bei 37°C wurden die Bakterien auf antibiotikahaltige Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Anzucht der Bakterien:

Die *E.coli* Kulturen wurden unter aeroben Bedingungen über Nacht bei 37°C in LB-Medium angezogen.

Herstellung und Lagerung von Glycerinkulturen:

Bakterien wurden in Flüssigkulturen mit 15% (v/v) sterilem Glycerin bei -80°C gelagert.

2.2.3 Plasmidisolierung aus *E.coli*

E.coli Zellen aus Übernachtskulturen (LB-Medium, 100µg/ml Ampicillin) wurden durch Zentrifugation geerntet. Je nach benötigter Plasmid-DNA-Menge wurden entweder der QIAprep Miniprep oder Maxiprep Kit (Qiagen, Hilden) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Die Plasmid-DNA wurde mit Wasser von den Säulen eluiert.

2.2.4 DNA-Restriktion und Agarose-Gelelektrophorese

TAE buffer (1x):	40mM Tris-HCl, 1mM EDTA, eingestellt mit Essigsäure auf pH 8.0
DNA-Probenpuffer (5x):	20% (w/v) Glycerin, 100mM EDTA, 0.25% (w/v) Bromphenolblau, 0.25% (w/v) Xylencyanol
DNA-Molekulargewichtsmarker:	NEB, Schwalbach

Für die Restriktionsenzyme sind die von den Herstellern (NEB, Schwalbach bzw. MBI Fermentas, St. Leon-Rot) angegebenen Puffer und Inkubationstemperaturen verwendet worden. Generell wurden 1-5µg DNA verdaut und nach Zugabe des 5x DNA-Probenpuffers elektrophoretisch in 0.8-2% Agarosegelen aufgetrennt.

2.2.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Nach der Trennung von DNA-Molekülen durch Agarose-Gelelektrophorese wurden die DNA-Fragmente unter UV-Licht ($\lambda = 260\text{nm}$) in einer Geldokumentationsanlage mit einem Skalpell in Form kleiner Blöckchen ausgeschnitten, mit der standardisierten Methode des QIAquick II Agarose Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden) aus den Agarose-Blöckchen extrahiert und mit Wasser von den Säulen eluiert.

2.2.6 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

PAA-Gel (DNA):	7.8ml H ₂ O, 2ml Acrylamid/Bisacrylamid 30%(w/v):0,8%(w/v), 200µl 50xTAE, 100µl APS (10%), 10µl TEMED
----------------	--

Zur Auftrennung kurzer DNA-Fragmente wurde eine PAA-Gelelektrophorese in 1xTAE-Puffer bei 120-130V durchgeführt.

2.2.7 Dephosphorylierung der 5'-Enden

Um nach Restriktionen mit nur einem Restriktionsenzym die Religation des Vektors zu verhindern, wurden die 5'-Enden der DNA mit alkalischer Phosphatase gemäß den Angaben des Herstellers verdaut ("Calf Intestine Phosphatase" (CIP), NEB, Schwalbach).

2.2.8 Auffüllen 5'-überhängender Enden mit der T4 Polymerase

Überhängende 5'-Enden doppelsträngiger DNA, die bei Restriktionsspaltungen (Kapitel 2.2.4) entstehen, wurden durch die T4-Polymerase (NEB, Schwalbach) zu „glatten Enden“ aufgefüllt. Hierdurch wird die Ligation von DNA-Fragmenten ermöglicht, die durch Restriktion mit verschiedenen Enzymen inkompatible Enden erhalten haben. Außerdem können so Restriktionsschnittstellen durch Auffüllen und Religation entfernt werden.

2.2.9 „Oligoannealing“

Synthetisch hergestellte komplementäre Oligonukleotide können bei einer Ligation als "Insert" verwendet werden. Sofern die Oligonukleotide nicht phosphoryliert waren, wurden die 5'-Enden zunächst mit einer Phosphonukleotidkinase (PNK, NEB, Schwalbach) phosphoryliert. Für die Phosphorylierung werden je 1 µg der in HPLC-H₂O gelösten Oligonukleotide mit je 1 µl PNK-Puffer, dNTPs und PNK versetzt und auf 10 µl mit H₂O_{bidest} aufgefüllt. Die Inkubation erfolgt für 20 min bei 37°C. Für die Hybridisierung ("Annealing") wurden 2 µl 10xNEB Puffer 3 und H₂O_{bidest} ad 20 µl Reaktionsvolumen hinzugegeben, das Gemisch in einem Wasserbad auf 100°C erhitzt und bei Raumtemperatur abgekühlt.

2.2.10 DNA-Ligation

Mit Hilfe der DNA-Ligation können durch PCR hergestellte oder durch Restriktionsenzyme ausgeschnittene DNA-Fragmente („Inserts“) in entsprechend aufgeschnittene Plasmid-Vektoren inseriert werden. Es wurde entweder die T4-DNA-Ligase der Firmen NEB (Schwalbach) oder TaKaRa (über Mobitec, Göttingen bezogen) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.11 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde durch die Absorptionen bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch ermittelt, wobei eine Absorptionseinheit bei 260 nm einer Konzentration von 50 µg doppelsträngiger DNA/ml bzw. 40 µg RNA/ml entspricht (SAMBROOK *et al.*, 1989). Verunreinigungen durch Proteine lassen sich durch hohe Extinktionswerte bei 230 nm (Absorption der Peptidbindung) sowie bei 280 nm (Absorption aromatischer Aminosäuren) nachweisen. Das 260/280 nm-Verhältnis von reiner RNA liegt bei 1.7-1.8. Für reine DNA ist ein 260/280 nm-Verhältnis von ≥ 2 beschrieben.

2.2.12 DNA-Amplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation definierter DNA-Abschnitte erfolgte in einem Thermoblock der Firma Biometra. Dabei wurde als Standard ein Programm mit 1 min Denaturierung bei 94°C, 30 s Hybridisierung und 3 min Extension bei 72°C für 35 Zyklen verwendet. Die

Hybridisierungstemperatur wurde abhängig von der Art der eingesetzten DNA und der gewünschten Spezifität der Reaktion zwischen 45°C und 55°C variiert. Das Reaktionsvolumen betrug für eine diagnostische PCR 25µl, für eine präparative PCR 50µl. Ein PCR-Ansatz enthält zusätzlich zur Ausgangs-DNA (50ng) einen molaren Überschuss an Primern, eine hitzestabile DNA-Polymerase (BioTherm-Polymerase, GeneCraft; PWO, PeqLab) und einen Mix der vier Desoxyribonukleotide (dNTPs: dATP, dGTP, dCTP, dTTP). Beide DNA-Polymerasen wurden entsprechend den Angaben des Herstellers in die PCR-Reaktion eingesetzt.

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden mit der standardisierten Methode des QIAquick PCR-Purification Kit (QIAGEN, Hilden) direkt aufgereinigt oder über eine Agarosegelelektrophorese analysiert und anschließend isoliert (Kapitel 2.2.4, 2.2.5).

2.2.13 Sequenzanalyse

Zur Überprüfung der verwendeten Plasmide wurden die Sequenzen nach dem Prinzip des Kettenabbruchs von Sanger (SANGER *et al.*, 1977) hausintern bestimmt. Überprüft wurden die erhaltenen Sequenzen mithilfe von BLAST und dem BioEdit Programm (Kapitel 2.1.9).

2.2.14 RNA-Isolierung mit dem RNeasy Mini Kit

Für die Aufarbeitung von Gesamt-RNA aus Zellen oder Gewebe wurde das "RNeasy Kit"-Protokoll (Qiagen, Hilden) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Gewebeproben wurden mit einem Ultra-Turrax-T25 Homogenisator (IKA Labortechnik, Staufen, Germany) im Lysis-Puffer zerkleinert. Die RNA wurde mit HPLC-H₂O eluiert und bei -80°C gelagert.

2.2.15 Reverse Transkription PCR (RT PCR)

Die Synthese der cDNA erfolgte aus (1µg/Ansatz) Gesamt-RNA mit dem iScript "cDNA Synthesis Kit" (BioRad) gemäß den Angaben des Herstellers. Zur Benutzung in der quantitativen PCR wurde die cDNA 1:10 mit HPLC-H₂O verdünnt.

2.2.16 RACE-PCR

Die RACE-PCR wurde in dieser Arbeit dazu benutzt, um den 5' mRNA Bereich des NY-BR-1 Gens mit Hilfe des "5'/3'-RACE Kits" (Roche) zu amplifizieren. Die Prozedur wurde entsprechend den Angaben des Herstellers mit den in Tabelle 2.11 aufgelisteten Oligonukleotiden durchgeführt, wobei die genspezifischen NY-BR-1-Primer konsekutiv in den einzelnen Amplifikationsrunden eingesetzt wurden.

2.2.17 quantitative PCR („Real Time“ PCR Analyse)

Die Menge an NY-BR-1-Transkript wurde durch quantitative PCR mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR-Green (BUSTIN, 2000) in einem iCycler der Firma BioRad bestimmt. Der Standardreaktionsansatz (25µl) setzte sich aus 12,5µl 2x iQ™ SYBER® Green Supermix (BioRad), je 0.5µl 10µM Primer, 1µl (1:10) cDNA und H₂O zusammen. Für die „Two step“ PCR wurde als Standard ein Programm mit einem initialen Denaturierungsschritt bei 95°C für 3min gewählt, während denen die Gerätekalibrierung mit Fluorescein stattfindet. Daran schlossen sich 50 Zyklen bei 95°C für 30s und 30s bei 62°C an. Die kumulative Fluoreszenz wurde am Ende eines Zyklus gemessen. SYBR-Green interkaliert unspezifisch in doppelsträngige DNA. Nach der PCR muss deshalb die Schmelzkurve der PCR-Produkte kontrolliert werden, da sie Hinweise auf die spezifische Amplifikation eines DNA-Fragments gibt. Sind während der PCR verschiedene Fragmente amplifiziert worden, findet man mehrere „Peaks“ in der Schmelzkurve, was die Daten für weitere Analysen unbrauchbar macht. Schmelztemperaturen von weniger als 70°C deuten auf Primer-Dimere hin. Die Amplifikationskurve sollte idealerweise einen sigmoiden Verlauf haben und die Schwellenwert-Grenze in den linearen Bereich der sigmoiden Kurve gesetzt werden. Die Gerätesoftware errechnet für jede Probe die Zyklenzahl, die benötigt wurde, um diesen Schwellenwert zu erreichen (= CT-Wert, „threshold cycle“). Je geringer dieser Wert ist, desto mehr cDNA befand sich in der Probe. Um die Expression von NY-BR-1 im Vergleich zu einem "house keeping gene", in diesem Fall β-Aktin zu bestimmen, wurde die Expressionsratio nach folgender Formel errechnet: $\text{Ratio} = 2^{-\Delta\text{CT } \beta\text{-actin} - \Delta\text{CT NY-BR-1}}$. Die relative Expression von NY-BR-1 in einer Tumorprobe im Vergleich zu Normalgewebe, normalisiert auf β-Aktin wird nach folgender Formel errechnet: $\text{Ratio} = (E_{\text{target}})^{\Delta\text{CT target}(\text{control-sample})} / (E_{\text{ref}})^{\Delta\text{CT ref}(\text{control-sample})}$. Sie basiert auf der PCR Effizienz (E=2) und der Differenz der Schnittpunkte (CT) einer unbekannt Probe versus einer Kontrolle, zum Beispiel Tumor- versus Normalgewebe, im Vergleich zu einem Referenzgen. Berechnet wurden die Ratios mit Hilfe des REST Programms (PFAFFL, 2001).

2.2.18 „Northern-Blot“

20x SSC-Puffer:	0.3M Natriumcitrat, 3M NaCl, pH 7.0
10x MOPS-Puffer:	0.4M MOPS (Morpholinopropansulfat), 0.1M Natriumacetat 3xH ₂ O, 10mM EDTA, auf pH 7.2 mit NaOH einstellen, im Dunkeln bei 4°C lagern
Formaldehydgel:	0.5g Agarose, 36ml H ₂ O, 9ml Formaldehyd (37%), 5ml 10x MOPS Puffer
RNA-Probenpuffer:	1xMOPS, 18.5% Formaldehyd, 50% Formamid, 10% Glycerin, Bromphenolblau, bei -20°C lagern

Zum Nachweis der NY-BR-1 mRNA durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden wurde die aus Zelllinien isolierte Gesamt-RNA (10µg) nach Auftrennung (60V) in

einem Formaldehydgel auf eine inerte Membran (Hybond N, Amersham Pharmacia) transferiert ("Northern Blot"). Der Aufbau für den RNA-Transfer erfolgte nach Sambrook *et al.* (SAMBROOK *et al.*, 1989). Im Anschluss an die Formaldehydgel-Elektrophorese wurde das Gel zweimal 15min mit DEPC-H₂O_{bidest} gewaschen und anschließend in 2-fach konzentriertem SSC-Puffermedium äquilibriert. Das „Blotten“ erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur mit 10-fach konzentriertem SSC-Puffermedium. Der erfolgreiche RNA-Transfer konnte unter UV-Licht ($\lambda = 230\text{nm}$) überprüft werden.

2.2.19 Fixierung von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen

Die Membran wurde 5min in 2-fach konzentriertem SSC-Puffermedium gewaschen und die auf eine Nylonmembran transferierte RNA mit Hilfe eines UV-Ofens (Stratalinker, Stratagene) durch UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 254\text{nm}$ ($120\text{mJ} \cdot \text{cm}^2$) kovalent auf der Membran fixiert.

2.2.20 Synthese radioaktiv markierter DNA-Sonden

Die Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden erfolgte nach dem „Megaprime DNA- Labelling-System“ (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers, wobei [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP (3000 Ci/mmol; NEN DuPont, Bad Homburg) als radioaktiv markiertes Nukleotid eingesetzt wurde. Für die Synthese wurden ca. 20ng homologe DNA eingesetzt. Die synthetisierten Sonden wurden mittels Gelfiltration über "Nick Columns" (Amersham Pharmacia) gereinigt, um nicht inkorporierte Nukleotide zu eliminieren, bevor sie für die Hybridisierung verwendet werden konnten.

2.2.21 Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden

Hybridisierungspuffer:	1% BSA (Fraction V), 1mM EDTA, 7% SDS, 0.25M NaHPO ₄ , pH 7.2
Waschpuffer 1:	2x SSC 0.1% SDS
Waschpuffer 2:	1x SSC 0.1% SDS
Waschpuffer 3:	0.1x SSC 0.1 % SDS

Zur Hybridisierung mit homologen DNA-Sonden wurde die Nylonmembran zur Absättigung unbesetzter Membranbindungsstellen zuvor 30min bei Hybridisierungstemperatur (65°C) mit Hybridisierungspuffer (CHURCH UND GILBERT, 1984) vorhybridisiert. Die radioaktiv markierten DNA-Sonden (Kapitel 2.2.20) wurden für 5min bei 95°C denaturiert, anschließend 5min auf Eis gekühlt und zum Vorhybridisierungsansatz gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 65°C in Hybridisierungsröhren über Nacht. Um die unspezifisch gebundene DNA von der Nylonmembran zu entfernen, wurden die Röhren zunächst zweimal mit Waschpuffer 1 ausgespült und je zweimal 15min bei 60°C mit Waschpuffer 2 bzw. Waschpuffer 3

inkubiert. Nach dem Waschen konnten die Membranen in Frischhaltefolie eingeschlagen werden und Röntgenfilme (Kodak X-OMAT/XAR-5) in lichtdichten Expositionskassetten (BTS, St. Leon-Rot) mit Reflektorschirm („intensifying screen“, NEN DuPont, Bad Homburg) bei -80°C aufgelegt werden. Die Radioautogramme wurden entsprechend der Strahlungsintensität der Membranen nach 1-7 Tagen entwickelt.

2.2.22 Heterologe Expression rekombinanter Proteine in *E.coli*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in den pGEX-Vektor klonierten Expressionskonstrukte in kompetente *E.coli* Zellen des Stammes BL21 (DE3) pLysS transformiert (Kapitel 2.1.6). Die Expression der GST-Fusionsproteine wurde durch das Lactose-Analogon IPTG (Isopropyl β -D-thiogalactopyranosid) induziert. Zur heterologen Expression wurden zunächst Übernacht-Vorkulturen angezogen, die dann in frisches Medium im Verhältnis 1:100 in Kulturkolben mit Schikane überimpft wurden. Induziert wurden die Zellen bei einer $\text{OD}_{600} = 0.5$ durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0.2mM). Die Zellen wurden nach 3h Inkubation bei 30°C bzw. 12h Inkubation bei RT (Raumtemperatur) durch Zentrifugation (4000rpm, 20min, 4°C) geerntet. Die Lagerung der Zellpellets bis zur Bakterienlyse erfolgte bei -20°C .

2.2.23 Reinigung von GST-Fusionsproteinen

Elutionspuffer (5ml): 150 μl NaCl (5M), 250 μl Tris (1M, pH8), 4.6ml H_2O , 0.023g Glutathion

Das Bakterienpellet (aus 250ml Kultur) wurde in 10ml kaltem PBS-Puffer/DNaseI (Endkonzentration: 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) resuspendiert. Nach Zugabe von je 26 μl MnCl_2 (1M), 260 μl MgCl_2 (1M) sowie einer Spatelspitze Lysozym wurde das Lysat 15min auf Eis inkubiert und anschließend 3x10s sonifiziert. Anschließend erfolgte nach Zugabe von 1ml 5M NaCl + 500 μl 20% Triton X-100 eine weitere 10-minütige Inkubation auf Eis. Unlösliche Zellbestandteile werden durch Zentrifugation (14000rpm, 30min, 4°C) entfernt. Die Aufreinigung der GST-Fusionsproteine erfolgte über Affinitätschromatographie mit Glutathion-Sepharose (Amersham Pharmacia), an die der GST-Anteil des rekombinanten Proteins binden konnte. Zu dem Überstand wurden 300 μl Glutathion-Sepharose pipettiert und das Gemisch 1-2h bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden die Glutathion-Agarose-Partikel einmal mit 50ml PBS/1% Triton-X-100 und zweimal mit 50ml PBS (ohne Lysozym und ohne Protease-Inhibitoren) gewaschen. Das an Glutathion-Sepharose gebundene rekombinante GST-Fusionsprotein wurde in 5ml PBS resuspendiert und in eine PolyPrep-Säule (BioRad) überführt. Nachdem sämtliche Flüssigkeit herausgeflossen war, wurde die Säule unten abgedichtet. Das GST-Protein wird durch Zugabe von 1ml frisch hergestelltem Elutionspuffer von der Glutathion-

Sepharose eluiert. Die Säule wurde dazu oben verschlossen und das Gemisch 10-20min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Für Mikroinjektionsexperimente wurde das eluierte Protein über Nacht bei 4°C gegen PBS in Slide-A-Lyzer 10K Kassetten (Pierce/Perbio) dialysiert. Die Lagerung des rekombinanten Proteins erfolgte aliquotiert nach Schockgefrieren in flüssigem N₂ bei -80°C. Zur Bestimmung der Konzentration (Kapitel 2.2.26) und Reinheit der GST-Fusionsproteine wurde eine Proteinbestimmung und/oder SDS-PAGE (Kapitel 2.2.27.1) durchgeführt.

2.2.24 Reinigung von His-Fusionsproteinen

Die denaturierende Reinigung von His-Fusionsproteinen (8M Harnstoffpuffer) erfolgte über Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Agarose von Qiagen (Hilden) gemäß den Angaben des Herstellers.

2.2.25 Reinigung von Einschlusskörpern („Inclusion bodies“)

Viele in *E.coli* Zellen heterolog exprimierte Proteine, insbesondere Membranproteine, die durch übermäßigen Einbau in die Zellmembran toxisch für das Bakterium sind, bilden hochmolekulare Aggregate, so genannte Einschlusskörper („Inclusion bodies“). Dieses Phänomen beschränkt sich nicht nur auf in *E.coli* Zellen heterolog exprimierte Proteine, sondern ist auch bei *E.coli*-eigenen Proteinen, deren Expressionsrate extrem hoch war, beobachtet worden (GRIBSKOV UND BURGESS, 1983).

500ml Bakterienkultur (Kapitel 2.2.22) wurden durch Zentrifugation geerntet, in 25ml kaltem PBS resuspendiert und 3x40s sonifiziert. Zwischen den einzelnen Sonifizierungsschritten wurden die Proben 3min auf Eis gestellt. Die Suspension wurde 10min bei 6500g zentrifugiert (4°C). Mit dem Überstand folgte eine weitere Zentrifugation bei 40000g für 15min. Der Niederschlag wurde in PBS/1% Triton-X-100 resuspendiert und erneut zentrifugiert (4000g, 10min, 4°C). Das erhaltene Pellet wurde anschließend in 8M Harnstoff/20mM DTT resuspendiert und eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Roller inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (40000g, 10min, 15°C) wurde der Überstand (gelöste Einschlusskörper) abgenommen und bei 4°C gelagert.

2.2.26 Proteinquantifizierung nach Bradford

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte nach der Methode von Bradford (BRADFORD, 1976). Die Stammlösung des Proteinfärbereagens (BioRad Protein „Assay“, mit Coomassie G-250, BioRad) wurde mit destilliertem Wasser 1:5 verdünnt. Jeweils 1-2µl des Proteinlysats und des entsprechenden Lysis-Puffers wurden mit 1ml Bradfordlösung

vermischt, bei 595 nm im Photometer vermessen und anhand einer Eichkurve quantifiziert.

2.2.27 SDS-PAGE und „Western Blot“

2.2.27.1 SDS-PAGE

Acrylamid/Bisacrylamid:	30% (w/v):0,8% (w/v)
APS:	10% (w/v) in H ₂ O
Trenngelpuffer:	1.5M Tris-HCl pH 8.8, 0.4% SDS
Sammelgelpuffer:	0.5M Tris-HCl pH 6.8, 0.4% SDS
SDS-Lämmli-puffer (6x):	3.5ml 1M Tris/HCl pH 6.8, 3ml β-Mercaptoethanol (14,3M), 1g SDS, 3ml Glycerol, 200µl 1% (w/v) Bromophenolblau, ad 10ml H ₂ O
SDS-Laufpuffer (1x):	25mM Tris, 250mM Glycin, 0.1% SDS
Coomassie Entfärbelösung:	200ml Methanol, 70ml Eisessig ad 1l H ₂ O
Coomassie Lösung:	0.08% Coomassie G250, 1.6% Phosphorsäure, 8% Ammoniumsulfat, 20 % Methanol
Protein-Molekulargewichtsmarker:	NEB (Schwalbach), PeqLab (Erlangen)

Zur Auftrennung von Proteinen mit einem größeren Molekulargewicht als 10kDa wurde eine diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, abgekürzt SDS-PAGE nach Laemmli (LAEMMLI *et al.*, 1970) durchgeführt. Die SDS-PAGE erfolgte bei 30-50mA in einfach konzentriertem SDS-Laufpuffermedium in Elektrophoresekammern der Firma BioRad. Die Protein-Proben (10-100µg Protein) wurden vor dem Gellauf mit 6-fach konzentriertem Gelladepuffermedium versetzt und 5-10min bei 95°C denaturiert. Für eine Molekularmassenbestimmung wurden die Proteingemische „Prestained Protein Marker, Broad Range“ (NEB) und peqGold (PeqLab) verwendet.

Zur Anfärbung der Proteinbanden wurden die Gele zunächst 10min in gebrauchter Entfärbelösung inkubiert, um die Proteine im Gel zu fixieren und um den größten Teil des SDS zu entfernen. Anschließend wurden die Gele für 20min in Färbelösung überführt. Danach wurde das überschüssige Coomassie in Entfärbelösung ausgewaschen und die Gele getrocknet.

2.2.27.2 „Western Blot“/„Immunoblot“

Transferpuffer (1x):	25mM Tris, 192mM Glycin, 20% Methanol
Blockierungspuffer/Inkubationspuffer für Antikörper:	5% Magermilchpulver, 0.05% Tween, PBS
Waschpuffer:	0.1% Triton-X-100, PBS
Ponceau-Lösung:	1g Ponceau S, 50ml Essigsäure, H ₂ O ad 1l
ECL- bzw. ECLplus Kit	Amersham Pharmacia, Freiburg

Nach der Auftrennung im SDS-Gel wurden die Proteine auf eine Immobilon-P Membran (0.45µm, Millipore, Schwalbach) in einer „Transblot Semi Dry“ (BioRad) Kammer transferiert. Vor dem Transfer wurde die Membranen kurz in 100% Methanol gelegt und anschließend zusammen mit dem SDS-Gel 15min. in Transferpuffer äquilibriert. Der Transfer erfolgte bei 80mA/Gel. Der Proteintransfer wurde mit reversibler Ponceaurotfärbung überprüft. Unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Membran wurden in Blockierungspuffer für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C blockiert. Dann erfolgte eine Inkubation mit dem Primärantikörper für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Nach der Inkubation mit dem Erstantikörper wurde die Membran dreimal 10min gewaschen und bei Raumtemperatur für eine Stunde mit dem Zweitantikörper inkubiert. Durch dreimaliges Waschen wurde überschüssiger, nicht gebundener Sekundärantikörper entfernt. Die Detektion der HRP-Aktivität erfolgte mit dem ECL- bzw. ECLplus Kit (Amersham Pharmacia) gemäß den Angaben des Herstellers.

2.2.28 Entfernen von an Membranen gebundenen Antikörpern

Strip-Puffer:

65mM Tris pH 6,8, 2% SDS, 50µM β-Mercaptoethanol

Das "Strippen" der Membran diente dazu, bereits gebundene Antikörper zu entfernen, so dass ein Nachweis mit einem anderen Erstantikörper möglich war. Dazu wurde die Membran 20-30 Minuten bei 50°C im "Strip"-Puffer inkubiert und anschließend 3 x 15min gewaschen (0,1%-Triton-X-100, PBS). Anschließend musste diese erneut geblockt werden, bevor die Inkubation mit einem weiteren Erstantikörper erfolgen konnte.

2.2.29 Erzeugung polyklonaler Antikörperseren

Für die Immunisierung zweier Hühner (Firma Pineda, Berlin) wurde den Tieren einige Male im Abstand von vier und zwei Wochen das Zielprotein injiziert. Vor der Erstimmunisierung wurde den Hühnern 1ml Blut für ein Prä-Immuserum entnommen. Zur Immunisierung wurden jeweils 0,4mg Protein/Huhn subkutan injiziert. Die Blutentnahme erfolgte ab Tag 61 alle 30 Tage. Parallel dazu wurden sofern vorhanden die Dotter der gelegten Eier gesammelt.

2.2.30 Prä-Absorption polyklonaler Antiseren gegen GST-GFP-Protein

Gereinigtes GST-GFP Protein (100µl, 100µg) wurde über Nacht bei 4°C an Glutathion-Sepharose (20µl) gebunden, abzentrifugiert, in 100µl PBS resuspendiert und 1h bei 4°C

mit 200µl Antiserum inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand mit NaN_3 (0,02%) versetzt und bei 4°C gelagert.

2.2.31 Kultivierung von Säugerzellen

Penicillin / Streptomycin (100x):	10.000U/ml Penicillin, 10mg/ml Streptomycin
Trypsin:	Trypsin/EDTA mit Phenolrot 0.25g/l (Invitrogen, Karlsruhe)
L-Glutamin (100x):	200 mM in 0.85% NaCl-Lösung (BioWhittaker, Verviers, Belgien)
FCS:	Fötales Kälber Serum (FCS) (PAA Laboratories, Linz; Invitrogen, Karlsruhe) Hitzeinaktivierung 30min bei 56°C (FCSi)
DPBS:	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Bio Whittaker, Belgien)
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Bio Whittaker, Verviers, Belgien)
RPMI:	Roswell Park Memorial Institute (Invitrogen, Karlsruhe; BioWhittaker, Verviers, Belgien)
DMEM:F12:	CC-Pro, Neustadt/W.
McCoy's 5A:	CC-Pro, Neustadt/W.
Leibowitz's L15:	Invitrogen, Karlsruhe
Optimem 1:	Modifikation von MEM (Eagle's) mit einem reduzierten Serum- und minimalem Proteinanteil (Invitrogen, Karlsruhe)

Alle Zelllinien wurden entsprechend den Angaben der ATCC kultiviert und passagiert. Sofern nicht anders beschrieben, wurden die Zellen durch kurze Inkubation mit Trypsin/EDTA abgelöst. Die langfristige Lagerung der Zellen erfolgte in Flüssigstickstoff in FCSi, dem 10% DMSO zugesetzt wurden.

2.2.32 Behandlung eukaryontischer Zellen mit Proteasomeninhibitoren

ALLN	50mM Stammlösung in DMSO	5µM für 24h Inkubation, 50µM für 4h Inkubation
ALLM	20mM Stammlösung in Ethanol	20µM für 24h Inkubation
MG132	10mM Stammlösung in Ethanol	10µM für 24h Inkubation

Die Zellen wurden 24h mit den entsprechend in Zellkulturmedium verdünnten Inhibitoren inkubiert, anschließend lysiert und die Lysate im "Western Blot" analysiert.

2.2.33 Transfektion eukaryontischer Zellen

Zum Einbringen von Fremd-DNA in Säugerzellen, die in Kultur gehalten werden, wurden die in Tabelle 2.13 aufgeführten Reagenzien gemäß den Angaben des Herstellers eingesetzt.

Tabelle 2.13 | Transfektionsreagenzien

Reagenz	Hersteller
Ca-Phosphat:	Sigma, Taufkirchen
Polyethylenimin-(PEI):	Sigma, Taufkirchen
Lipofectamine 2000:	Invitrogen, Karlsruhe
MATra:	IBA, Göttingen
Amaxa Nucleofector technology:	amaxa, Köln
Transfectin:	BioRad, München

Für die Transfektion mit PEI wurden pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte zu je 60µl PBS 10,8µl PEI (10mM, gut gevortext) bzw. 4µg DNA pipettiert. Das PBS-DNA Gemisch wurde auf dem Vortexer tropfenweise zum PBS-PEI Gemisch zugegeben. Der Ansatz wird anschließend 10min bei Raumtemperatur zur Ausbildung der PEI/DNA-Polyplexe inkubiert. Pro Vertiefung werden 120µl der PEI/DNAPolyplexe auf die Zellen gegeben.

Bei einem Transfektionsansatz für eine Vertiefung einer 24-Lochplatte mit der Ca-Phosphat Methode wurden 48µl 2xHBS Puffer in einem Eppendorfreaktionsgefäß vorgelegt. Die zu transfizierende DNA wurde in 42µl H₂O verdünnt, 6µl CaCl₂ hinzupipettiert und der Ansatz zu dem HBS-Puffer auf dem Vortexer tropfenweise übertragen. Von dem Gesamtansatz werden 80µl pro Vertiefung auf die Zellen pipettiert.

Für die Transfektion der siRNA-Oligos wurde Lipofectamine 2000 verwendet. Es wurden 100pmol der Duplices pro Vertiefung einer 6-Lochplatte eingesetzt.

2.2.34 Herstellung von Gesamtzellextrakten von adhärennten Zellen und Gewebeproben

KLB-Puffer:	50mM Tris/HCl pH 7,4; 150mM NaCl; 4mM EDTA; 0,1% Triton x-100; 0,1% NP-40; Lagerung bei 4°; kurz vor Gebrauch: 1mM PMSF, 1mM DTT, Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche) zugeben
Modifizierter RIPA-Puffer:	50mM Tris-HCl, pH 7.4, 150mM NaCl, 0.1% SDS, 1mM EDTA, 1% Na-deoxycholate, 1% Triton X-100, Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche)
IP-Lysispuffer:	50mM Tris pH 8, 150mM NaCl, 5mM EDTA , 0.5% NP-40; 1mM DTT; 1mM PMSF; 1 Tablette/10ml Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche)

Zur Herstellung von Gesamtzellextrakten wurden die Zellkulturschalen (10cm, konfluent) auf Eis platziert, die Zellen zwei Mal mit kaltem PBS gewaschen, geerntet und nach Zentrifugation in 500µl KLB-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde sonifiziert und 30min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation des Lysats (14.000rpm, 20min, 4°C) wurde der Überstand abgenommen, der Proteingehalt mittels der Bradford-Methode (Kapitel 2.2.26) bestimmt, die Lysate in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Herstellung von Gewebeextrakten wurden Gewebestückchen in kaltem, modifizierten RIPA-Puffer mit Hilfe eines Homogenisators (Ultra-Turrax T25, IKA Labortechnik) zerkleinert, anschließend sonifiziert und 30min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation der Lysate (14.000rpm, 20min, 4°C) konnte das Zytosol von den zellulären Membranen und unlöslichen Zellbestandteilen getrennt werden. Im Pellet war hierdurch die Membranfraktion gewonnen worden (zelluläre Membranpräparation). Diese Membranfraktion wurde direkt in 1X SDS-Lämmli-Puffer aufgenommen, 10min bei 95°C denaturiert und dann für die SDS-PAGE benutzt.

2.2.35 Immunpräzipitation

Bei der Immunpräzipitation (IP) kann ein Protein mit Hilfe eines Antikörpers aus einem Totallysat isoliert und im anschließenden "Western Blot" analysiert werden. Dabei wird das Protein von einem spezifischen Antikörper gebunden, der über dessen Fc-Teil an Protein-A/G-Agarose bindet. Durch Zentrifugation können die gebundenen Proteine vom Überstand abgetrennt werden (NYGREN *et al.*, 1988; ELIASSON *et al.*, 1988).

Für die Immunpräzipitation wurden transfizierte 293T Zellen (5×10^7 Zellen pro 10cm Schale) verwendet. Nach Lyse dieser Zellen in 500-700µl IP-Lysispuffer (Kapitel 2.2.34) mit anschließender Sonifizierung wurde ein sogenanntes "Pre-Clearing" durchgeführt. Dazu werden 500-1000µg Zellextrakt mit Protein-A/G-Agarose inkubiert (1-2h, 4°C), um in der IP-Reaktion einen erhöhten Hintergrund durch unspezifisches Binden des Proteins an die Agarosematrix zu verhindern. Parallel wurde 1µg des spezifischen Antikörpers an 30µl Protein-A/G-Agarose gebunden (1-2h, 4°C). Nach Zentrifugation des Lysates wurde der Überstand zu der Antikörper/Protein-A/G-Agarose gegeben und der Ansatz über Nacht auf einem Drehrad bei 4°C inkubiert. Die Agarose wurde dreimal mit IP-Lysispuffer ohne Proteaseinhibitoren gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden durch Zugabe von SDS-Gelladepuffer, anschließendem Kochen und Zentrifugieren von der Agarose gelöst, und der Überstand auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Detektion der präzipitierten Proteine erfolgt im "Western Blot" (Kapitel 2.2.27.2).

2.2.36 Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen

Die Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen erfolgte mit dem „Cell surface protein biotinylation and purification kit“ der Firma Perbio (Bonn) gemäß den Angaben des Herstellers. Konfluente Zelleinzelschichten wurden bei 4°C mit membranimpermeablem Sulfo-NHS-SS-Biotin inkubiert, die Reaktion durch einen Überschuss an primären Aminen ("Quenching solution") abgestoppt und die Zellen lysiert. Biotinylierte Proteine konnten mit Neutravidin-Agarose präzipitiert, mit 50mM DTT eluiert und im "Western Blot" (Kapitel 2.2.27.2) analysiert werden.

2.2.37 Immunhistochemie

In Zusammenarbeit mit Herrn Dr. K. Engels (Pathologie, Uniklinik Frankfurt) wurden immunhistochemische Analysen verschiedener Gewebe mit dem monoklonalen anti-NY-BR-1 Antikörper durchgeführt. Die Gewebeschnitte wurden in EDTA Puffer für 45s in einem Drucktopf gekocht und 30min bei RT mit dem monoklonalen anti-NY-BR-1 Antikörper (1:100) inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde ein biotinylierter anti-Maus Antikörper verwendet. Die Färbung wurde mit einem CSA Detektionssystem (DAKO) visualisiert.

2.2.38 Fluoreszenzmikroskopie

Fluorophore und Fluorochrome absorbieren Licht einer bestimmten Wellenlänge. Unter Emission eines Lichtquants kann das angeregte Molekül wieder in seinen energetischen Grundzustand gelangen. Bei der Markierung bestimmter Stoffe mit Fluorochromen wird diese Eigenschaft der Fluoreszenz genutzt, um diese so in einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen. Die Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht es, die Lokalisation eines Proteins oder die relative Lokalisation mehrerer Proteine zueinander innerhalb einer Zelle zu bestimmen. Neben Fluorochromen wie Rhodamin, Cy3 oder FITC haben sich auch fluoreszierende Proteine für die Fluoreszenzmikroskopie bewährt. Das grün-fluoreszierende Protein GFP („green fluorescent protein“) aus der Qualle *Aequorea victoria* und seine Varianten haben sich zu einem der wichtigsten Hilfsmittel der Fluoreszenzmikroskopie entwickelt. GFP zeichnet sich durch stabile Fluoreszenz aus und kann als Fusion zur Markierung von Proteinen eingesetzt werden. Seine Fluoreszenz stammt von dem durch Zyklisierung und Oxidation entstandenen „Auto-Fluorophor“ aus drei benachbarten Aminosäureseitenketten. In Abbildung 2.1 sind die Anregungs- und Emissionsspektren von GFP und seinen Varianten gezeigt.

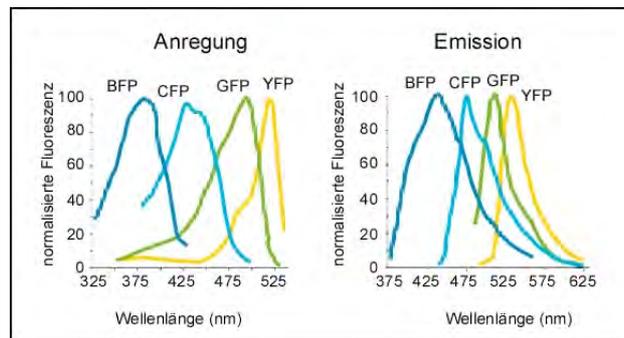


Abbildung 2.1 | Anregungs- und Emissionsspektren autofluoreszierender Proteine (adaptiert nach STAUBER *et al.*, 1998).

Sämtliche Fluoreszenzanalysen in dieser Arbeit wurden entweder mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop der Firma Carl Zeiss oder mit einem konfokalen „Laserscanning“ Mikroskop TCS-SL der Firma Leica durchgeführt. Die Präparate wurden mit einer CCD-Kamera erfasst, mit dem computergestütztem Bilderfassungssystem AxioVision 3.0 der Firma Carl Zeiss oder der Leica Confocal Software visualisiert und anschließend mit dem Photoshop Programm ausgewertet.

2.2.39 Direkte und indirekte Immunfluoreszenz

Zelluläre und überexprimierte Proteine wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz visualisiert. Für die Immunfluoreszenz wurden Zellen in MatTek Schälchen ausgesät und

transient transfiziert. 24h nach Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen, 20min bei RT mit 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert und 15min bei RT mit 0.1% Triton-X-100 in PBS permeabilisiert. Die permeabilisierten Zellen wurden mit PBS gewaschen und 1h bei RT mit dem jeweiligen Erstantikörper in 10% FCS in PBS inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 1h bei RT mit den Zweitantikörpern in 10% BSA in PBS inkubiert. Die Färbung von unfixierten Zellen unterschied sich von der oben beschriebenen Methode darin, dass sowohl Primär- als auch Sekundärantikörper in PBS, 10% FCS, 0.1% NaN₃ auf lebende Zellen gegeben wurden, die Inkubation jeweils 1h bei 37°C erfolgte und die Zellen anschließend mit PFA fixiert wurden. Die Zellkerne wurden mit TO-PRO-3 (Molecular Probes) gefärbt. Zur Färbung der Plasmamembran wurde Rhodamin-WGA (1:50, Molecular Probes) 30min zu nicht fixierten Zellen gegeben (Stammlösung: 1µg/µl). Wurden die Zellen zuvor fixiert, konnten durch Rhodamin-WGA ebenfalls die intrazellulären Membranen visualisiert werden. Alexa647-konjugiertes Cholera toxin B (Molecular Probes) diente der Markierung von "lipid rafts". Es wurde 1:1000 (Stammlösung 1µg/µl) auf lebende Zellen in Gegenwart von 0.1% NaN₃ gegeben und 30min bei 37°C inkubiert.

2.2.40 Mikroinjektion

Die Mikroinjektion dient dem gezielten und effizienten Einbringen von Proteinen und DNA in das Zytoplasma oder den Zellkern von adhärennten Zellen. Vero Zellen eignen sich hierfür aufgrund ihres großen Zytoplasmas, ihrer gut sichtbaren Kerne und ihrer starken Adhärenz besonders gut. Mit der Methode der Mikroinjektion können unter anderem Kernimport- und Exportsignale von Proteinen auf ihre Aktivität hin untersucht werden (ROSORIOUS *et al.*, 1999). Die zu injizierende DNA sollte eine Konzentration von etwa 50ng/µl haben, die von Proteinen sollte bei 2-5µg/µl liegen. Vor der Injektion werden die Proteine oder die DNA mindestens für 15min abzentrifugiert (4°C, 14.000rpm), um mögliche Aggregate und Verunreinigungen zu entfernen. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Injektionskapillaren werden mit dem Micropipette-Puller von Sutter Instrument gezogen und mit 8µl Protein- bzw. DNA-Lösung befüllt. Anschließend wird die Kapillare in die Halterung am Femto Jet AIS2 von Eppendorf eingespannt. Vor der Injektion werden die am Tag zuvor ausgesäten Vero Zellen mit 20µl HEPES-Puffer versetzt. Während der Mikroinjektion können sowohl Druck als auch Dauer der Injektion ständig angepasst werden, um die Zerstörung der Zellmembranen zu vermeiden.

2.2.41 Durchflusszytometrie (FACS)

FACS Puffer:	PBS, 3% FCS
Permeabilisierungspuffer:	PBS, 1% FCS, 0,1% Triton-X-100
Fixierungspuffer:	PBS, 1% FCS, 4% Paraformaldehyd

Die Expression von Zelloberflächenproteinen wurde durch Färbung mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern und anschließender Messung im Durchflusszytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson) bestimmt. Dazu wurden 293T Zellen (1×10^6) mit kaltem PBS gewaschen, durch Abspülen oder mit EDTA (0,05% in PBS) von der Zellkulturschale gelöst und anschließend durch Zentrifugation (1500rpm, 5min) geerntet. Der Primärantikörper wurde in einem Volumenverhältnis von 1:100 ($\sim 10 \mu\text{g/ml}$) in FACS-Puffer verdünnt, die pelletierten Zellen in 100 μl Antikörpermischung resuspendiert und daraufhin 30min auf Eis inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Sekundärantikörper (1:100 in FACS-Puffer) auf Eis im Dunkeln inkubiert. Die Messung erfolgte nach erneutem Waschen und Resuspendieren in 500 μl FACS-Puffer. Für die Färbung von intrazellulären Proteinen wurden die Zellen nach dem Waschen und Ernten zunächst 10min fixiert und anschließend 10min permeabilisiert. Die Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörpern erfolgte im Permeabilisationspuffer jeweils 30min auf Eis.

Im FACSCalibur werden die Zellen durch eine Kapillare in das Gerät eingesogen und dort von einem Argonlaser bestrahlt. Die Wellenlänge des emittierten Lichts ist von dem verwendeten Fluoreszenzfarbstoff abhängig. Das Licht wird von Sammellinsen eingefangen und über verschiedene Spiegel und Filter an Detektoren weitergeleitet, welche Auskunft über Größe („forward scatter“, FSC), Granularität („sideward scatter“, SSC) oder Fluoreszenz („fluorescence detector“, FL) geben. Die Analyse erfolgte mit Hilfe des Programmes CellQuest Pro (Becton Dickinson)

2.2.42 Weichagar-Versuch/„Soft Agar Assay“

Mit Hilfe eines Weichagar Versuchs kann die Transformationskapazität von Zellen untersucht werden. Kontaktinhibierte Zellen wachsen nicht im Weichagar, während transformierte Zellen in der Lage sind, nach einigen Tagen Kolonien zu bilden.

Auf eine Bodenschicht von 0,5% LMP („Low melting point“)-Agar in Medium, wurden 2500 Zellen in 0,3% LMP-Agar in 100 μl Medium in eine Vertiefung einer 96-„well“ Platte ausgesät und mit Medium überschichtet. Es wurden von jedem Ansatz Triplikate ausplattiert. Beim Ausplattieren muss durch kurzes, schnelles Abkühlen der Platte darauf geachtet werden, dass die Zellschicht schnell aushärtet und die Zellen nicht auf die darunterliegende 0.5%ige Agarschicht sinken. Auf dieser Bodenschicht können auch nicht

transformierte Zellen wachsen und so das Ergebnis verfälschen. Nach 7-14 Tagen Inkubation wurde die Bildung von Kolonien im Weichagar lichtmikroskopisch bestimmt und mittels XTT-Versuch quantifiziert.

2.2.43 Proliferationsnachweis mittels XTT

Der XTT-Versuch bestimmt die Menge an lebenden Zellen im Ansatz. Die Grundlage für die Messung ist die Umwandlung von Tetrazolium Salzen (z.B. XTT, MTT) durch die Succinat-Tetrazolium-Reduktase zu Formazan. Tetrazolium Salze besitzen eine schwache Rotfärbung, Formazan hingegen ist stark rot gefärbt. Die Succinat-Tetrazolium Reduktase ist eine Komponente des Atmungskettenkomplexes der Mitochondrien und nur in metabolisch intakten Zellen aktiv. Dadurch lässt sich die Rotfärbung des Zellmediums mit der Anzahl lebender Zellen korrelieren. Das XTT Substrat wurde durch eine 1:50 Zugabe von PMS (Phenazinmethosulfat) aktiviert und als 1:2 Verdünnung mit Medium zu 100µl auf die Platten gegeben. Die XTT Messung erfolgte nach 3-5h bzw. 10h bei 490nm im ELISA Reader.

2.2.44 Adhäsionsversuch

Medium	Zusammensetzung	Volumen (ml)
Grundmedium:	Medium 199 (M199) Hepes (1mM) Heparin (5000 IE Liquemin) Gentamycin (50 mg/ml)	500 10 0.5 1
Nährmedium:	Grundmedium FBS Humanes Serum ECGF	318 40 40 2
PBS (Ca ²⁺):	PBS, 0.91mM CaCl ₂	
Fixierlösung:	1% Glutaraldehyd in PBS	

In Zusammenarbeit mit Dr. R. Blaheta (Urologie, Uniklinik Frankfurt) wurden Adhäsionsversuche mit Endothelzellen (HUVEC) durchgeführt, die aus humanem Nabelschnurgewebe isoliert und freundlicherweise von C. Blumenberg (Urologie, Uniklinik Frankfurt) zur Verfügung gestellt wurden. Die humanen Endothelzellen wurden zur Bestimmung der Adhäsionskapazität transfizierter 293T Zellen herangezogen. Zu Versuchszwecken wurden Endothelzellen der Passagen 1-5 verwendet. Für die Adhäsionsstudie wurden am Vortag des Versuchs Endothelzellen in 6-Loch-Platten (Wuchsfläche: 9,5 cm²) ausgesät, so dass sie über Nacht adhären konnten. Die zu untersuchenden transfizierten 293T Zellen wurden am Tag der Versuchsdurchführung von den Kulturflaschen mit 0,05% EDTA in PBS abgelöst und in 1ml vorgewärmten Nährmedium aufgenommen. Durch entsprechende Verdünnung wurden die Zellen auf die gewünschte Konzentration von 5x10⁵ Zellen pro ml Nährmedium eingestellt. Das Endothelzell-Nährmedium wurde aus den 6-Loch Platten entfernt und pro Vertiefung 1ml

des Nährmediums mit 5×10^5 Tumorzellen auf den Endothelzellrasen pipettiert. Jede Vertiefung wurde danach zusätzlich mit 1ml Endothelzell-Nährmedium aufgefüllt. Nach entsprechenden Inkubationszeiten (120min bzw. 240min bei 37°C) wurden die nicht adhärenen Zellen durch 3-maliges Waschen mit vorgewärmtem calciumhaltigem PBS entfernt. Die an Endothelzellen adhärenen Tumorzellen wurden für 10min in 1% Glutaraldehyd-Fixierlösung inkubiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen. Die Adhäsionsstudie konnte nun unter dem Fluoreszenzmikroskop (20x Objektiv) ausgewertet werden. Hierbei wurde auf fünf verschiedenen Flächen ($5 \times 0,25\text{mm}^2$) die Gesamtzahl sämtlicher an die Endothelzellen gebundener Tumorzellen bestimmt, und aus dem Mittelwert die Adhäsionsrate der Tumorzellen pro 1mm^2 berechnet.

2.2.45 Hefe-Zwei-Hybrid-System

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System ist eine Methode, mit der Protein-Protein Interaktionen *in vivo* detektiert werden können (STELZL *et al.*, 2005; FIELDS UND SONG, 1989). In Zusammenarbeit mit Dr. U. Stelzl (Arbeitsgruppe Prof. Dr. E. Wanker, MDC, Berlin) wurde ein automatisierter Hefe-Zwei-Hybrid "Screen" mit verschiedenen NY-BR-1 Konstrukten (Tabelle 2.7) durchgeführt. Bei diesem Matrix basierten Verfahren werden Hefen, die mit dem Köder-Plasmid (pBTM117c) transformiert wurden mit Hefen konjugiert, die das Beute-Plasmid (pGAD426) tragen und auf SDII Agar (-Trp, -Leu) ausplattiert, um diejenigen diploiden Hefen zu selektionieren, die beide Plasmide tragen. Hefen, deren Fusionsproteine interagieren und so den Transkriptionsfaktor bestehend aus der Gal4 DNA-Bindungs- und der LexA-Transaktivierungsdomäne rekonstituieren können, bilden Kolonien auf SDIV Selektionsagarplatten (-Trp, -Leu, -His, -Ura). Eine weitere Bestätigung dieser Interaktion erfolgt mittels β -Galaktosidase Test auf Nylonmembranen, auf die die Kolonien der SDIV Agarplatten übertragen wurden.

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Experimente zur Untersuchung des Brust Tumorantigens NY-BR-1 sind im Folgenden dargestellt. Das gewebespezifische Expressionsmuster von NY-BR-1 sowie die Tatsache, dass NY-BR-1 auf mRNA Ebene in vielen Brusttumoren im Vergleich zu Normalgewebe überexprimiert ist, suggerieren eine funktionelle Beteiligung bei der Tumorgenese. Bei Brustkrebspatienten wurde sowohl eine zelluläre als auch eine humorale Immunantwort gegen NY-BR-1 beobachtet, was dessen Bedeutung als potentiell therapeutisches Zielprotein unterstreicht.

Bei NY-BR-1 handelte es sich um ein neues, unbekanntes Protein, für das es zu Beginn dieser Arbeit weder eine Vollängen cDNA noch einen Antikörper gab. Ziel dieser Arbeit war sowohl die biochemische als auch die molekularbiologische Charakterisierung dieses Proteins. Von zentraler Bedeutung war zunächst die Klonierung eines NY-BR-1 Vollängenklons sowie die Herstellung eines anti-NY-BR-1 Antikörpers, um die Grundlagen für die molekularbiologische Analyse von NY-BR-1 zu schaffen. Des Weiteren lag der Fokus zum einen auf Untersuchungen zur Expression des Gens bzw. des Proteins in Zelllinien und Geweben, zum anderen darauf, die subzelluläre Lokalisation zu studieren. Darüber hinaus sollten funktionelle Domänen identifiziert und näher charakterisiert werden.

3.1 Klonierung des Vollängen-NY-BR-1-Konstrukts

Wie einleitend schon beschrieben, wurde eine Sequenz für NY-BR-1 identifiziert (Acc. No.: AF269087), die ein offenes Leseraster („Open Reading Frame“, ORF) von 4023 Basenpaaren hat und für ein Protein mit 1341 Aminosäuren kodiert (JÄGER *et al.*, 2001). Ein 5'-RACE-PCR Produkt, das für den angenommenen Translationsstart kodiert, hatte 5' des ATG noch 99 weitere Basen. Sequenzvergleiche mit genomischer DNA ergaben, dass ausgehend von dem beschriebenen Sequenzbeginn 168bps Nukleotide strangaufwärts ein weiteres potentiell Start ATG liegt und 15 bp davor ein Stopp-Codon zu finden ist (JÄGER *et al.*, 2001). Wie Untersuchungen von zahlreichen eukaryontischen Genen zeigten, beginnt der ORF mit dem ersten „ATG“ des 5'-Endes, welches eine so genannte Kozak-Sequenz besitzt. Die Sequenzumgebung des Start-ATG ist für eine optimale Initiation der Translation wichtig. Vor allem die Nukleotidpositionen -3 und +4 sind für die Initiation der Translation eukaryontischer mRNA von entscheidender Bedeutung (KOZAK, 1984). An der Position -3 befindet sich vorwiegend eine Purinbase (A oder G), an der Position +4 meistens eine Guaninbase (Kozak-Sequenz: 5'-CC(A/G)CTATGG-3'). Die Sequenz von NY-BR-1 zeigt dieses „ATG“ samt Kozak-

Sequenz (5'-CAGCCATGGAGG-3') an Position -168. Das beschriebene Start-ATG (5'-AGAAGATGACAAA-3') an Basenposition 1 hingegen zeigt lediglich eine der Kozak-Sequenz ähnliche Basenabfolge. Geht man davon aus, dass dieser Sequenzabschnitt zu Exon 1 und somit zur *NY-BR-1* mRNA gehört, ist für diese Position der Translationsstart anzunehmen. Abbildung 3.1 zeigt den 5' Bereich der kodierenden Nukleotidsequenz von *NY-BR-1*. Der ursprünglich angenommene Translationsstart ist unterstrichen, der „neue“ ist zusammen mit den Aminosäuren der Kozak Sequenz gelb unterlegt. Im Folgenden sind die Aminosäurepositionen bezogen auf den längsten *NY-BR-1* ORF, der für aa 1-1397 kodiert, angegeben. Die Zahlen in Klammern weisen gegebenenfalls auf die alte, ursprüngliche Position hin.

```

-10      GGCCGCAGCCATGGAGGAGATCTCTGCCGCGCTGTCAAGGTCGTGCCGGGCCGGAGCGCCCGAGCCCTTTCAGCCAGC
71      TAGTCTATACCAGCAACGACTCCTACATCGTCCACTCTGGGGATCTTAGAAAGATCCATAAAGCTGCCTCCCGGGGACAA
151     GTCCGGAAGCTGGAGAAGATGACAAAGAGGAAGAAGACCATCAACCTTAATATACAAGACGCCAGAGAGGACTGCTCT
231     ACACTGGGCTGTGTCAATGGCCATGAGGAAGTAGTAACATTTCTGGTAGACAGAAAGTGCCAGCTTGACGTCCTTGATG
311     CCGAACACAG...

```

Abbildung 3.1 | Ausschnitt aus der Nukleotidsequenz von *NY-BR-1*. Die Zahlen auf der linken Seite geben die Nukleotidpositionen an. Gelb unterlegt bzw. unterstrichen sind die angenommenen Translationsstartpunkte (ATG) sowie die Basen der Kozak-Konsensussequenz.

Da zu Beginn der Arbeit kein Volllängenklon von *NY-BR-1* verfügbar war, wurde ausgehend von den vorhandenen Teilklonen pC3_NY609-1397_GFP, pC3_NY173-1125_GFP und pC3_NY111-173_GFP in mehreren Schritten der ORF für aa 56-1397 kloniert (Abbildung 3.2 A-C). Die Klonierung des pC3_NY173-1397_GFP Konstruktes erfolgte über die BamHI und XcmI Schnittstellen der Plasmide pC3_NY609-1397_GFP und pC3_173-1125_GFP (Abbildung 3.2 B). Mittels RACE-PCR konnte aus RNA der Zelllinie MDA MB 453 die cDNA, die für aa 56-112 kodiert, amplifiziert werden. Über BamHI/NcoI wurde dieses Fragment in pC3_NY111-173GFP kloniert, um pC3_NY56-173_GFP zu generieren (Abbildung 3.2 A). Das Plasmid pC3_NY56-1397_GFP (pC3_NY1-1341_GFP) konnte ausgehend von pC3_NY56-173_GFP und pC3_NY173-1397GFP kloniert werden, indem mittels PCR das Fragment NY56-173_GFP mit den Schnittstellen KpnI und BamHI generiert wurde, das anschließend in den KpnI/BamHI geschnittenen pC3_NY173-1397GFP Vektor ligiert wurde (Abbildung 3.2 C). Auf diese Weise wurden an der Position 173 bedingt durch die vorhandene BamHI Schnittstelle und das ursprüngliche ATG des Ausgangskonstrukts ein Methionin eingefügt und die Aminosäuren „KAS“ (Lysin, Alanin, Serin) mit „RIH“ (Arginin, Isoleucin, Histidin) substituiert. Mit Hilfe spezifischer Primer für den 5'- und 3'-Bereich sollte der gesamte kodierende Bereich des Gens aus Brust-, Testis- oder Zelllinien-cDNA per PCR amplifiziert werden. Es gelang jedoch lediglich, *NY-BR-1* Teilsequenzen zu generieren.

Um zu untersuchen, ob überhaupt *NY-BR-1* spezifische Transkripte in entsprechender Größe existieren, wurde aus Zelllinien Gesamt-RNA und polyA⁺-RNA isoliert, auf einem Formaldehydgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert („Northern Blot“). Mit Hilfe einer radioaktiv markierten *NY-BR-1* spezifischen Sonde (bp 3375-4191) wurde die Membran hybridisiert und anschließend per Radioautographie die detektierten mRNA Transkripte visualisiert (Abbildung 3.3). Anhand der bekannten Größen der 28SrRNA (4.8kb) und 18SrRNA (1.9kb) lässt sich abschätzen, dass die längsten detektierten Transkripte ca. 6-7kb groß sind.

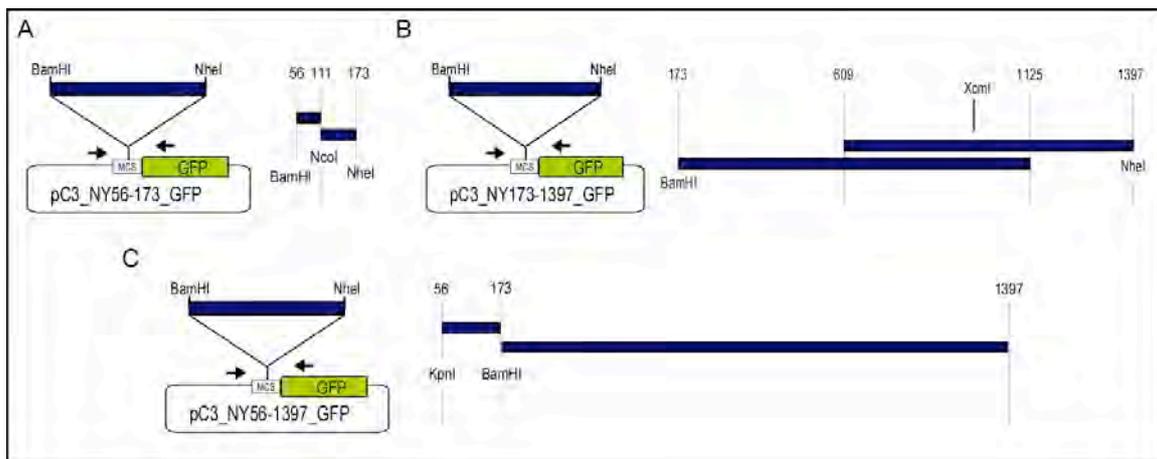


Abbildung 3.2 | Schematische Darstellung der Klonierung des NY-BR-1 Vollängenkonstrukts. A-C | Die pC3_GFP Konstrukte sind jeweils links dargestellt, die klonierten NY-BR-1 Sequenzbereiche sind auf der rechten Seite abgebildet. Die NY-BR-1 Fragmente sind über die Schnittstellen der angegebenen Restriktionsenzyme in den pC3_GFP Vektor kloniert worden. Die Zahlen geben die Aminosäurepositionen an. Für weitere Erklärungen siehe Text.

Sowohl in den Spuren der Gesamt-RNA als auch in denen der polyA⁺-RNA von den Zelllinien MDA MB 453 und BT474 sind weitere Banden zu erkennen, die möglicherweise Spleißvarianten oder Isoformen repräsentieren. Die Qualität der isolierten RNA ist gut, da kaum Degradation zu beobachten ist. Das Foto in Abbildung 3.3 B dokumentiert den Transfer der Gesamt-RNA auf die Nylonmembran, der relativ gleichmäßig erfolgte. Diese „Northern Blot“ Analyse zeigt deutlich, dass Transkripte existieren, die von einer *NY-BR-1* spezifischen Sonde detektiert werden und groß genug sind, um für die *NY-BR-1* mRNA zu kodieren.

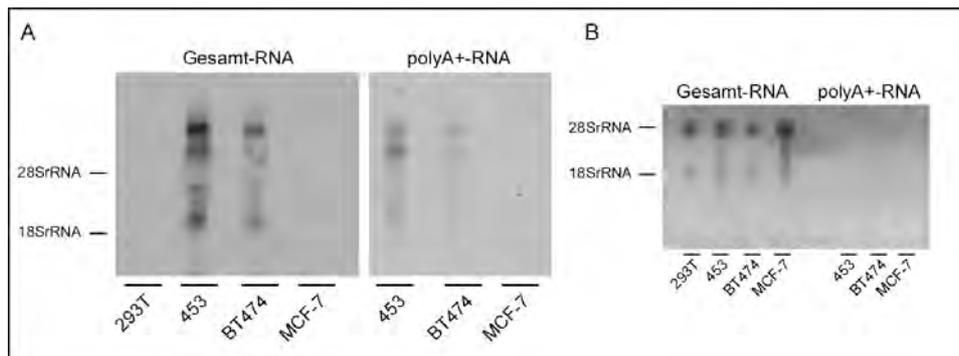


Abbildung 3.3 | "Northern Blot" Analyse von Gesamt-RNA und polyA⁺-RNA der angegebenen Zelllinien. A | Radioautographie des "Northern Blots", der mit einer NY-BR-1 spezifischen radioaktiv markierten Sonde (bp 3375-4191) hybridisiert wurde. **B |** Foto der Nylonmembran nach dem Transfer.

Das NY-BR-1 Vollängen-Expressionskonstrukt (pC3_NY1-1397) wurde uns kürzlich freundlicherweise von Dr. D. Jäger (NCT, Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Auch bei diesem Konstrukt handelt es sich um einen synthetischen Klon. Die Klonierung weiterer NY-BR-1 Expressionskonstrukte ist in den jeweiligen Kapiteln beschrieben. Alle Konstrukte wurden mit Sequenzierprimern (Tabelle 2.8) sowie entsprechenden genspezifischen Primern (Tabelle 2.10) sequenziert.

3.2 "In silico" Sequenzanalyse

Die aus der cDNA-Sequenz entsprechend abgeleitete Aminosäuresequenz von NY-BR-1 besitzt für den größtmöglichen ORF eine Länge von 1397 Aminosäuren, was einem errechneten Molekulargewicht von 158kDa entspricht. Um Aussagen bezüglich der Struktur bzw. der Topologie des Proteins und über mögliche funktionell wichtige Domänen machen zu können, wurde computergestützt die Proteinsequenz analysiert (Kapitel 2.1.9). Zusätzlich zu den bereits veröffentlichten Motiven sind weitere identifizierte Domänen in Abbildung 3.4 dargestellt. N-terminal befindet sich eine Ankyrin Wiederholungsregion (aa 37-259) („Ankyrin-repeat-region“, ARR), in der sich 4 Ankyrin-Wiederholungsmotive befinden (aa 72-104, 105-137, 138-170, 171-203) („Ankyrin-repeats“, AR). Diese Wiederholungssequenzen zählen zu den häufigsten Protein-Protein-Interaktionsdomänen und sind abgesehen vom Ankyrin selbst z.B. im "p53-binding protein" 53BP2 oder im "NF-κB inhibitory protein" IκB-α zu finden. Des Weiteren wurde eine „aspartic protease domain“ (ILIDSGADINLV; aa 124-135) gefunden wie sie zum Beispiel in Cathepsin D vorkommt. C-terminal befinden sich drei „Coiled coil“ Bereiche, die ebenfalls Protein-Protein-Interaktionsdomänen darstellen. Auch wurde eine Chromosomensegregationsdomäne (aa 1004-1156) vorhergesagt. Weiterhin befindet sich C-terminal ein leucinreicher Sequenzabschnitt (LLHENCMLKKEIAMLKLEIATL; aa 1100-1121), der allerdings keine Homologien zu einem "Leucin-Zipper" DNA Bindungsmotiv aufweist, wohl

aber eine Protein Dimerisierungsoberfläche darstellen könnte. Zwei nukleäre Lokalisationssignale (NLS) werden im N-terminalen Bereich vorhergesagt, die eine Lokalisation im Zellkern nahe legen. Das erste wird als zweiteiliges („bipartite“) NLS (ROBBINS *et al.*, 1991) beginnend bei Aminosäure 40 beschrieben. Das zweite NLS wird von Aminosäuren 56-60 kodiert und stellt ein klassisches pat4 NLS (4 basische aa K/R, „SV40 large T antigen“, (BEDNENKO *et al.*, 2003). Ursprünglich wurde für aa 73-90 ein „bipartite“ NLS beschrieben (JÄGER *et al.*, 2001), das nach visueller Abschätzung jedoch weder die Konsensussequenz eines zweiteiligen NLS noch eines klassischen NLS besitzt. Über die Bindung nukleärer Importsignale an die Transportrezeptoren Importin- α und - β wird im Allgemeinen der Kernimport von Proteinen vermittelt.

Mit Hilfe des ConPred II Programms konnten zwei Transmembranbereiche (aa 147-167, 208-228) und eine Membran-Signalsequenz (aa 1-25) für NY-BR-1 vorhergesagt werden. Aminosäureposition 1382 wird möglicherweise durch Anhängen eines Glykosylphosphatidylinositol (GPI) Ankers modifiziert. Das PSORT II Programm sagt keine peroxisomalen Signalsequenzen, kein Retentionssignal für das endoplasmatische Retikulum, kein Signal für den Proteintransport vom Golgi- N-Glykosylierungen Apparat zur Zelloberfläche und auch keine Furin Spaltungsstelle (RX[K/R]R) vorher. Auch werden keine posttranslationalen Modifikationsstellen für N-Myristoylierungen, Farnesylierungen, Prenylierungen oder O-Glykosylierungen identifiziert. ScanProsite sagt für die Aminosäuren 427-441 und 1346-1349 voraus. Datenbankvergleiche sowohl der Nukleotid- als auch der Proteinsequenz mit Hilfe des BLAST Programms (Kapitel 2.1.9) ergaben keine signifikanten Homologien zu bekannten, charakterisierten humanen Proteinen. Es wurden lediglich ähnliche, nicht charakterisierte Proteine gefunden. Die Analyse der Proteinsequenz mit Sequenzdatenbanken verschiedener Spezies ergab Ähnlichkeiten (20-49%) zu unbekanntem, nicht charakterisierten Proteinen in *M. musculus*, *C. familiaris*, *P. troglodytes*, *D. melanogaster*, *C. elegans* und *S. cerevisiae*. Das murine NY-BR-1 Homolog ist auf Chromosom 6 lokalisiert (Acc.No.: XP_132817). Abgeleitet von dieser Sequenz wird ein 1681aa großes Protein vorhergesagt, das dem gesamten NY-BR-1 Protein zu 28% identisch ist und dessen aa 654-1242 dem C-Terminus des humanen NY-BR-1 zu 49% identisch sind.

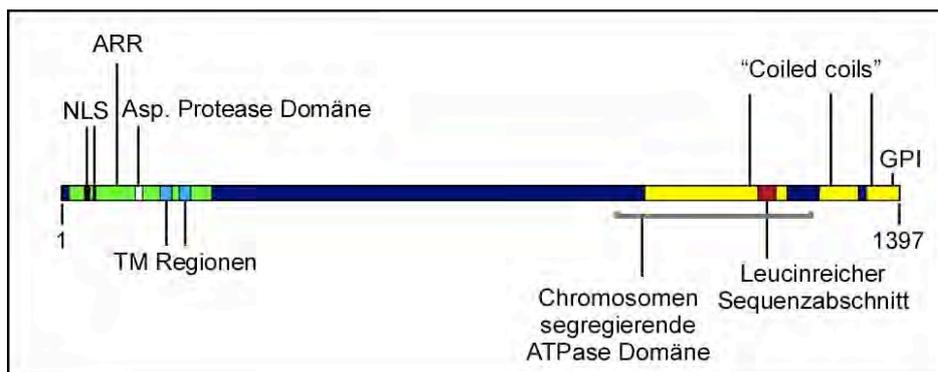


Abbildung 3.4 | Vorhergesagte Domänenorganisation von NY-BR-1. Potentielle Transmembrandomänen (TM) sind blau gekennzeichnet. Domäne 1 wird für Aminosäuren 147-167 und Domäne 2 für Aminosäuren 208-228 vorhergesagt. ARR: "Ankyrin Repeat Region", NLS: "Nuclear localization signal", GPI: Glykosylphosphatidylinositol. Erläuterungen siehe Text.

Die Isoform von NY-BR-1, die ebenfalls im SEREX „Screen“ identifiziert und als NY-BR-1.1 bezeichnet wurde (ANKRD30B Acc.No: AF269088, (JÄGER *et al.*, 2001) besitzt 1011aa, und ist NY-BR-1 zu 54% identisch (von aa 98-1138). Eine Funktion ist für dieses Protein ebenfalls nicht bekannt.

3.3 Erzeugung eines polyklonalen Antiserums gegen NY-BR-1

Da kein kommerzieller Antikörper gegen NY-BR-1 existiert, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein anti-NY-BR-1 Antiserum in Hühnern produziert. Für die Herstellung des Antigens wurden verschiedene Sequenzabschnitte von NY-BR-1 in die bakteriellen Expressionsvektoren pQE32 und pGEX_GFP kloniert. Die native Reinigung ausreichender Mengen an Antigen über Affinitätschromatographie (Ni-NTA-Agarose bzw. Glutathion-Sepharose) war nicht möglich, da die Proteine entweder kaum von der Agarose/Sepharose eluiert werden konnten oder nur bedingt löslich waren bzw. in Einschlusskörpern („Inclusion bodies“) aggregierten. Im Folgenden soll hier nur auf die Klonierung, Expression und Reinigung des für die Immunisierung verwendeten Proteins eingegangen werden. Hierfür wurde der Sequenzabschnitt aa 1125-1397 als Antigen gewählt, der Teil eines im SEREX „Screen“ identifizierten Klons ist (JÄGER *et al.*, 2001) und zu NY-BR1.1 keine Homologien aufweist.

3.3.1 Klonierung und Expression des NY-BR-1 Konstrukts in *E.coli* BL21

Zur Herstellung des pGEX_NY1125-1397_GFP Expressionskonstrukts wurde aus dem pC3_NY1125-1397_GFP (Kapitel 3.5.1) das NY-BR-1 Fragment über die BamHI/NheI Schnittstellen in den pGEX_GFP Vektor kloniert, der somit für ein GST_NY-BR-1_GFP Fusionsprotein kodiert. Die Expression des pC3_NY1125-1397_GFP Konstrukts wurde

wie in den Kapiteln 2.2.22 und 2.2.25 beschrieben in *E.coli* BL21(DE3) durchgeführt und das Protein anschließend aus „Inclusion bodies“ gereinigt.

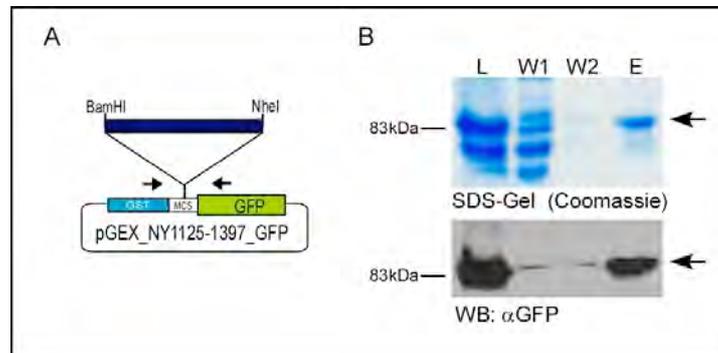


Abbildung 3.5 | Klonierung und Expression des GST_NY1125-1397_GFP Proteins in *E.coli*. **A** | Schematische Darstellung des NY-BR-1 Expressionskonstrukts. **B** | SDS-PAGE und "Western Blot" Analyse des in *E.coli* BL21(DE3) exprimierten GST_NY-BR-1_GFP Proteins. Es wurden je 10 μ l der Fraktionen einzelner Reinigungsschritte auf das Gel geladen. L: Lysat, W1: erste Waschfraktion, W2: zweite Waschfraktion; E: Einschlusskörper. Die Pfeile markieren jeweils das Fusionsprotein, das eine Größe von 85kDa hat. Die Markerbande ist links dargestellt.

Der Nachweis für die heterologe Expression der NY-BR-1-cDNA in *E.coli* erfolgte mittels SDS-PAGE und „Western Blot“ Analyse der einzelnen Reinigungsfraktionen (s. Abbildung 3.5). Mittels eines anti-GFP-Antikörpers wurde auf „Western-Blot“ Ebene der Nachweis erbracht, dass durch die Reinigung der Einschlusskörper das NY-BR-1 Protein angereichert wurde. Das gereinigte Antigen wurde für die Immunisierung zweier Hühner (Pineda,Berlin) 4-fach verdünnt, um eine Harnstoffkonzentration von maximal 2M zu erhalten. Die Immunisierung erfolgte wie in Kapitel 2.2.29 beschrieben.

3.3.2 Testen des Antiserums

Die Tiere wurden für die Erzeugung des polyklonalen Antikörpers in den beschriebenen Abständen und Darreichungsformen immunisiert und die erzeugten Antiseren und Dotter jeweils nach ihren Entnahmen auf ihre spezifische Reaktivität gegen das rekombinante Antigen im „Western Blot“ getestet.

Abbildung 3.6 zeigt die Reaktivität der beiden Seren in „Western Blot“ Analysen mit rekombinantem Protein (A/B) sowie mit Lysaten transfizierter 293T Zellen (C). Für das Testen der Seren mit rekombinantem Protein wurde GST_GFP Protein, GST_NY1125-1397_GFP und GST_NY1125-1397-Protein eingesetzt. Für die Klonierung des pGEX_NY1125-1397 Expressionskonstrukts wurde die kodierende Sequenz für das GFP mit den Restriktionsenzymen NheI/EcoRI aus dem pGEX_NY1125-1397_GFP herausgeschnitten, die überhängenden DNA-Enden mit der T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und der Vektor religiert. Die Expression der pGEX_GFP und pGEX_NY1125-

1397 Konstrukte erfolgte in *E.coli* BL21(DE3) mit anschließender nativer Reinigung der Fusionsproteine über Glutathion-Sepharose. Die an Glutathion-Sepharose gebundene Proteinmenge war für die "Western Blot" Analysen ausreichend.

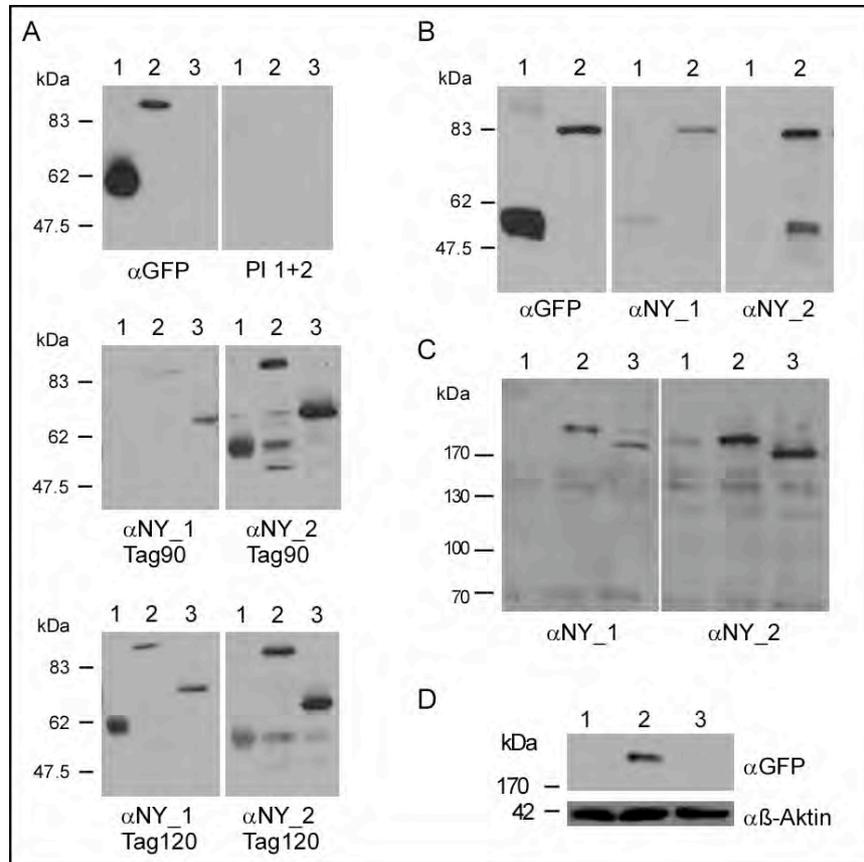


Abbildung 3.6 | Immunologische Analyse der anti-NY-BR-1 Antiseren. A/B | "Western Blot" Analyse der anti-NY-BR-1 Antiseren mit rekombinantem Protein. Die Proteine wurden in *E.coli* BL21 expimiert, nativ über Glutathion-Sepharose gereinigt und an Sepharose gebunden für die "Western Blot" Analyse mit SDS-Ladepuffer versetzt. Die jeweiligen Seren wurden 1:1000, der anti-GFP Antikörper 1:2000 verdünnt eingesetzt. Außerdem wurden gegen GST_GFP präabsorbierte Seren 1:200 eingesetzt (**B**). Spur 1: GST_GFP, Spur 2: GST_NY1125-1397_GFP, Spur 3: GST_NY1125-1397. **C/D** | "Western Blot" Analyse der anti-NY-BR-1 Antiseren mit Lysaten aus untransfizierten 293T Zellen (Spur 1), NY-GFP transfizierten (Spur 2) und aus NY-BR-1 transfizierten Zellen (Spur 3). Die Seren wurden 1:100, die Antikörper gegen GFP und β -Aktin 1:1000 verdünnt eingesetzt. Als Sekundärantikörper dienten HRP-konjugierte anti-Huhn bzw. anti-Kaninchen Antikörper (1:2000). Die Membran wurde für die Inkubation mit den verschiedenen Seren in Streifen geschnitten. α NY_1: anti-NY-BR-1 Serum von Huhn 1; α NY_2: anti-NY-BR-1 Serum von Huhn 2. α GFP: anti-GFP Antikörper, α β -Aktin: anti- β -Aktin Antikörper. Links ist jeweils der Molekulargewichtsmarker angegeben.

Wie in Abbildung 3.6 A oben zu sehen ist, detektiert der anti-GFP Antikörper GST_GFP und GST_NY1125-1397_GFP (Spuren 1 und 2), nicht aber GST_NY1125-1397 Protein (Spur 3). Die „Western Blot“ Analyse mit den Prä-Immuseren beider Tiere (PI1+2) diente als Isotypenkontrolle. Die Prä-Immuseren erkennen keines der rekombinanten Proteine. Darunter sind jeweils zwei „Blots“ mit den Antiseren der Immunisierungstage 90 und 120 abgebildet. Die Analysen zeigen deutlich, dass beide Seren das Antigen +/- GFP

detektieren. Um sicherzustellen, dass auch NY-BR-1 spezifische Antikörper gebildet wurden, wurden die Seren einer Prä-Absorption gegen an Glutathion-Sepharose gebundenes GST_GFP Protein unterzogen (Kapitel 2.2.30). Abbildung 3.6 B zeigt, dass nach der Prä-Absorption GST_NY1125-1397 detektiert wird, fast aber keine Detektion des GST_GFP Proteins zu sehen ist. Es sind folglich NY-BR-1 spezifische Antikörper produziert worden und die Präabsorption war erfolgreich. Um zu überprüfen, ob auch in Säugerzellen exprimiertes NY-BR-1 detektiert wird, wurden Lysate von nicht transfizierten und transfizierten 293T Zellen im "Western Blot" analysiert (Abbildung 3.6). Beide Antiseren zeigen trotz unspezifischer Detektion zellulärer Proteine deutlich, dass in transfizierten Zellen NY-BR-1_GFP und NY-BR-1, in der Kontrolle aber kein Protein dieser Größen immunologisch nachgewiesen werden konnte. Nach dem Entfernen gebundener Antikörper von den Membranen (Kapitel 2.2.28), wurden diese mit einem anti-GFP Antikörper bzw. mit einem anti- β -Aktin Antikörper inkubiert, um die Expression des GFP-Fusionsproteins zu bestätigen und die Proteinmenge in den einzelnen Spuren anhand des "house keeping" Proteins β -Aktin zu kontrollieren (Abbildung 3.6 D).

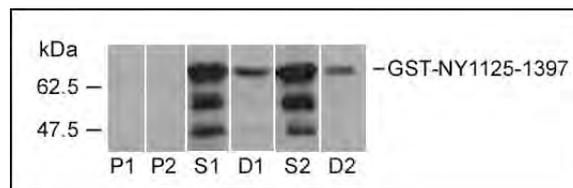


Abbildung 3.7 | Immunologische Analyse der anti-NY-BR-1 Antiseren und Dotter. "Western Blot" Analyse der anti-NY-BR-1 Antiseren mit rekombinantem GST_NY1125-1397 Protein. Das Protein wurde in *E.coli* BL21 expimiert, nativ über Glutathion-Sepharose gereinigt und an Sepharose gebunden für die "Western Blot" Analyse mit SDS-Ladepuffer versetzt. Die Membran wurde für die Inkubation mit den verschiedenen Seren/Dottern in Streifen geschnitten. Die jeweiligen Seren bzw. Dotter wurden 1:1000 verdünnt eingesetzt. P1/P2: Prä-,mmunseren; S1/S2: Seren Tag 120; D1/D2: Dotter. Als Sekundäntikörper dienen HRP-konjugierte anti-Huhn bzw. anti-Kaninchen Antikörper. Links ist jeweils der Molekulargewichtsmarker angegeben.

Die mit H₂O verdünnten Eidotter (5:1) der immunisierten Hühner zeigten ebenfalls in "Western Blot" Analysen mit rekombinantem GST_NY1125-1397 Protein anti-NY-BR-1 Reaktivität (Abbildung 3.7). Die Reaktivität der Gesamt-IgY Moleküle aus den Dottern war nach einer Ammoniumsulfatreinigung deutlich gemindert, so dass sich der Einsatz des hergestellten Antiserums auf die Verwendung der Seren beschränkte. Die Reinigung der NY-BR-1 spezifischen Antikörper aus den Seren und Dottern mittels Affinitäts chromatographie war nicht möglich, da die Menge an nativ gereinigtem Antigen nicht ausreichte. Endogenes NY-BR-1 konnte mit diesen Seren nicht detektiert werden.

3.4 Expressionsanalyse auf Transkriptebene

Differenziell exprimierte Gene bzw. auf Transkriptebene hoch- oder herunterregulierte Gene lassen sich mit einer Kombination aus reverser Transkription und herkömmlicher PCR (RT-PCR) mit anschließender Gelelektrophorese untersuchen. Hierbei können amplifizierte DNA-Mengen visuell unterschieden, jedoch nicht direkt quantifiziert werden. Die quantitative PCR, auch Echtzeit-PCR („Real-time“-PCR) genannt, bietet die Möglichkeit, während einer PCR die synthetisierte Menge an DNA zu messen. Mit dieser Methode können deshalb DNA-Mengen spezifisch für ausgewählte Sequenzen quantifiziert werden, da die Amplifikation der DNA während einer PCR proportional zur Ausgangsmenge ist. Die Kombination von reverser Transkription und anschließender „Real-time“-PCR erlaubt somit, die mRNA Menge bestimmter Gene indirekt zu bestimmen (BUSTIN, 2000). Die *NY-BR-1* mRNA Menge wurde hier im Vergleich zu der mRNA Menge des Haushaltsgens β -Aktin in verschiedenen Zelllinien und Geweben mittels qPCR untersucht und normalisiert (Kapitel 2.2.17).

Für die Amplifikation des Referenzgens wurden β -Aktin spezifische Primer eingesetzt, die ein 231bp großes Fragment amplifizieren und bereits etabliert waren (LECLERC *et al.*, 2002). Für die Analysen wurden die in Tabelle 2.9 aufgelisteten Oligonukleotide verwendet, die ein 311bp großes Fragment von *NY-BR-1* (bp 3066-3378) amplifizieren. Als Kontrolle diente das pC3_*NY-BR-1* Plasmid. Die Amplifikationskurven (MDA MB 453, MCF-7) der Reaktionen zeigen für das Kontrollgen β -Aktin CT-Werte von 27 bzw. 18, was bedeutet, dass die cDNA der MDA MB 453 Zelllinie gering konzentriert ist und die der MCF-7 Zelllinie optimal konzentriert ist (Abbildung 3.8, A). Idealerweise erwartet man für ein Haushaltsgen einen CT-Wert zwischen 18 und 25. Der entsprechende CT-Wert für die Amplifikation des *NY-BR-1* Fragments liegt für die MDA MB 453 cDNA bei 41 und für MCF-7 cDNA ist keine Amplifikation von *NY-BR-1* zu detektieren. In diesem Beispiel ist die *NY-BR-1* mRNA Menge in MDA MB 453 Zellen 2^{14} -fach geringer als die mRNA Menge von β -Aktin und in MCF-7 Zellen ist *NY-BR-1* nicht exprimiert. Die exemplarischen Schmelzkurven zeigen für die Amplifikation des *NY-BR-1* Fragments vom Plasmid und aus der MDA MB 453 cDNA einen „Peak“ bei ca. 83°C (Abbildung 3.8, A). Ein einzelner „Peak“ deutet auf die Amplifikation nur eines Produkts hin. Um die spezifische Amplifikation des PCR-Produktes zu überprüfen, wurden die qPCR-Produkte auf einem PAA Gel elektrophoretisch aufgetrennt (Kapitel 2.2.6). Das Gelfoto (Abbildung 3.8, B) zeigt ebenso wie die Schmelzkurven deutlich, dass bei optimierten Bedingungen nur ein PCR-Produkt aus der cDNA generiert wird (Plasmid und MDA MB 453 Zellen). Aus der cDNA der MCF-7 Zellen konnte kein *NY-BR-1* spezifisches DNA-Fragment amplifiziert werden. Weder in der Schmelzkurve, noch auf dem Gel ist die Amplifikation eines PCR-

Produktes zu sehen. Da die β -Aktin mRNA Menge in RNA aus Gewebeproben zum Teil sehr gering war und somit mehrere Amplifikationsrunden erforderte, wurde die Zyklenzahl auf 50 festgesetzt.

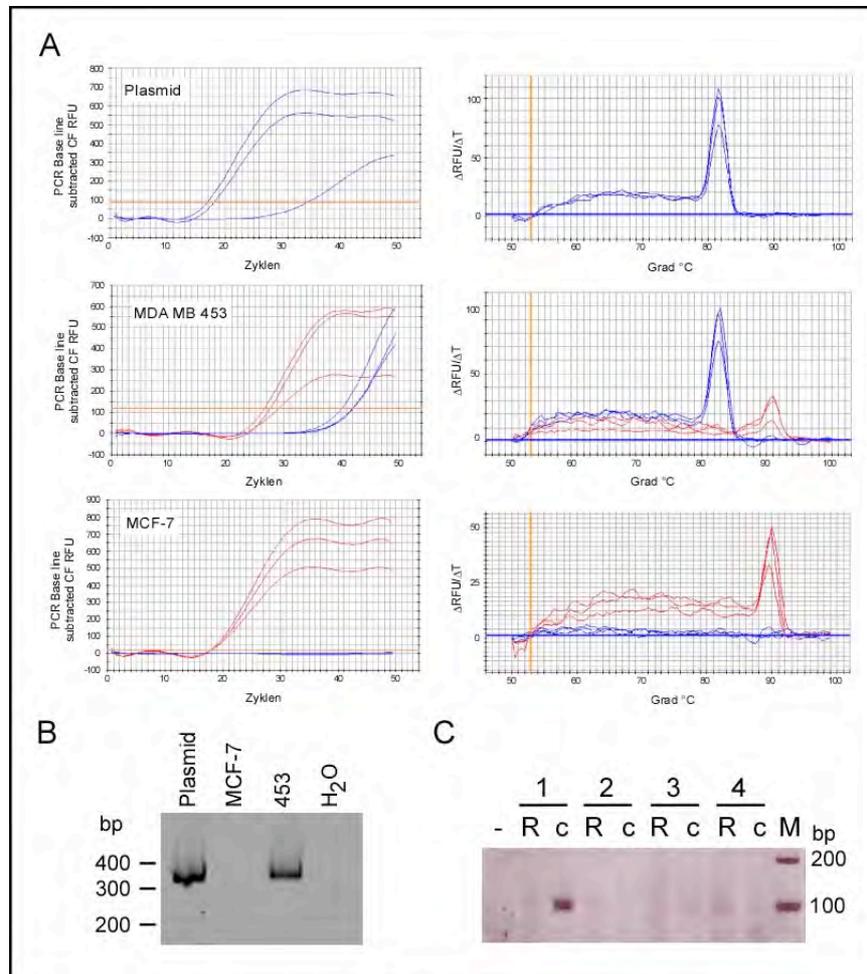


Abbildung 3.8 | Exemplarisches Echtzeit-PCR/qPCR Experiment. A | Amplifikations- und Schmelzkurven eines qPCR Experiments mit der cDNA der Zelllinien MDA MB 453 und MCF-7. Das pC3_NYBR_1 Plasmid diente als Kontrolle. **B/C** | PAA-Gel-Analyse der NY-BR-1 qPCR Produkte. **B** | Die PCR-Produkte des in A dargestellten Experiments wurden elektrophoretisch auf einem PAA-Gel aufgetrennt und die DNA mit Ethidiumbromid visualisiert. Verwendete Primer: 5'-CAAGAGCTCTGCAGTGTGAGATTG-3' („sense“) und 5'-CTGGTATTGGTGTTCAGTGTTG-3' („antisense“). Molekulargewichtsmarker links. **C** | Elektrophoretische Auftrennung (PAA-Gel) der PCR-Produkte eines Experiments und Visualisierung der DNA mit Ethidiumbromid. Verwendete NY-BR-1 Primer: 5'- AACATGCACAAAGAGACCAACGT-3' („sense“) und 5'-TGTTTGTTCACATTATCTTGTTTCGTTT-3' („antisense“). 1: MDA MB 453; 2: SK-BR-3; 3: MCF-7; 4: A431. R: RNA; c: cDNA. Molekulargewichtsmarker rechts.

Bei einer Hybridisierungstemperatur von 62°C wurden optimale qPCR Ergebnisse sowohl für die NY-BR-1 spezifischen Primer als auch für die β -Aktin Primer erzielt. Die Optimierung der qPCR für NY-BR-1 erforderte zunächst das Testen verschiedener Primerkombinationen. In Abbildung 3.8 C ist ein Gelfoto abgebildet, das die Amplifikation eines 100bp großen DNA-Fragments mit einer anderen NY-BR-1-Primerkombination

zeigt. Während der Etablierung der *NY-BR-1*-qPCR wurde auch die Qualität der RNA-Isolierung auf mögliche Kontaminationen mit genomischer DNA geprüft. Wie auf dem Gelfoto anhand der Spuren, die mit einem „R“ gekennzeichnet sind erkennbar ist, sind die RNA Präparationen nicht durch genomische DNA kontaminiert. Zusätzlich wurde dieses PCR-Produkt aufgereinigt, in den pGEMTeasy-Vektor kloniert und per Sequenzanalyse die Richtigkeit der Sequenz kontrolliert. Alle nachfolgenden Untersuchungen zur *NY-BR-1* mRNA Expression wurden mit den oben genannten Oligonukleotiden durchgeführt, da mit diesen bei stringenten Bedingungen, d.h. bei einer hohen Hybridisierungstemperatur, spezifische Produkte generiert wurden.

3.4.1 *NY-BR-1* mRNA Expression in Zelllinien

Eine Voraussetzung für funktionelle Studien ist die Etablierung geeigneter Zellkulturmodelle. Um Einblicke in die biologische Funktion von *NY-BR-1* erhalten zu können, wurden zunächst verschiedene Zelllinien bezüglich ihrer *NY-BR-1* Expression untersucht.

Abbildung 3.9 zeigt das Ergebnis eines „Real-time“-PCR-Experiments, in dem die Expression von *NY-BR-1* im Vergleich zur Expression von β -Aktin in Zelllinien (Brust, Prostata, Hals/Kopfgewebe) und normaler Brust untersucht und normalisiert wurde.

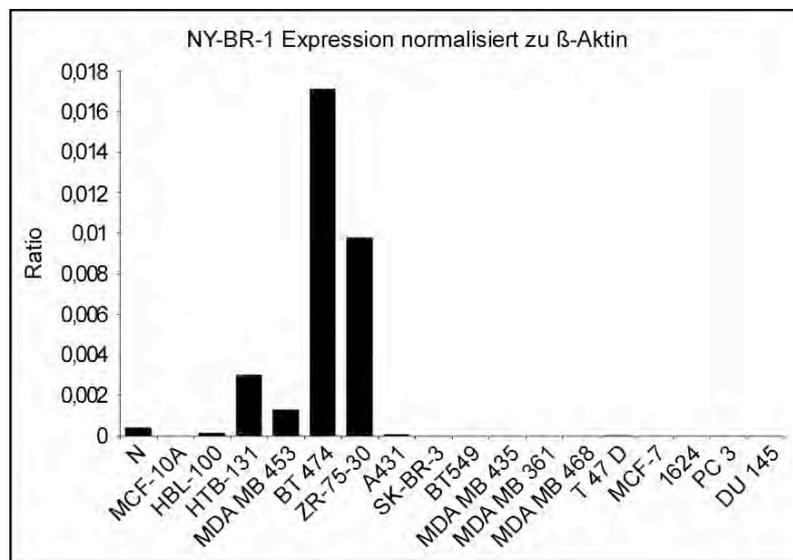


Abbildung 3.9 | *NY-BR-1* mRNA Expression in verschiedenen Zelllinien. qPCR Analyse der cDNA aus den angegebenen Zelllinien. Alle *NY-BR-1* Expressionsdaten wurden zu β -Aktin normalisiert und sind im Verhältnis dazu dargestellt (Ratio, β -Aktinexpression = 1).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Zelllinien BT474, HTB-131/MDA MB 453 und ZR-75-30 signifikante *NY-BR-1* mRNA Mengen im Vergleich zum Haushaltsgen β -Aktin aufweisen. Alle übrigen getesteten Zelllinien waren *NY-BR-1* negativ. Nicht in

diesem Experiment und in dem Diagramm gezeigt sind die Daten für HeLa und 293T Zellen, die auf mRNA Ebene ebenfalls *NY-BR-1* negativ sind.

3.4.2 *NY-BR-1* mRNA Expression in Gewebeproben

Von besonderem Interesse war die Expressionsanalyse von Patientenproben, um Aussagen über die *in vivo* Situation machen zu können. In der Literatur ist *NY-BR-1* als in Brusttumoren im Vergleich zu normalem Brustgewebe überexprimiertes Tumorantigen beschrieben (JÄGER *et al.*, 2001; JIANG *et al.*, 2002; RADVANYI *et al.*, 2005). Die qPCR-Analyse von 12 Primärtumoren, 13 Brusttumormetastasen und Pleuralergüssen von drei Brustkrebspatientinnen im Vergleich zu normalem Brustgewebe zeigte, dass *NY-BR-1* in 71% der Proben überexprimiert wird (Abbildung 3.10).

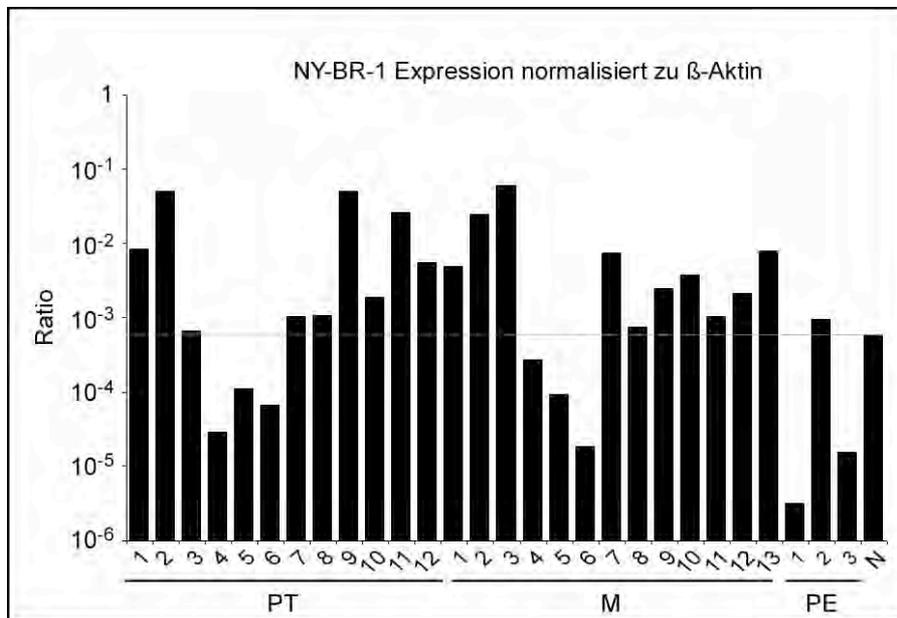


Abbildung 3.10 | *NY-BR-1* Expressionsanalyse in Brust. *NY-BR-1* qPCR Expressionsanalyse in 12 Primärtumoren (PT), 13 Brustmetastasen (M), 3 Pleuralergüssen (PE) und normalem Brustgewebe. Alle *NY-BR-1* Expressionsdaten wurden zu β -Aktin normalisiert und sind im Verhältnis dazu dargestellt (Ratio, β -Aktinexpression = 1).

Die Analyse von normalem Prostatagewebe zeigte, dass *NY-BR-1* auch in diesem Gewebe exprimiert wird. Es wurden 10 positive Normalgewebe mit dem Prostata Tumorgewebe desselben Patienten („matched pairs“) analysiert (Abbildung 3.11 A). Die *NY-BR-1* Expression im jeweiligen Tumor war in zwei Fällen erhöht, in 5 Fällen erniedrigt und in 3 Proben unverändert.

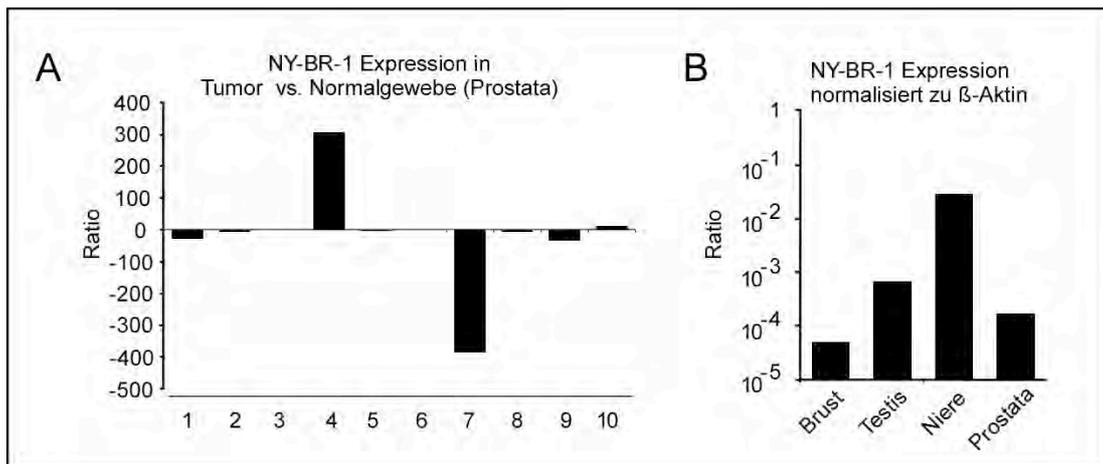


Abbildung 3.11 | NY-BR-1 Expressionsanalyse in Prostata, Testis, Niere und Brust. A | NY-BR-1 qPCR Expressionsanalyse in Normal- und Tumorgewebe desselben Patienten. Es wurden 10 Probenpaare untersucht. Die NY-BR-1 Expression wurde zu β -Aktin normalisiert und im Verhältnis von Tumor zu Normalgewebe dargestellt (REST-Programm). B | NY-BR-1 mRNA Expression in Brust-, Testis, Nieren- und Prostatagewebe. Alle NY-BR-1 Expressionsdaten wurden zu β -Aktin normalisiert und sind im Verhältnis dazu dargestellt (Ratio, β -Aktinexpression = 1).

Für Prostatumoren kann bei dieser Probenzahl keine Überexpression des NY-BR-1 Gens postuliert werden. Den korrespondierenden Patientendaten (Tabelle 3.1) zu Folge handelte es sich bei den Prostatumoren hauptsächlich um mäßig bis gering differenzierte Adenokarzinome.

Abbildung 3.11 B zeigt die NY-BR-1 mRNA Expression in Brust, Testis, Prostata und Niere normalisiert mit β -Aktin. Entgegen ersten Beobachtungen (JÄGER *et al.*, 2001; JÄGER *et al.*, 2004) wird NY-BR-1 nicht nur in Testis, Brust und Prostata sondern auch zumindest in einer Nierenprobe exprimiert.

Tabelle 3.1 | Tumorstadien und klinische Daten der Prostata-Patienten, deren Gewebeproben für die NY-BR-1 Expressionsanalysen verwendet wurden.

Probenpaar	„Grading“	NY-BR-1 mRNA Regulation Tumor-/Normalgewebe
1	G2	-
2	G3	+/-
3	G2	+
4	G2	+
5	G2	+/-
6	G3	+/-
7	G3	-
8	G2	-
9	G3	-
10	G2	+

3.4.3 “Microarray” Analyse

In der Arbeitsgruppe von Dr. H. Sültmann (DKFZ, Heidelberg) wurde ein "Brust-Tumor-cDNA Chip" erstellt, auf den die von uns zur Verfügung gestellte Teilsequenz des *NY-BR-1* Gens (bp 1827-4191, aa 609-1397) aufgebracht wurde. Analysiert wurde RNA von 49 Primärtumoren. Zur Normalisierung diente die kommerzielle humane Universal-Referenz-RNA (UHRR) der Firma Stratagene.

Tabelle 3.2 | Tumorstadien und klinische Daten der Brusttumor Patienten, deren RNA für die „Microarray“ Analyse verwendet wurde.

Alter	
Median (range)	56 years (33-79)
Geschlecht	
weiblich	49
Tumortyp	
Invasiv, duktal	36
Invasiv, lobulär	4
Medullär	2
Ductulobulär	3
Pathologisches “Staging”/Tumorstadium	
T1	17
T2	11
T3	1
T4	5
Keine Information	11
Pathologisches “Grading”/Differenzierungsgrad	
G1	3
G2	18
G3	20
Keine Information	4

Ein Großteil der Primärtumoren waren invasive, duktale Mammakarzinome mit einem T1-T2 „Staging“ und einem G2-G3 „Grading“ (Tabelle 3.2). Die "Array"-Datenanalyse erfolgte wie beschrieben (SÜLTMANN *et al.*, 2005). Abbildung 3.12 zeigt die Expression von *NY-BR-1* normalisiert zur Kontroll-RNA. *NY-BR-1* ist in 44 von 49 Proben (89%) exprimiert und im Durchschnitt 2.05-fach überexprimiert.

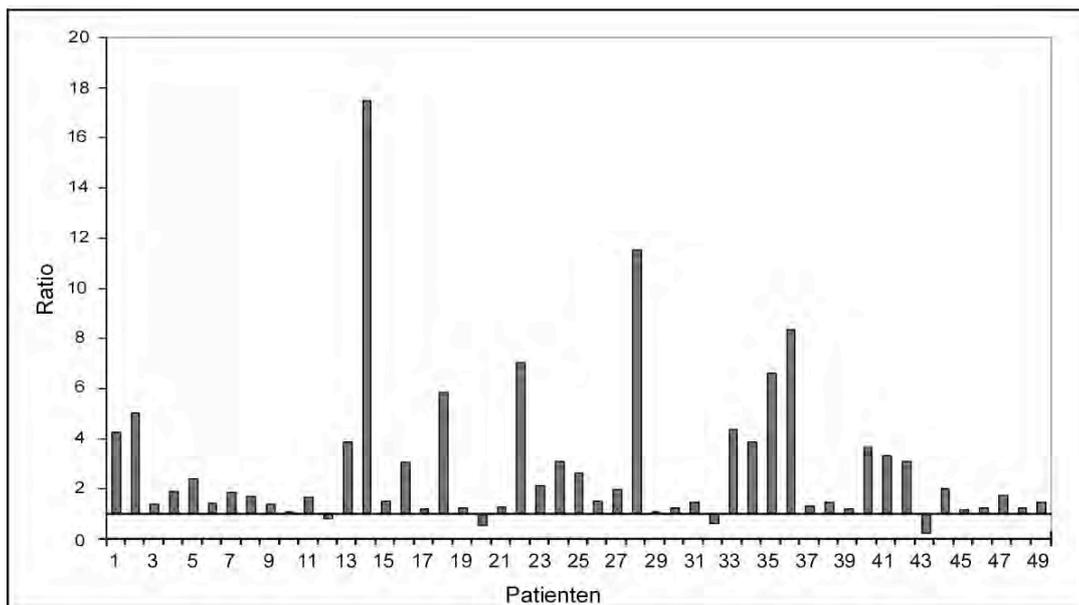


Abbildung 3.12 | NY-BR-1 Expressionsdaten der „Microarray“ Analyse. Es wurden 49 Patientenproben mittels „Microarray“ Analyse des „Breast-Cancer-Chips“ bezüglich der NY-BR-1 mRNA Expression getestet. Dargestellt ist die Ratio der NY-BR-1 mRNA Menge (Y-Achse) im Vergleich zur Kontroll-RNA (humane Universal-Referenz-RNA, Stratagene).

Die Analyse einer CGH-Datenbank (durchgeführt von Dr. S. Joos, Heidelberg) ergab, dass der genomische Lokus von NY-BR-1 bei Brustkrebs weder amplifiziert noch deletiert ist.

3.5 NY-BR-1 Proteinexpression

NY-BR-1 wird in ca. 70% aller Brusttumoren überexprimiert. Da sich diese Angaben auf PCR-Daten beziehen und nur in 20% der Fälle die mRNA Expression mit der Proteinexpression korreliert (CARTER *et al.*, 2004), war es von großem Interesse, in Gewebeproben die Expression von endogenem NY-BR-1 auf Proteinebene zu untersuchen.

3.5.1 Evaluierung des monoklonalen anti-NY-BR-1 Antikörpers

Für diese Analysen konnte zusätzlich ein monoklonaler anti-NY-BR-1 Antikörper verwendet werden, der in der Zwischenzeit gegen das Peptid NY-BR-1 aa 851-928 hergestellt und uns freundlicherweise von Dr. D. Jäger (NCT, Heidelberg) zur Verfügung gestellt wurde. Der monoklonale anti-NY-BR-1 Antikörper wurde zunächst ebenfalls in „Western-Blot“ Analysen auf seine Spezifität getestet. In Abbildung 3.13 ist ein Ausschnitt der NY-BR-1 Aminosäuresequenz dargestellt. Das für die Immunisierung verwendete Peptid (rot unterlegt) kodiert für einen sich wiederholenden Bereiche und ist dementsprechend zu zwei weiteren Sequenzabschnitten zu 87 bzw. 92% identisch (gelb

unterlegt). Zu anderen Proteinen, die Isoform NY-BR-1.1. eingeschlossen, zeigt dieser Sequenzbereich keine Homologien.

```

561 YEENSWDESESLCETVSOQKDVCLPKATHQKEIDKINGKLEESPNKDGLLKATCGMKVSIPTKALELKDMDQTFKAEPPEKPS
641 AFEPATEMQKSVPNKALELKNEQTLRADEILPSESEKDYEEENSWDTESI CETVSOQKDVCLPKAAHQKEIDKINGKLEGS
721 PVKDGLLKANCQGMKVSIPKALELMDMDQTFKAEPPEKPSAFEPPIEMQKSVPNKALELKNEQTLRADEILPSESKQKDYE
801 ESSWDESESI CETVSOQKDVCLPKATHQKEIDKINGKLEESPDNDGFLKAPCRMKVSIPKALELMDMDQTFKAEPPEKPSAF
881 EPAIEMQKSVPNKALELKNEQTLRADQMFPESEKQKKVEENSWDESESLRETVSOQKDVCPKATHQKEMDKISGKLEDSTS
961 LSKILDVHSCERARELQKDHCEQRTGKMEQMKKKFCVLKKLSEAKEIKSQLENQKVKWEQELCSVRLTLNQEERKRN

```

Abbildung 3.13 | Ausschnitt der NY-BR-1 Aminosäuresequenz. Grau unterlegt ist die Sequenz des rekombinanten Peptids, das zur Immunisierung benutzt wurde. Gelb unterlegt sind Sequenzbereiche, die zu dieser Sequenz zu 87% bzw. 92% identisch sind. Die Aminosäurepositionen sind links angezeigt.

Um zunächst die Spezifität des monoklonalen anti-NY-BR-1 Antikörpers zu bestimmen und die transiente NY-BR-1 Expression in Säugerzellen zu untersuchen, wurden Lysate von transfizierten 293T Zellen im "Western Blot" getestet. Da 293T Zellen kein endogenes NY-BR-1 exprimieren konnte das Lysat nicht transfizierter Zellen als Negativkontrolle eingesetzt werden.

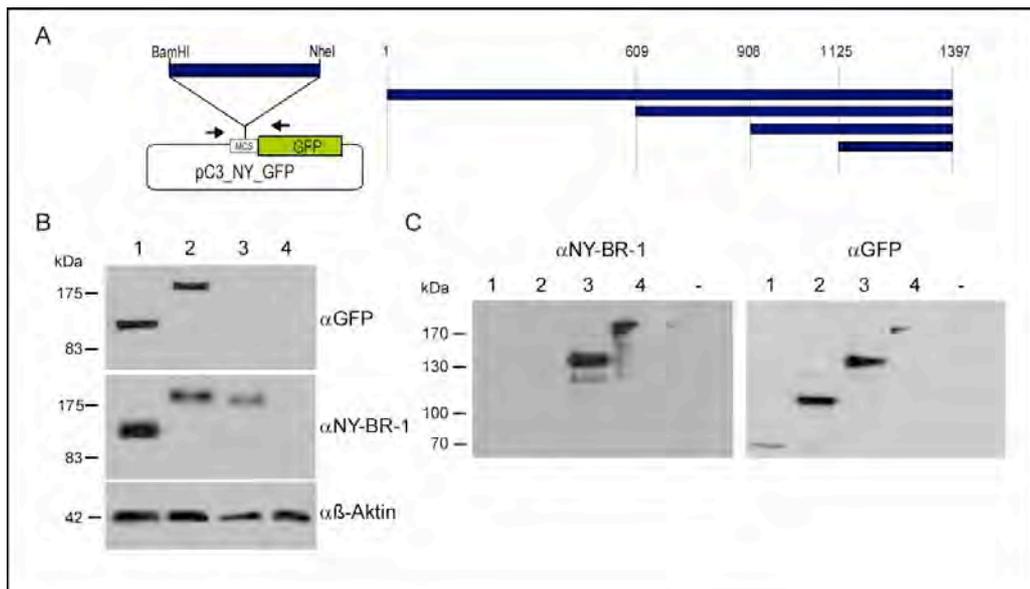


Abbildung 3.14 | Spezifität des monoklonalen anti-NY-BR-1 Antikörpers. **A** | Schematische Darstellung der pC3_NY-BR-1_GFP Konstrukte, die transient in 293T Zellen exprimiert wurden. **B** | "Western Blot" Analyse von Lysaten transient transfizierter 293T Zellen mit dem anti-GFP Antikörper (Verdünnung 1:1000, oben), dem monoklonalen anti-NY-BR-1 Antikörper (Verdünnung 1:250, Mitte) und dem anti-β-Aktin Antikörper (Verdünnung 1:2000, unten). Spur 1: NY609-1397_GFP; 2: NY1-1397_GFP; 3: NY1-1397; 4: nicht transfiziert. **C** | "Western Blot" Analyse von Lysaten transient transfizierter 293T Zellen mit dem monoklonalen anti-NY-BR-1 Antikörper (Verdünnung 1:250, links) und dem anti-GFP Antikörper (Verdünnung 1:1000, rechts). Spur 1: NY1125-1397_GFP; 2: NY908-1397_GFP; 3: NY609-1397_GFP; 4: NY1-1397_GFP; -: nicht transfiziert. Als Sekundäntikörper dienten HRP-konjugierte anti-Maus bzw. anti-Kaninchen Antikörper (1:2000). Links ist jeweils der Molekulargewichtsmarker angegeben.

Die pC3_NY908-1397_GFP und pC3_NY1125-1397_GFP Konstrukte wurden kloniert, indem mittels PCR das jeweilige NY-BR-1 Fragment mit den Schnittstellen BamHI und NheI generiert wurde, das anschließend in den BamHI/NheI geschnittenen pC3_GFP Vektor ligiert wurde. Mittels anti-GFP Antikörper wurde die Expression der unterschiedlichen NY-BR-1_GFP Konstrukte kontrolliert (Abbildung 3.14 B/C). Der anti-GFP Antikörper detektiert das Volllänge NY-BR-1_GFP (185kDa) sowie die Deletionsmutanten NY609-1397_GFP (115kDa), NY980-1397_GFP (85kDa) und NY1125-1397_GFP (57kDa). In Klammern ist jeweils das errechnete Molekulargewicht angegeben. Der anti-NY-BR-1 Antikörper erkennt sowohl NY-BR-1 (158kDa), das NY-BR-1_GFP Fusionsprotein als auch die NY-BR-1 Deletionsmutante NY609-1397_GFP. Die Deletionsmutanten NY1125-1397_GFP (57kDa) und NY908-1397_GFP (85kDa) werden nicht im „Western Blot“ detektiert. Da bei dem NY908-1397_GFP Fusionsprotein auch ein Bereich des Peptids mit diesem Sequenzabschnitt überlappt, dieses Protein aber nicht erkannt wird vom Antikörper liegt demnach das Antikörper-Epitop im vorderen Abschnitt des Peptidantigens. Die im „Western Blot“ detektierten NY-BR-1 Fusionsproteine haben ein höheres Molekulargewicht als das für sie berechnete, was möglicherweise auf posttranslationelle Modifikationen (Glykosylierungen, etc.) zurückzuführen ist.

Die Funktionalität des Antikörpers wurde auch in Immunpräzipitationen (IP) getestet. Abbildung 3.15 zeigt "Western Blot" Analysen, in denen FLAG_NY-BR-1 (Klonierung siehe Kapitel 2.1.4 und 2.1.5, siehe Anhang) sowohl mit dem monoklonalen anti-NY-BR-1 Antikörper als auch mit dem anti-FLAG Antikörper aus Lysaten transfizierter 293T Zellen präzipitiert werden konnte (Abbildung 3.15 B/C). Der kommerzielle anti-FLAG Antikörper diente zur Kontrolle der IP und der Detektion des FLAG_NY-BR-1-Fusionsproteins im "Western Blot". Der FLAG-Antikörper und der monoklonale anti-NY-BR-1 Antikörper detektierten spezifisch ein nicht prozessiertes Protein von ca. 175kDa (C). Diese Ergebnisse zeigen, dass der monoklonale anti-NY-BR-1 Antikörper spezifisch in Säugerzellen überexprimiertes NY-BR-1 im "Western Blot" erkennt und zudem auch für die Anwendung in der IP geeignet ist.

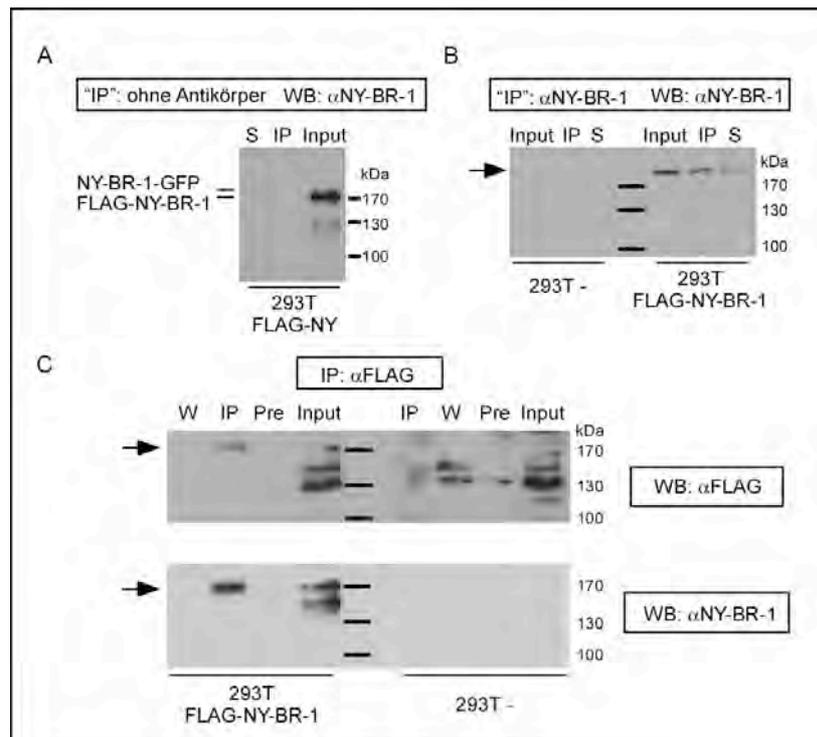


Abbildung 3.15 | Immunpräzipitation von transient exprimiertem NY-BR-1. **A** | Test auf unspezifische Bindung des exprimierten NY-BR-1 Proteins an Protein A/G-Agarose. **B** | Immunpräzipitation des FLAG-NY-BR-1 Proteins mit dem monoklonalen anti-NY-BR-1 Antikörper aus Lysaten transfizierter 293T Zellen. **C** | Immunpräzipitation des FLAG-NY-BR-1 Proteins mit dem monoklonalen anti-FLAG Antikörper aus Lysaten transfizierter 293T Zellen. Die Detektion im "Western Blot" (WB) erfolgte mit dem anti-NY-BR-1 Antikörper (1:250) bzw. mit einem anti-FLAG Antikörper (1:1000). "Input": 10% des für die IP eingesetzten Ausgangslysats; IP: immunpräzipitiertes Protein; S: Überstand nach IP Reaktion; Pre: an Protein A/G-Agarose gebundenes Protein nach der Vorinkubation („preclearing“); W: Fraktion nach dem ersten Waschschritt. Als Sekundärantikörper dienten HRP-konjugierte anti-Maus bzw. anti-Kaninchen Antikörper (1:2000). Rechts ist jeweils der Molekulargewichtsmarker angegeben.

Abbildung 3.16 zeigt schematisch im Vergleich die relative Lage der für die jeweiligen Immunisierungen verwendeten Antigene. Für die weiteren Analysen wurde ausschließlich der monoklonale anti-NY-BR-1 Antikörper verwendet.

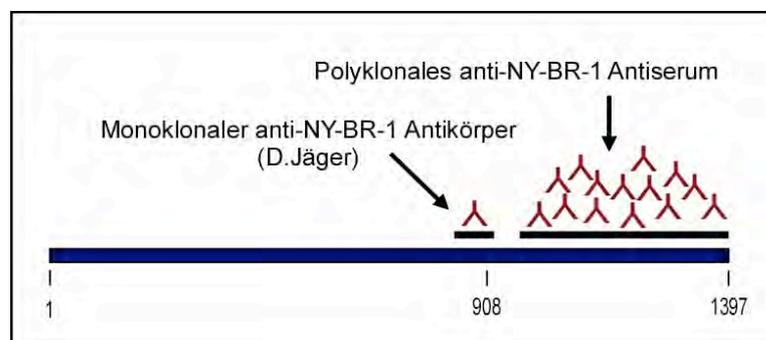


Abbildung 3.16 | Schematische Darstellung der rekombinanten Peptide bzw. Proteine für die Herstellung des monoklonalen und des polyklonalen anti-NY-BR-1 Antiserums. Die schwarzen Balken repräsentieren die Sequenzbereiche der verwendeten Antigene. Die Zahlen geben die Aminosäureposition an.

3.5.2 NY-BR-1 Expression in Zelllinien

Nach der erfolgreichen Etablierung des monoklonalen anti-NY-BR-1 Antikörpers für „Western Blot“ Analysen transfizierter Zellen sollte endogenes NY-BR-1 untersucht werden. Der „Western Blot“ in Abbildung 3.17 zeigt die Analyse der NY-BR-1 mRNA positiven Zelllinien BT474, MDA MB 453 sowie der negativen Zelllinie MCF-7. Weder im löslichen Lysat noch in der unlöslichen Pelletfraktion konnte endogenes NY-BR-1 spezifisch detektiert werden.

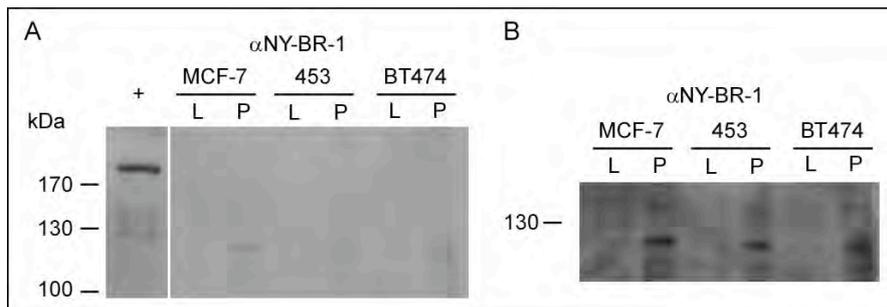


Abbildung 3.17 | "Western Blot" Analyse des endogenen NY-BR-1 Proteins in Zelllinien. **A** | Lysate und unlösliche Pelletfraktionen der Lysatpräparationen. Die Detektion erfolgte mit dem 1:250 verdünnten anti-NY-BR-1 Antikörper. Als Sekundärantikörper diente ein HRP-konjugierter anti-Maus Antikörper (1:2000). **B** | Längere Exposition des Films. L: Lysat; P: Pellet; +: Lysat von FLAG_NY-BR-1 transfizierten 293T Zellen. Links ist der Molekulargewichtsmarker eingezeichnet.

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass NY-BR-1 proteasomal degradiert wird und nur wenig zelluläres Protein vorliegt, wurden die Zellen (BT474, MDA MB 453 und MCF-7) mit den Proteasomeninhibitoren ALLN, ALLM, MG132 (Kapitel 2.2.32) inkubiert. Diese Behandlung zeigte im "Western Blot" jedoch keine Stabilisierung des NY-BR-1 Proteins, so dass die Detektion des endogenen Proteins nicht möglich war. Versuche, endogenes NY-BR-1 aus Zelllysaten mit dem monoklonalen anti-NY-BR-1 Antikörper mittels Immunpräzipitation anzureichern, blieben ebenfalls ohne Erfolg.

3.5.3 NY-BR-1 Expression in Gewebeproben und Pleuralergüssen

Untersuchungen von normalem Brustgewebe im Vergleich zur NY-BR-1 negativen MCF-7 Brust-Zelllinie im „Western Blot“ ergaben, dass nur im Pellet, in der Triton-X-100 unlöslichen Membranfraktion, der Lysatpräparation eine Bande von ca. 150kDa detektiert war (Abbildung 3.18 A). Die Gewebeextrakte wurden wie in Kapitel 2.2.34 beschrieben hergestellt. Bei dem Lysat der MCF-7 Zellen handelte es sich um ein Gesamtzell-Lysat, in dem sowohl die Membranfraktion als auch alle löslichen Proteine enthalten waren. Von den mittels qPCR positiv getesteten Metastasenproben wurden vier im Vergleich zu normaler Brust im "Western Blot" analysiert (Abbildung 3.18 B). Auch hier ist NY-BR-1 nur in der Pelletfraktion der Metastasen detektiert. Die "Blots" der Lysate

sind hier nicht gezeigt. Zur Kontrolle, dass es sich bei den Metastasegewebeproben nicht hauptsächlich um Normalgewebe handelt, wurde der „Blot“ mit einem anti-ErbB2 Antikörper inkubiert. ErbB2 ist in 30% aller Brusttumoren und Metastasen überexprimiert und ErbB2 Expression wird wie erwartet vorwiegend in Metastasen beobachtet.

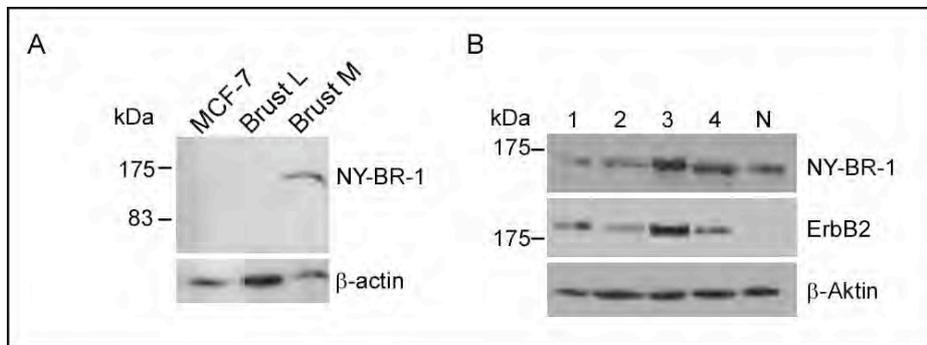


Abbildung 3.18 | "Western Blot" Analyse des NY-BR-1 Proteins in Brustgewebe und Brustmetastasen. A | Endogenes NY-BR-1 wird in der Triton-X-100 unlöslichen Pelletfraktion einer Lysatpräparation von normalem Brustgewebe (Brust M) detektiert, nicht aber als lösliches Protein im Lysat von normalem Brustgewebe (Brust L). Als Negativkontrolle wurde Gesamtzelllysat von MCF-7 Zellen eingesetzt (MCF-7). Die Detektion erfolgte mit dem anti-NY-BR-1 Antikörper (1:250) bzw. mit dem anti- β -Aktin Antikörper (1:1000). **B |** In Brustmetastasen (1-4) sind endogenes NY-BR-1 und der Membranrezeptor ErbB2 ebenfalls in der Triton-X-100 unlöslichen Pelletfraktion detektierbar. Als Positivkontrolle für endogenes NY-BR-1 diente die Membranfraktion von normalem Brustgewebe (N). Die Detektion erfolgte mit dem anti-NY-BR-1 Antikörper (1:250), dem anti-ErbB2-Antikörper (1:500) bzw. mit dem anti- β -Aktin Antikörper (1:1000). Als Sekundärantikörper dienen HRP-konjugierte anti-Maus bzw. anti-Kaninchen Antikörper (1:2000). Links ist der Molekulargewichtsmarker eingezeichnet und rechts die jeweils mit spezifischen Antikörpern detektierten Proteine NY-BR-1, ErbB2 und β -Aktin.

Dass NY-BR-1 auch in Prostata exprimiert sein könnte, wurde zunächst persönlich durch D. Jäger (NCT, Heidelberg) kommuniziert. Daraufhin wurde die NY-BR-1 mRNA Expression mittels qPCR (Abbildung 3.11) in Prostata Normalgewebe und korrespondierenden Tumorproben analysiert. Die Regulation des NY-BR-1 Gens in den Tumorproben im Vergleich zum Normalgewebe konnte überwiegend auch auf Proteinebene beobachtet werden (Abbildung 3.19). Die Herunterregulation von NY-BR-1 im Tumorgewebe (Probenpaare 1 und 2, qPCR Proben 8 und 7) ist deutlich auch auf Proteinebene zu sehen. Das Probenpaar 3 entspricht der qPCR Probe 10, in der NY-BR-1 im Tumor überexprimiert ist. Auch im Tumorgewebe ist hier NY-BR-1 Proteinexpression detektierbar. Da sich für diese Tumorprobe anhand der β -Aktin Detektion jedoch eine höhere, eingesetzte Proteinkonzentration ableiten lässt, ist diese Überexpression auf Proteinebene nicht allzu signifikant. Für Probenpaar 4, was der qPCR Probe 9 entspricht, korrespondiert die im Tumor geringere mRNA Menge nicht mit der Proteinexpression. Wiederum war endogenes NY-BR-1 Protein lediglich in den unlöslichen

Membranfraktionen (Abbildung 3.19, oben), nicht aber in den Lysaten der Gewebelysatpräparationen detektierbar (Abbildung 3.19, unten).

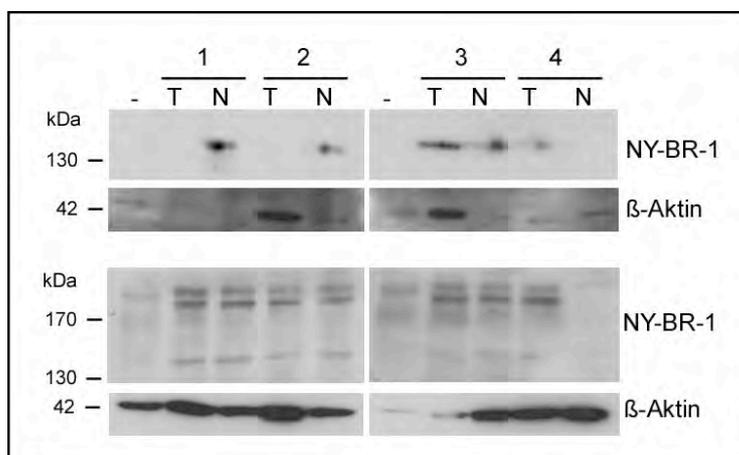


Abbildung 3.19 | "Western Blot" Analyse des NY-BR-1 Proteins in Prostata Normalgewebe und Tumoren. Endogenes NY-BR-1 wird in der Triton-X-100 unlöslichen Fraktion von normalem Prostatagewebe (N) und Prostata Tumorgewebe (T) detektiert („Blots“ oben), nicht aber als lösliches Protein im Lysat dieser Proben („Blots“ unten). Als Negativkontrolle (-) wurde das Lysat (unten) bzw. die Membranfraktion (oben) von MCF-10A Zellen eingesetzt. 4 Probenpaare Normal- und Tumorgewebe (1-4, "matched pairs") wurden mit dem anti-NY-BR-1 Antikörper (1:250) bzw. mit dem anti- β -Aktin Antikörper (1:1000) analysiert. Als Sekundärantikörper dienten HRP-konjugierte anti-Maus bzw. anti-Kaninchen Antikörper (1:2000). Links ist der Molekulargewichtsmarker eingezeichnet. Links ist der Molekulargewichtsmarker angegeben und rechts die jeweils mit spezifischen Antikörpern detektierten Proteine NY-BR-1 und β -Aktin.

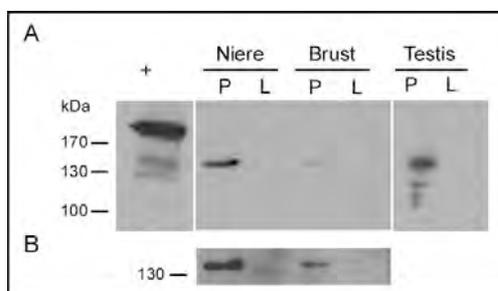


Abbildung 3.20 | NY-BR-1 Proteinexpression in Niere, Brust und Testis. **A** | Endogenes NY-BR-1 wird in der Triton-X-100 unlöslichen Fraktion (P) von normalem Nieren-, Brust- und Testisgewebe detektiert, nicht aber als lösliches Protein im Lysat dieser Proben (L). Als Positivkontrolle (+) wurde das Lysat von 293T Zellen eingesetzt, die transient FLAG_NY-BR-1 exprimieren. Die Detektion erfolgte mittels des anti-NY-BR-1 Antikörpers (1:250). Als Sekundärantikörper diente ein HRP-konjugierte anti-Maus Antikörper (1:2000). Links ist der Molekulargewichtsmarker eingezeichnet. **B** | Längere Exposition des in A gezeigten "Blots". Die einzelnen Teile des Blots entstammen einer Membran, die zerschnitten wurde.

Das Brust Tumorantigen NY-BR-1 kommt auch in Testis vor und konnte in diesem Gewebe (Pellet) im "Western Blot" nachgewiesen werden. Überraschenderweise war auch in normalem Nierengewebe NY-BR-1 mRNA nachweisbar (Abbildung 3.11), was sich auch auf Proteinebene bestätigen ließ (Abbildung 3.20). Die Pleuralergüsse der Brustkrebspatienten waren ähnlich wie die Zelllinien trotz der schwachen mRNA

Expression in PE2 nicht auf Proteinebene NY-BR-1 positiv (Abbildung 3.21). Als Positivkontrollen für den nachfolgenden "Western Blot" dienten hier Lysate und Pellets von Testis-, Prostata- und Brust-Normalgewebeproben. In dieser Präparation des normalen Brustgewebes war NY-BR-1 nicht detektierbar, was an dem hohen Fettanteil und dem geringen Gewebeanteil dieser Gewebeprobe gelegen haben könnte.

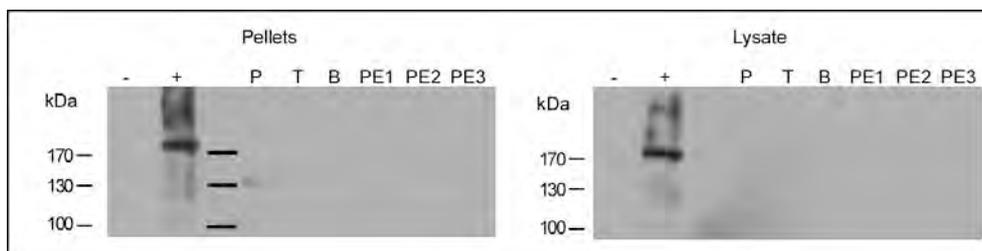


Abbildung 3.21 | NY-BR-1 Proteinexpression in Pleuralergüssen (PE). Endogenes NY-BR-1 wird in der Triton-X-100 unlöslichen Fraktion (links) von normalem Prostata-, Testis- und Brustgewebe detektiert, nicht aber als lösliches Protein im Lysat dieser Proben (rechts). In den Pellets bzw. Lysaten der Pleuralergüsse (PE1-3) konnte NY-BR-1 nicht detektiert werden. Als Positivkontrolle (+) wurde das Lysat von 293T Zellen eingesetzt, die transient FLAG_NY-BR-1 exprimieren, als Negativkontrolle diente das Lysat nicht transfizierter 293T Zellen. Die Detektion erfolgte mit dem anti-NY-BR-1 Antikörper (1:250). Als Sekundärantikörper diente ein HRP-konjugierte anti-Maus Antikörper (1:2000). Links ist der Molekulargewichtsmarker eingezeichnet.

Zusammenfassend kann hier festgestellt werden, dass die Detektion des NY-BR-1 Proteins in den untersuchten Geweben überwiegend nur im Pellet möglich war und dass das endogene NY-BR-1 ein Molekulargewicht von 150kDa hat. Damit weicht die Größe geringfügig von dem für NY-BR-1 theoretischen Molekulargewicht (160kDa) ab. Mit dem polyklonalen anti-NY-BR-1 Antiserum war es nicht möglich, endogenes NY-BR-1 zu detektieren.

3.5.4 Immunhistochemie

In Zusammenarbeit mit Herrn Dr. K. Engels (Pathologie, Uniklinik Frankfurt) wurden immunhistochemische Analysen durchgeführt. Die NY-BR-1 Proteinexpression konnte auch immunhistochemisch in Brust Karzinomen sowie Seminomen (Hodentumoren) und Prostata Karzinomen bestimmt werden. In Abbildung 3.22 sind repräsentative Gewebeschnitte dargestellt, die mit dem anti-NY-BR-1 Antikörper gefärbt wurden. Diese Färbungen zeigen, dass NY-BR-1 in Brust und Prostata vorwiegend in Epithelzellen exprimiert wird. Bei Seminomen ist die NY-BR-1 Expression in atypischen Keimzellen zu beobachten.

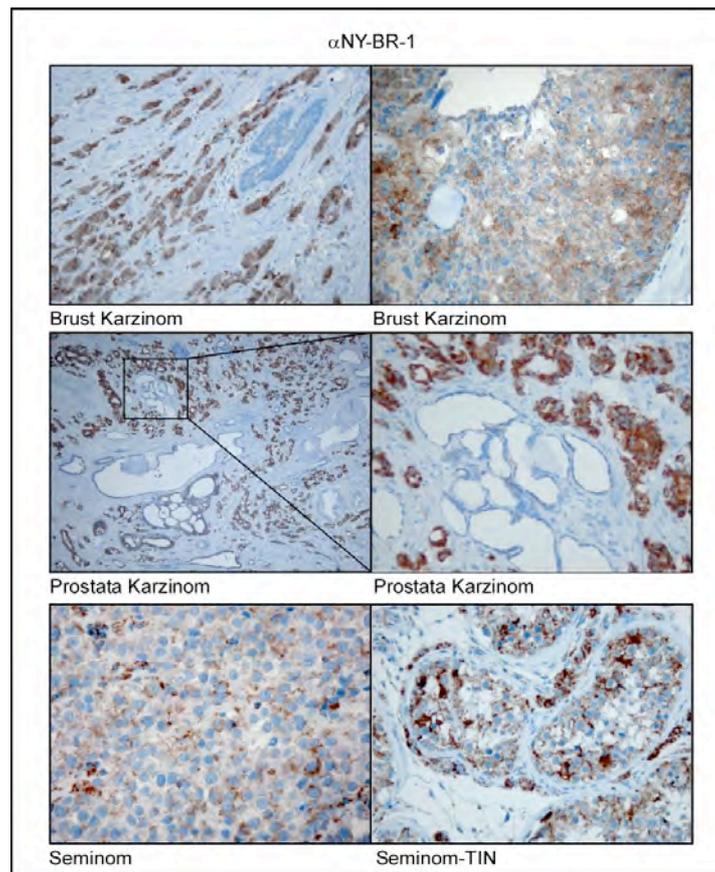


Abbildung 3.22 | NY-BR-1 Expression in Brust-, Prostata- und Testis-Karzinomen. Immunhistochemische Analyse der angegebenen Gewebe mit dem anti-NY-BR-1 Antikörper (1:100). Als Sekundärantikörper wurde ein biotinylierter anti-Maus Antikörper eingesetzt. Die Färbung wurde mit dem CSA-Detektionssystem (DAKO) visualisiert. TIN: testikuläre intraepitheliale Neoplasie.

Tabelle 3.3 fasst die Ergebnisse der qPCR- und „Western Blot“ Analysen für NY-BR-1 Expression in Zelllinien und Geweben zusammen. Von 12 getesteten Brustzelllinien waren für NY-BR-1 auf mRNA Ebene 4 positiv, aber in keiner konnte NY-BR-1 auf Proteinebene detektiert werden. Die Prostatazelllinien PC3 und DU145 waren nicht NY-BR-1 mRNA positiv. Die Testiszelllinie Cates-1B konnte weder auf mRNA-Ebene noch auf Proteinebene getestet werden, da die Zellen auch unter verschiedenen Wachstumsbedingungen nicht proliferierten. Für die untersuchten soliden Tumoren und deren Normalgewebe (Brust, Testis, Prostata, Niere) war es hingegen möglich, sowohl NY-BR-1 auf mRNA Ebene als auch auf Proteinebene im "Western Blot" zu detektieren.

Tabelle 3.3: Zusammenfassung der NY-BR-1 Expressionsanalysen mittels qRT-PCR und "Western Blot" in Zelllinien und Gewebeproben. +/-: detektierbar/nicht detektierbar; n.d.: nicht durchgeführt.

Zelllinie	NY-BR-1 expression	
	qRT-PCR	WB
HeLa	-	-
293T	-	-
MDA MB 361	-	n.d.
MDA MB 453/HTB131	+	-
MDA MB 435	-	-
MDA MB 468	-	n.d.
BT474	+	-
BT549	-	n.d.
T47D	+/-	n.d.
SK-BR 3	-	-
MCF-7	-	-
MCF-10A	-	-
HBL-100	-	-
A431	-	-
ZR-75-30	+	n.d.
HUVEC	-	n.d.
1624	-	n.d.
PC3	-	-
DU145	-	-

Gewebe	NY-BR-1 Expression	
	qRT-PCR	WB
Brust, Normalgewebe	+	+
Brust, Primärtumor	+	+
Brust, Metastase	+	+
Brust, Pleuralerguss	+	-
Testis, Normalgewebe	+	+
Testis, Primärtumor	+	+
Prostata, Normalgewebe	+	+
Prostata, Primärtumor	+	+
Niere, Normalgewebe	+	+

3.6 Herrunterregulation von NY-BR-1 über "RNA interference"

Um Einblicke in die biologische Funktion von Proteinen zu erhalten, bietet sich die Möglichkeit an, experimentell die Expression des Zielproteins entweder durch Überexpression oder durch Abschalten/Herrunterregulation im Zellkultursystem oder im Tiermodell zu verändern und den Phänotypen, betroffene Signalwege, etc. näher zu analysieren. Eine Strategie, spezifisch die Genexpression herunterzuregulieren ist die Applikation von "small interfering RNA" (siRNA) (ELBASHIR *et al.*, 2001), die entweder als Oligo-Duplex oder kloniert in einen geeigneten Vektor, z.B. pSUPER, appliziert werden können. Die Klonierung dieser Sequenzabschnitte in einen Vektor bietet unter anderem den Vorteil der stabilen und induzierbaren siRNA Expression. Es wurden zwei

Sequenabschnitte für NY-BR-1 in Zusammenarbeit mit Dr. M. Truss (Charite, Berlin) für die Synthese der siRNA Oligonukleotide ausgewählt, die keine Homologien zu anderen Genen aufweisen. Um die Funktionalität dieser hybridisierten Oligonukleotide (siRNA Duplex) zu untersuchen, wurden 293T Zellen, die transient NY-BR-1_GFP exprimieren, mit den siRNA Oligos transfiziert, die Zellen nach 24h lysiert und im "Western Blot" die Menge an NY-BR-1 Protein bestimmt. Analog wurden die beiden siRNA-Sequenzen über "Oligo-Annealing" (Kapitel 2.2.9) in den pSUPER-Vektor kloniert (pSUPER_siNY1, pSUPER_siNY2), die ebenfalls zur Transfektion NY-BR-1_GFP exprimierender Zellen benutzt wurden. Als unspezifische Kontrolle wurden EGFP spezifische siRNA Duplices transfiziert. Abbildung 3.23 zeigt das Ergebnis die "Western Blot" Analyse eines siRNA-Experiments. β -Tubulin wurde als Normalisierungskontrolle für die auf das Gel aufgetragenen Proteinmengen ausgewählt.

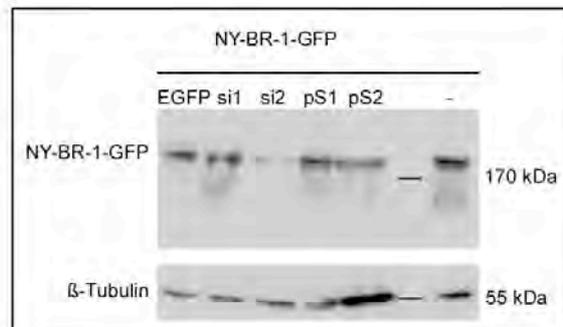


Abbildung 3.23 | Die Menge an NY-BR-1 Protein kann durch NY-BR-1 spezifische siRNA Oligos herunterreguliert werden. 293T Zellen wurden transient mit pC3_NY-BR-1_GFP und den angegebenen siRNA Oligos bzw. pSUPER-Konstrukten transfiziert und nach 24h geerntet. EGFP: EGFP spezifische siRNA Oligos; si1: NY-BR-1 spezifische siRNA Oligos; si2: NY-BR-1 spezifische siRNA Oligos; pS1: pSUPER, der für NY-BR-1 spezifische si1 kodiert, pS2: pSUPER, der für NY-BR-1 spezifische si2 kodiert; -: unbehandelte transfizierte Zellen. Rechts ist der Molekulargewichtsmarker angegeben. β -Tubulin diente als Normalisierungskontrolle.

Dieses Experiment zeigt, dass siRNA Duplex si2 und pSUPER_siNY2 in der Lage sind, funktionell mit der NY-BR-1 Genexpression zu interferieren. Die Expression des pSUPER_siNY2 Konstrukts führt in Relation zum detektierten β -Tubulin im Vergleich zu den übrigen Proben betrachtet zu einer verminderten NY-BR-1 Proteinmenge. Weiterführend wurde untersucht, ob auch endogenes NY-BR-1 mit Hilfe dieser Technik herunterreguliert werden kann. Da das Protein nicht auf Proteinebene nachzuweisen war, wurde die NY-BR-1 mRNA Expression in den Proben mittels qPCR analysiert. Die Transfektion von NY-BR-1 mRNA positiven BT474 oder MDA MB 453 Zellen mit siRNA-Oligo si2 oder dem pSUPER_siNY2-Vektor zusammen mit dem für GFP kodierenden pF143 Kontrollplasmid führten in keinem der beiden Fälle zu einer verminderten NY-BR-1 mRNA Menge. Da bei diesen Zelllinien visuellen Abschätzungen zu Folge die Zahl GFP

exprimierender Zellen nach Transfektion des pF143 Plasmids bei ca. 10-20% liegt, war der ausbleibende siRNA Effekt möglicherweise auf die geringe Transfektionseffizienz der siRNA Oligos zurückzuführen.

3.7 Subzelluläre Lokalisation des NY-BR-1 Proteins und „Domain-Mapping“

Im Gegensatz zu prokaryontischen Zellen, die nur von einer Plasmamembran umgeben sind, besitzen die weitaus komplexeren eukaryontischen Zellen zusätzlich ein vielfältiges Endomembransystem, das der Schaffung funktionell verschiedener, voneinander getrennter Reaktionsräume dient. Die verschiedenen Membranen sind ein grundlegender Bestandteil der Zellorganisation, denn sie grenzen Zellen und subzelluläre Reaktionsräume (Kompartimente) von ihrer Umgebung ab. Viele der verschiedenen Membranen einer Eukaryotenzelle gehören zu einem inneren über Membranfluss kommunizierenden Membransystem. Dieses System umfasst die Kernhülle, das Endoplasmatische Retikulum, den Golgi-Apparat, die Microbodies (z.B. Peroxisomen) sowie die Plasmamembran. Dieses Membransystem ermöglicht hochselektive Transportprozesse von Proteinen, Ionen, Stoffwechselintermediaten, etc. zwischen dem Kern, dem Inneren der Zelle, dem Zytosol und dem extrazellulären Raum. Die zeitliche und vor allem räumliche Trennung essentieller biologischer Prozesse wie Transkription, Translation und Signaltransduktion ist ebenso charakteristisch für eukaryontische Zellen wie die Lokalisierung einzelner Stoffwechselwege in spezifischen Kompartimenten bzw. Organellen. Zum Beispiel kann die Aktivität von Transkriptionsfaktoren allein schon durch die Regulation ihrer subzellulären Lokalisation kontrolliert werden. Somit können Studien zur subzellulären Lokalisation eines Proteins möglicherweise schon wertvolle Hinweise für eine Funktion liefern.

Da zu Beginn der Arbeit noch kein Vollängenkonstrukt zur Verfügung stand, wurden zunächst verschiedene NY-BR-1_GFP Deletionskonstrukte zur Identifizierung und Charakterisierung funktioneller Domänen und potentieller Lokalisations- bzw. Kernimportsignale eingesetzt. Die Fusionsproteine wurden transient in 293T Zellen exprimiert und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (konfokales Mikroskop oder Zeiss AxioVert200 Mikroskop) analysiert. Für die Herstellung der pC3_NY-BR-1_GFP, pC3_GST_GFP und pC3_SV40NLS_GFP Expressionskonstrukte wurden, sofern nicht anders angegeben, PCR-Produkte generiert, die über die BamHI/NheI Schnittstellen in den jeweiligen Vektor inseriert wurden. Die Klonierungen der Fragmente in den pC3(+/-) bzw. pC3(-)_FLAG Vektor erfolgten über BamHI/KpnI oder BamHI/NotI Schnittstellen. Das Konstrukt pC3(-)_FLAG_NY1-1120 wurde durch Restriktion des pC3(-)_FLAG_NY-BR-1 Plasmids mit den Enzymen XbaI/KpnI und anschließender Religation des Vektors kloniert.

3.7.1 Potentielle Kernlokalisierungssignale (NLS)

Da die bioinformatische Analyse der Proteinsequenz die Existenz eines Kernlokalisierungssignals und ein bZIP Motivs für NY-BR-1 vorhergesagte, wurde NY-BR-1 als putativer Transkriptionsfaktor beschrieben (JÄGER *et al.*, 2001).

Die folgenden Studien orientieren sich an dem publizierten NY-BR-1 ORF, der für aa 56-1397 (aa 1-1341) kodiert. Um potentielle Kernlokalisierungssignale experimentell zu identifizieren, wurde zuerst die Lokalisation N-terminaler NY-BR-1_GFP Fusionsproteine in transient transfizierten 293T Zellen analysiert. Das Fusionsprotein NY56-369_GFP ist vorwiegend im Kern lokalisiert, während das NY111-396_GFP Protein, dem der „NLS“ kodierende Bereich fehlt, hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisiert ist (Abbildung 3.24 oben). Das kürzere NY56-173_GFP Fusionsprotein, das den Bereich des vorhergesagten NLS einschließt, lokalisiert ebenfalls vorwiegend im Kern bzw. in Kern und Zytoplasma (Abbildung 3.24 unten).

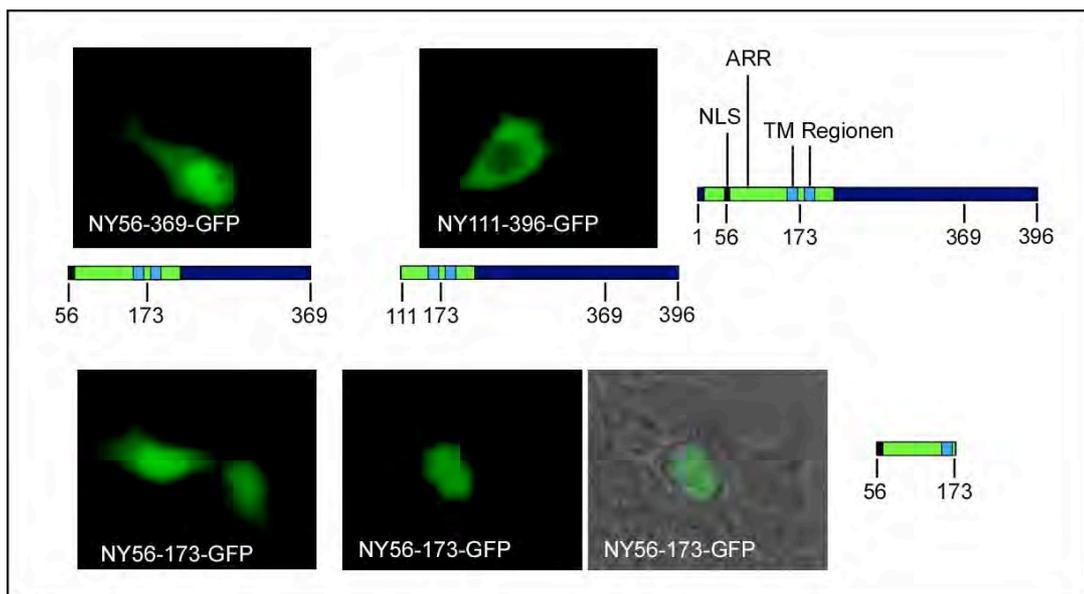


Abbildung 3.24 | Lokalisationsstudien N-terminaler NY-BR-1_GFP Fusionsproteine in 293T Zellen. 293T Zellen wurden mit den angegebenen NY-BR-1_GFP Fusionskonstrukten transient transfiziert und fluorezenzmikroskopisch (Zeiss AxioVert200) analysiert. Die Zahlen geben die Aminosäurepositionen des NY-BR-1 Proteins an. Rechts ist schematisch die Domänenorganisation des NY-BR-1 Teilproteins abgebildet.

Da bei Makromolekülen bis zu einem Molekulargewicht von 60kDa passive Diffusion durch die Kernhülle in den Kern einem Konzentrationsgradienten folgend nicht ausgeschlossen werden kann, wurden für die weitere Analyse kurzer Sequenzbereiche GST_GFP Fusionsproteine kloniert. GST_GFP alleine kann nicht in den Kern transportiert werden und diffundiert auch passiv nicht durch die Kernhülle (ROSORIUS *et al.*, 1999). Das nukleär lokalisierte NY56-173_GFP Protein befindet sich im „steady state“ auch als GST_GFP Fusionsprotein zum Teil im Kern (Abbildung 3.25 links). Tatsächlich befindet

sich das für aa 73-90 (aa 17-34) beschriebene zweiteilige („bipartite“) NLS in diesem Bereich (JÄGER *et al.*, 2001). Es besitzt jedoch fast keine der für NLS charakteristischen basischen Aminosäuren Arginin und Lysin. Gemäß einer visuellen Abschätzung entsprachen die Sequenzabschnitte aa 56-62 (aa 1-6) und aa 57-74 (aa 2-18) eher potentiellen Kernlokalisierungssignalen. Werden Fusionsproteine transient exprimiert, denen diese Aminosäuren (56-62 bzw. 56-74) fehlen, so beobachtet man hauptsächlich eine zytoplasmatische Lokalisation der Fusionsproteine (Abbildung 3.25). Diese Ergebnisse legen nahe, dass es sich bei dem Sequenzabschnitt von aa 56-74 um ein Kernimportsignal handeln könnte. Weiterhin zeigte die vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation des GST_NY74-173_GFP Proteins, dass das von Jäger *et al.* (JÄGER *et al.*, 2001) vorhergesagte NLS (aa 73-90) nicht funktionell ist.

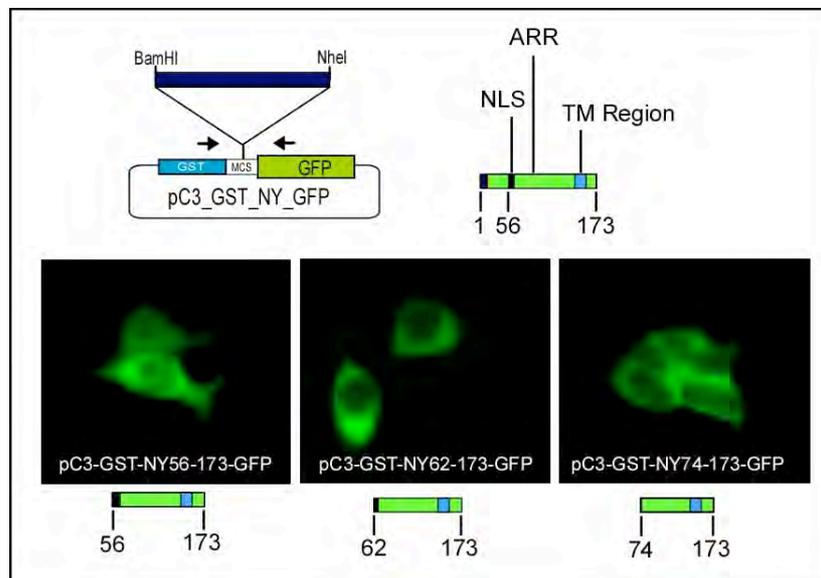


Abbildung 3.25 | Schematische Übersicht der klonierten N-terminalen NY-BR-1_GFP Fusionsproteine und Lokalisationsstudien transient transfizierter 293T Zellen. 293T Zellen wurden mit den angegebenen GST_NY-BR-1_GFP Fusionskonstrukten transient transfiziert und fluoreszenzmikroskopisch (Zeiss AxioVert) analysiert. Die Zahlen geben die Aminosäurepositionen des NY-BR-1 Proteins an. Oben ist schematisch die Domänenorganisation des NY-BR-1 Teilproteins abgebildet.

Um zu klären, ob diese Sequenzen tatsächlich in der Lage sind, als funktionelles NLS den Kernimport von Proteinen zu vermitteln, wurden sie ebenfalls als GST_NLS_GFP-Fusion analysiert. Als Positivkontrolle diente das zweigeteilte Nukleoplasmin NLS (ROBBINS *et al.*, 1991). Die Fragmente (aa 56-62, aa 57-74, Nukleoplasmin NLS) wurden über Oligo-Annealing in den pC3_GST_GFP Vektor kloniert. Abbildung 3.26 (links) zeigt die Lokalisation dieser transient exprimierten Fusionsproteine. Wie erwartet ist das GST_Nukleoplasmin NLS_GFP Protein im Nukleus lokalisiert. Das GST_NY56-62_Protein zeigt vorwiegend eine Akkumulation im Kern. Das GST_NY57-74_GFP

Protein hingegen zeigt eine schwache Kernlokalisierung und ist hauptsächlich zytoplasmatisch zu sehen.

Um gezielt Kernimport- bzw. Export-Signale zu untersuchen, ist eine standardisierte Methode die Mikroinjektion rekombinanter GST-NLS-GFP Fusionsproteine in Säugerzellen, z.B. Vero Zellen. Im Falle der NLS-/Kernimportuntersuchungen wird hierbei das rekombinante GFP-Fusionsprotein in das Zytoplasma der Zellen injiziert und dessen Lokalisation nach bestimmten Zeitintervallen mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops dokumentiert.

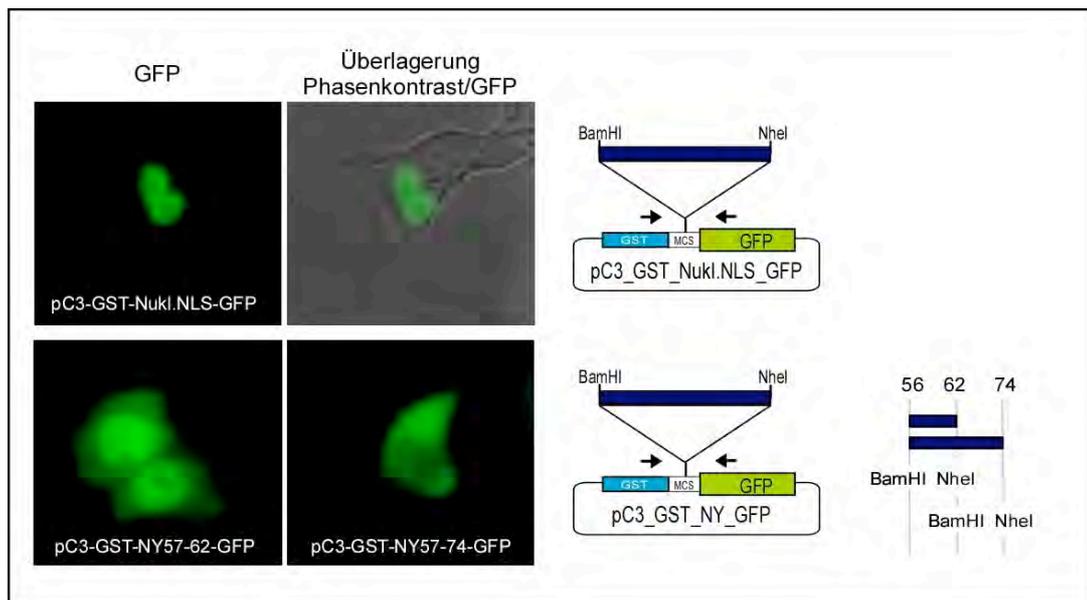


Abbildung 3.26 | Lokalisationsstudien der vorhergesagten GST_NY(NLS)_GFP Fusionsproteine in 293T Zellen. 293T Zellen wurden mit den angegebenen Fusionskonstrukten transient transfiziert und fluoreszenzmikroskopisch (Zeiss AxioVert200) analysiert. Die Zahlen geben die Aminosäurepositionen des NY-BR-1 Proteins an. Rechts sind schematisch die GST_GFP Fusionskonstrukte für das Nukleoplasmin NLS (Positivkontrolle) und für die NY-BR-1 Sequenzen aa 56-62 bzw. aa 57-74 dargestellt.

Für Mikroinjektionsexperimente wurden die in Abbildung 3.27 B dargestellten GST-GFP Fusionskonstrukte kloniert, in *E.coli* exprimiert und wie in Kapitel 2.2.23 beschrieben über Affinitätschromatographie gereinigt. Die GST-GFP Fusionsproteine wurden in Vero Zellen mikroinjiziert (Kapitel 2.2.40) und deren Lokalisation zu verschiedenen Zeitpunkten mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Als Positivkontrolle diente das zweiteilige NLS des Nukleoplasmin (ROBBINS *et al.*, 1991), das wie erwartet schon nach wenigen Minuten den Import des GST_Nukleoplasmin NLS_GFP Proteins in den Kern vermittelte. Die Mikroinjektion der rekombinanten GST_NY-BR-1_GFP Proteine in das Zytoplasma von Vero Zellen bestätigt die Beobachtungen der Transfektionsstudien, dass es sich bei den NY-BR-1 Sequenzen um sehr schwache bzw. „langsame“ Kernlokalisierungssignale handelt. Für beide NY-BR-1 Fusionsproteine war erst nach mehreren Stunden eine

Akkumulation des Proteins im Zellkern zu beobachten. Das zweigeteilte NLS, das in dieser Arbeit für aa 40 der kodierenden Sequenz beschrieben wird (Abbildung 3.4), wurde nicht weiter charakterisiert.

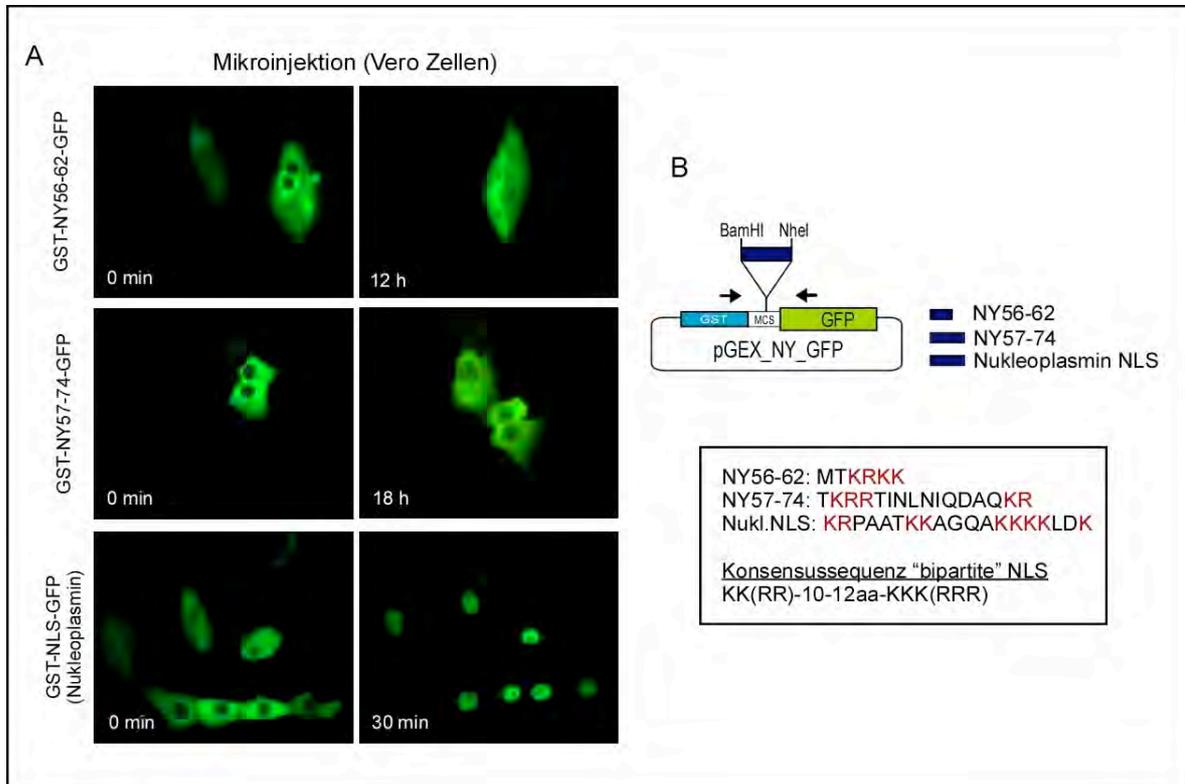


Abbildung 3.27 | Mikroinjektion von GST_NY-BR-1_GFP Fusionsproteinen in Vero Zellen. **A** | Mikroinjektion der rekombinanten GST_GFP Fusionsproteine in Vero Zellen (Zeitpunkt 0 Minuten) und die fluoreszenzmikroskopische Analyse (Zeiss AxioVert200) nach den angegebenen Zeitintervallen. Die Zahlen geben die Aminosäureposition des NY-BR-1 Proteins an. **B** | Schematische Darstellung und Aminosäuresequenz der klonierten GST_NY-BR-1_GFP Fusionsproteine. Rot hervorgehoben sind die für NLS charakteristischen basischen Aminosäuren Arginin (R) und Lysin (K). Als Positivkontrolle für ein "bipartite" NLS diente das GST_Nukleoplasmin NLS_GFP Fusionsprotein.

3.7.2 Expression des Vollängen-NY-BR-1 Konstruktes

Bei der Untersuchung einzelner Domänen ist es wichtig, deren Rolle und Funktionalität im Kontext des Vollängenproteins zu betrachten. Hierzu wurden NY-BR-1 bzw. FLAG_NY-BR-1 in 293T Zellen transient exprimiert und die zelluläre Lokalisation der Proteine durch indirekte Immunfluoreszenz untersucht. Die Färbung wurden mit dem monoklonalen anti-NY-BR-1 Antikörper oder mit dem anti-FLAG Antikörper durchgeführt. In stark überexprimierenden Zellen ist NY-BR-1 ein zytoplasmatisch lokalisiertes Protein, während in schwach exprimierenden Zellen war eine Lokalisation hauptsächlich an der Plasmamembran zu beobachten (Abbildung 3.28).

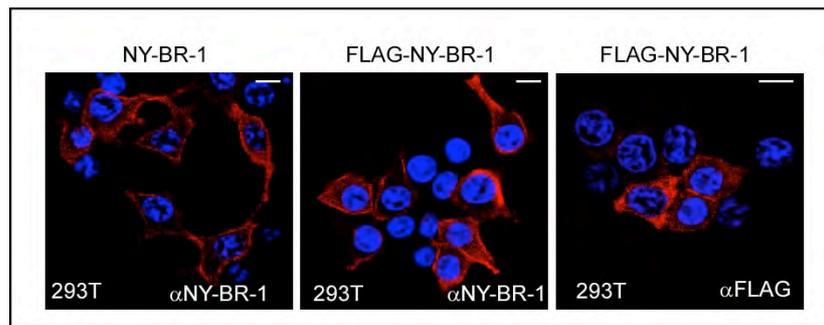


Abbildung 3.28 | Transient exprimiertes NY-BR-1 ist mit der Plasmamembran assoziiert. Indirekte Immunfluoreszenz fixierter NY-BR-1 und FLAG_NY-BR-1 exprimierender 293T Zellen. Zur Detektion des NY-BR-1 Proteins wurde der monoklonale anti-NY-BR-1 Antikörper 1:50 verdünnt eingesetzt. Das FLAG-NY-BR-1 Fusionsprotein wurde wie angegeben mit dem anti-NY-BR-1 Antikörper bzw. mit dem monoklonalen anti-FLAG Antikörper (1:500 verdünnt) und dem sekundären Cy3-konjugierten anti-Maus Antikörper (1:2000) detektiert. Die Zellkerne wurden mit TOP-RO (1:2000) visualisiert. Die Zellen wurden mit einem konfokalen Mikroskop analysiert. „Längenmaß“ 10µm.

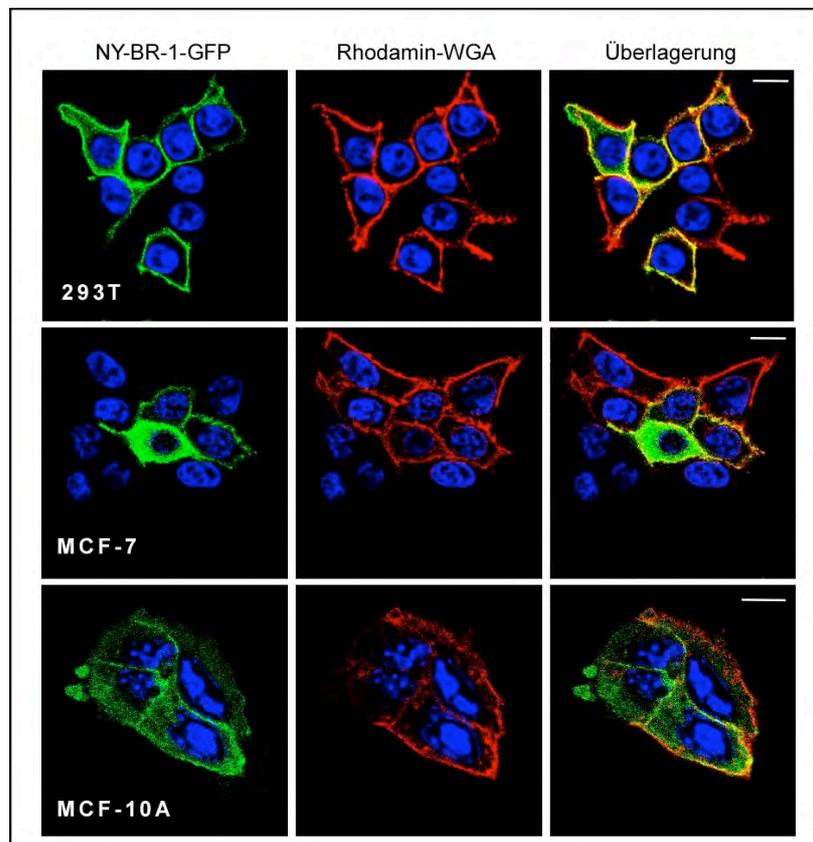


Abbildung 3.29 | Transient exprimiertes NY-BR-1 ist mit der Plasmamembran assoziiert. Membranlokalisierung des NY-BR-1_GFP Fusionsproteins in transient transfizierten 293T, MCF-7 und MCF-10A Zellen. Zur Visualisierung der Plasmamembran wurde Rhodamin-konjugiertes WGA (1:200) eingesetzt. Die Nuklei wurden mit TOP-RO (1:2000) gefärbt. Die Analyse der Zellen erfolgte mit einem konfokalen Mikroskop. „Längenmaß“ 10µm.

Die Expressionsstudien des NY-BR-1_GFP Fusionsproteins in 293T Zellen zeigen ebenfalls membranständig lokalisiertes NY-BR-1 Protein (Abbildung 3.29, oben). Um die Membranen zu visualisieren, wurden sie mit WGA angefärbt. Die DNA der Zellkerne ist

mit TO-PRO visualisiert worden. Die transiente Expression des NY-BR-1_GFP Proteins in den beiden Brustzelllinien MCF-7 und MCF-10A konnte diese Beobachten bestätigen (Abbildung 3.29, Mitte und unten). Unabhängig von ihren Fusionen sind die Proteine dieser Expressionskonstrukte identisch lokalisiert, so dass hier GFP- oder FLAG-bedingte Lokalisationsartefakte ausgeschlossen werden können. Anhand dessen lässt sich außerdem erkennen, dass das Expressionskonstrukt vollständig und ohne offensichtliche Prozessierung translatiert wird.

Die Kolokalisation des NY-BR-1_GFP Proteins mit Rhodamin-WGA bestätigte auch in der Prostatazelllinie PC3 sowie in der Cervix Karzinomzelllinie HeLa dessen Membranassoziation (Abbildung 3.30).

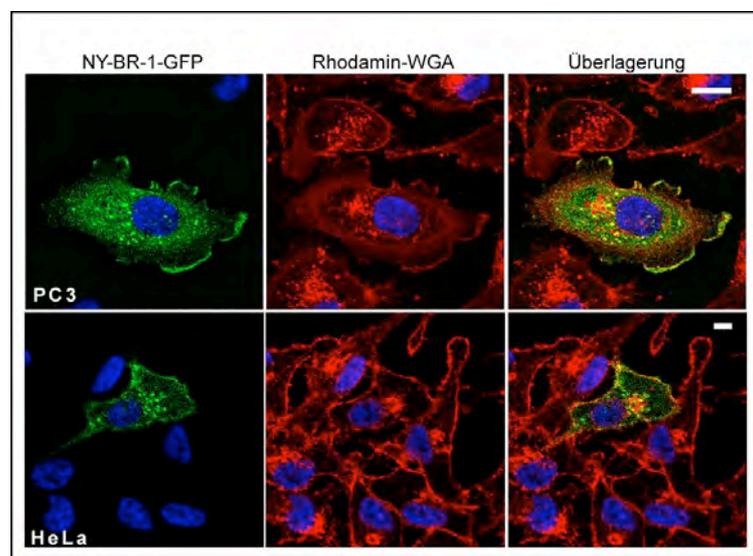


Abbildung 3.30 | Transient exprimiertes NY-BR-1 ist in Prostatazellen und Cervixzellen mit der Plasmamembran assoziiert. Membranlokalisierung des NY-BR-1_GFP Fusionsproteins in transient transfizierten PC3 und HeLa Zellen. Zur Visualisierung der Plasmamembran wurde Rhodamin-konjugiertes WGA (1:200) eingesetzt. Die Nuklei wurden mit TOP-RO (1:2000) gefärbt. Die Analyse der Zellen erfolgte mit einem konfokalen Mikroskop.

NY-BR-1 ist ein vorwiegend membranassoziiertes Protein, bzw. ist bei stark exprimierenden Zellen auch im Zytoplasma zu finden. Eine Kernlokalisierung des Volllängenproteins konnte nicht beobachtet werden. Wird N-terminal das SV40NLS an NY-BR-1_GFP fusioniert, dann wird NY-BR-1_GFP in den Kern transportiert (Abbildung 3.31). Ein sehr geringer Prozentsatz des Proteins befindet sich an der Membran. Diese Experimente beweisen zum einen ebenfalls die Translation des Volllängenproteins, zum anderen zeigen sie, dass eine Kernlokalisierung durch die Fusion mit dem SV40NLS prinzipiell möglich ist.

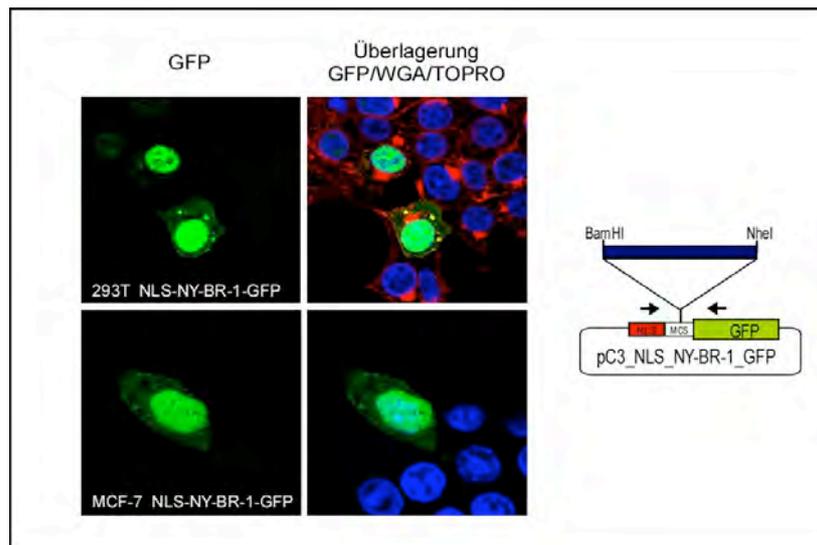


Abbildung 3.31 | SV40NLS-NY-BR-1_GFP ist im Kern lokalisiert. 293T und MCF-7 Zellen wurden transient mit dem pC3_SV40NLS_NY-BR-1_GFP Konstrukt transfiziert und die Lokalisation des GFP-Fusionsproteins fluoreszenzmikroskopisch (konfokales Mikroskop) analysiert. Die Fusion mit dem SV40NLS vermittelt dem NY-BR-1_GFP Protein eine Kernlokalisation. Ein geringer Prozentsatz des Proteins ist an der Plasmamembran bzw. im Zytoplasma lokalisiert. Die Plasmamembran der 293T Zellen ist mit Rhodamin-WGA (1:200) angefärbt. Die Kerne sind mit TOP-RO (1:2000) angefärbt. Rechts ist schematisch das Konstrukt dargestellt.

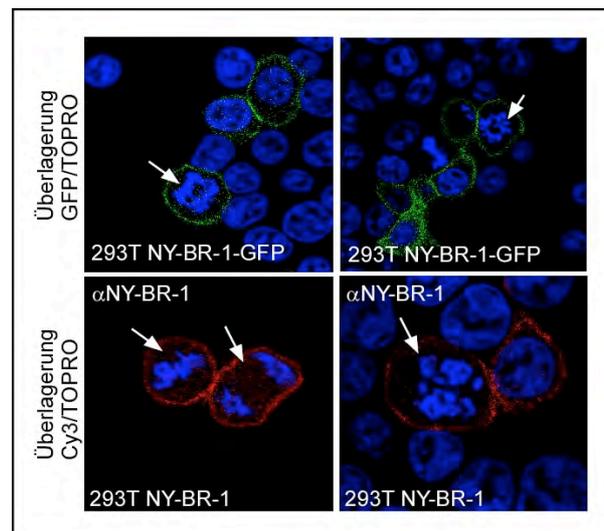


Abbildung 3.32 | Transiente Expression von NY-BR-1 in 293T Zellen während der Mitose. Sowohl NY-BR-1 als auch NY-BR-1_GFP exprimierende 293T Zellen zeigen eine membranständige Lokalisation des Proteins während der Mitose. Der anti-NY-BR-1 Antikörper wurde in der indirekten Immunfluoreszenz 1:50 verdünnt eingesetzt, der sekundäre Cy3-konjugierte anti-Maus Antikörper 1:2000. Die Kerne sind mit TOP-RO (1:2000) angefärbt. Die Analyse der Zellen erfolgte mit einem konfokalen Mikroskop.

Abbildung 3.32 zeigt 293T Zellen, die transient NY-BR-1 bzw. NY-BR-1_GFP exprimieren während der Mitose. Aufgrund der TOP-RO Färbung sind kondensierende Chromosomen und kondensierte Chromosomen, die sich in der Metaphaseplatte anordnen oder schon zu den Spindelpolen auseinandergezogen werden, deutlich zu erkennen. Die Lokalisation

von NY-BR-1 und NY-BR-1_GFP während der Zellteilung bleibt unverändert an der Membran. Es wurden zwar für den C-Terminus von NY-BR-1 homologe Bereiche zu einer Chromosomen segregierender ATPase-Domäne (ähnlich dem SMC2 Protein, STRUNNIKOV *et al.*, 1995) mit Bioinformatik Programmen vorhergesagt (siehe Abbildung 3.4), eine Assoziation mit dem Spindelapparat oder den Chromosomen war hier jedoch nicht zu beobachten.

3.8 NY-BR-1 ist ein Membranprotein

Lokalisationsstudien mit transient exprimiertem NY-BR-1_GFP Fusionsprotein (s.o.) legen nahe, dass NY-BR-1 ein Membranprotein ist. Um herauszufinden, ob es sich um ein an die Membran intrazellulär/extrazellulär assoziiertes bzw. verankertes Protein oder ein Transmembranprotein handelt, wurde diese Fragestellung mit diversen methodischen Ansätzen untersucht.

3.8.1 Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen

Mit Hilfe der Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen lässt sich biochemisch untersuchen, ob ein Protein an der Zelloberfläche exprimiert ist. Diese Methode basiert darauf, dass Membranproteine an ihren primären Aminen (z.B. bei Lysin) kovalent mit membranimpermeablem EZ-Link-Sulfo-NHS-SS-Biotin (Perbio) verbunden werden und dann aus Gesamtzellextrakten durch Binden des Biotins an Neutravidin-Agarose isoliert werden können. Mit Hilfe von DTT (Dithiothreitol, einer Substanz zur Reduktion von Disulfidbrücken) werden die gebundenen Proteine von dem Biotin abgespalten und auf diese Weise von der Agarose eluiert.

Um zu untersuchen ob sich NY-BR-1 an der Zelloberfläche befindet, wurden pC3_NY-BR-1_GFP, pC3_FasL_FLAG bzw. pC3_Survivin_GFP Konstrukte in konfluenten 293T Zellen exprimiert. Als zytoplasmatische Negativkontrolle diente Survivin-GFP und als Positivkontrolle der Fas Ligand (FasL), der sich sowohl in zytoplasmatischen Vesikeln als auch bei Überexpression an der Zelloberfläche befindet (ANDREOLA *et al.*, 2002). Um die spezifische Biotinylierung der Oberflächenproteine zu kontrollieren, wurden parallel alle Proben ohne Biotin angesetzt (Abbildung 3.33, Spuren 5-7). Die Negativkontrolle, Survivin_GFP war jeweils nur im „Input“ detektierbar, nicht jedoch in den eluierten Fraktionen. Die Positivkontrolle, FasL_FLAG hingegen konnte sowohl im „Input“ als auch in dem Eluat der Biotinylierungsreaktion detektiert werden. NY-BR-1_GFP war im „Input“ sowie in der eluierten Fraktion detektierbar, nicht aber in der unbiotinylierten Kontrolle. Diese Ergebnisse belegen, dass sich NY-BR-1 bzw. ein Teil des Proteins an der Zelloberfläche befindet.

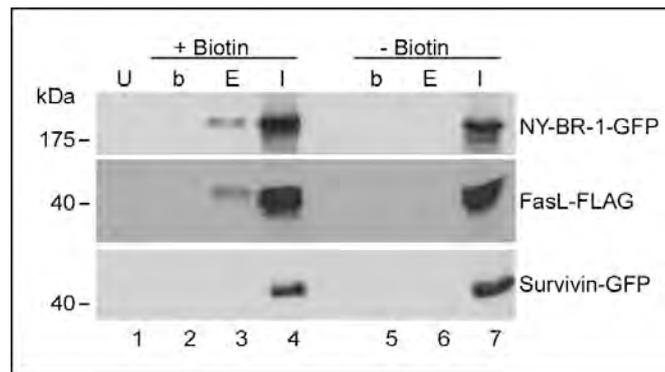


Abbildung 3.33 | NY-BR-1 ist ein Zelloberflächenprotein. Transient exprimiertes NY-BR-1_GFP konnte auf der Zelloberfläche von 293T Zellen mit membranimpermeablem Biotin markiert, nach der Zellyse mit Neutravidin-Agarose präzipitiert und im "Western Blot" detektiert werden (links). Als Positivkontrolle dienten 293T Zellen, die transient den FasL_FLAG exprimieren. Das Zytoplasmamprotein Survivin_GFP wurde als Negativkontrolle eingesetzt. Um unspezifische Bindungen an Neutravidin-Agarose auszuschließen, wurden transfizierte Zellen entsprechend ohne Biotinylierungsschritt analog behandelt und analysiert (rechts). U: untransfizierte Zellen; I: "Input", 10% des für die IP eingesetzten Ausgangslysats; E: eluiertes Protein; b: Neutravidin-Agarose "beads" nach der Elution. Die Detektion erfolgte mit dem anti-NY-BR-1 Antikörper (1:250), dem anti-FLAG Antikörper (1:1000) bzw. mit dem anti-GFP Antikörper (1:500). Als Sekundäntikörper dienten HRP-konjugierte anti-Maus bzw. anti-Kaninchen Antikörper (1:2000). Links ist der Molekulargewichtsmarker eingezeichnet und rechts die jeweils mit spezifischen Antikörpern detektierten Proteine NY-BR-1, FasL_FLAG und Survivin_GFP.

3.8.2 NY-BR-1 wird an der Zelloberfläche exprimiert (FACS Analyse)

Um zu untersuchen ob NY-BR-1 auf der Zelloberfläche lebender Zellen detektiert werden kann, wurden FACS Analysen durchgeführt. Das pC3-NY-BR-1 Konstrukt wurde hierfür transient in 293T Zellen exprimiert und anschließend mit dem monoklonalen anti-NY-BR-1 Antikörper detektiert. Da die Zellen nicht permeabilisiert wurden, wurde nur der membranständige Rezeptor angefärbt. Im Histogramm ist zu sehen, dass pC3-transfizierte 293T Zellen negativ für NY-BR-1 sind, NY-BR-1 bei pC3_NY-BR-1 transfizierten 293T Zellen hingegen auf der Oberfläche detektiert werden konnte (Abbildung 3.34). Dies erkennt man an der auftretenden Fluoreszenz der Zellen, die von einer spezifischen Bindung des anti-NY-BR-1 Antikörpers und des PE-markierten anti-Maus Antikörpers stammt. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das Epitop des Antikörpers (aa 851-928), demnach also ein Teil des C-Terminus, extrazellulär ist.

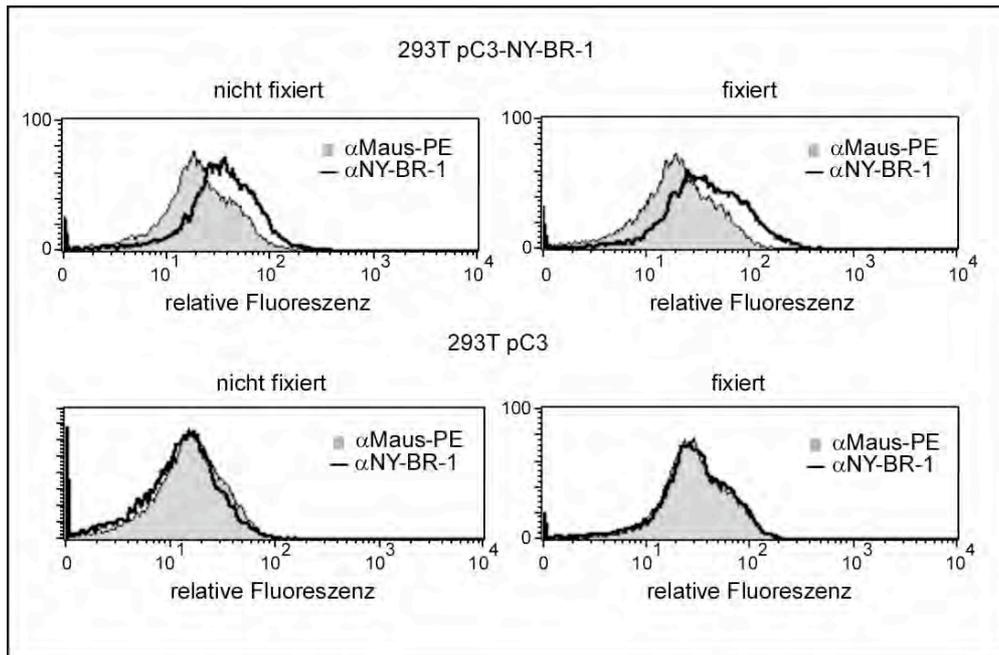


Abbildung 3.34 | Der C-Terminus des NY-BR-1-Proteins ist auf der Zelloberfläche für den monoklonalen anti-NY-BR-1 Antikörper zugänglich. NY-BR-1 exprimierende 293T Zellen wurden sowohl fixiert als auch nicht fixiert mit anti-NY-BR-1 Antikörper (1:50) und mit PE-konjugiertem anti-Maus Antikörper (1:200) gefärbt und im FACS analysiert. Als Kontrolle dienten 293T Zellen, die mit dem leeren Vektor (pC3) transfiziert wurden.

3.8.3 NY-BR-1 ist ein Transmembranprotein

Die oben aufgeführten Experimente zeigen, dass der C-Terminus von NY-BR-1 extrazellulär ist. Als nächstes stellte sich die Frage, ob es sich bei NY-BR-1 um ein Typ II Transmembranprotein handelt, dessen N-Terminus intrazellulär ist. Um die Topologie des Tumorantigens NY-BR-1 eingehender zu untersuchen, wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz und FACS Analysen die Lokalisation des N-Terminus studiert. Für die Immunfluoreszenz wurden die zu untersuchenden Zellen entweder vor oder nach der Antikörper-Färbung fixiert, um entsprechend eine Gesamtzellfärbung oder nur eine Zelloberflächenfärbung zu bekommen (Kapitel 2.2.39). Die Lebendfärbung erfolgte in Gegenwart von NaN_3 , um die Internalisierung der Antikörper-(Antigen-)Komplexe und das so genannte „Capping“ zu verhindern. Die Zellkerne wurden mit TOP-RO visualisiert. Um die Bedingungen zu optimieren, wurden NIH 3.7 Zellen, die stabil den humanen Rezeptor ErbB2 exprimieren, benutzt. Das Membranprotein ErbB2 wird sowohl bei der Lebendfärbung als auch bei der Färbung fixierter Zellen von dem Antikörper FSP77, der gegen die extrazelluläre Domäne des Rezeptors gerichtet ist, erkannt (Abbildung 3.35, oben). Der Antikörper sc-284 hingegen detektiert ErbB2 nur in fixierten, nicht aber in unfixierten Zellen (Abbildung 3.35 unten). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Methode und die Bedingungen geeignet sind, um Membranproteine auf der Zelloberfläche zu detektieren.

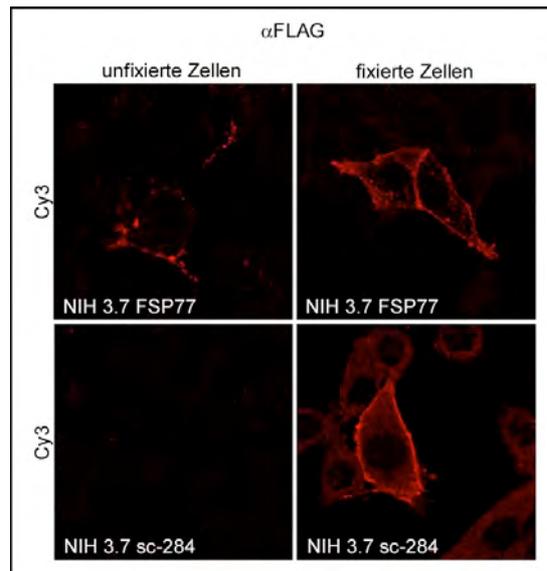


Abbildung 3.35 | Indirekte Immunfluoreszenz des ErbB2 Proteins in NIH3.7 Zellen. Indirekte Immunfluoreszenz von lebenden, unfixierten NIH3.7 Zellen, die einen konstitutiv aktiven ErbB2 Rezeptor stabil exprimieren. Der anti-ErbB2 Antikörper wurde 1:50 verdünnt eingesetzt, die Sekundärantikörper (anti-Maus-Cy3/anti-Kaninchen-Cy3) wurden 1:2000 verdünnt. Sc-284: anti-ErbB2 Antikörper gegen ein Epitop der intrazellulären Domäne; FSP77: anti-ErbB2 Antikörper gegen ein Epitop der extrazellulären Domäne. Die Analyse der Zellen erfolgte mit einem konfokalen Mikroskop.

Da für den N-Terminus von NY-BR-1 kein Antikörper zur Verfügung stand, wurde das FLAG-NY-BR-1-Konstrukt verwendet. Als Kontrollen für intra- und extrazelluläres FLAG-Epitop dienten pC3_FasL-FLAG bzw. das pCi_NK1R-FLAG-Konstrukt. Für die Immunfluoreszenz wurden 293T Zellen, die transient FLAG_NY-BR-1 exprimieren, mit dem monoklonalen Antikörper anti-FLAG M2 (1:500) inkubiert. Fixierte Zellen zeigen ein positives Signal sowohl für die Färbung mit dem anti-FLAG Antikörper als auch mit dem anti-NY-BR-1 Antikörper (siehe Abbildung 3.28). Auch in lebend gefärbten Zellen lässt sich das NY-BR-1 Protein mit beiden Antikörpern detektieren (Abbildung 3.36, A). Die FACS Analyse liefert dasselbe Ergebnis (Abbildung 3.36, B/C): FLAG-NY-BR-1 ist im Vergleich zur Kontrolle mit beiden Antikörpern spezifisch in lebenden und fixierten Zellen detektierbar.

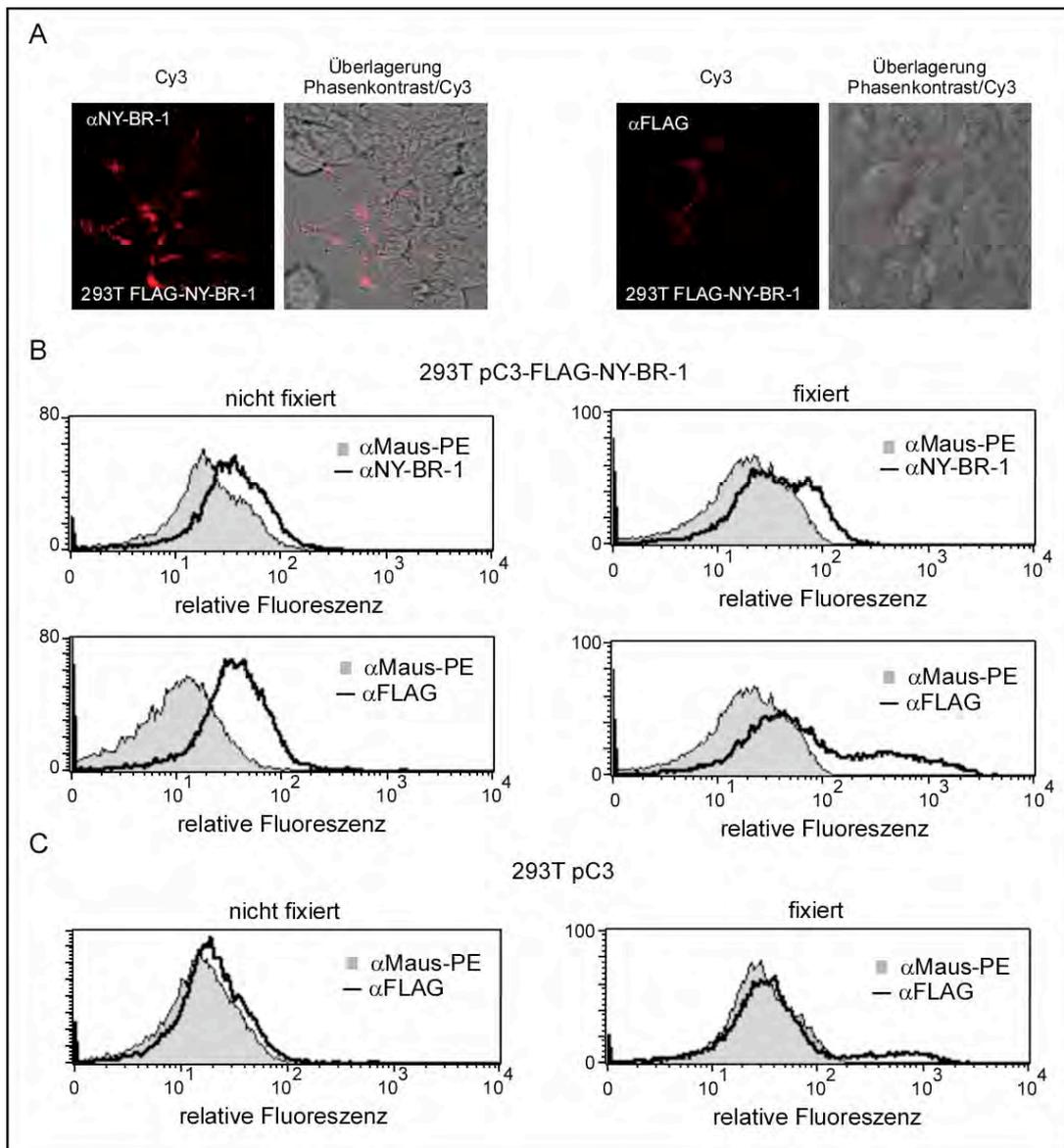


Abbildung 3.36 | Der N-Terminus des FLAG-NY-BR-1 Proteins ist extrazellulär. A | Indirekte Immunfluoreszenz von lebenden, unfixierten FLAG_NY-BR-1 exprimierenden 293T Zellen. Der anti-NY-BR-1 Antikörper wurde 1:25 verdünnt eingesetzt, der anti-FLAG Antikörper 1:500 und der Cy3-konjugierte anti-Maus-Sekundäntikörper 1:2000. Die Analyse der Zellen erfolgte mit einem konfokalen Mikroskop. **B/C** | FACS Analysen lebender und fixierter transfizierter 293T Zellen. **B** | FLAG_NY-BR-1 exprimierende 293T Zellen wurden sowohl fixiert als auch nicht fixiert mit anti-NY-BR-1 (1:50) und anti-FLAG (1:1000) Antikörpern inkubiert, mit PE-konjugiertem anti-Maus Antikörper (1:200) gefärbt und im FACS analysiert. **C** | Als Kontrolle dienten 293T Zellen, die mit dem leeren Vektor (pC3) transfiziert wurden.

Das FLAG-Epitop der Positivkontrolle für extrazelluläres FLAG, der FLAG-Neurokinin 1 Rezeptor, konnte sowohl durch Inkubation lebender als auch fixierter Zellen mit dem FLAG Antikörper nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der FACS Analyse und der Immunfluoreszenz zeigten, dass das FLAG-Epitop auf der Zelloberfläche detektierbar ist (Abbildung 3.37).

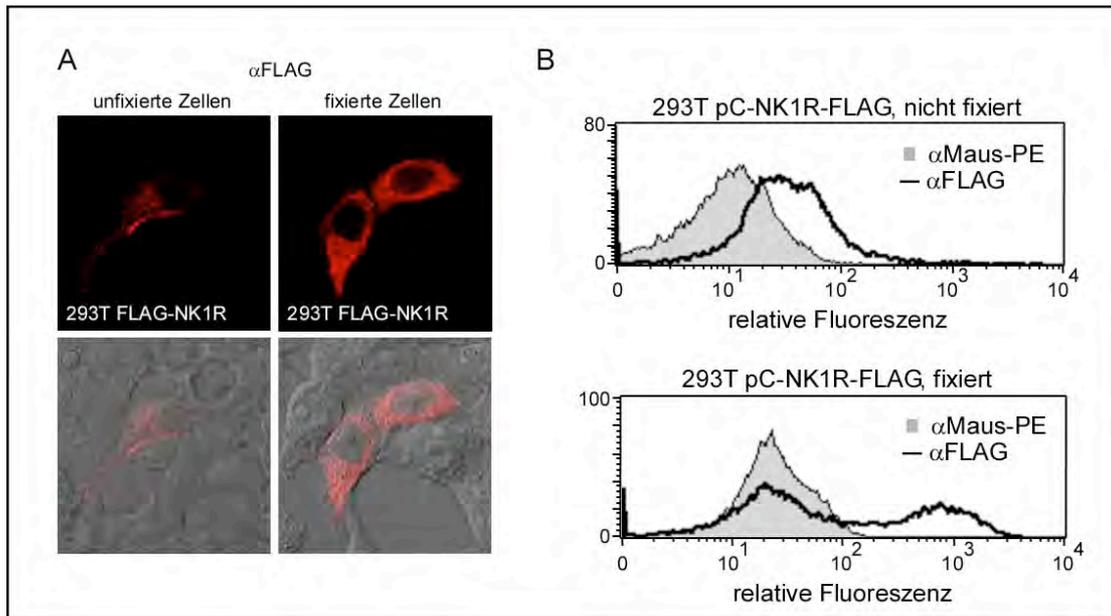


Abbildung 3.37 | Das FLAG-Epitop des FLAG-NK1 Rezeptors ist auf der Oberfläche von 293T Zellen detektierbar. A | Indirekte Immunfluoreszenz von lebenden, unfixierten FLAG_NK1R exprimierenden 293T Zellen. Der anti-FLAG Antikörper wurde 1:500 verdünnt, der Cy3-konjugierte anti-Maus-Sekundärantikörper wurde 1:2000 verdünnt eingesetzt. Die Analyse der Zellen erfolgte mit einem konfokalen Mikroskop. **B |** FACS Analysen lebender und fixierter transfizierter 293T Zellen. FLAG-NK1R exprimierende 293T Zellen wurden sowohl fixiert als auch nicht fixiert mit anti-FLAG Antikörper (1:1000) inkubiert, mit PE-konjugiertem anti-Maus Antikörper (1:200) gefärbt und im FACS analysiert.

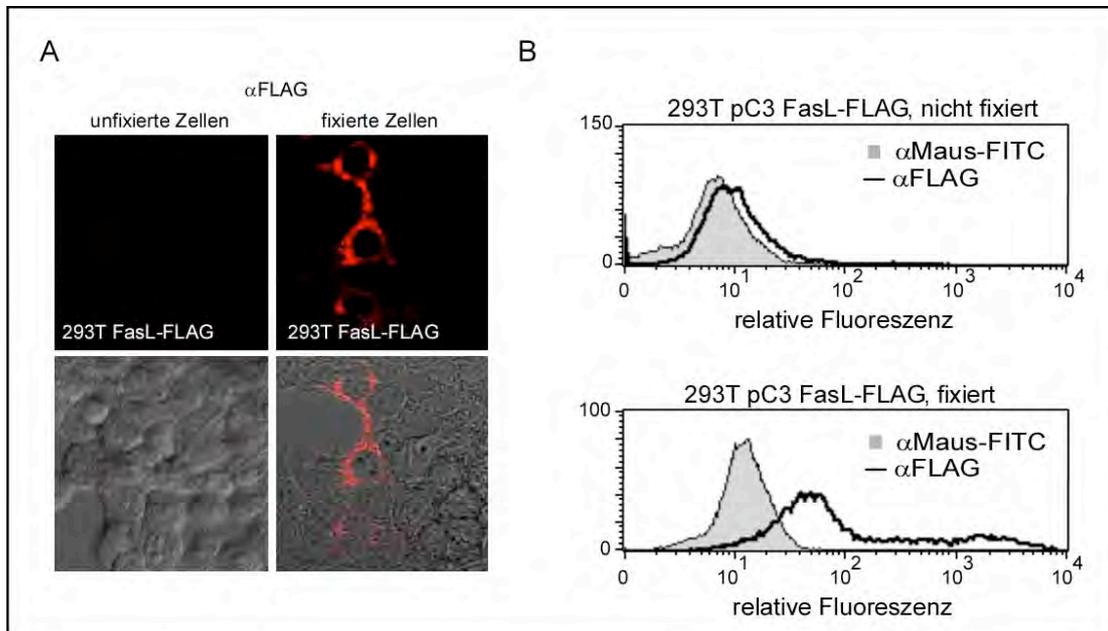


Abbildung 3.38 | Das FLAG-Epitop des FasL-FLAG Proteins ist nur intrazellulär in 293T Zellen detektierbar. Indirekte Immunfluoreszenz von lebenden, unfixierten FasL-FLAG exprimierenden 293T Zellen. Der anti-FLAG Antikörper wurde 1:500 und der Cy3-konjugierte anti-Maus-Sekundärantikörper 1:2000 verdünnt. Die Analyse der Zellen erfolgte mit einem konfokalen Mikroskop. **B |** FACS Analysen lebender und fixierter transfizierter 293T Zellen. FasL-FLAG exprimierende 293T Zellen wurden sowohl fixiert als auch nicht fixiert mit anti-FLAG Antikörper (1:1000) inkubiert, mit PE-konjugiertem anti-Maus Antikörper (1:200) gefärbt und im FACS analysiert.

Die Detektion des FasL-FLAG-Proteins, der Kontrolle für intrazelluläres FLAG, mit dem FLAG Antikörper war wie erwartet nicht auf der Zelloberfläche lebender Zellen, sondern nur in fixierten Zellen möglich, da bei diesem Typ II Protein das N-terminale FLAG-Epitop intrazellulär lokalisiert ist (Abbildung 3.38). Grundsätzlich ist der Einsatz des FLAG M2 Antikörpers im FACS (anti-FLAG 1:1000) wegen des starken Hintergrundes nicht optimal, aber unter Verwendung der entsprechenden Kontrollen durchaus möglich.

Wie in Kapitel 3.2 bereits beschrieben, wurde eine Analyse der abgeleiteten Proteinsequenz mit dem Algorithmus zur Berechnung der Hydrophobizität einer Aminosäuresequenz nach Kyte und Doolittle (1982) und dem ConPred II-Programm (ARA *et al.*, 2004) durchgeführt, um Einblicke in die molekulare Struktur/Topologie von NY-BR-1 zu erhalten. Mit Hilfe dieser Programme konnten anhand der für Aminosäuren berechneten Hydrophobizität mögliche membrandurchspannende Bereiche identifiziert werden. Abbildung 3.4 und Abbildung 3.39 A/B zeigen, dass dem Protein zwei potentielle transmembrane Bereiche nahe dem N-Terminus zugewiesen werden.

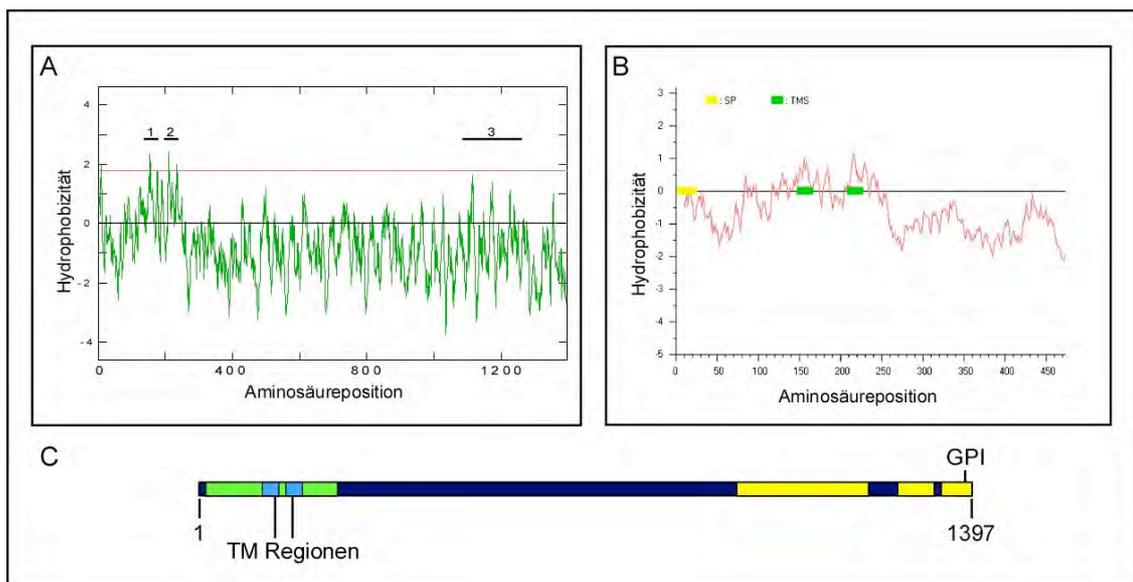


Abbildung 3.39 | Für das NY-BR-1 Protein werden zwei N-terminale Transmembrandomänen und eine C-terminale hydrophobe Region berechnet. A | Hydrophobizitätsanalyse der Aminosäuresequenz von NY-BR-1 nach Kyte und Doolittle. Auf der x-Achse sind die Positionen der Aminosäuren aufgeführt, die y-Achse zeigt deren Hydrophobizität (positive Werte = hydrophob, negative Werte = hydrophil). Die potentiellen transmembranen Bereiche sind durch römische Zahlen gekennzeichnet. **B** | ConPred II Hydrophobizitätsanalyse der Aminosäuresequenz von NY-BR-1. Auf der x-Achse sind die Positionen der Aminosäuren aufgeführt, die y-Achse zeigt deren Hydrophobizität (positive Werte = hydrophob, negative Werte = hydrophil). Die potentiellen transmembranen Bereiche sind grün gekennzeichnet. Die vorhergesagte Signalsequenz ist gelb markiert. **C** | Schematische Darstellung des NY-BR-1 Proteins. Die Transmembrandomänen (aa 147-167/aa 208-228) sowie eine potentielle GPI Verankerungsstelle (aa 1382) sind gekennzeichnet. Der grüne Bereich markiert die "Ankyrin Repeat Region", die gelben Abschnitte repräsentieren die "Coiled coils".

Nach Kyte und Doolittle (1982) werden für die Transmembrandomänen I und II des NY-BR-1-Proteins Hydrophobizitätswerte von bis zu 2,5 errechnet, die damit deutlich über dem „Threshold“ liegen. Der N-Terminus selbst ist nach den Berechnungen des ConPred II Programms genauso wie der C-Terminus extrazellulär, was mit den experimentellen Daten übereinstimmt. Des Weiteren wird für die N-terminalen 25 Aminosäuren ein Membran-Signalpeptid vorhergesagt.

Eine erste funktionelle Untersuchung zur Existenz dieses Signalpeptids erfolgte mit N-terminalen FLAG-NY-BR-1 Fusionskonstrukten, deren Lokalisation nach transients Expression in 293T Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz visualisiert wurde. Hierfür wurden die in Abbildung 3.40 dargestellten Konstrukte kloniert und verwendet.

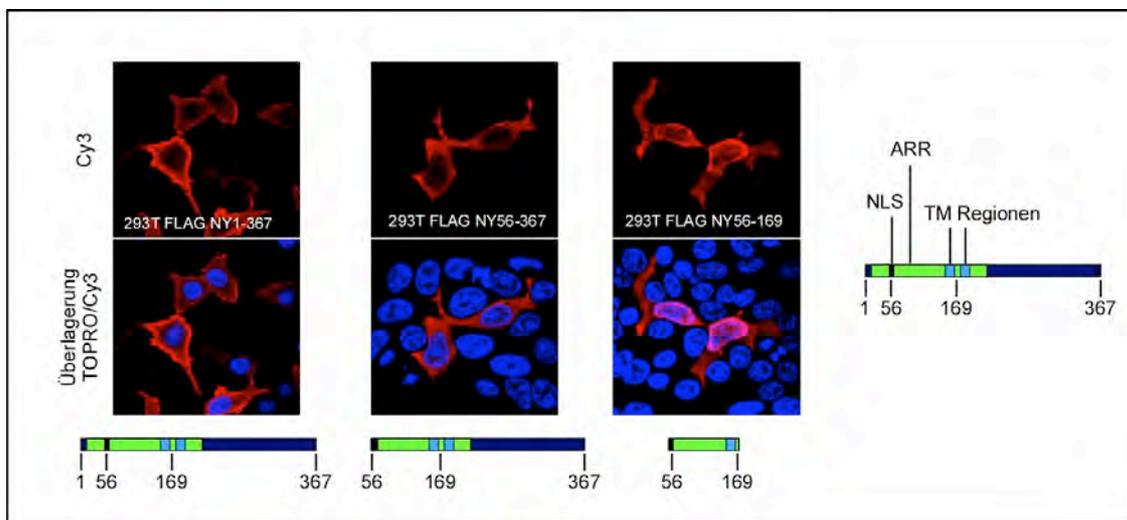


Abbildung 3.40 | Der N-Terminus von NY-BR-1 kodiert möglicherweise eine Membransignalsequenz. Indirekte Immunfluoreszenz von fixierten 293T Zellen, die die angegebenen FLAG-NY-BR-1 Fusionsproteine exprimieren. Der anti-FLAG Antikörper wurde 1:500, der anti-Maus-Cy3 Antikörper wurde 1:2000 verdünnt eingesetzt. Die Zellkerne wurden mit TOP-RO (1:2000) angefärbt. Die Analyse der Zellen erfolgte mit einem konfokalen Mikroskop. Links ist schematisch die vorhergesagte Domänenorganisation für diesen Proteinabschnitt dargestellt.

Der NY-BR-1 N-Terminus (aa 1-367) ist an der Membran lokalisiert, während das FLAG_NY56-367 Protein, dem die Signalsequenz fehlt, hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert und keine Akkumulation des Proteins an der Membran zu beobachten ist. Diese Beobachtungen suggerieren die Existenz eines Signalpeptids, das die Membranlokalisation des Fusionsproteins vermittelt. Das kürzere FLAG_NY156-169 Protein, dem sowohl das potentielle Signalpeptid als auch eine Transmembrandomäne fehlen lokalisiert vorwiegend im Kern, ist aber auch im Zytoplasma. Die Lokalisation dieses Fusionsproteins im Kern lässt sich durch die Anwesenheit des schwachen NLS (aa 56-62) in dem kodierenden Bereich erklären (Abbildung 3.27).

Interessant an der Lokalisation des FLAG_NY56-367 Proteins ist, dass das NY56-369_GFP Fusionsprotein vorwiegend im Kern lokalisiert ist (Abbildung 3.24). Bedingt durch die GFP-Fusion könnte die Konformation des NY-BR-1 Deletionsproteins so verändert sein, dass das NLS (aa 56-62) funktionell ist und den Transport in den Zellkern ermöglicht.

Die Beobachtung, dass endogenes NY-BR-1 ein Molekulargewicht von 150kDa besitzt, könnte durch die Existenz von Spleißvarianten erklärt werden. Jäger *et al.* (2001) gehen davon aus, dass die NY-BR-1 mRNA alternativ gespleißt wird, da sie sich aus modulartigen Sequenzwiederholungen zusammensetzt. Da sich N-terminal das Signalpeptid und die Transmembrandomänen befinden, war es interessant herauszufinden, wie N-terminale NY-BR-1 Deletionen lokalisiert sind, die Spleißvarianten simulieren, denen dieser Bereich fehlt. Außerdem wurde analog untersucht, wie C-terminale Deletionen lokalisiert sind. Für diese Experimente wurden die in Abbildung 3.41 dargestellten Konstrukte kloniert, in 293T Zellen transient exprimiert und mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert: NY-BR-1 aa 1-852, NY-BR-1 aa 1-1120 und NY-BR-1 aa 445-1397 sind membranständige Proteine. Demnach wären sowohl N-terminal als auch C-terminal verkürzte NY-BR-1 Proteinvarianten Membranproteine. Interessanterweise fehlen dem NY-BR-1 aa 445-1397 Protein sowohl das Signalpeptid als auch die vorhergesagten Transmembranbereiche. Um diese Beobachtung zu verstehen, wurden weitere C-terminale NY-BR-1_GFP Fusionskonstrukte exprimiert und deren Lokalisation bestimmt (Abbildung 3.41, B). Gemäß Kyte und Doolittle (1982) befindet sich im C-Terminus zwischen aa 1100 und aa 1250 ein hydrophober Bereich, der möglicherweise eine zusätzliche Membranregion darstellt. Das Fusionsprotein NY609-1125_GFP, das weder für diesen hydrophoben Abschnitt noch für vorhergesagte NLS oder Signalsequenzen kodiert, zeigt eine zelluläre Lokalisation im Kern und im Zytoplasma transient transfizierter 293T Zellen. Für das C-terminale NY908-1397_GFP Protein war eine deutliche Membranlokalisation zu beobachten. Die Proteine NY908-1171_GFP und NY1125-1397_GFP lokalisierten vorwiegend im Zytoplasma. Auffallend war bei NY908-1397_GFP, dass nur in wenigen Zellen eine homogene Membranlokalisation vorlag und sich in den meisten beobachteten Zellen Aggregate an der Plasmamembran befanden.

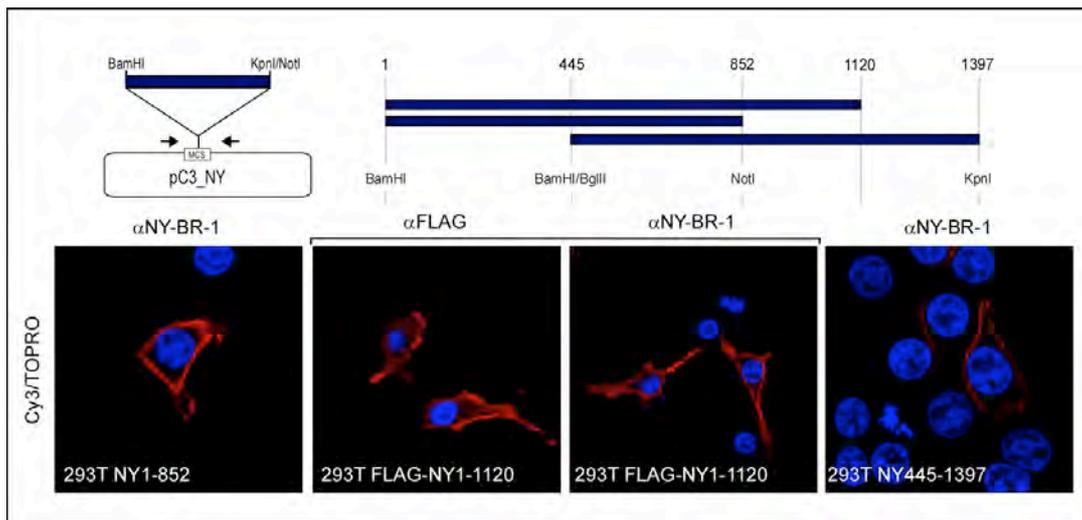


Abbildung 3.41 | Sowohl N-terminale als auch C-terminale NY-BR-1 Deletionskonstrukte sind mit der Plasmamembran assoziiert. A | Indirekte Immunfluoreszenz von fixierten 293T Zellen, die die angegebenen NY-BR-1 Deletionsproteine exprimieren. Der anti-FLAG Antikörper wurde 1:500, der anti-Maus-Cy3 Antikörper wurde 1:2000 verdünnt eingesetzt. **B |** Lokalisationsstudien mit NY-BR-1_GFP Fusionsproteinen, die für die angegebenen NY-BR-1 Sequenzabschnitte kodieren. Die Kerne wurden mit TOP-RO (1:2000) visualisiert. Die Analyse der Zellen erfolgte mit einem konfokalen Mikroskop.

Bei einer eingehenderen bioinformatischen Analyse der Proteinsequenz (Kapitel 2.1.9) wurde für aa 1382 eine mögliche Verankerungsstelle für eine GPI Modifikation sowie 2 N-Glykosylierungsstellen für die Positionen aa 427-441 und aa 1346-1349 gefunden. Sowohl GPI-Anker als auch N-Glykosylierungen vermitteln den Transport zur Membran und die Assoziation von Proteinen mit „lipid rafts“ (BENTING *et al.*, 1999a; BENTING *et al.*, 1999b).

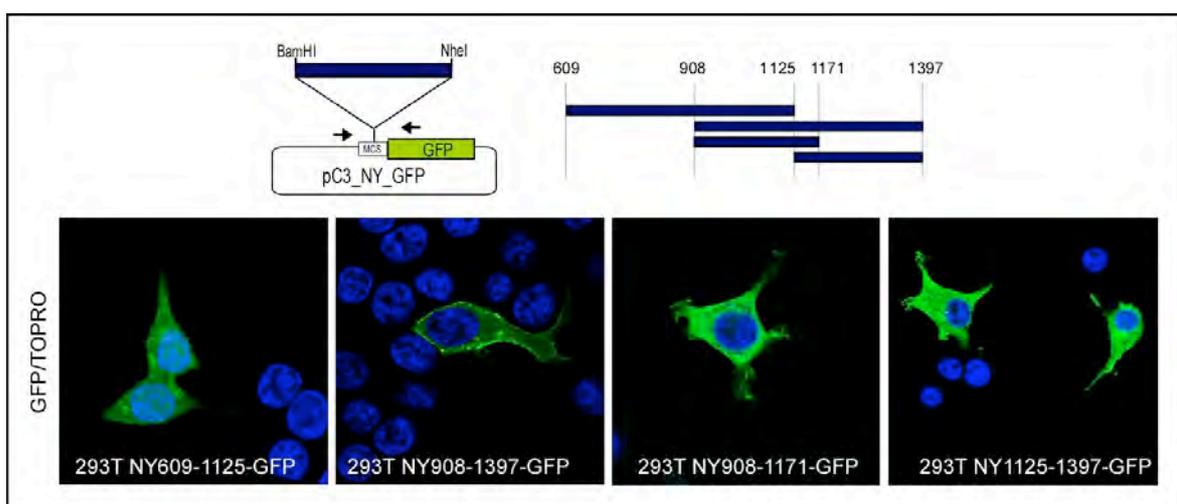


Abbildung 3.42 | NY908-1397_GFP lokalisiert an der Plasmamembran. Schematische Darstellung der C-terminalen NY-BR-1_GFP Fusionskonstrukte (oben), die in 293T Zellen transient exprimiert wurden. Die Lokalisation der Fusionsproteine erfolgte mit einem konfokalen Mikroskop (unten). Die Kerne wurden mit TOP-RO (1:2000) visualisiert.

Das NY908-1397-GFP Fusionsprotein umfasst im Gegensatz zu NY908-1171_GFP sowohl die GPI Ankerstelle als auch eine N-Glykosylierungsstelle. Somit ließe sich die Lokalisation des NY-BR-1 aa 908-1397 Proteins durch eine Assoziation mit „lipid rafts“ erklären. Um die Assoziation mit „lipid rafts“ zu untersuchen, wurden mit pC3_NY908-1397_GFP transfizierte 293T Zellen mit Alexa 647 konjugiertem Cholera toxin B, einem Marker für „rafts“, behandelt und im konfokalen Mikroskop analysiert (Abbildung 3.43). Anhand der Überlagerung der GFP- (grün) und Alexa647- (rot) Fluoreszenz ist erkennbar, dass die Proteine zum Teil kolokalisieren und somit NY908-1397_GFP mit „rafts“ assoziiert sein könnte.

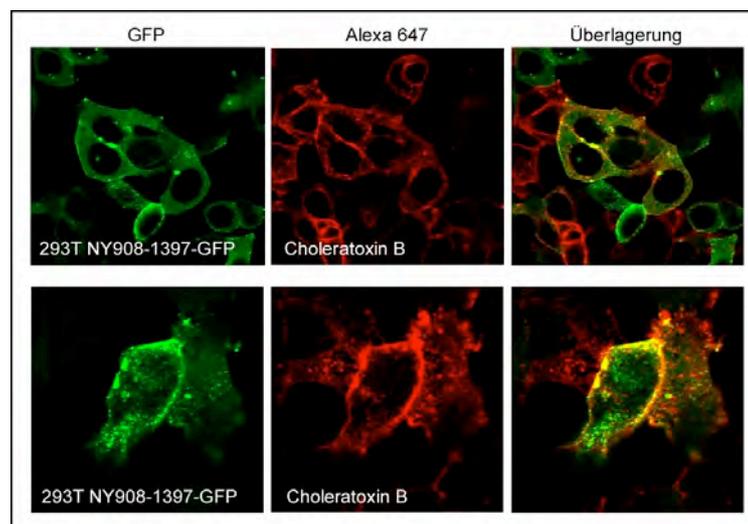


Abbildung 3.43 | NY908-1397GFP kolokalisiert mit dem „lipid raft“-Marker Cholera toxin B. 293T Zellen, die transient NY908-1397_GFP exprimieren wurden mit Alexa 647 konjugiertem Cholera toxin B (rot, 1:1000) inkubiert. Die Analyse der Zellen erfolgte mit einem konfokalen Mikroskop. Die Kolokalisation ist anhand der Überlagerung der Fluoreszenzen (gelb) zu erkennen.

Das NY1125-1397_GFP Protein, das ebenfalls für die Aminosäuren kodiert, die N-glykosyliert werden bzw. einen GPI Anker haben könnten, ist hauptsächlich zytoplasmatisch und kaum an der Membran lokalisiert. Bisher konnte die N-Glykosylierung von NY-BR-1 nur marginal durch Endoglykosidase H (EndoH) Verdau und Tunicamycin Behandlung untersucht werden. Tunicamycin inhibiert die Glykosylierung *in vivo*, während Endoglykosidase H N-glykosylierte Proteine in Zelllysaten *in vitro* deglykosyliert. Deshalb ist nicht auszuschließen, dass Deletionskonstrukte konformationsbedingt unterschiedlich bzw. gar nicht posttranslational modifiziert werden und somit eine andere Lokalisation zeigen als im Kontext des Gesamtproteins.

Um eine Assoziation des Proteins mit "lipid rafts" auch biochemisch zu bestätigen, sollten entsprechende Fraktionierungen und "Western Blot" Analysen durchgeführt werden. Auch ist es wichtig, eine mögliche Assoziation des Volllängenproteins mit "lipid rafts" zu

untersuchen. Erste Hinweise dafür ist die Tatsache, dass sich NY-BR-1 bei Gewebeproben nur in der Triton-X-100 unlöslichen Pelletfraktion im „Western Blot“ detektieren lässt.

3.9 Lokalisation von endogenem NY-BR-1

Nachdem im Zellkultursystem eingehend bestätigt wurde, dass NY-BR-1 ein Membranprotein ist, folgte die Untersuchung der Lokalisation des endogenen Proteins.

Für die Zelllinien MDA MB 453 und BT474 sowie den Pleuralerguss, der *NY-BR-1* mRNA exprimierte, war es mittels indirekter Immunfluoreszenz nicht möglich, endogenes NY-BR-1 Protein zu detektieren (Abbildung 3.21). Im Gegensatz dazu gelang es bei Gewebeschnitten, NY-BR-1 immunhistochemisch spezifisch zu detektieren (Abbildung 3.6). Die Färbungen zeigten zwar auch zytoplasmatisch lokalisiertes NY-BR-1 Protein, die Ausschnittsvergrößerungen in Abbildung 3.44 belegen jedoch, dass NY-BR-1 im Brust Karzinom und Seminom auch endogen mit der Membran assoziiert ist.

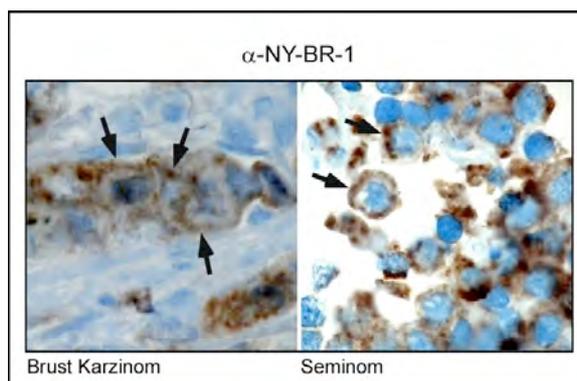


Abbildung 3.44 | Lokalisation des endogenen NY-BR-1 Proteins in Testis- und Brustkarzinomen. Immunhistochemische Färbung von Seminom- und Brustkarzinomgewebe, das mit dem anti-NY-BR-1 Antikörper (1:100) gefärbt wurde. Die Pfeile weisen auf die Membranlokalisation des NY-BR-1 Proteins hin. Als Sekundärantikörper wurde ein biotinylierter anti-Maus Antikörper eingesetzt. Die Färbung wurde mit dem CSA-Detektionssystem (DAKO) visualisiert.

3.10 NY-BR-1 Interaktionspartner

Die Interaktion von Proteinen ist für den koordinierten und effizienten Ablauf biologischer Prozesse essentiell. Durch die Anwendung von „Microarrays“ und Matrix-Hefe-Zwei-Hybrid Analysen können immer komplexere Interaktionsnetzwerke auf Transkript- und Proteinebene identifiziert und verstanden werden. Somit können über die Identifikation von Interaktionspartnern Informationen gewonnen werden, die zur Aufklärung einer möglichen Funktion eines unbekanntes Proteins beitragen.

In einer bioinformatischen Analyse der NY-BR-1 Proteinsequenz wurden N-terminale Ankyrin Wiederholungsdomänen und C-terminale „Coiled Coils“ sowie eine leucinreiche Sequenz vorhergesagt (Abbildung 3.4). Da diese Motive charakteristisch für Protein-

Protein-Interaktionsdomänen sind, ist es möglich, dass NY-BR-1 Dimere oder Multimere bildet bzw. mit anderen Proteinen interagiert.

Wie in Kapitel 3.2 bereits erwähnt, scheint der leucinreiche Sequenzabschnitt keine typische DNA-Bindungsdomäne zu sein, da es sich nicht um ein klassisches bZIP-Motiv handelt. Gemäß der experimentell bestätigten vorhergesagten Topologie befindet sich der Großteil des Proteins extrazellulär, so dass eine Bindung an DNA unwahrscheinlich ist. Sowohl Ankyrin-Wiederholungssequenzen als auch „coiled coil“ Regionen vermitteln die Interaktion von Proteinen. Mit Hilfe eines matrixbasierten Hefe-Zwei-Hybrid-Systems sollten Interaktionspartner von NY-BR-1 identifiziert werden und mit Co-Immunpräzipitationen eine mögliche Interaktion mit sich selbst untersucht werden.

3.10.1 NY-BR-1 hat das Potential zur Dimerisierung bzw. Multimerisierung

Eine Möglichkeit, Interaktionen zweier Proteine *in vitro* nachzuweisen, ist die Co-Immunpräzipitation (Co-IP). Das Prinzip dieser Methode besteht darin, dass mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers ein Protein oder ein Proteinkomplex aus einem Zelllysate gebunden und durch Bindung des Antikörpers an Protein A/G-Agarose vom Lysat getrennt und angereichert werden kann. Da die experimentellen Bedingungen so gewählt werden, dass Proteininteraktionen bei der Zellyse bestehen bleiben, können gebundene Proteine im "Western Blot" detektiert werden.

Um biochemisch zu untersuchen, ob NY-BR-1 mit sich selbst interagieren kann, wurden mit Lysaten transfizierter 293T Zellen Co-Immunpräzipitationen durchgeführt. Für den Nachweis der Dimerisierung bzw. Multimerisierung des Volllänge NY-BR-1 Proteins wurden hierfür pC3_FLAG_NY-BR-1 und pC3_NY-BR-1_GFP in 293T Zellen koexprimiert und sowohl mit einem anti-FLAG Antikörper oder alternativ mit einem anti-GFP Antikörper präzipitiert. Der Nachweis der präzipitierten Proteine im "Western Blot" erfolgte mit dem monoklonalen anti-NY-BR-1 Antikörper. Um die Expression der jeweiligen Bindungspartner zu belegen, wurde in der „Input“-Spur ein Aliquot (5-10%) des für die IP eingesetzten Zelllysates aufgetragen. Wie in Abbildung 3.45 A zu erkennen ist, wird NY-BR-1 nur in NY-BR-1-exprimierenden 293T Zellen mit dem spezifischen anti-FLAG Antikörper immunpräzipitiert, jedoch nicht mit dem anti-GFP Antikörper. In „mock“ transfizierten Zellen ist keine Präzipitation des Proteins zu detektieren (links). Rechts ist zu sehen, dass NY-BR-1_GFP spezifisch sowohl mit dem anti-NY-BR-1 Antikörper als auch mit dem anti-GFP Antikörper präzipitiert werden kann.

Dass FLAG_NY-BR-1 und NY-BR-1_GFP Dimere/Multimere bilden können, zeigt Abbildung 3.45 (unten). Die Präzipitation beider Fusionsproteine erfolgte reziprok mit den

anti-FLAG bzw. anti-GFP Antikörpern. Beide NY-BR-1 Fusionsproteine lassen sich mit dem monoklonalen anti-NY-BR-1 Antikörper im "Western Blot" nachweisen.

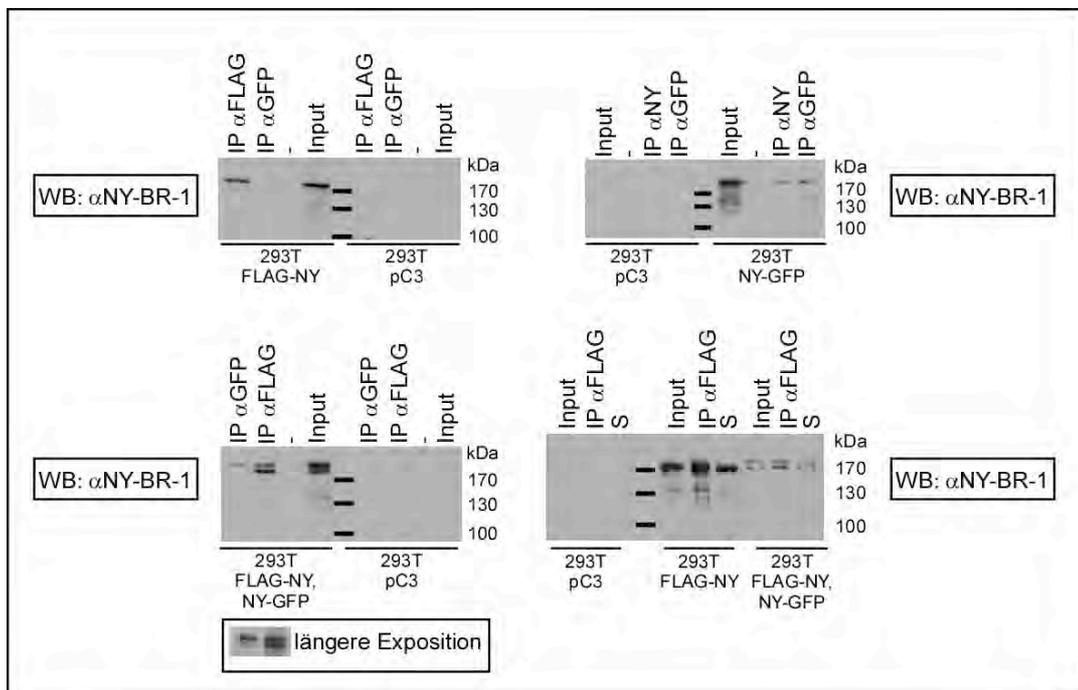


Abbildung 3.45 | NY-BR-1 hat das Potential zur Dimerisierung. A | Spezifische Präzipitation des FLAG_NY-BR-1 Proteins aus Lysaten transfizierter 293T Zellen mit dem anti-FLAG Antikörper (links). Spezifische Präzipitation des NY-BR-1_GFP Proteins aus Lysaten transfizierter 293T Zellen mit den anti-GFP und anti-NY-BR-1 Antikörpern (rechts). **B** | Co-Immünpräzipitation der FLAG_NY-BR-1 und NY-BR-1_GFP Proteine mit dem monoklonalen anti-FLAG Antikörper bzw. dem anti-GFP Antikörper aus Lysaten transfizierter 293T Zellen. Die Detektion im "Western Blot" (WB) erfolgte mit dem anti-NY-BR-1 Antikörper (1:250) und einem HRP-konjugiertem anti-Maus Antikörper (1:2000). „Input“: 10% des für die IP eingesetzten Ausgangslysats; IP: mit dem angegebenen Antikörper immunpräzipitiertes Protein; -: IP Reaktion ohne Antikörper; S: Überstand nach IP Reaktion; S: Überstand des an Antikörper-Protein A/G-Agarose gebundenen Proteins; Rechts ist jeweils der Molekulargewichtsmarker angegeben.

Co-Immünpräzipitations-Experimente mit den NY609-1397_GFP und NY609-1397_myc Deletionskonstrukten (Abbildung 3.46 links) ergaben, dass auch der C-Terminus von NY-BR-1 in der Lage ist, Dimere/Multimere zu bilden. Die Interaktion ist jedoch im "Western Blot" (anti-NY-BR-1 Antikörper) nur für die IP Reaktion, die mit dem anti-myc Antikörper durchgeführt wurde, nachzuweisen. Der anti-GFP Antikörper präzipitiert zwar NY609-1397-GFP, eine Co-Immünpräzipitation des NY609-1397_myc Proteins ist jedoch nicht zu sehen. In Abbildung 3.46 (rechts) ist die Interaktion des NY609-1397_GFP Proteins mit dem Vollängen FLAG_NY-BR-1 gezeigt. Auch hier ist die Co-IP, die mit dem anti-GFP Antikörper durchgeführt wurde nicht so effizient wie diejenige, bei der der anti-FLAG Antikörper eingesetzt wurde. Die Interaktion N-terminaler NY-BR-1 Deletionsproteine mit sich selbst oder dem Vollängen NY-BR-1 Protein müsste in weiteren Experimenten noch geklärt werden.

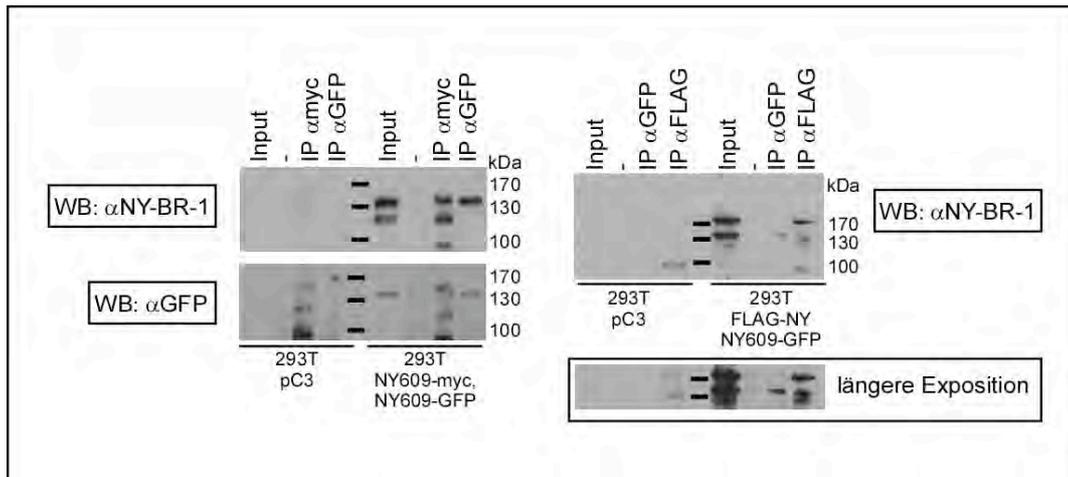


Abbildung 3.46 | Das NY609-1397_GFP Deletionsprotein interagiert mit dem Volllängen NY-BR-1 und mit NY609-1397_myc. Spezifische Präzipitation des NY609-1397_GFP Proteins bzw. des NY609-1397_myc Proteins aus Lysaten transfizierter 293T Zellen mit dem anti-GFP Antikörper bzw. mit dem anti-myc Antikörper. Die Detektion im "Western Blot" (WB) erfolgte mit dem anti-NY-BR-1 Antikörper (1:250) und dem anti-GFP Antikörper (1:500) (links). Spezifische Präzipitation des FLAG_NY-BR-1 Proteins bzw. des NY609-1397_GFP Proteins aus Lysaten transfizierter 293T Zellen mit den anti-FLAG bzw. dem anti-GFP Antikörper (rechts). Die Detektion im "Western Blot" (WB) erfolgte mit dem anti-NY-BR-1 Antikörper (1:250). „Input“: 10% des für die IP eingesetzten Ausgangslysats; IP: mit dem angegebenen Antikörper immunpräzipitiertes Protein; -: IP Reaktion ohne Antikörper. Rechts ist jeweils der Molekulargewichtsmarker angegeben.

3.10.2 Hefe-Zwei-Hybrid-System

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System bietet die Möglichkeit, *in vivo* Protein-Protein-Interaktionen nachzuweisen bzw. neue Interaktionspartner zu identifizieren. In Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. E. Wanker und Dr. U. Stelzl (MDC, Berlin) wurde ein Matrix basierter Hefe-Zwei-Hybrid-„Assay“ durchgeführt, um mögliche Bindungspartner von NY-BR-1 zu identifizieren.

Sämtliche NY-BR-1 PCR-Produkte für das Hefe-Zwei-Hybrid-System wurden entweder über Sal/NotI oder über BamHI/NotI sowohl in den pBTM117c Vektor (Köder-/„bait“-Vektor) als auch in den pGAD Vektor (Beute-/„prey“-Vektor) kloniert (Tabelle 2.7, Abbildung 3.47 links). Vor dem eigentlichen Versuch wurde zunächst die Autoreaktivität der einzelnen Fusionskonstrukte untersucht. Diejenigen, die mit dem jeweiligen Leervektor bereits in der Lage waren, auf SDIV Agarplatten Kolonien zu bilden wurden für weitere Untersuchungen nicht berücksichtigt. NY609-1397 ist im "prey"-Vektor (pGAD426) autoreaktiv, da dieser Vektor mit dem pBTM117c Leervektor und infolge dessen mit allen getesteten pBTM-Konstrukten Kolonien bildet. Bei pBTM_NY608-853 zusammen mit dem pGAD426 ist ebenfalls eine Kolonienbildung bedingt durch Autoreaktivität zu beobachten. Autoreaktiv waren ferner die Klone mit den Nummern 162, 169, 171, 172 und 240.

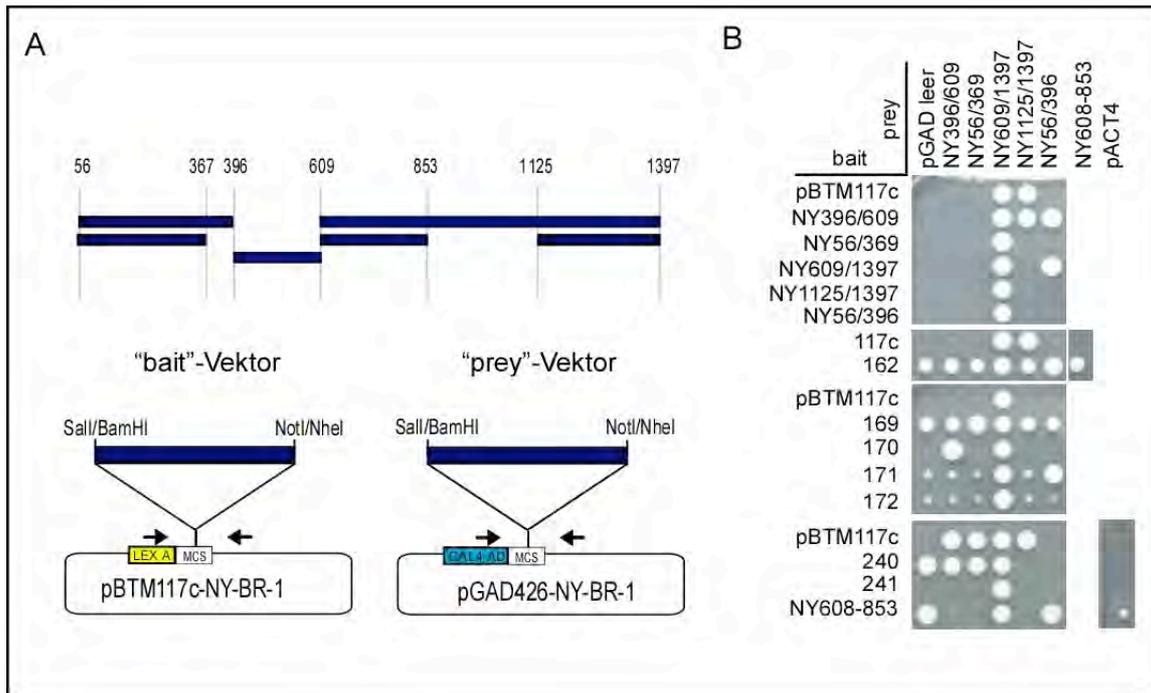


Abbildung 3.47 | Klonierung und Autoreaktivitätstest der für den Hefe-Zwei-Hybrid Versuch eingesetzten NY-BR-1 Konstrukte. **A** | Schematische Darstellung der für den Versuch klonierten NY-BR-1 Konstrukte. Der pBTM117c-Vektor ist der Köder-Vektor („bait“) und der pGAD426 ist der Beute-Vektor („prey“). Alle oben angegebenen Konstrukte wurden in beide Vektoren kloniert. **B** | Autoreaktivitätstest der NY-BR-1 Konstrukte. Die Zahlen sind stellvertretend für andere Konstrukte angegeben, die nicht für NY-BR-1 kodieren.

Das Ergebnis des Matrix-Hefe-Zwei-Hybrid „Screens“ ist in Abbildung 3.48 aufgeführt. Als potentielle Interaktionspartner für NY-BR-1 wurden die Proteine BAT1, CHD3, Vimentin, HTATIP und EEF1G sowohl mit dem Wachstumstest als auch im β -Galaktosidase Test identifiziert (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.4 | Übersicht der im YTH „Screen“ identifizierten Interaktionspartner von NY-BR-1

Gen	Name	Acc.No.
HTATIP	"HIV-1 Tat interactive protein", 60kDa, Isoform 3	AAH93032
EEF1G	"Elongation factor 1-gamma" (EF-1-gamma)	P26641
BAT1	"HLA-B associated transcript 1 (BAT1)", "transcript variant 1", mRNA	NM_004640
CHD3	"Chromodomain helicase-DNA-binding protein 3", (CHD-3) (Mi-2 autoantigen 240 kDa protein) (Mi2-alpha)	Q12873
Vim	Vimentin	P08670

Da die Proteine CHD3, HTATIP, und Vimentin den persönlichen Angaben U. Stelzls zu Folge häufig mit ihrer Methode identifiziert werden, ist deren Bedeutung als Interaktionspartner vorsichtig zu betrachten. Die Validierung der Interaktion über Co-IP und Kolokalisationsstudien ist je nach Kontext sinnvoll. In der „Genecard“-Datenbank sind

BAT1, HTATIP und CHD3 als nukleäre Proteine beschrieben, so dass diese als Interaktionspartner bisher nicht in weiterführenden Experimenten untersucht wurden.

Vimentin gehört zu den Klasse III Intermediärfilamenten und wird hauptsächlich in mesenchymalen, nicht epithelialen Zellen, Fibroblasten, und auch schwach in T- und B-Zellen exprimiert. Außerdem wurde es in vielen hormonunabhängigen Brusttumorzelllinien gefunden. Es ist eines der prominentesten Phosphoproteine, deren Phosphorylierung vor allem während der Zellteilung verstärkt auftritt wenn sich die Vimentinfilamente reorganisieren.

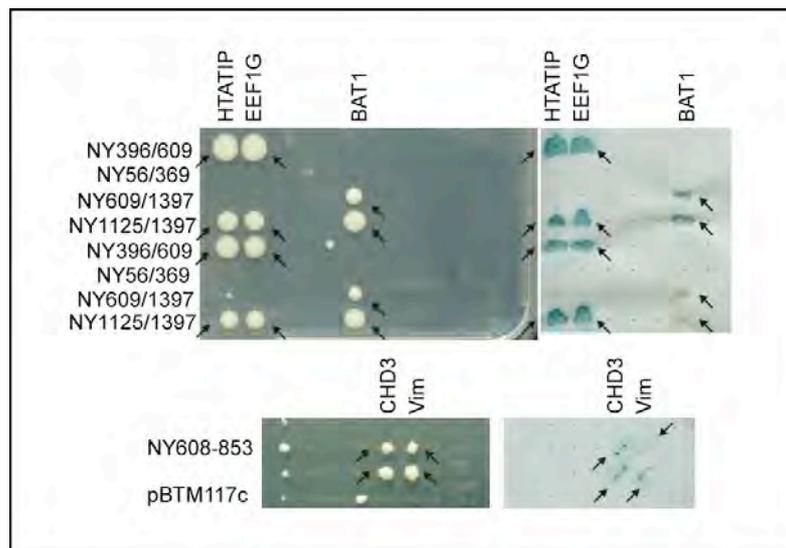


Abbildung 3.48 | Potentielle NY-BR-1 Interaktionspartner, die im Hefe-Zwei-Hybrid-System identifiziert wurden. Links ist ein Bild des Wachstumsversuch, rechts ist der β -Galaktosidaseversuch dargestellt.

Vimentin zeigt in diesem „Assay“ eine Interaktion mit NY608-853, dass zwar mit dem leeren pGAD426-Vektor, aber nicht mit allen getesteten "prey"-Vektoren interagieren kann. Aufgrund der Membranlokalisierung von NY-BR-1 erschien eine Interaktion mit Vimentin als nicht ausgeschlossen. Mittels indirekter Immunfluoreszenz wurde zunächst die Kolokalisation von endogenem Vimentin und transient exprimiertem NY-BR-1 in 293T Zellen geprüft. Vimentin wurde mit einem monoklonalen anti-Vimentin Antikörper detektiert. In Abbildung 3.49 sind horizontale Sektionen dargestellt, die am konfokalen Mikroskop aufgenommen wurden. Sie zeigen die GFP Fluoreszenz des NY-BR-1_GFP Fusionsproteins und die des Cy3-konjugierten anti-Maus Antikörpers (rot) mit dessen Hilfe der Vimentin Antikörper detektiert wurde. Da in 293T Zellen keine Kolokalisation der beiden Proteine zu beobachten war, erschienen Co-IP Experimente nicht sinnvoll. Die übrigen der im „Screen“ identifizierten Proteine wurden aus den oben beschriebenen Gründen nicht näher untersucht.

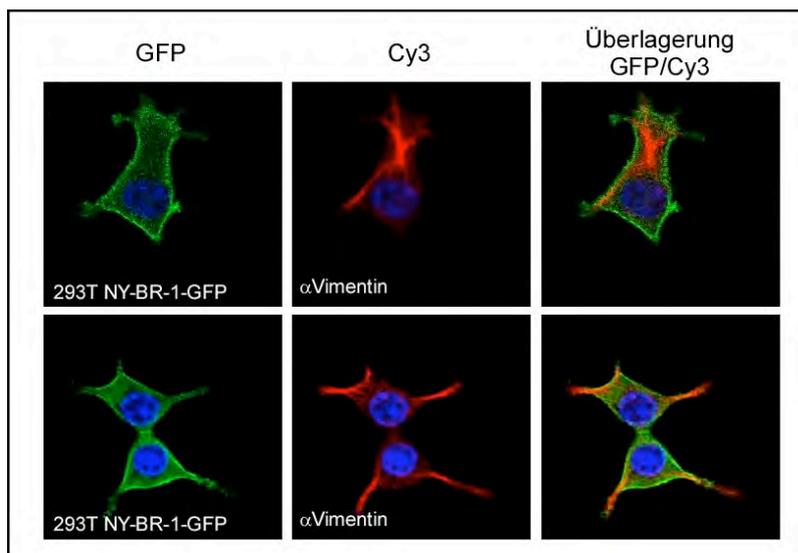


Abbildung 3.49 | NY-BR-1 und endogenes Vimentin zeigen keine Kolokalisation in 293T Zellen. Kolokalisationsstudien von transient exprimiertem NY-BR1_GFP und endogenem Vimentin (rot) in fixierten 293T Zellen. Der monoklonale anti-Vimentin Antikörper wurde 1:1000 verdünnt, der Cy3-anti-Maus Antikörper 1:2000 verdünnt eingesetzt. Aufnahmen vom konfokalen Mikroskop. Die Zellkerne wurden mit TOP-RO (1:2000) visualisiert.

3.11 Analyse der spontanen anti-NY-BR-1 Antikörper Reaktivität in Patientenseren

Da es sich bei NY-BR-1 um ein postuliertes Tumorantigen handelt, das in einem SEREX „Screen“ identifiziert wurde, ist zu erwarten, dass bei NY-BR-1 positiven Brustkrebspatienten eine spontane humorale Immunantwort auftritt. Um diese Fragestellung näher zu untersuchen, wurden 5 Patientenseren und das Serum eines gesunden Menschen im "Western Blot" auf anti-NY-BR-1 Antikörper getestet.

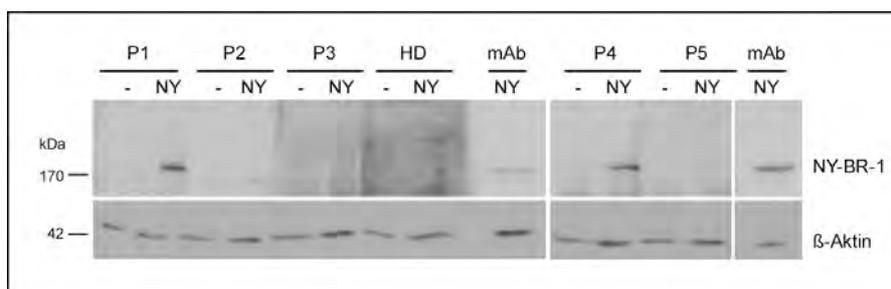


Abbildung 3.50 | Anti-NY-BR-1 Serumantikörperreaktivität gegen transient exprimiertes NY-BR-1. Lysate von nicht transfizierten (-) und mit pC3-NY-BR-1 (NY) transfizierten 293T Zellen wurden im „Western Blot“ mit den Seren von 5 Brustkrebspatienten (P1-P5) auf ihre Reaktivität gegen das NY-BR-1 Protein getestet. Die Membran wurde entsprechend geschnitten und die Streifen mit den angegebenen Seren (1:100) inkubiert. Als Kontrollen wurden der monoklonale anti-NY-BR-1 Antikörper (mAb, 1:250) und das Serum eines gesunden Donors (HD, 1:100) eingesetzt. β -Aktin diente als Kontrolle für die Proteinkonzentration der einzelnen Proben. Die Detektion erfolgte mit HRP-konjugierten anti-Mensch (1:8000), anti-Maus (1:2000) und anti-Kaninchen (1:2000) Antikörpern. Links ist der Molekulargewichtsmarker gezeigt.

Hierfür wurden sowohl Lysate NY-BR-1 exprimierender 293T Zellen als auch Lysate von untransfizierten 293T Zellen verwendet. Die Seren wurden 1:100 verdünnt und mit einem HRP-konjugierten anti-Human (IgG) Antikörper detektiert. Abbildung 3.50 zeigt representative "Western Blots" für Patienten 1-5 (P1-P5) und für einen gesunden Donor. Die Seren der Patienten 1 und 4 detektieren eindeutig das überexprimierte NY-BR-1 Protein in den Lysaten transfizierter 293T Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Die Seren P1 (NY+) und P5 (NY-) wurden zusammen mit den Kontrollen HD und mAb im „Western Blot“ auf ihre Serumantikörper Reaktivität mit normalem Brustgewebe getestet (Abbildung 3.51). Auch hier ist für P1 deutlich die Detektion des in 293T Zellen überexprimierten NY-BR-1 Proteins zu erkennen. In normalem Brustgewebe wird endogenes NY-BR-1 ebenfalls schwach von P1 detektiert. Im Gegensatz dazu, sind im "Western Blot" keine Banden bei Serum P5 und bei dem Serum des gesunden Donors zu sehen.

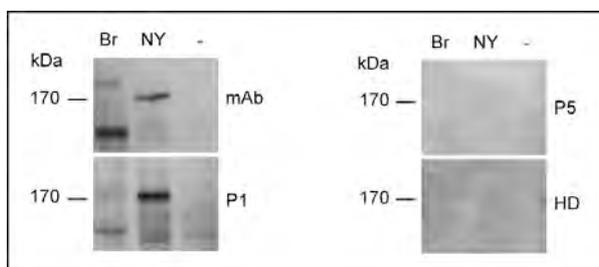


Abbildung 3.51 | Anti-NY-BR-1 Serumantikörperreaktivität gegen endogenes NY-BR-1. Lysate von normalem Brustgewebe (Br), nicht transfizierten (-) und mit pC3-NY-BR-1 (NY) transfizierten 293T Zellen wurden im "Western Blot" mit den Seren von 2 Brustkrebspatienten auf ihre Reaktivität gegen das NY-BR-1 Protein getestet. Die Membran wurde entsprechend geschnitten und die Streifen mit den angegebenen Seren (1:100) inkubiert. Als Kontrollen wurden der monoklonale anti-NY-BR-1 Antikörper (mAb, 1:250) und das Serum eines gesunden Donors (HD, 1:100) eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit HRP-konjugierten anti-Mensch (1:8000), anti-Maus (1:2000) und anti-Kaninchen (1:2000) Antikörpern. Links ist der Molekulargewichtsmarker gezeigt.

Im Vergleich zu rekombinantem Protein bakteriellen Ursprungs, ist bei in Zelllinien überexprimiertem bzw. endogenem NY-BR-1 die Möglichkeit gegeben, auch Serumantikörper, die gegen modifizierte Epitope gebildet wurden, zu detektieren. Aus diesem Grund, wurden weitere 50 Patientenserum mit normalem Brustgewebe getestet. Die Ergebnisse konnten jedoch bisher nicht adäquat ausgewertet werden, da der Prozentsatz der reaktiven Patientenserum demnach bei über 50% läge und 2 Normalserum überraschenderweise ebenfalls mit endogenem NY-BR-1 reaktiv waren.

3.12 Funktionelle Studien

Zelllinien bieten die Möglichkeit, Prozesse wie Zellzyklus, Proliferation, Adhäsion, Migration, Apoptose, etc. im Zellkulturmodell zu untersuchen. Da endogenes NY-BR-1 bisher weder in Zelllinien noch in Pleuralergüssen auf Proteinebene nachweisbar war,

wurde für die folgenden Studien ein Transfektionssystem etabliert. Bei der Wahl eines Brust- bzw. prostataspezifischen Systems war die geringe Transfektions- bzw. Expressionseffizienz trotz diverser Transfektionsmethoden (Tabelle 2.13) limitierend. Visuellen Abschätzungen (Zellen am Mikroskop gezählt) zu Folge lag die Zahl der NY-BR-1_GFP exprimierenden Zellen 24h nach der Transfektion bei 5-10% (Tabelle 3.5).

Tabelle 3.5 | NY-BR-1_GFP Expression in Zelllinien 24h post-Transfektion. Grün fluoreszierende Zellen wurden am Mikroskop ausgezählt und so die Zahl der positiven Zellen in % ermittelt, um die Transfektionseffizienz abzuschätzen,

Zelllinie	NY-BR-1_GFP Expression (%) 24h post-Transfektion (Lipofectamine 2000)
HeLa	10
293T	> 30
NIH3T3	5
MDA MB 453/HTB131	5
BT474	5
SK-BR 3	5
MCF-7	10
MCF-10A	5
HBL-100	< 5
PC3	10
DU145	1-5
MDCK	< 5

Von den getesteten Methoden erwies sich das Transfektionsreagenz Lipofectamine 2000 als das Effizienteste. Die Etablierung stabiler Zelllinien bot keine Alternative zur transienten Expression, da die NY-BR-1_GFP Expression bereits nach 14 Tagen weder fluoreszenzmikroskopisch noch auf Proteinebene im "Western Blot" detekrierbar war (Abbildung 3.52).

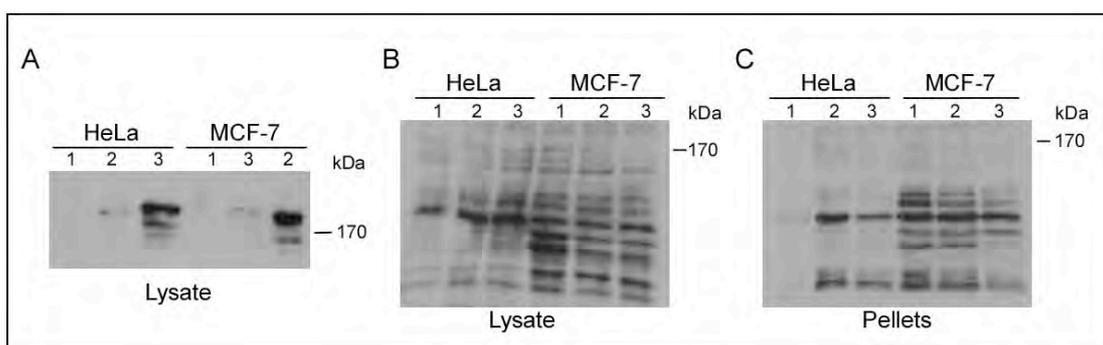


Abbildung 3.52 | NY-BR-1 Expression in stabilen Zelllinien. Die Expression von NY-BR-1 und NY-BR-1_GFP Protein wurde in Lysaten von stabil transfizierten HeLa und MCF-7 Zellen im "Western Blot" mit dem monoklonalen anti-NY-BR-1 Antikörper (1:250) analysiert. Die Detektion erfolgte mit dem HRP-konjugierten anti-Maus (1:2000) Antikörper. A | "Western Blot" Analyse der transfizierten Zellen, die 24h post-Transfektion geerntet wurden. B/C | "Western Blots" sowohl für Lysate als auch für die Pelletfraktion der Zellen 21Tage post-Transfektion. 1: untransfiziert, 2: NY-BR-1, 3: NY-BR-1_GFP. Links ist der Molekulargewichtsmarker gezeigt.

Da der Weichagar Versuch mit NIH3T3 Wildtyp (Negativkontrolle) und NIH3.7 Zellen (Positivkontrolle) etabliert war, wurden trotz geringer Expressionseffizienz transient transfizierte NIH3T3 Zellen hierfür verwendet. Die folgenden funktionellen Studien zum Adhäsionsverhalten wurden mit 293T Zellen durchgeführt, bei denen die Transfektionseffizienz bei mindestens 30% lag.

3.12.1 Weichagar-Versuch

Onkogene beeinflussen unter bestimmten Bedingungen das Proliferations-, Migrations-, und Adhäsionsverhalten sowie die Apoptose und führen zu einer neoplastischen Transformation. Überexprimierte Onkogene, wie z.B. ErbB2, können NIH3T3 Zellen *in vitro* transformieren (BAASNER *et al.*, 1996). In einem Weichagar-Versuch (Kapitel 2.2.42 und 2.2.43) sollte das Transformationspotential von NY-BR-1 untersucht werden. Hierfür wurden NIH3T3 Zellen, die transient NY-BR-1_GFP und entsprechende Kontrollen exprimieren, in semisolidem Medium ausgesät (Abbildung 3.53). Die Proliferation der Zellen wurde nach 10 Tagen mit einem XTT „Assay“ bestimmt (Abbildung 3.53 B) und die Kolonienbildung (Abbildung 3.53 A) dokumentiert.

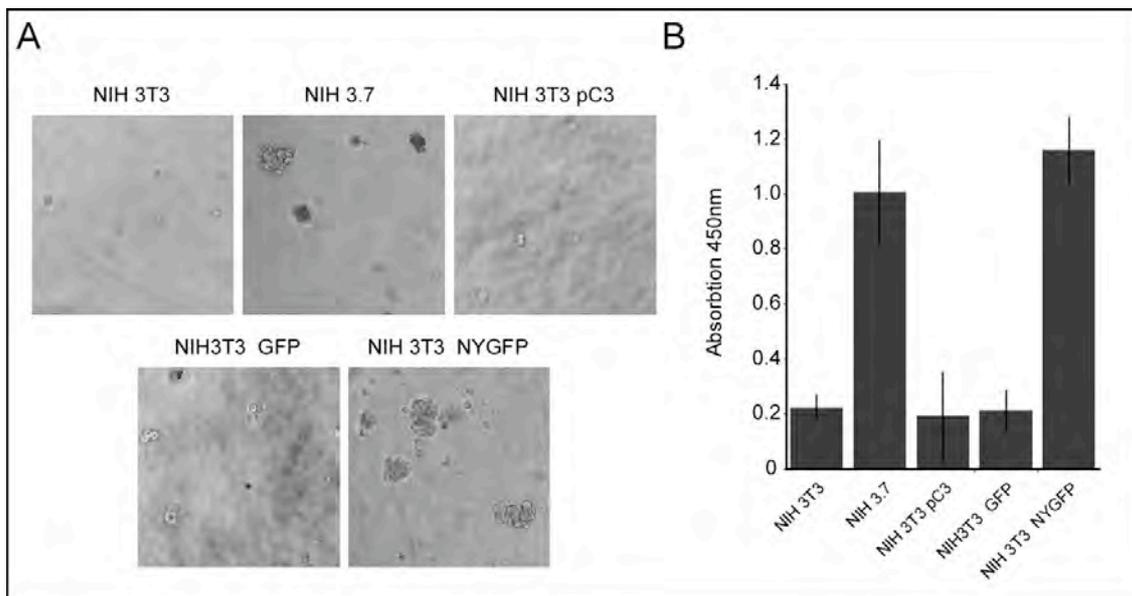


Abbildung 3.53 | NY-BR-1 exprimierende NIH3T3 Zellen bilden in semisolidem Medium Kolonien. A | Phasenkontrastbilder der im semisoliden Medium nach 10 Tagen gewachsenen Zellen/Kolonien. NIH 3T3: Wildtypzellen; NIH 3.7: NIH 3T3 Zellen, die stabil ErbB2 exprimieren. NIH 3T3_pC3: NIH 3T3 Zellen, die mit dem pC3 Leervektor transfiziert wurden; NIH 3T3_GFP: NIH 3T3 Zellen, die mit dem pF143 Vektor transfiziert wurden; NIH 3T3 NYGFP: NIH 3T3 Zellen, die transient NY-BR-1_GFP exprimieren. **B |** XTT-Proliferationsversuch. Die Proliferation wurde mit einem XTT „Assay“ bestimmt. Gezeigt sind die Absorptionswerte gemessen bei 450nm. Die Werte sind mit Standardabweichungen der Triplikate gezeigt.

Die Positivkontrolle, NIH 3.7 Zellen, die stabil konstitutiv aktives humanes ErbB2 exprimieren, bilden im Vergleich zu den Wildtypzellen Kolonien. NIH3T3 Zellen, die NY-BR-1_GFP exprimieren, sind ebenfalls in der Lage, Kolonien zu bilden. Die Kontrollen Leervektor (pC3) und pF143 (GFP) verhalten sich wie NIH 3T3 Wildtypzellen. Die visuell abgeschätzte, geringe Transfektionseffizienz für NIH 3T3 NY-BR-1_GFP von ca. 5% im Vergleich zu NIH 3T3 und NIH 3T3 GFP (abgeschätzte Transfektionseffizienz von ca. 30-40%) unterstreichen die Signifikanz der gemessenen Werte. Diese Resultate geben erste Hinweise darauf, dass NY-BR-1 eine wichtige Rolle bei der Tumorgenese spielen könnte.

3.12.2 Adhäsionsversuch

Die Fähigkeit, von Zellen auf Matrixproteinen zu adhären, kann im Adhäsionsversuch getestet werden. Um zu untersuchen ob NY-BR-1 exprimierende Zellen im Vergleich zu Wildtypzellen bzw. GFP exprimierenden Zellen ein verändertes Adhäsionsverhalten zeigen, wurde ein Adhäsionsversuch (Kapitel 2.2.44) durchgeführt. Hierzu wurden transfizierte 293T Zellen auf eine konfluente Einzelzellschicht humaner Endothelzellen ausgesät und nach verschiedenen Zeitpunkten gewaschen und fixiert. Die Auszählung der adhärenierten Zellen erfolgte lichtmikroskopisch. In Abbildung 3.54 sind die Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente gezeigt. Der Anteil an adhärenierten Zellen ist prozentual dargestellt. Als Kontrollen dienten unbehandelte, mit dem Leervektor pCDNA3 (pC3) sowie mit dem pF143 (pC3_GFP) transfizierte 293T Zellen.

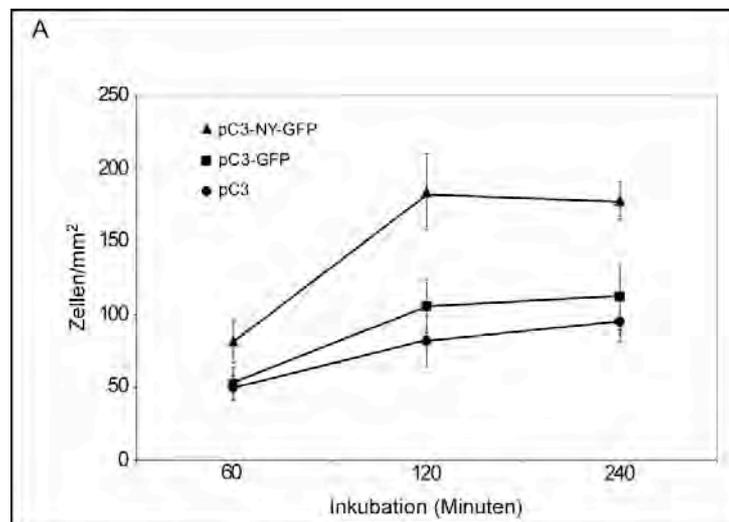


Abbildung 3.54 | NY-BR-1 exprimierende 293T Zellen adhären vermehrt/schneller auf humanen Endothelzellen.

Transfizierte 293T Zellen (pC3-NY-GFP: pC3-NY-BR-1_GFP; pC3: pCDNA3.1; pC3-GFP: pF143) wurden 12h post-Transfektion auf einen Endothelzellrasen ausgesät und nach 60, 120 und 240min fixiert. Die Zahl der adhärenierten Zellen wird mit Hilfe eines Mikroskops bestimmt.

Nach 60 Minuten adhärten von den Kontrollzellen ca. 50 Zellen/mm², von den NY-BR-1_GFP exprimierenden 293T-Zellen bereits 80 Zellen/mm². Nach einem Zeitraum von 4h waren ungefähr 2.5 mal so viele NY-BR-1 exprimierende Zellen adhärten als von den Kontrollzellen.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, das Brust Tumorantigen NY-BR-1 molekularbiologisch und biochemisch zu charakterisieren sowie dessen Expression in Zelllinien und Geweben zu untersuchen. Weiterhin wurden erste Untersuchungen zur Evaluierung der klinischen Relevanz des Tumorantigens als prognostischer Marker und als Zielprotein für immuntherapeutische Strategien durchgeführt.

4.1 NY-BR-1: Klonierung und Antikörperherstellung

Da es sich bei *NY-BR-1* um ein neues, unbekanntes Gen handelt, mußten zu Beginn dieser Arbeit für die geplanten Untersuchungen zunächst die molekularbiologischen Werkzeuge und Methoden etabliert werden. Eine Voraussetzung für die Charakterisierung war die Herstellung eines Vollängenklons. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein *NY-BR-1* Expressionskonstrukt kloniert, das dem ursprünglich identifizierten ORF von *NY-BR-1* (JÄGER *et al.*, 2001) entspricht. Der ORF wurde anhand von bereits vorhandenen Teilklonen und amplifizierten RACE PCR Sequenzen konstruiert (Abbildung 3.2). Die kürzlich von D. Jäger zur Verfügung gestellte cDNA, die für aa 1-1397 kodiert, wurde in dessen Labor ebenfalls aus Teilsequenzen zusammengesetzt. Die NY1-1397 Sequenz umfaßt die nach heutigem Wissen längstmögliche kodierende Sequenz des *NY-BR-1* Gens. Das Vorhandensein einer Kozak Sequenz unterstützt die Annahme, dass es sich bei dem vorderen ATG auch um den tatsächlichen Translationsstart handelt (Abbildung 3.1). Bisher gelang es nicht, den gesamten kodierenden Bereich von *NY-BR-1* in einem Stück aus der cDNA verschiedener Zelllinien bzw. Brust oder Testis zu amplifizieren. Das Vorhandensein des angenommenen ORF wird durch die mit SEREX identifizierten und aus Testis cDNA amplifizierten Teilsequenzen sowie durch überlappende EST Klone gestützt. In dieser Arbeit konnten in einer „Northern Blot“ Analyse *NY-BR-1* Transkripte in Zelllinien nachgewiesen werden. Eine *NY-BR-1* spezifische radioaktiv markierte Sonde detektierte 2 Transkripte in der polyA⁺-mRNA aus MDA MB 453 und BT474 Zellen, die beide lang genug sind, um für den angenommenen NY-BR-1 ORF zu kodieren (Abbildung 3.3). Es wäre weiterhin sinnvoll, eine Testis cDNA Bank zu „screenen“, um den vollständigen *NY-BR-1* ORF aus einzelnen cDNA Klonen ohne Amplifikationen zusammensetzen zu können.

Besonders wichtig für eine detaillierte Charakterisierung eines neuen Proteins ist ein Antikörper. Da kein kommerzieller anti-NY-BR-1 Antikörper erhältlich ist, wurde zu Beginn der vorliegenden Arbeit ein anti-NY-BR-1 Antiserum in Hühnern hergestellt, welches zur Detektion des rekombinanten und überexprimierten NY-BR-1 Proteins im “Western Blot”

eingesetzt werden konnte (Abbildung 3.5, Abbildung 3.6). Im Eidotter waren ebenfalls NY-BR-1 spezifische Antikörper im "Western Blot" nachweisbar (Abbildung 3.7). Da dieses Hühnerserum unspezifisch an weitere zelluläre Proteine bindet und endogenes NY-BR-1 nicht eindeutig detektiert, wurde jedoch für die weiteren Analysen alternativ ein monoklonaler anti-NY-BR-1 Antikörper (freundlicherweise von D. Jäger, NCT, Heidelberg zur Verfügung gestellt) eingesetzt.

Expressionsanalysen mit transient überexprimiertem NY-BR-1 haben gezeigt, dass sowohl das polyklonale anti-NY-BR-1 Antiserum aus Huhn als auch der monoklonale Antikörper spezifisch NY-BR-1 und verschiedene NY-BR-1 Deletionsproteine im "Western Blot" erkennt (Abbildung 3.14). Der monoklonale anti-NY-BR-1 Antikörper ließ sich auch für Immunpräzipitationen (Abbildung 3.15), Immunhistochemie (Abbildung 3.22, Abbildung 3.44), für FACS Analysen (Abbildung 3.34) und für die Immunfluoreszenz (Abbildung 3.28) verwenden.

4.2 Endogenes NY-BR-1

Mit Hilfe des monoklonalen anti-NY-BR-1 Antikörpers war es erstmalig möglich, endogenes NY-BR-1 im "Western Blot" nachzuweisen und damit auch zu beweisen, dass ein NY-BR-1 (Volllängen)Protein existiert (Abbildung 3.18).

Anhand der Analysen mit Lysaten aus Brust, Prostata, Testis und Niere kann zusammengefaßt werden, dass NY-BR-1 nur in der Triton-X-100 unlöslichen Membranfraktion einer Lysatpräparation nachweisbar ist (Abbildung 3.18, Abbildung 3.19, Abbildung 3.20). Anders als bei transient überexprimiertem NY-BR-1 wird es nicht als lösliches Protein im Überstand detektiert. Das in Zelllinien transient exprimierte Protein (aa 1-1397) hat ein errechnetes Molekulargewicht von 158kDa und weist im "Western Blot" ein Molekulargewicht von ca. 175kDa auf, was möglicherweise auf Modifikationen wie Glykosylierung zurückzuführen ist (Abbildung 3.14, Abbildung 3.15). Vorläufige Experimente mit Tunicamycin und Endoglykosidase H, die im Ergebnisteil nicht näher aufgeführt wurden, konnten die Glykosylierung des Volllängenproteins aber bisher nicht eindeutig zeigen. Die Zugabe von Tunicamycin in das Zellkulturmedium inhibiert die Glykosylierung *in vivo*, während Endoglykosidase H N-glykosylierte Proteine in Zelllysaten *in vitro* deglykosyliert.

Die Größe des endogenen NY-BR-1 Proteins hingegen ist mit ca. 150kDa kleiner als vorhergesagt. Es ist möglich, dass endogenes NY-BR-1 durch einen kürzeren ORF kodiert wird. Auffällig an der NY-BR-1 Aminosäuresequenz sind 3 Wiederholungen der Exone 10-15 (Abbildung 1.5), die insgesamt vier Mal nacheinander vorliegen und jeweils für ein Proteinsegment von 13kDa kodieren. Möglicherweise werden diese alternativ gesplitt, so dass dadurch kürzere Varianten entstehen. Die in der Literatur beschriebene

Spleißvariante, die für aa 396-1397 kodiert (JIANG *et al.*, 2002), hätte ebenfalls ein errechnetes Molekulargewicht, das der beobachteten Größe im "Western Blot" entspricht. Eine posttranslationelle Prozessierung bzw. Spaltung des Proteins ist für überexprimiertes NY-BR-1 Protein nicht beobachtet worden. In Immunpräzipitationen konnte reziprok mit dem anti-NY-BR-1 bzw. mit dem anti-FLAG Antikörper FLAG_NY-BR-1 Protein präzipitiert und im "Western Blot" detektiert werden (Abbildung 3.15). Da das Epitop des monoklonalen anti-NY-BR-1 Antikörpers bei aa 852-928 liegt und das FLAG-Epitop eine N-terminale Fusion ist, wird der N-Terminus nicht prozessiert. Das NY-BR-1_GFP Fusionsprotein wurde ebenfalls mit dem anti-NY-BR-1 sowie dem anti-GFP Antikörper detektiert, so dass eine Prozessierung des C-Terminus ebenfalls nicht vorliegt (Abbildung 3.14).

Um die Fragen nach endogenen Transkriptlängen, Proteinmolekulargewicht, verschiedenen Spleißvarianten, etc. abschließend klären zu können, müssen weitere Versuche unternommen werden, die Vollängen cDNA aus verschiedenen Geweben zu identifizieren.

4.3 Analyse der endogenen NY-BR-1 Expression

Das Brust Tumorantigen *NY-BR-1* zeigte eine Gewebe spezifische Expression in Testis, Brust und - sehr schwach - auch in Placenta, und ist in Brusttumoren auf mRNA Ebene in 84% exprimiert bzw. nach visueller Abschätzung im Vergleich zu normalem Brustgewebe in über 60% auf mRNA Ebene überexprimiert (JÄGER *et al.*, 2001). Expressionsanalysen mittels qPCR von 28 Patientenproben, davon 12 Primärtumoren, 13 Metastasen und 3 Pleuralergüsse, konnten diese Beobachtung bestätigen und auch quantitativ belegen, dass *NY-BR-1* in Brusttumoren im Vergleich zu normalem Brustgewebe überexprimiert ist. In 70% der Fälle waren *NY-BR-1* mRNA Mengen nachweisbar, die signifikant (Faktor 2 - ca. 90) über dem Expressionsniveau in normalem Brustgewebe lagen (Abbildung 3.10). cDNA „Microarray“ Analysen, die in Zusammenarbeit mit H. Sültmann (DKFZ, Heidelberg) mit 49 Patientenproben durchgeführt wurden, zeigten, dass *NY-BR-1* durchschnittlich im Vergleich zur Referenz RNA (UHRR) 2-fach überexprimiert war (Abbildung 3.12). Parallel wurde die RNA derselben Patienten auch für die Hybridisierung eines "whole genome Arrays" verwendet. Hier zeigten die Daten im Durchschnitt eine 6-fache Überexpression von *NY-BR-1* mRNA im Vergleich zur Normalisierung mit der Referenz RNA (SEIL *et al.*, Manuskript eingereicht). Weitere RT-PCR Analysen, die in der Gruppe von D. Jäger (NCT, Heidelberg) mit 50 Brust-Primärtumorproben mittels RT-PCR durchgeführt wurden, ergaben, dass von 50 Tumoren 38 auf Transkriptebene *NY-BR-1* positiv (77%) waren (SEIL *et al.*, Manuskript eingereicht). Wie einleitend schon erwähnt wurde, konnte die Überexpression von *NY-BR-1* in Brusttumoren und Metastasen in der Zwischenzeit auch

von anderen Gruppen mittels „Microarray“ Analysen bestätigt werden (JIANG *et al.*, 2002; RADVANYI *et al.*, 2005).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, dass *NY-BR-1* auf mRNA Ebene in über 70% der Brusttumoren im Vergleich zu normalem Brustgewebe überexprimiert ist. Der molekulare Mechanismus, der in Brusttumoren zu der beobachteten *NY-BR-1* Überexpression führt, ist nicht bekannt. Eine Überexpression als Folge von Genamplifikation in Brusttumoren kann anhand von CGH Datenbank Vergleichen (freundlicherweise durchgeführt von S. Joos, DKFZ, Heidelberg) jedoch ausgeschlossen werden. Daher erfolgt die Regulation der Expression auf Transkriptions- oder Translationsebene bzw. über posttranslationelle Modifikationen.

Mit Hilfe des monoklonalen anti-*NY-BR-1* Antikörpers konnte *NY-BR-1* Expression auch erstmalig in normalem Brustgewebe sowie in Brusttumor Metastasen auf Proteinebene in „Western Blot“ Analysen nachgewiesen werden (Abbildung 3.18). Immunhistochemische Analysen zeigten, dass *NY-BR-1* in Brusttumoren in Epithelzellen exprimiert ist (Abbildung 3.22). Die *NY-BR-1* Expression in normalem Brustgewebe war immunhistochemisch oftmals nur sehr schwach in Epithelzellen zu detektieren (SEIL *et al.*, Manuskript eingereicht, THEURILLAT *et al.*, Manuskript eingereicht), so dass *NY-BR-1* auch auf Proteinebene in Tumoren der Brust im Vergleich zu Normalgewebe überexprimiert zu sein scheint. Um diese Frage abschließend beantworten zu können, wären umfassende immunhistochemische Analysen, zum Beispiel mit "Tissue Arrays" notwendig. Ein "Tissue Array" mit über 2000 Brusttumorproben, von denen mehr als 1000 Primärtumoren sind, zeigt, dass die Expression dieses Differenzierungsantigens mit dem Tumorgrad assoziiert ist (Grad I 82%, Grad 2 69% und Grad 3 46% *NY-BR-1* positive Tumoren), aber unabhängig vom "Staging" des Tumors ist (THEURILLAT *et al.*, Manuskript eingereicht). Übereinstimmend mit den Ergebnissen der in dieser Arbeit analysierten Brust Metastasen, beschreiben die Autoren eine stabile *NY-BR-1* Expression im Primärtumor und in (Fern) Metastasen.

In Lysaten von Testisgewebe konnte das *NY-BR-1* Protein im „Western Blot“ und immunhistochemisch in Seminomen (Testistumor) ebenfalls nachgewiesen werden (Abbildung 3.22). Hier war *NY-BR-1* Expression hauptsächlich in atypischen Keimzellen zu beobachten. Interessanterweise ist *NY-BR-1* Expression auch in Prostata und Prostatatumoren beobachtet worden: Jäger *et al.* (2004) haben eine sporadische Expression basierend auf RT-PCR Daten in Prostata und in 25% der Prostata-Tumoren beschrieben. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass *NY-BR-1* in den getesteten Prostata Normalgeweben sowohl auf mRNA (qPCR) als auch auf Proteinebene ("Western Blot") exprimiert wird (Abbildung 3.11 A). Die beobachteten Unterschiede der *NY-BR-1* mRNA Expression in Prostatatumoren im Vergleich zu dem

jeweiligen korrespondierenden normalen Prostatagewebe ließen sich auf Proteinebene ebenfalls bestätigen. Im korrespondierenden Tumorgewebe ist die NY-BR-1 Expression im Vergleich zum Normalgewebe nicht reguliert bzw. sogar in 50% der Fälle schwach bis stark herunterreguliert (Abbildung 3.11, Abbildung 3.19).

Überraschenderweise erwies sich auch eine Probe aus normalem Nierengewebe, die als Negativkontrolle dienen sollte, in qPCR und "Western Blot" Analysen als NY-BR-1 positiv (Abbildung 3.11 B, Abbildung 3.20).

Jäger *et al.* (2004) haben verschiedene Normalgewebe vitaler Organe wie Lunge, Pankreas, Niere, Leber, Kolon sowie Uterus, Ovar und Prostata mittels RT-PCR auf *NY-BR-1* Expression getestet. Im Gegensatz zu diesen früheren Beobachtungen ist NY-BR-1 auch in Prostata und Niere exprimiert. Da aber das sogenannte Normalgewebe im allgemeinen bei der Operation eines Tumors entnommen wird, könnte die analysierte Nierenprobe auch deshalb NY-BR-1 positiv gewesen sein, weil sie zum Teil NY-BR-1 positive Tumorzellen enthalten hat. Oft ist auch die Probenbeschaffenheit nicht homogen, d.h., dass beispielsweise bei Brust viel Fettgewebe enthalten ist oder ein hoher Anteil an Bindegewebe vorliegt, so dass Proben abhängig Schwankungen im Expressionsmuster entstehen können. *NY-BR-1* Expression ist zum Beispiel nicht in jeder Gewebeprobe aus normaler Brust bzw. Prostata detektierbar (JÄGER *et al.*, 2004; JIANG *et al.*, 2002).

Nach dem bisher beschriebenen Expressionsmuster ist NY-BR-1 ein Differenzierungsantigen mit Expression in Testis und normalem Brustgewebe sowie verstärkter Expression bei Mammakarzinomen. Weiterhin ist NY-BR-1 in Prostatagewebe und zum Teil in Prostatatumoren exprimiert. Die Frage nach der Expression in weiteren Normalgeweben muß noch eingehend geklärt werden. So sollten jeweils mehrere Proben bzw. "Probenpools" im "Northern Blot" bzw. mit quantitativer PCR und im "Western Blot" getestet werden. Um die Probenbeschaffenheit besser kontrollieren zu können, wäre die immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten, bei denen sich verschiedene Zelltypen mikroskopisch unterscheiden lassen, für die Tumoren, aus denen RNA und Proteinlysate hergestellt werden, wünschenswert.

Im Gegensatz zu Brusttumoren und deren Metastasen konnte NY-BR-1 in einem *NY-BR-1* mRNA positiven Pleuralerguß einer Brustkrebspatientin auf Proteinebene nicht nachgewiesen werden (Abbildung 3.10, Abbildung 3.21). Die Expressionsanalyse der *NY-BR-1* mRNA in Brustkrebs und Prostata Zelllinien ergab, dass in 4 von 13 Zelllinien *NY-BR-1* mRNA Expression detektiert werden konnte, aber das Protein im "Western Blot" nicht nachweisbar war (Abbildung 3.9, Abbildung 3.17,

Tabelle 3.3). Im Vergleich zu normalem Brustgewebe waren die *NY-BR-1* mRNA level der Zelllinien 2-20-fach (qPCR) höher, und der "Northern Blot" belegt die Existenz zweier spezifischer *NY-BR-1* Banden für die Zelllinien (Abbildung 3.9, Abbildung 3.3). In normalem Brustgewebe konnte *NY-BR-1* detektiert werden, was in den Lysaten und unlöslichen Pelletfraktionen der Lysatpräparationen der Zelllinien trotz höherer mRNA Mengen nicht möglich war. Warum das *NY-BR-1* Protein in den gezeigten Versuchen nur in Primärtumoren und Metastasen und nicht in Zelllinien oder Pleuralergüssen nachgewiesen werden konnte, läßt sich derzeit nicht eindeutig sagen. Möglicherweise wird in Zelllinien eine Variante des Proteins exprimiert, der das Antikörper Epitop fehlt (C-Terminus deletiert, alternativ gesplitt). Da als Antigen für das anti-*NY-BR-1* Antiserum aus Huhn ebenfalls ein C-terminales Peptid eingesetzt wurde (Abbildung 3.5) und das Hühnerserum kein endogenes *NY-BR-1* erkennt, konnte dieses Serum nicht als Alternative dienen, um *NY-BR-1* Protein in Zelllinien nachzuweisen. Die Patientenseren, die anti-*NY-BR-1* Antikörper aufweisen, detektierten in Zelllinien ebenfalls kein endogenes Protein (Kapitel 3.3.2). Ersten Experimenten mit Proteasomeninhibitoren zu Folge liegt dies nicht daran, dass *NY-BR-1* über den proteasomalen Abbauweg sehr schnell nach der Translation degradiert wird (Kapitel 3.5.2). Möglicherweise wird *NY-BR-1* also nicht richtig translatiert. Bei der Herstellung stabiler Zelllinien war zu beobachten, dass im Gegensatz zu GFP exprimierenden Kontrollzellen nach 14 Tagen die Expression von *NY-BR-1_GFP* herunterreguliert wurde und entsprechend keine *NY-BR-1* Expression mehr zu beobachten war (Abbildung 3.52).

Die Überexpression im Tumor deutet darauf hin, dass die Expression von *NY-BR-1* eine wichtige Rolle bei der Tumorgenese *in vivo* spielen könnte, diese jedoch für die Haltung der Tumorzellen in Zellkultur nicht essentiell ist. Die Daten der "Tissue Arrays" zeigen, dass *NY-BR-1* Expression vom Differenzierungsgrad der Tumoren abhängig ist (THEURILLAT *et al.*, Manuskript eingereicht). Da Zelllinien, die aus Brusttumorgewebe etabliert wurden, im allgemeinen dedifferenziert erscheinen, ist eine Expression des Differenzierungsantigens *NY-BR-1* dementsprechend nicht plausibel. Es bleibt trotzdem unklar, weshalb die getesteten Zelllinien *NY-BR-1* mRNA, nicht aber *NY-BR-1* Protein aufweisen.

4.4 Studien zur subzellulären Lokalisation von NY-BR-1

Zur Identifikation funktioneller Domänen wurden verkürzte *NY-BR-1_GFP* bzw. FLAG-*NY-BR-1* Expressionskonstrukte generiert und in Zelllinien exprimiert (Kapitel 3.7, Kapitel 3.8). Ersten bioinformatischen Vorhersagen zu Folge, bei denen ein bipartite NLS sowie ein bZIP Motiv identifiziert wurde, könnte es sich bei *NY-BR-1* um einen putativen Transkriptionsfaktor handeln (JÄGER *et al.*, 2001). Die im Rahmen dieser Arbeit

durchgeführten Untersuchungen zu vorhergesagten Kernlokalisierungssignalen (NLS) haben ergeben, dass es einen Sequenzbereich gibt (aa 56-62 bzw. aa 56-74), der den Kerntransport von GST_NY-BR-1_GFP Fusionsproteinen vermitteln kann (Abbildung 3.4, Abbildung 3.24 - Abbildung 3.27). Es handelt sich dabei um ein im Vergleich zum Nukleoplasmin NLS schwaches NLS. Dieses Kernlokalisierungssignal stimmt jedoch nicht mit dem von Jäger *et al.* vorhergesagten Signal überein (JÄGER *et al.*, 2001), was die Bedeutung einer experimentellen Verifizierung bioinformatisch vorhergesagter Motive unterstreicht.

4.5 NY-BR-1 ist ein Membranprotein

Um die zelluläre Lokalisation des Volllängen NY-BR-1 Proteins zu bestimmen, wurden neben NY-BR-1 auch NY-BR-1_GFP bzw. FLAG_NY-BR-1 Fusionsproteine transient in unterschiedlichen Zelllinien exprimiert, die anschließend mit einem konfokalen Laser-scanning Mikroskop analysiert wurden (Kapitel 3.7.2). Die Bilder zeigen eindeutig eine membranständige Lokalisation des Volllängenproteins (Abbildung 3.28, Abbildung 3.29, Abbildung 3.30). Ein unphysiologisch hohes Level an Überexpression hatte eine zytoplasmatische NY-BR-1 Lokalisation zur Folge (Abbildung 3.29). Transient exprimiertes SV40NLS_NY_GFP Fusionsprotein z.B. ist hauptsächlich im Kern und nur zu einem geringen Anteil an der Membran lokalisiert (Abbildung 3.31). Ein starkes NLS, wie das SV40NLS, ist also in der Lage, das NY-BR-1 Volllängenprotein in den Kern zu transportieren. Angesichts der Tatsache, dass NY-BR-1 je nach Expressionsstärke membranständig und/oder zytoplasmatisch, nicht jedoch im Kern lokalisiert ist, läßt vermuten, dass das NLS im Kontext des Volllängenproteins nicht funktionell ist. Das NY-BR-1 "NLS" hat demnach keinen Einfluß auf die Membranlokalisierung; die Membranlokalisierung ist dominant. Möglich wäre, dass das "NLS" konformationsbedingt maskiert oder zu schwach ist, um den Transport des Volllängenproteins in den Kern zu vermitteln. Shiio *et al.* (2003) beschreiben NY-BR-1 als Chromatin assoziiertes Protein, das sie anhand eines massenspektroskopisch sequenzierten C-terminalen Peptids in ihrem „Screen“ identifiziert haben. Die Autoren räumen allerdings ein, dass bei ihrer Methode zur Anreicherung Chromatin assoziierter Proteine Artefakte auftreten können und die Möglichkeit nicht ausgeschlossen ist, zytoplasmatische Proteine und Membranproteine mit aufzureinigen.

Die bei der Sequenzanalyse vorhergesagte Chromosomen segregierende ATPase Domäne scheint keine funktionelle Bedeutung zu haben, da das NY-BR-1 Protein auch während der Mitose an der Membran lokalisiert (Abbildung 3.32).

In der vorliegenden Arbeit konnte mit verschiedenen Methoden gezeigt werden, dass NY-BR-1 ein Membranprotein ist und nicht etwa nur mit der Membran assoziiert vorliegt. Zum

einen wurde biochemisch über die Biotinylierung der Zelloberflächenproteine der Nachweis erbracht, dass sich Bereiche des Proteins auf der Zelloberfläche befinden (Abbildung 3.33). Zum anderen konnte sowohl in FACS Analysen als auch über indirekte Immunfluoreszenz NY-BR-1 mit dem monoklonalen anti-NY-BR-1 Antikörper auf der Zelloberfläche lebender, transfizierter 293T Zellen detektiert werden (Abbildung 3.34, Abbildung 3.36). Das bedeutet, dass der Sequenzbereich, der für das Epitop des Antikörpers kodiert, extrazellulär präsentiert wird. Weiterhin konnte mittels FACS und Immunfluoreszenz gezeigt werden, dass auch der N-Terminus auf der Zelloberfläche exprimiert wird (Abbildung 3.36). Die Vorhersage durch den ConPred Algorithmus, derzufolge NY-BR-1 zwei Transmembrandomänen (aa 147-167, aa 208-228), sowie einen extrazellulären N- und C-Terminus aufweist (Abbildung 3.39), unterstützt bioinformatisch die vorliegenden experimentellen Daten.

Lokalisationsstudien mit N- und C-terminalen NY-BR-1 Deletionsproteinen haben gezeigt, dass zwei Proteinregionen existieren, die eine Membranlokalisierung vermitteln können.

Das N-terminale Protein NY1-852 kodiert für die bioinformatisch vorhergesagten Transmembrandomänen sowie für ein potentielles Signalpeptid. Der Transport von Proteinen zur Membran wird meist durch entsprechende N-terminale Signalsequenzen vermittelt (TANG UND TENG, 2005). In der vorliegenden Arbeit konnten erste experimentelle Hinweise auf die Existenz einer Signalsequenz gefunden werden: Die Untersuchungen mit dem N-terminalen FLAG-Fusionsprotein FLAG_NY1-367 zeigen sehr deutlich eine Lokalisation des Proteins an der Plasmamembran, während das FLAG_NY56-367 Protein nukleo/zytoplasmatisch lokalisiert (Abbildung 3.40). Das Signalpeptid wird vermutlich nicht abgespalten, da das N-terminale FLAG-tag auf der Oberfläche von transfizierten 293T Zellen detektiert wird (Abbildung 3.36). Es fiel bei den Lokalisationsstudien auf, dass die Membranlokalisierung von FLAG_NY-BR-1 weniger deutlich erschien als beim NY-BR-1 Protein (Abbildung 3.28). Möglicherweise interferiert das FLAG-Epitop mit der Funktion des Signalpeptids. Grundsätzlich ist die Fusion von "tags" kritisch auf funktionelle Veränderungen hin zu prüfen. Für das NY-BR-1_GFP Fusionsprotein konnte keine veränderte zelluläre Lokalisation im Vergleich zum NY-BR-1 Protein beobachtet werden. Bei NY-BR-1 Deletionsmutanten führte die GFP-Fusion unter Umständen zu einer veränderten Proteinkonformation und infolge dessen zu einer veränderten Lokalisation. So ist zum Beispiel das NY56-396_GFP Fusionsprotein fast ausschließlich im Kern lokalisiert, während FLAG_NY56-367 hauptsächlich im Zytoplasma detektiert wird. In einigen Fällen wäre möglicherweise die Fusion kurzer C-terminaler "tags" sinnvoll.

Der C-terminale Anteil von NY-BR-1 (NY445-1397), der ebenfalls an der Membran detektiert wird, ist lediglich im Bereich der aa 1100-1250 hydrophob, und es wird keine Transmembrandomäne vorhergesagt (Abbildung 3.42, Abbildung 3.39). Der

Mechanismus, über den NY-BR-1 Fusionsprotein, dem sowohl die Membrandomänen als auch das Signalpeptid fehlen zur Membran transportiert wird, konnte in der vorliegenden Arbeit ansatzweise adressiert werden. Der Bereich, der für die Membranlokalisation verantwortlich ist, ließ sich über die Expression von Deletionsmutanten auf aa 908-1397 eingrenzen. Auffällig war die "lichterkettenartige" Lokalisation des NY908-1397_GFP Proteins (möglicherweise Aggregate) an der Membran (Abbildung 3.42). Desweiteren befindet sich im NY-BR-1 Protein bei aa 1382 eine putative Verankerungsstelle für einen GPI Anker (Abbildung 3.39), und es werden Motive innerhalb der Proteinsequenz vorhergesagt, die N-glykosyliert werden könnten (Kapitel 3.2). Die auffällige Lokalisation und die genannten möglichen Modifikationen legen die Möglichkeit einer Assoziation mit "lipid rafts" nahe (LEGLER *et al.*, 2005; BENTING *et al.*, 1999b). Als "lipid rafts" werden lipidreiche Mikrodomänen in der Membran bezeichnet, in denen mehrere Membranproteine zu funktionellen Komplexen assoziieren (SIMONS UND TOOMRE, 2000; SIMONS UND IKONEN, 1997).

Es existieren verschiedene Wege, über die Proteine an die Membran gelangen können (SCHULEIN, 2004). Membranproteine, die in der Plasmamembran bleiben, werden über den sekretorischen Weg transportiert. Für apikale Membranproteine sind im wesentlichen zwei Sortierungswege verantwortlich: ein "raft"-abhängiger für GPI-verankerte und einige Transmembranproteine sowie ein "raft"-unabhängiger Mechanismus (HELMS UND ZURZOLO, 2004). Erste Experimente mit NY908-1397_GFP exprimierenden 293T Zellen konnten diese Assoziation über eine teilweise Kolo-kalisation mit der Alexa 647 konjugierten Cholera-toxin B Untereinheit zeigen (Abbildung 3.43). Die B Untereinheit des Cholera-toxins bindet mit hoher Affinität das mit „rafts“ assoziierte GM1 Protein (SHOGOMORI UND FUTERMAN, 2001). Das kürzere Fusionsprotein, das NY908-1171_GFP Protein, fehlt die GPI Verankerungsstelle sowie die N-Glykosylierungsstelle und folgerichtig zeigt dieses Protein eine zytoplasmatische Lokalisation in 293T Zellen (Abbildung 3.42). Um allerdings abschließend eine Assoziation mit "lipid rafts" klären zu können, müssen die Experimente mit dem Voll-längenprotein wiederholt und umfassende biochemische und zellbiologische Analysen dazu durchgeführt werden. Die Tatsache, dass NY-BR-1 in Gewebeproben ausschließlich in der Triton-X-100 unlöslichen Fraktion im "Western Blot" nachgewiesen werden konnte, stellt einen weiteren Hinweis darauf dar, dass NY-BR-1 in "lipid rafts" lokalisiert. Unklar bleibt, ob und wie beide "Membrandomänen" miteinander interagieren und über welchen Weg NY-BR-1 letztendlich zur Membran gelangt.

Denkbar wäre für das NY-BR-1 Voll-längenprotein eine zusätzliche Verankerung des C-Terminus über einen GPI Anker. Alternativ könnte NY-BR-1 abhängig vom Zelltyp als ein GPI-verankertes oder als ein Transmembranprotein existieren, wie es für den Fc γ

Rezeptor III beschrieben ist (RAVETCH UND PERUSSIA, 1989; SELVARAJ *et al.*, 1989). In NK Zellen ist der Fc γ Rezeptor III (CD16) als Transmembranprotein exprimiert und in Neutrophilen liegt das Molekül als GPI verankertes Protein vor. In Abbildung 4.1 ist eine mögliche Topologie des NY-BR-1 Proteins unter Berücksichtigung der experimentell identifizierten Domänen dargestellt. Weitere Studien sollen Aufschluß darüber geben können, welchen Effekt die Mutation der potentiell modifizierten Aminosäuren (für GPI und N-Glykosylierung) auf die Lokalisation des Vollängenproteins hat und ob ein synergistischer Effekt der Motive vorliegt.

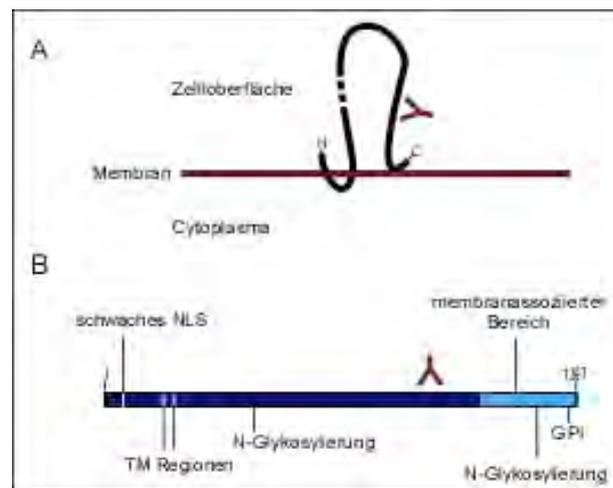


Abbildung 4.1 | Mögliche Topologie des NY-BR-1 Proteins. **A** | NY-BR-1 ist ein Membranprotein: Der N- und C-Terminus von NY-BR-1 befinden sich auf der Zelloberfläche. Der gestrichelte Bereich deutet den mittleren Bereich des Proteins an, für den keine Informationen zur Topologie vorliegen. **B** | Schematische Übersicht der experimentell identifizierten Domänen (Beschriftung oben) und bioinformatisch vorhergesagter Regionen (Beschriftung unten). Das rote "Y" markiert die Bindungsstelle des monoklonalen anti-NY-BR-1 Antikörpers (A/B).

In immunhistochemischen Färbungen ist für endogenes NY-BR-1 ebenfalls eine membranständige Expression in einigen Brust Karzinomzellen und Seminomzellen zu beobachten (Abbildung 3.44). In den meisten Zellen ist endogenes NY-BR-1 bei diesen Analysen allerdings im Zytoplasma zu sehen. Es scheint dort aber nicht homogen exprimiert zu werden, sondern weist eine eher vesikuläre/granuläre Lokalisation auf. Diese Beobachtung erklärt, weshalb NY-BR-1 ausschließlich in der Pelletfraktion, in der alle Membranbestandteile sowie intrazelluläre Organellen enthalten sind, und nicht als lösliches zytoplasmatisches Protein im "Western Blot" detektiert werden kann.

4.6 NY-BR-1 Interaktionspartner/Dimerisierung

In der Literatur konnte bisher für NY-BR-1 keine Funktion beschrieben werden. Durch "*in silico*" Analysen und Datenbankvergleiche der NY-BR-1 Proteinsequenz sollten Hinweise auf die physiologische Rolle von NY-BR-1 erhalten werden. Sequenzvergleiche mit

homologen Proteinen anderer Spezies ergaben jedoch keine signifikanten Ähnlichkeiten zu bereits bekannten Proteinen. Die bioinformatische Analyse der NY-BR-1 Proteinsequenz ließ keinen eindeutigen Rückschluß auf eine Funktion zu. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass NY-BR-1 ein Membranprotein mit einem kurzen intrazellulären "loop" ist, das weder während der Mitose an den Chromosomen noch im Kern lokalisiert ist. Diverse Motive, die in der Sequenz von NY-BR-1 vorhergesagt werden, wie zum Beispiel Ankyrin Wiederholungen und eine leucinreiche Region, deuten auf Protein-Protein-Interaktionsdomänen hin (Abbildung 3.4). Die Interaktion von Proteinen ist essentiell für alle biologischen Prozesse. So ist zum Beispiel die Dimerisierung bzw. Multimerisierung von Transkriptionsfaktoren oder Membranrezeptoren für die Signaltransduktion wichtig. Rezeptortyrosinkinasen, zum Beispiel Mitglieder der EGFR Familie, dimerisieren ligandeninduziert und werden dabei durch Autophosphorylierung aktiviert (KING UND SARTORELLI, 1989; SPIVAK-KROIZMAN *et al.*, 1992).

Die Dimerisierung bzw. Multimerisierung von NY-BR-1 wurde mittels Immunpräzipitation untersucht. NY-BR-1 ist in der Lage, mit sich selbst zu interagieren (Abbildung 3.45). Experimente mit dem NY609-1397 Deletionskonstrukt zeigten, dass der C-Terminus dimerisiert bzw. mit dem Volllängenprotein interagieren kann (Abbildung 3.46). Ein weiteres Eingrenzen des Interaktionsbereiches innerhalb des C-Terminus fehlt derzeit. Ob auch der N-Terminus, der für Ankyrin Wiederholungen kodiert, mit Volllängen NY-BR-1 interagiert, wurde bisher nicht getestet.

Um Interaktionspartner von NY-BR-1 zu indentifizieren, die Hinweise auf eine Funktion liefern könnten, wurde ein Hefe-Zwei-Hybrid („Yeast-Two-Hybrid“, YTH) Versuch in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. E. Wanker/Uli Stelzl (Berlin) durchgeführt. In dem YTH konnten 5 potentielle Interaktionspartner identifiziert werden (Tabelle 3.4). Die Relevanz dieser Bindungen bzw. Bindungspartner ist noch nicht weiter untersucht worden.

Zu diesem Zeitpunkt war nicht bekannt, dass NY-BR-1 als Membranprotein fungiert und fast ausschließlich extrazelluläre Bereiche aufweist. Deshalb wäre es wünschenswert, ein neues System für die Auffindung von NY-BR-1 Bindungspartnern zu wählen, das am ehesten den *in vivo* Bedingungen entspricht, so dass Membranproteine auch in ihrer Membranumgebung miteinander interagieren können. Hierfür wäre ein modifizierter YTH Versuch, wie z.B. ein "split ubiquitin membrane based YTH" (STAGLJAR *et al.*, 1998) sinnvoll, der speziell für Membranproteine entwickelt wurde. Im Gegensatz zu konventionellen YTH, bei denen die Interaktionen im Hefe-Nukleus stattfinden, repräsentiert der Membran basierte YTH „Assay“ ein *in vivo* System, das Interaktionen von Membranproteinen in ihrer natürlichen Membranumgebung zuläßt. Ein weiteres

Zellkultur basiertes System, der "One STrEP Assay" (Firma Iba) bietet ähnlich wie ein GST-Pulldown Versuch die Möglichkeit, Interaktionspartner in Säugerzellen nachzuweisen. Die Identifizierung der Bindungspartner erfolgt dann über SDS-PAGE und Massenspektroskopie. Zudem wären auch Techniken, wie "Far-Western" oder "Phage Display" geeignet, um die Suche nach Bindungspartnern zu wiederholen.

4.7 Studien zur Funktion des NY-BR-1 Proteins

Eine Voraussetzung für die Durchführung funktioneller Studien ist ein geeignetes Zellkultursystem bzw. ein Tiermodell. Um einerseits die Folgen einer Überexpression sowie andererseits den Effekt der Herunterregulation von NY-BR-1 über siRNA (Abbildung 3.23) untersuchen zu können, wäre ein brustspezifisches Zellkultursystem sinnvoll. Im Rahmen dieser Arbeit konnte weder ein Brustzell-Modell noch ein anderes System mit endogenem NY-BR-1 etabliert werden, da NY-BR-1 zum einen in den untersuchten Zelllinien nicht auf Proteinebene exprimiert wird und sich zum anderen die für ein Zellkulturmodell geeigneten Zelllinien nicht effizient transfizieren ließen (Tabelle 3.3, Tabelle 3.5). Transient transfizierte MCF-7 oder HeLa Zellen, die für die Herstellung stabiler Zelllinien benutzt werden sollten, zeigten nach einer 14 tägigen Selektion mit G418-haltigem Zellkulturmedium keine NY-BR-1 Proteinexpression mehr (Abbildung 3.52).

Verschiedene Transfektionstechniken konnten nicht zur Lösung dieses Problems beitragen. Auch wenn die Effizienz in bestimmten Linien für das GFP-Leerplasmid z.B. durch Nukleofektion erhöht werden konnte, wurde NY-BR-1_GFP generell in max. 10% der Zellen detektiert (Tabelle 3.5). Deshalb wurde ein transientes Transfektionsmodell mit 293T Zellen verwendet. Für zukünftige Experimente wäre entsprechend ein induzierbares Zellkulturmodell wünschenswert. Da für NY-BR-1 ein Maushomolog durch Datenbankvergleiche ein Maushomolog identifiziert werden konnte, wären langfristig "knock out" bzw. "knock in" Mäuse sinnvoll, um die *in vivo* Funktion die Rolle von NY-BR-1 während der Entwicklung klären zu können. Das Maushomolog ist ebenfalls ein nicht charakterisiertes, unbekanntes Protein, so dass dafür umfassende Vorarbeiten, wie die Klonierung der kodierenden und der genomischen Sequenz und entsprechende Expressionsanalysen nötig wären.

4.7.1 Weichagar-Versuch

Onkogene können unter bestimmten Bedingungen die zelluläre Kontrolle der Proliferation, des Zelltods, der Migration und der Adhäsion beeinflussen, so dass sie eine neoplastische Transformation verursachen. Viele überexprimierte Onkogene, wie H-Ras und ErbB2, haben die Fähigkeit, NIH3T3 Zellen *in vitro* zu transformieren (FUNATO *et al.*, 1994;

BAASNER *et al.*, 1996). Bei nicht transformierten Zellen wird durch den Verlust oder die Veränderung von Zell-Zell-Kontakten Apoptose (Anoikis) ausgelöst (VALENTIJN *et al.*, 2004). Um zu untersuchen, ob NY-BR-1 transformierendes Potential besitzt, wurden Weichagar-Versuche mit transfizierten NIH3T3 Zellen durchgeführt (Abbildung 3.53). Die Überexpression von NY-BR-1 in NIH3T3 Fibroblasten führte zur Transformation dieser Zellen und zur Kolonienbildung im Weichagar. Als Positivkontrolle dienten stabil ErbB2 exprimierende NIH3T3 (NIH3.7) Zellen (HARWERTH *et al.*, 1993). Im Proliferationsversuch waren für NY-BR-1 exprimierende NIH3T3 Zellen vergleichbare Werte gemessen worden wie für die Positivkontrolle. Für NIH3T3 Zellen, die entweder mit dem pcDNA3.1 Leervektor transfiziert wurden oder transient GFP exprimierten, wurden ähnliche Werte im XTT-Versuch gemessen wie für die Wildtypzellen. Interessant an diesen Beobachtungen ist ferner, dass schon die schwache NY-BR-1 Expression in NIH3T3 Zellen (Transfektionseffizienz von max. 5%) im Weichagar-Versuch einen signifikanten Wachstumsvorteil für transfizierte Zellen im Vergleich zu Wildtypzellen bedeutete. Ob NY-BR-1 Expression auch *in vivo* die Bildungen von Tumoren auslöst, soll zukünftig durch Injektion von NY-BR-1 exprimierenden Zellen in Nacktmäusen untersucht bzw. bestätigt werden. Geeignet wären hierfür entweder die NIH3T3 Zellen oder Brustzelllinien, wie zum Beispiel die murine HC11 Zelllinie (BALL *et al.*, 1988). Auch primäre MECs („mouse mammary epithelial cells“), die nach Transfektion transplantiert werden, wären geeignet. Transfektionen wurden im Rahmen dieser Arbeit sowohl mit HC11 Zellen als auch mit isolierten MECs zu diesem Zweck durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Die Transfektionseffizienz von max. 5% war jedoch zu gering für Transplantationsexperimente mit Nacktmäusen. Um die ektopische NY-BR-1 Expression in diesen Zellen zu erhöhen, werden zukünftige Studien mit Hilfe eines viralen Expressionsvektors durchgeführt.

4.7.2 Adhäsionsversuch

Der Prozess der Metastasierung setzt eine koordinierte Interaktion von Tumorzelle und extrazellulärer Matrix voraus (DE WEVER UND MAREEL, 2003; BEN-ZE'EV *et al.*, 2000). Nach dem Einbruch der Tumorzellen in das Blutgefäßsystem und ihrer Verteilung mit dem Blut spielt beim Verlassen der Gefäße (Extraversion) die Interaktion der Tumorzellen mit Endothelzellen und der endothelialen extrazellulären Matrix eine wichtige Rolle. Der Einfluß von Proteinen bzw. Onkogenen auf die Fähigkeit von Zellen, auf Endothelzellen zu adhären läßt sich experimentell in einem Adhäsionsversuch abschätzen. In Ermangelung eines Brust spezifischen Systems, wurde hier das Transfektionsmodell mit 293T Zellen verwendet. Bei diesem Versuch wurden nicht transfizierte und transfizierte 293T Zellen bezüglich ihrer Adhäsion an humane Endothelzellen untersucht (Abbildung 3.54). Im Vergleich zu den Kontrollzellen, die entweder mit dem Leerplasmid oder dem

GFP-Vektor transfiziert wurden, zeigten NY-BR-1 exprimierende 293T Zellen eine erhöhte Adhäsionsfähigkeit auf Endothelzellen.

Der molekulare Mechanismus, der diesen Beobachtungen zu Grunde liegt, ist bisher nicht verstanden. Oftmals wird für metastasierende Zellen eine Korrelation von Metastasierung und geringerer Überlebensrate mit einer verminderten Expression von Adhäsionsproteinen wie z.B. E-Cadherin beobachtet (Ji *et al.*, 1997). Andererseits ist die Expression von Integrinen in Tumoren nicht einheitlich reguliert ist. Für transformierte Zellen wurde in verschiedenen Tumoren sowohl deren Überexpression als auch eine verminderte Expression verschiedener Integrinuntereinheiten im Vergleich zu Normalgewebe beschrieben (FAWCETT UND HARRIS, 1992; HEINO, 1993). So zeigen zum Beispiel NIH3T3 Zellen, die zuvor durch stabile ErbB2 Expression transformiert wurden, *in vitro* bei gleichzeitiger Überexpression der Integrin alpha 4 Untereinheit sogar eine erhöhte Invasivität (GAMBALETTA *et al.*, 2000). Deshalb wäre es möglich, dass NY-BR-1 Expression nicht nur zur Transformation bestimmter Zellen beiträgt, sondern auch gleichzeitig die Fähigkeit der Zellen beeinflusst zu migrieren bzw. nach Migration an Endothelzellen zu adhären. Eine eingehende Analyse des Invasions- bzw. Migrationsverhaltens NY-BR-1 exprimierender Zellen ist Gegenstand weiterer Untersuchungen. Zukünftige Experimente (FACS Analysen und/oder "Western Blot" Analysen) werden klären, ob durch NY-BR-1 Expression Adhäsionsproteine, wie z.B. Cadherine bzw. Integrine bezüglich ihrer Expression ebenfalls reguliert werden oder ob NY-BR-1 möglicherweise sogar selbst als Adhäsionsprotein fungiert. In weiterführenden Lokalisationsstudien und Co-Immunpräzipitationen könnte untersucht werden, ob NY-BR-1 mit entsprechenden Adhäsionsproteinen kolokalisiert bzw. interagiert.

Die Durchführung von sogenannten ELISA-basierten "Phosphoassays" könnte dazu beitragen, Signaltransduktionswege zu identifizieren, die durch NY-BR-1 aktiviert werden bzw. in denen NY-BR-1 beteiligt ist. Dabei wird auch interessant sein zu untersuchen, ob NY-BR-1 einerseits bei der Signaltransduktion zum Beispiel durch Phosphorylierung modifiziert wird und ob dies ligandenabhängig (z.B. +/- FCS) geschieht.

Zusammenfassend läßt sich anhand dieser Zellkultur-Daten feststellen, dass NY-BR-1 offensichtlich transformierendes Potential aufweist und die Adhäsionsfähigkeit NY-BR-1 exprimierender Zellen an Endothelzellen erhöht.

4.8 Klinische Relevanz des Brust Tumorantigens NY-BR-1

Unter den Behandlungsmöglichkeiten bei Krebserkrankungen gewinnt die Immuntherapie zunehmend an Bedeutung. Seit Jahren wird nach Tumorantigenen gesucht, die als Zielstrukturen dafür genutzt werden können, das zytolytische Potential des

Immunsystems gegen Krebs auszunutzen (SIMPSON *et al.*, 2005a; OLD, 1981; BOON UND OLD, 1997). Die ersten Vakzinierungen wurden mit inaktivierten Tumorzellen (Tumorzelllinien) durchgeführt. Trotz beachtlicher Erfolge im Mausmodell birgt diese Strategie das Risiko, Autoimmunität auszulösen (LUDEWIG *et al.*, 2000; OVERWIJK *et al.*, 1999; VAN ELSAS *et al.*, 2001; DUDLEY *et al.*, 2002). Viele Vakzine, die basierend auf Tumor assoziierten Antigenen entwickelt wurden, haben bereits in präklinischen Studien bewiesen, dass sie in der Lage sind, tumorspezifische Immunantworten auszulösen und ein Immungedächtnis ohne Autoimmunität zu etablieren (SOARES *et al.*, 2001; VAN DER BRUGGEN *et al.*, 2002; SCANLAN *et al.*, 2002). So haben sich beispielsweise in Vakzinierungsstudien mit Brustkrebspatienten die Tumorantigene Her2/neu (DISIS *et al.*, 2002), MUC-1 (APOSTOLOPOULOS *et al.*, 1999), MAGE-3 (CHOMEZ *et al.*, 2001), Mammaglobin (TANAKA *et al.*, 2003) oder CEA (SCHLOM *et al.*, 1996) als immunogene therapeutische Zielproteine erwiesen, ohne dass durch Vakzinierung Autoimmunität ausgelöst wurde (zur Übersicht siehe NESTLE, 2002).

Obwohl bis heute über 100 verschiedene Tumorantigene beschrieben wurden, sind die meisten von ihnen "Auto-Antigene", die Tumor assoziiert, aber nicht tumorspezifisch sind und auch in Normalgeweben exprimiert werden (RENKVIST *et al.*, 2001). Virale Onkogene und mutierte Auto-Antigene hingegen sind tumorspezifisch, machen aber nur einen geringen Prozentsatz der bekannten Tumor assoziierten Antigene aus. Abgesehen vom Melanom, dem klassischen Beispiel eines immunogenen Tumors, gibt es sehr viel weniger geeignete TAA für Brust-, Prostata-, Lungen-, Nieren-, Darm- und Pankreaskrebs. Erschwerend kommt hinzu, dass die TAA Expression oft nicht in allen Patientenpopulationen und im individuellen Tumor gegeben ist. Eines der potentesten Tumorantigene, das in Brustkrebs überexprimiert ist, ist Her2/neu. Es wird in ca. 30% aller IDC überexprimiert. Mutiertes P53, ein potentiell Target zytotoxischer T-Zellen, wird in 40% aller epidermalen Tumoren exprimiert. Das Tumorantigen CEA ("carcinoembryonic antigen") wird in nahezu 100% aller Kolonkarzinome exprimiert (RADVANYI, 2004). Für die Entitäten Brust-, Prostata- und Lungenkrebs werden jedoch dringend neue Antigene mit einem breiteren Anwendungsspektrum benötigt bzw. solche, die mit den bereits bekannten kombiniert werden können. Auch besteht ein dringender Bedarf sowohl an diagnostisch als auch prognostisch relevanten Tumormarkern, um eine frühzeitige und zuverlässige Detektion des Tumors und eine optimale Therapie zu ermöglichen. Das Brust Tumorantigen NY-BR-1 ist aufgrund seines Expressionsprofils und seiner Immunogenität sowohl für die Diagnose als auch für neue immuntherapeutische Strategien von großem Interesse.

4.8.1 NY-BR-1 als diagnostischer und prognostischer Marker für Brustkrebs

NY-BR-1 ist in über 70% der Brusttumoren exprimiert (Abbildung 3.10, Abbildung 3.12, SEIL *et al.*, eingereicht) und könnte deshalb als ein wertvoller diagnostischer bzw. prognostischer Tumormarker fungieren. Zum einen wäre die Detektion von im Blut und in der Lymphe zirkulierenden Tumorzellen mit *NY-BR-1* als Marker denkbar. Erste Untersuchungen zeigten bereits, dass *NY-BR-1* vor allem in Kombination mit *Mammaglobin* hierfür geeignet ist (ZEHENTNER *et al.*, 2002; REINHOLZ *et al.*, 2005). Zum anderen könnte *NY-BR-1* als prognostischer Tumormarker eingesetzt werden. Trotz aller Fortschritte bei der Identifizierung von Tumorantigenen ist nach wie vor die immunhistochemische Validierung der "gold standard" für die Expression eines Antigens im Gewebe und um Zusammenhänge zwischen Tumor Histotyp und Stadium herzustellen (RADVANYI, 2004). Theurillat *et al.* (Manuskript eingereicht) haben in "Tissue Arrays" mit über 1000 Brusttumorproben eine Co-Expression von *NY-BR-1* und dem Östrogen Rezeptor alpha (ER) in 77% der ER positiven Tumoren festgestellt. 69% der ER negativen Tumoren waren *NY-BR-1* negativ. Im Gegensatz dazu ist die *NY-BR-1* Expression invers mit der ErbB2 Expression korreliert. Über 60% der ErbB2 negativen und EGFR negativen Tumoren zeigten *NY-BR-1* Expression. Außerdem ist *NY-BR-1* Expression entsprechend mit einer guten Prognose assoziiert (THEURILLAT *et al.*, Manuskript eingereicht). Wie einleitend schon erwähnt, zählen ER positive Brusttumoren zu denjenigen mit einer guten Prognose, während die ER negativen und ErbB2 positiven eher eine schlechte Prognose aufweisen.

Zusammenfassend lässt sich anhand dieser Daten die Aussage treffen, dass *NY-BR-1* zusammen mit ER, PR und ErbB2 auch als wertvoller Marker für die Diagnose von Brustkrebs mittels Immunhistochemie dienen könnte. Da mittlerweile ein anti-*NY-BR-1* Antikörper zur Verfügung steht, wären entsprechende IHC-Färbungen für *NY-BR-1* nun durchführbar.

4.8.2 NY-BR-1 als neues Target für die Immuntherapie?

Mit Hilfe der SEREX Methode lassen sich spontane humorale Immunantworten gegen autologe Proteine eines Tumors detektieren. Da *NY-BR-1* ursprünglich in einem SEREX „Screen“ identifiziert wurde (JÄGER *et al.*, 2001; JÄGER *et al.*, 2002b), sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, mit welcher Häufigkeit bei "*NY-BR-1* positiven" Brustkrebspatienten anti-*NY-BR-1* Antikörper im Serum auftreten. Hierzu wurden Lysate von transfizierten und nicht transfizierten 293T Zellen im "Western Blot" zunächst mit einer Auswahl an Patientenseren analysiert (Abbildung 3.50). Im Gegensatz zu rekombinantem

Protein aus Bakterien bietet das in 293T Zellen exprimierte NY-BR-1 Protein den Vorteil, dass auch Serum Antikörperantworten detektiert werden, die gegen modifizierte Epitope gerichtet sind. Sinnvoll wäre es, die Seren mit endogenem NY-BR-1 Protein (z.B. normales Brustgewebe) zu testen. Zwar war es möglich, endogenes NY-BR-1 in normalem Brustgewebe auf diese Weise zu detektieren, aber der Test von weiteren 50 Seren von Brustkrebspatienten und Seren von gesunden Individuen hat gezeigt, dass unspezifische Reaktionen das Ergebnis verfälschen (Abbildung 3.51). Demnach wären über 50% der Seren NY-BR-1 positiv. Im Paralleltest mit transfizierten 293T Zelllysaten wurden bei 7% der NY-BR-1 positiven Patienten Antikörper gegen NY-BR-1 festgestellt (SEIL *et al.*, eingereicht). Diese Ergebnisse zeigen, dass je nach Sensitivität des Tests und Antikörperkonzentration im Patientenserum mindestens 7% der NY-BR-1 positiven Tumorpatienten auch in der Serologie positiv sind. Für das Tumorantigen NY-ESO-1 werden spontane humorale und zelluläre Immunantworten in 50% der Fälle beschrieben (JÄGER *et al.*, 2001). Generell werden jedoch nur geringe Konzentrationen an Serum Antikörpern gegen Tumorantigene beobachtet (CORONELLA-WOOD UND HERSH, 2003). So haben beispielsweise 20% der Patienten mit ErbB2 überexprimierenden Tumoren anti-ErbB2 Serum-Antikörper, aber die Antikörpermengen liegen 20-fach unter einer therapeutischen, effektiven *in vivo* Dosis (DISIS *et al.*, 1997). Bei einem Teil der Patienten könnte aber die bereits vorhandene spontane humorale Immunantwort durch Vakzinierungen stimuliert werden.

Bei der Diagnose von Brustkrebs wären serologische Schnelltests hilfreich. Grundsätzlich wäre hierfür die Etablierung eines ELISAs ("Enzyme-linked Immunosorbent assay") oder eines "Western Blot" basierten Tests zur Detektion von anti-NY-BR-1 Antikörpern im Serum von Patienten wünschenswert, die den gleichzeitigen Nachweis von Serumantikörpern gegen weitere Tumorantigene erlauben. Da Expression und Reinigung des Volllängen NY-BR-1 Proteins in *E.coli* problematisch ist, müssten für ELISAs evtl. rekombinante Teilproteine gepoolt werden oder aber in eukaryontischen Zellen (Insekten, Hefe) exprimiertes Protein eingesetzt werden. Alternativ wären auch "Western Blot" Analysen mit rekombinantem oder in Säugerzellen überexprimiertem NY-BR-1 durchführbar.

Weiterhin wäre es hilfreich, die Ursache für die Immunogenität von NY-BR-1 zu klären. Liegt im Tumor mutiertes, anders modifiziertes oder alternativ gespleißtes Protein vor, wie zum Beispiel bei hypoglykosyliertem MUC-1, das in Folge dessen immunogen wirkt? Sollte das der Fall sein, dann müsste das bei der Wahl des Antigens für entsprechende Tests berücksichtigt werden. Die "Western Blot" Analysen zeigen, dass zumindest keine Modifikationen, die die Proteingröße maßgeblich verändern, auftreten. Das detektierte Protein hat in allen untersuchten Normalgeweben und Tumoren dieselbe Größe, und

Patientenseren detektieren dasselbe Protein wie der monoklonale Antikörper (ohne weitere Banden). Bei Prostatakrebspatienten oder Patienten anderer Krebserkrankungen wurde die Serologie bisher nicht näher untersucht, sie soll aber zukünftig geprüft werden.

4.8.2.1 NY-BR-1: Antikörper basierte Therapien?

Zelloberflächenantigene sind potentielle Zielproteine für antikörperbasierte Therapien bei der Behandlung von Krebs, die allein oder in Kombination mit einer Chemotherapie bereits erfolgreich in der Klinik angewendet werden (CARTER, 2001; CARTER *et al.*, 2004). Der große Vorteil beim Einsatz von Antikörpern ist, dass sie direkt ihren anti-Tumoreffekt entweder über das Komplementsystem oder durch Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC, "Antibody dependent cell mediated cytotoxicity") ausüben können. IgG und IgM Antikörper aktivieren das Komplementsystem über den klassischen Weg nur dann, wenn sie auf der Zelloberfläche an das jeweilige Antigen gebunden sind. Diese Aktivierungskaskade führt dazu, dass die Zellen für Phagozytose markiert oder über die Bildung eines membranzerstörenden Komplexes lysiert werden.

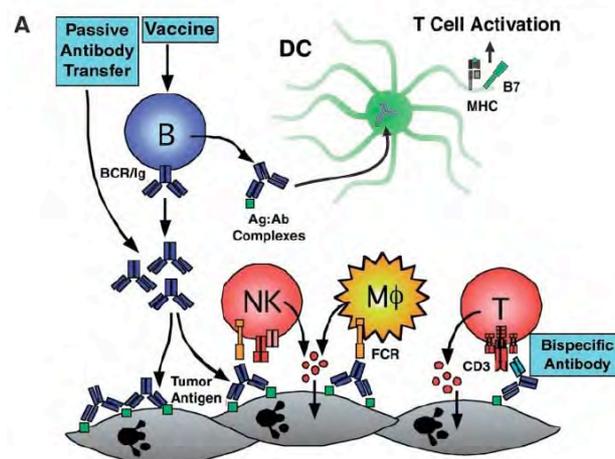


Abbildung 4.2 | Manipulation der humoralen Immunantwort (nach BLATTMAN UND GREENBERG, 2004). Die B-Zell Antwort kann durch Vakzinierung mit Tumorantigenen gesteigert werden, um die Produktion von Antikörpern zu induzieren, die Tumorzellen killen und Antigenpräsentation fördern. Passiv transferierte monoklonale Antikörper oder bispezifische Antikörper können an Antigene auf Tumorzellen binden und so Effektorzellen aktivieren. BCR/Ig: B-Zellrezeptor; Ag:Ab: Antigen:Antikörper.

Bei der ADCC werden Natürliche Killer (NK) Zellen rekrutiert, die über ihren Fc-Rezeptor (CD16) den konstanten Teil des Antikörpers binden und ihre zytolytische Effektorfunktion über Perforin und Granzym B direkt ausüben können. Weitere Zelltypen, die auf diese Weise aktiviert werden, schließen Phagozyten (Makrophagen und Neutrophile) sowie Mastzellen, Basophile und Eosinophile Zellen ein. Diese Zellen können alternativ ebenfalls durch das Komplementsystem rekrutiert werden, das wiederum seinerseits initial

über Antikörper aktiviert wurde (s.o.). Eine Zusammenfassung darüber, wie eine humorale Immunantwort *in vivo* manipuliert werden kann, ist in Abbildung 4.2 dargestellt.

Die für die Klinik zugelassenen therapeutischen Antikörper üben ihre anti-Tumorwirkung über eine Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen aus (Tabelle 4.1). Herceptin beispielsweise löst Zellzyklusarrest aus, sensitiviert Tumorzellen für Radio- und Chemotherapie und verursacht ADCC.

Tabelle 4.1 | Anti-Tumor Aktivität therapeutischer monoklonaler Antikörper (aus CARTER *et al.*, 2004).

Tumor activities <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	Representative clinical examples ¹
Growth inhibition	
Cell cycle arrest	Herceptin, Erbitux
Sensitization to other agents	
Chemotherapy	Herceptin, Rituxan, Erbitux
Radiotherapy	Herceptin, Erbitux
Apoptosis	
Activation of proapoptotic pathway	Rituxan
Death receptor activation	anti-Trail-R1, anti-Trail-R2 agonist antibodies
Inhibition of anti-apoptotic pathway	
Growth factor antagonism	Erbitux, Omnitarg, ABX-EGF, HuMax-EGFr
Secondary immune functions	
Antibody dependent cellular cytotoxicity	Herceptin, Rituxan, Erbitux, Campath-1H, HuMax-CD20,
Complement dependent cytotoxicity	Rituxan, Campath-1H, HuMax-CD20,
Anti-angiogenic	
Angiogenic ligand or receptor antagonist	Avastin
Indirect	Herceptin, Erbitux
Inhibition of invasion/ metastasis	Erbitux

¹Sources: ABX-EGF (E7.6.3 (Yang *et al.* 1999, Foon *et al.* 2004)); anti-Trail-R1, anti-Trail-R2; www.cambridgeantibody.com; Avastin (Ferrara 2002, Salgaller 2003); Campath-1H (Schulz *et al.* 2000); Erbitux (C225 (Mendelsohn 2000)); Herceptin (Sliwkowski *et al.* 1999, Baselga *et al.* 2001); HuMax-CD20 and HuMax-EGFR (Glennie & van de Winkel 2003); Omnitarg (rhuMAb2C4 (Agus *et al.* 2002, Mendoza *et al.* 2002)); Rituxan (Cemy *et al.* 2002, Maloney *et al.* 2002). See also: Carter (2001), Milenic (2002), Ludwig *et al.* (2003).

Eine weitere wichtige Funktion von tumorspezifischen Antikörpern ist die Oponierung der Tumorzellen mit Antikörpern, wodurch ihre Aufnahme durch DC (Bindung über Fc Rezeptor γ) verbessert und sowohl CD8⁺ als auch CD4⁺ T-Zellantworten stimuliert werden. Groh *et al.* haben höhere Tumorantigen spezifische CD8⁺ T-Zellzahlen beobachtet, nachdem sie T-Zellkulturen gesunder Donoren mit DCs stimuliert haben, die zuvor mit anti-MICA ("MHC class I chain-related protein A") Antikörpern opsoniert und mit Peptiden oder Brusttumor Zellen beladen wurden (GROH *et al.*, 2005). NY-BR-1 positive Zelllinien zeigten dabei einen stärkeren Effekt als NY-BR-1 negative. Interessanterweise handelt es sich dabei unter anderem um eine Zelllinie (MDA MB 453), die gemäß den in dieser Arbeit durchgeführten Analysen lediglich auf mRNA Ebene NY-BR-1 positiv war. Da diese Gruppe die NY-BR-1 Expression nicht auf Proteinebene bestätigt hat, bleibt derzeit nicht nachvollziehbar ob es sich um einen auf Proteinebene ebenfalls positiven Zelllinien Klon handelt und wie dieser Effekt zu erklären ist.

Da im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass NY-BR-1 ein Membranprotein ist, stellt sich die Frage ob NY-BR-1 ein potentielles "Target" für Antikörper basierte Therapien bei der Behandlung von Krebs sein könnte.

In der Übersichtsarbeit von Carter *et al.* (2004) werden wichtige Kriterien erläutert, die bei der Evaluierung eines neuen Zelloberflächenantigens für Antikörper basierte Therapien erfüllt sein sollten. Die Grundvoraussetzung dafür ist selbstverständlich die Lokalisation des Antigens an bzw. in der Membran. Näherungsweise kann dies durch bioinformatische Algorithmen bestimmt werden. In jedem Fall muß aber eine Membranlokalisation experimentell bestätigt werden. Die am häufigsten verwendete Strategie ist die FACS Analyse, bei der entweder endogenes oder transient exprimiertes Antigen mit oder ohne "tag" je nach Antikörperverfügbarkeit auf der Zelloberfläche detektiert wird (CARTER *et al.*, 2004). Für NY-BR-1 wurde dies biochemisch und zellbiologisch sowohl für NY-BR-1 als auch für GFP- bzw. FLAG- NY-BR-1 Fusionsproteine bestätigt. Abgesehen davon, dass NY-BR-1 grundsätzlich auf der Zelloberfläche exprimiert wird und sogar für den monoklonalen anti-NY-BR-1 Antikörper zugänglich ist, muß natürlich noch geprüft werden, ob endogenes NY-BR-1 Protein *in vivo* überhaupt für Antikörper erreichbar ist. Da NY-BR-1 in Epithelzellen der Milchdrüsengänge möglicherweise apikal exprimiert wird, wäre das Protein schlecht für Antikörper erreichbar. Durch Versuche mit transfizierten polarisierten MDCK Zellen sollte untersucht werden, auf welcher Seite (apikal, basal, basolateral) NY-BR-1 in der Zelle lokalisiert. Aufgrund der bereits beschriebenen Expressionsschwierigkeiten konnte diese Fragestellung im Rahmen dieser Arbeit noch nicht geklärt werden. Anhand erster immunhistochemischer Gewebeschnitte von Brustkarzinomen, Prostatakarzinomen und Seminomen scheint die NY-BR-1 Membranlokalisation allerdings nicht auf die apikale Seite der Epithelzellen beschränkt zu sein.

Ein häufig auftretendes Problem bei membranständigen Tumor assoziierten Antigenen ist, dass sie an der Zelloberfläche prozessiert bzw. abgespalten werden ("shedding") und so zur Immuntoleranz beitragen können. Beispielsweise werden die löslichen Formen von CEA (bei Kolonkarzinomen) oder MUC-1 (bei Brustkrebs) in hohen Konzentrationen im Patientenserum gefunden (PELLEGRINI *et al.*, 1997; BEATTY *et al.*, 2001). MUC-1 ist in mehr als 90% der Brustkrebspatienten exprimiert, aber nur wenige von ihnen zeigen eine CD8⁺ T-Zellantwort gegenüber MUC-1 Peptiden. Zirkulierendes, abgespaltenes MUC-1 kann durch Blockieren der T-Zell-APC Interaktion und T-Zell-Tumorzell-Interaktion immunsuppressiv wirken (AGRAWAL *et al.*, 1998). Dasselbe trifft für CEA und weitere prozessierte Zelloberflächen Antigene zu. Freigesetzte Antigene können mit der Wirkungsweise der Antikörper interferieren und Toleranz auslösen. Deshalb muß untersucht werden, ob sie im Blut detektierbar sind und ob es für die therapeutische Anwendung nicht möglich ist, Antikörper gegen den nicht prozessierten Teil des Antigens

zu entwickeln. Für ErbB2 beispielsweise, das ebenfalls in löslicher Form im Serum von Patienten vorkommt, hat sich gezeigt, dass Trastuzumab sogar die Prozessierung des Vollängenrezeptors inhibiert. Zukünftige Untersuchungen werden zeigen, ob NY-BR-1 ebenfalls zu den prozessierten Zelloberflächenantigenen gehört.

Als weiteres wichtiges Kriterium ist das Expressionsprofil des Oberflächenantigens zu nennen. Ein ideales Expressionsprofil ist gekennzeichnet durch hohe und homogene Antigenexpression auf der Zelloberfläche aller Tumorzellen für viele Tumortypen und vor allem bei den meisten Patienten. Weiterhin sollte dessen Expression essentiell für das Überleben der Krebszelle sein während es in normalem Gewebe nicht exprimiert wird. Anhand des ErbB2 Proteins, das ebenfalls in einigen Normalgeweben exprimiert ist, hat sich gezeigt, dass nicht notwendigerweise alle Kriterien zutreffen müssen, damit ein Zelloberflächenprotein als Target genutzt werden kann. Viele bekannte Tumorantigene werden schwach in mehreren Normalgeweben und stärker in Tumorzellen exprimiert (SCHLOM, 1991). Unterschiede bezüglich der Bindungsaffinitäten verschiedener Antikörper ermöglichen trotzdem prinzipiell den Einsatz spezifischer Antikörper, die präferenziell das Antigen in Geweben mit einer hohen Expressionsrate binden (CROMBET *et al.*, 2004). Hier wären anti-EGFR Antikörper als Beispiele zu nennen: der Test verschiedener anti-EGFR Antikörper mit unterschiedlichen Bindungsaffinitäten (Erbix, hR3, ABX-EGF) hat gezeigt, dass Erbix und ABX-EGF bei Patienten Hautausschlag verursachen, hR3, der Antikörper mit der geringsten Affinität (10^{-9}), hingegen nicht (CROMBET *et al.*, 2004). Sofern keine unterschiedliche Expression in Normalgewebe und Tumor zu beobachten ist, das Antigen aber nicht in vitalen Organen vorliegt, können therapeutische Antikörper trotzdem gezielt eingesetzt werden.

Im Falle einer NY-BR-1 spezifischen Therapie bei Brustkrebs würde dessen Expression in den Organen Testis und Prostata nur bei Männern eine Rolle spielen, bei denen Brustkrebs aber nur sehr selten auftritt (weniger als 1%) (WEISS *et al.*, 2005). Da NY-BR-1 auch häufig in normalem Prostatagewebe exprimiert wird und sporadisch in Prostatatumoren überexprimiert wird, kämen für einen Teil der Prostatakrebspatienten möglicherweise ebenfalls NY-BR-1 spezifische Therapien in Frage. Damit die Schädigung vitaler Organe, wie zum Beispiel der Niere, bei systemischer Anwendung NY-BR-1 spezifischer Therapeutika ausgeschlossen werden kann, muß eine eingehendere Prüfung der Expression des NY-BR-1 Proteins erfolgen.

Für ein breites Anwendungsspektrum, sollte das Antigen idealerweise in Tumoren aller Stadien, inklusive der Metastasen, exprimiert sein, da das dem Stadium der meisten Patienten entspricht, die experimentelle Therapeutika erhalten würden. NY-BR-1 wird

sowohl im Primärtumor, der im allgemeinen nicht die lebensbedrohende Gefahr darstellt, als auch in Metastasen exprimiert (diese Arbeit und JIANG *et al.*, 2002), THEURILLAT *et al.*, Manuskript eingereicht). Somit wäre eine NY-BR-1 spezifische Immuntherapie theoretisch auch für die gezielte Eliminierung von Metastasen geeignet.

Eine nicht homogene Expression des Antigens in einem Tumor oder in Metastasen ist jedoch kein Ausschlußkriterium für den Einsatz Antikörper basierte Therapien. Durch Konjugation der monoklonalen Antikörper mit Radioisotopen, "Drugs" oder Toxinen können Nachbarzellen ebenfalls eliminiert und somit der Antitumoreffekt verstärkt werden (Abbildung 4.3) (BLATTMAN UND GREENBERG, 2004).

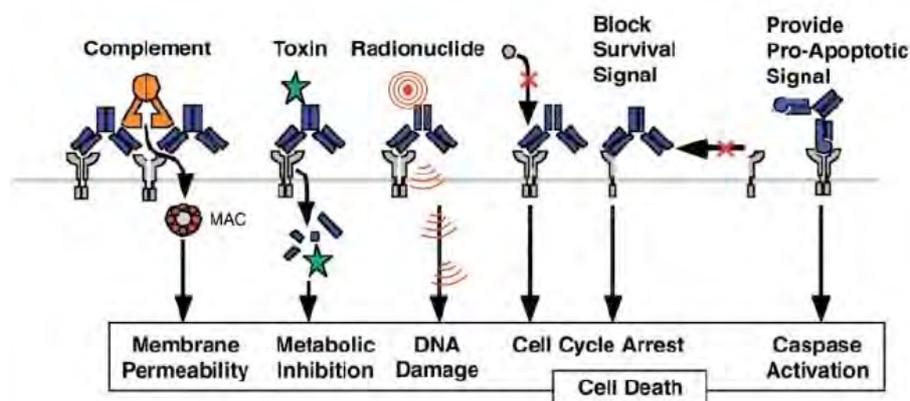


Abbildung 4.3 | Therapeutische monoklonale Antikörper (nach BLATTMAN UND GREENBERG, 2004). Modifizierte und nicht modifizierte Antikörper können auf verschiedene Arten direkt zum Tod der Tumorzellen führen, ohne Effektorzellen rekrutieren zu müssen. MAC: "Membrane attack complex".

Auch werden „Single Chain“ (scFv-Fragmente) Varianten erprobt, die den Vorteil haben, dass sie kleiner sind und effizienter diffundieren. Sie können ihrerseits mit Toxinen konjugiert werden, um ihre Anti-Tumoreffizienz zu erhöhen (VON MINCKWITZ *et al.*, 2005; BIBURGER *et al.*, 2005; ROTH *et al.*, 2005; ROHRBACH *et al.*, 2005). Bispezifische Antikörper, die simultan an Tumorzellen binden und Rezeptoren (CD3 oder Fc Rezeptor) auf Immuneffektor-Zellen aktivieren, werden ebenfalls für die Therapie entwickelt (CARTER, 2001; WIMBERGER *et al.*, 2003; XIONG *et al.*, 2002).

Im Gegensatz zur Therapie nicht solider Tumoren wie Leukämien, bei denen wenige Kopien des Tumorantigens auf der Zelloberfläche ausreichen, müssen bei soliden Tumoren für einen gezielten Angriff sehr viele Moleküle exprimiert sein. Herceptin z.B. hat als alleiniges Medikament in der "first line" Therapie bei 35% bzw. 0% von insgesamt 111 untersuchten Brustkrebs Patienten mit starker bzw. schwacher ErbB2 Expression (IHC) ein Ansprechen auf die Therapie zur Folge (VOGEL *et al.*, 2002). Die in diesem Fall beobachtete direkte Korrelation von Wirkung und Expression trifft nicht für den therapeutischen Antikörper Omnitarg zu, bei dem es sich um eine humanisierte Version

eines anti-ErbB2 Antikörpers handelt (AGUS *et al.*, 2002; MENDOZA *et al.*, 2002). Omnitarg hat sich im Gegensatz zu Herceptin als erfolgreich bei dem gezielten Angriff auf schwach ErbB2 exprimierende Zellen im MCF-7 "Xenograft" Mausmodell erwiesen (AGUS *et al.*, 2002) und wird derzeit in Phase II Studien getestet (DEGRENDELE, 2003).

Eine funktionelle Validierung des Target Antigens ist wünschenswert, aber keine Bedingung für erfolgreiche Antikörper basierte Strategien (CARTER *et al.*, 2004). Verschiedene Methoden, wie RNA "interference"/RNAi, antisense mRNA, Ribozyme, "knock outs", transgene Tiere bieten sich an, um die Funktion eines Proteins zu klären (LAVERY UND KING, 2003; KURRECK, 2003; CROOKE, 2004; CASTANOTTO *et al.*, 2002; KASHANI-SABET *et al.*, 2002; TORNELL UND SNAITH, 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine funktionelle siRNA Oligonukleotid Duplex identifiziert und erfolgreich bei der Herunterregulation von überexprimiertem NY-BR-1 eingesetzt wurde (Abbildung 3.23). In einem etablierten Zellkultursystem können zukünftig entsprechende Studien mit freien NY-BR-1 siRNA Oligos bzw. kloniert in den pSUPER Vektor durchgeführt werden. Die Anwendung dieser Technik bei NY-BR-1 positiven Zelllinien erwies sich als wenig sinnvoll, da das Protein nicht detektiert wird und somit auch keine Veränderungen der Expression verfolgt werden konnten (Kapitel 3.6). Die Kenntnis der biologischen Funktion könnte allerdings die Möglichkeit eröffnen, das Protein selbst als "drug target" zu nutzen. Außerdem ist es sinnvoll, die Funktion zu kennen, um das Risiko unerwünschter Nebenwirkungen einschätzen zu können.

Ideal wäre weiterhin, dass die Expression des immunogenen Antigens in der Pathogenese involviert ist bzw. essentiell für den Tumor ist, so dass die Immunogenität der Tumorzelle nicht durch Herunterregulation der Antigenexpression vermindert wird. Ersten Ergebnissen zu Folge besitzt NY-BR-1 transformierendes Potential, und es könnte ursächlich an der Tumorgenese beteiligt sein.

4.8.2.2 NY-BR-1: Vakzinestudien?

Da für NY-BR-1 bereits HLA-A2 restringierte CD8⁺ T-Zellepitope gefunden wurden, ist NY-BR-1 vor allem auch für Vakzinierungsstudien ein attraktives Zielprotein (JÄGER *et al.*, 2004; JÄGER *et al.*, Manuskript zur Veröffentlichung angenommen). Die Identifizierung und Charakterisierung von NY-BR-1 spezifischen T-Zellepitopen war jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit. Es konnten bereits NY-BR-1 spezifische T-Zellklone eines Brustkrebs- bzw. eines Prostatakrebspatienten isoliert werden, die in funktionellen „Assays“ (ELISPOT, Tetramer Färbung) bezüglich ihrer NY-BR-1 spezifischen Reaktivität getestet wurden (JÄGER *et al.*, Manuskript zur Veröffentlichung angenommen). Durch Transfektionsexperimente mit COS-7 Zellen konnte sogar für ein NY-BR-1 Peptid gezeigt werden, dass

es sich um ein natürlich prozessiertes und präsentierte Epitop handelt (JÄGER *et al.*, 2004; JÄGER *et al.*, Manuskript zur Veröffentlichung angenommen). Das zytolytische Potential dieser aktivierten T-Zellklone wird derzeit untersucht (JÄGER *et al.*, Manuskript zur Veröffentlichung angenommen). In diesem Kontext ist zu erwähnen, dass Theurillat *et al.*, in IHC Analysen eine MHC I Koexpression in 70% der NY positiven Primärtumoren und in 50% der Metastasen feststellen konnten (THEURILLAT *et al.*, Manuskript eingereicht). Die Expression der MHC I Moleküle ist neben dem Vorhandensein kostimulatorischer Signale eine Voraussetzung für die Aktivierung von CD8⁺-T-Zellen (VAN ENDERT, 1999; JÄGER *et al.*, 2002).

Das Hauptproblem einer erfolgreichen Immuntherapie besteht in der Überwindung oder der Verhinderung der durch Tumoren verursachten Immuntoleranz. Deshalb stellt sich mittlerweile dank des besseren Verständnisses der Immunologie und der Tumorgenese nicht mehr die Frage, ob Immuntherapie bei Krebs möglich ist, sondern wie sie erfolgreich eingesetzt werden kann (GILBOA, 2004). Tumorantigene repräsentieren hierfür grundsätzlich attraktive therapeutische Zielstrukturen. Um Ausweichstrategien („escape“) des Tumors zu erschweren, ist es empfehlenswert, für die Therapie nicht nur ein Tumorantigen als Zielstruktur sondern eine Kombination diverser Tumorantigene zu wählen.

Im Gegensatz zu Peptid-Vakzinierungsstudien, die ohne eine Evaluierung im Mausmodell durchgeführt werden dürfen, müssen für Antikörper basierte Therapien die Toxizität und Funktion der Antikörper zunächst im Mausmodell getestet werden. Für NY-BR-1 bietet sich hierfür die Herstellung transgener Mäuse an, die brustspezifisch NY-BR-1 exprimieren. Bisher ist jedoch nicht klar, ob NY-BR-1 Expression überhaupt *in vivo* zur Tumorbildung führt. Durch Kreuzungen mit Mäusen, die brustspezifisch ein Onkogen exprimieren und Tumoren bilden, könnte ein kooperativer Effekt erzielt und die Tumorentstehung beschleunigt werden. Sinnvoll wäre hierfür ein ER-Mausmodell, da in humanen Tumoren eine Koexpression von ER und NY-BR-1 beobachtet wurde (TILLI *et al.*, 2003; THEURILLAT *et al.*, Manuskript eingereicht).

Mit dem monoklonalen Antikörper existiert bereits ein vielversprechender Kandidat für derartige Studien. Allerdings wäre zuvor die Humanisierung (Austausch der konstanten murinen Bereiche) des Antikörpers erforderlich, da murine Antikörper im Menschen einerseits unerwünschte Immunreaktionen auslösen könnten und andererseits nicht in der Lage sind, die entsprechenden Effektorfunktionen zu aktivieren. Ferner müssten für umfassende Tests weitere monoklonale Antikörper gegen unterschiedliche NY-BR-1 Epitope hergestellt werden.

Die vorliegende Arbeit hat wesentlich dazu beigetragen, neben Expressionsanalysen die zelluläre Lokalisation des neuen Tumorantigens NY-BR-1 aufzuklären. Da NY-BR-1 ein Membranprotein mit einem gewebespezifischen Expressionsmuster und in Brusttumoren überexprimiert ist, kommen für NY-BR-1 positive Tumoren sowohl Vakzinierungen als auch Antikörper basierte Therapien in Frage. Beide Therapiestrategien könnten parallel angewendet werden und auf diese Weise eine synergistische anti-Tumorwirkung erzielen, wie schon in Studien mit ErbB2 und CTLA4 gezeigt werden konnte (EMENS *et al.*, 2005).

5 Literaturverzeichnis

Acres, B., and Limacher, J. M. (2005). MUC1 as a target antigen for cancer immunotherapy. *Expert Rev Vaccines* 4, 493-502.

Adluri, S., Gilewski, T., Zhang, S., Ramnath, V., Ragupathi, G., and Livingston, P. (1999). Specificity analysis of sera from breast cancer patients vaccinated with MUC1-KLH plus QS-21. *Br J Cancer* 79, 1806-1812.

Agrawal, B., Krantz, M. J., Reddish, M. A., and Longenecker, B. M. (1998). Cancer-associated MUC1 mucin inhibits human T-cell proliferation, which is reversible by IL-2. *Nat Med* 4, 43-49.

Agus, D. B., Akita, R. W., Fox, W. D., Lewis, G. D., Higgins, B., Pisacane, P. I., Lofgren, J. A., Tindell, C., Evans, D. P., Maiese, K., *et al.* (2002). Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth. *Cancer Cell* 2, 127-137.

Ahlert, T., Sauerbrei, W., Bastert, G., Ruhland, S., Bartik, B., Simiantonaki, N., Schumacher, J., Hacker, B., Schumacher, M., and Schirmacher, V. (1997). Tumor-cell number and viability as quality and efficacy parameters of autologous virus-modified cancer vaccines in patients with breast or ovarian cancer. *J Clin Oncol* 15, 1354-1366.

Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., and Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3983-3988.

Ames, B. N., Gold, L. S., and Willett, W. C. (1995). The causes and prevention of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5258-5265.

Andreola, G., Rivoltini, L., Castelli, C., Huber, V., Perego, P., Deho, P., Squarcina, P., Accornero, P., Lozupone, F., Lugini, L., *et al.* (2002). Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J Exp Med* 195, 1303-1316.

Apostolopoulos, V., Sandrin, M. S., and McKenzie, I. F. (1999). Carbohydrate/peptide mimics: effect on MUC1 cancer immunotherapy. *J Mol Med* 77, 427-436.

Arai, M., Mitsuke, H., Ikeda, M., Xia, J. X., Kikuchi, T., Satake, M., and Shimizu, T. (2004). ConPred II: a consensus prediction method for obtaining transmembrane topology models with high reliability. *Nucleic Acids Res* 32, 390-393.

Avigan, D., Vasir, B., Gong, J., Borges, V., Wu, Z., Uhl, L., Atkins, M., Mier, J., McDermott, D., Smith, T., *et al.* (2004). Fusion cell vaccination of patients with metastatic breast and renal cancer induces immunological and clinical responses. *Clin Cancer Res* 10, 4699-4708.

Baasner, S., von Melchner, H., Klenner, T., Hilgard, P., and Beckers, T. (1996). Reversible tumorigenesis in mice by conditional expression of the HER2/c-erbB2 receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 13, 901-911.

Ball, R. K., Friis, R. R., Schoenenberger, C. A., Doppler, W., and Groner, B. (1988). Prolactin regulation of beta-casein gene expression and of a cytosolic 120-kd protein in a cloned mouse mammary epithelial cell line. *Embo J* 7, 2089-2095.

- Baselga, J., and Albanell, J. (2001). Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies. *Ann Oncol* 12 *Suppl 1*, S35-41.
- Baselga, J., and Norton, L. (2002). Focus on breast cancer. *Cancer Cell* 1, 319-322.
- Beatty, P., Hanisch, F. G., Stolz, D. B., Finn, O. J., and Ciborowski, P. (2001). Biochemical characterization of the soluble form of tumor antigen MUC1 isolated from sera and ascites fluid of breast and pancreatic cancer patients. *Clin Cancer Res* 7, 781s-787s.
- Bednenko, J., Cingolani, G., and Gerace, L. (2003). Nucleocytoplasmic transport: navigating the channel. *Traffic* 4, 127-135.
- Ben-Ze'ev, A., Shtutman, M., and Zhurinsky, J. (2000). The integration of cell adhesion with gene expression: the role of beta-catenin. *Exp Cell Res* 261, 75-82.
- Benting, J., Rietveld, A., Ansorge, I., and Simons, K. (1999a). Acyl and alkyl chain length of GPI-anchors is critical for raft association in vitro. *FEBS Lett* 462, 47-50.
- Benting, J. H., Rietveld, A. G., and Simons, K. (1999b). N-Glycans mediate the apical sorting of a GPI-anchored, raft-associated protein in Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol* 146, 313-320.
- Biburger, M., Weth, R., and Wels, W. S. (2005). A novel bispecific tetravalent antibody fusion protein to target costimulatory activity for T-cell activation to tumor cells overexpressing ErbB2/HER2. *J Mol Biol* 346, 1299-1311.
- Blattman, J. N., and Greenberg, P. D. (2004). Cancer immunotherapy: a treatment for the masses. *Science* 305, 200-205.
- Boecker, W., and Buerger, H. (2003). Evidence of progenitor cells of glandular and myoepithelial cell lineages in the human adult female breast epithelium: a new progenitor (adult stem) cell concept. *Cell Prolif* 36 *Suppl 1*, 73-84.
- Boller, K., Janssen, O., Schuldes, H., Tonjes, R. R., and Kurth, R. (1997). Characterization of the antibody response specific for the human endogenous retrovirus HTDV/HERV-K. *J Virol* 71, 4581-4588.
- Boon, T., Cerottini, J. C., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P., and Van Pel, A. (1994). Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 12, 337-365.
- Boon, T., and Old, L. J. (1997). Cancer Tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 9, 681-683.
- Boyle, P., and Ferlay, J. (2005). Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol* 16, 481-488.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brummelkamp, T. R., Bernards, R., and Agami, R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296, 550-553.
- Burnet, F. M. (1970). The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 13, 1-27.

- Burstein, H. J. (2005). The distinctive nature of HER2-positive breast cancers. *N Engl J Med* 353, 1652-1654.
- Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25, 169-193.
- Carey, T. E., Lloyd, K. O., Takahashi, T., Travassos, L. R., and Old, L. J. (1979). AU cell-surface antigen of human malignant melanoma: solubilization and partial characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 2898-2902.
- Carey, T. E., Takahashi, T., Resnick, L. A., Oettgen, H. F., and Old, L. J. (1976). Cell surface antigens of human malignant melanoma: mixed hemadsorption assays for humoral immunity to cultured autologous melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 3278-3282.
- Carr, A., Rodriguez, E., Arango Mdel, C., Camacho, R., Osorio, M., Gabri, M., Carrillo, G., Valdes, Z., Bebelagua, Y., Perez, R., and Fernandez, L. E. (2003). Immunotherapy of advanced breast cancer with a heterophilic ganglioside (NeuGcGM3) cancer vaccine. *J Clin Oncol* 21, 1015-1021.
- Carter, P. (2001). Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer* 1, 118-129.
- Carter, P., Smith, L., and Ryan, M. (2004). Identification and validation of cell surface antigens for antibody targeting in oncology. *Endocr Relat Cancer* 11, 659-687.
- Castanotto, D., Li, J. R., Michienzi, A., Langlois, M. A., Lee, N. S., Puymirat, J., and Rossi, J. J. (2002). Intracellular ribozyme applications. *Biochem Soc Trans* 30, 1140-1145.
- Castilleja, A., Ward, N. E., O'Brian, C. A., Swearingen, B., 2nd, Swan, E., Gillogly, M. A., Murray, J. L., Kudelka, A. P., Gershenson, D. M., and Ioannides, C. G. (2001). Accelerated HER-2 degradation enhances ovarian tumor recognition by CTL. Implications for tumor immunogenicity. *Mol Cell Biochem* 217, 21-33.
- Cerny, T., Borisch, B., Introna, M., Johnson, P., and Rose, A. L. (2002). Mechanism of action of rituximab. *Anticancer Drugs* 13 Suppl 2, S3-10.
- Chen, Y. T. (2004). Identification of human tumor antigens by serological expression cloning: an online review on SEREX. *Cancer Immunity*.
- Chen, Y. T., Scanlan, M. J., Sahin, U., Tureci, O., Gure, A. O., Tsang, S., Williamson, B., Stockert, E., Pfreundschuh, M., and Old, L. J. (1997). A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1914-1918.
- Chen, Y. T., Scanlan, M.J., Obata, Y., Old, L.J. (2000). Identification of human tumor antigens by serological expression cloning., In *Principles and Practice of Biologic Therapy of Cancer.*, R. SA, ed. (Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins), pp. 557-570.
- Chomez, P., De Backer, O., Bertrand, M., De Plaen, E., Boon, T., and Lucas, S. (2001). An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family. *Cancer Res* 61, 5544-5551.

- Church, G. M., and Gilbert, W. (1984). Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* *81*, 1991-1995.
- Clarke, R. B., Anderson, E., Howell, A., and Potten, C. S. (2003). Regulation of human breast epithelial stem cells. *Cell Prolif* *36 Suppl 1*, 45-58.
- Coronella-Wood, J. A., and Hersh, E. M. (2003). Naturally occurring B-cell responses to breast cancer. *Cancer Immunol Immunother* *52*, 715-738.
- Crombet, T., Osorio, M., Cruz, T., Roca, C., del Castillo, R., Mon, R., Iznaga-Escobar, N., Figueredo, R., Koropatnick, J., Renginfo, E., *et al.* (2004). Use of the humanized anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody h-R3 in combination with radiotherapy in the treatment of locally advanced head and neck cancer patients. *J Clin Oncol* *22*, 1646-1654.
- Crooke, S. T. (2004). Antisense strategies. *Curr Mol Med* *4*, 465-487.
- Davis, I. D., Chen, W., Jackson, H., Parente, P., Shackleton, M., Hopkins, W., Chen, Q., Dimopoulos, N., Luke, T., Murphy, R., *et al.* (2004). Recombinant NY-ESO-1 protein with ISCOMATRIX adjuvant induces broad integrated antibody and CD4(+) and CD8(+) T cell responses in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 10697-10702.
- De Wever, O., and Mareel, M. (2003). Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol* *200*, 429-447.
- Dees, E. C., McKinnon, K. P., Kuhns, J. J., Chwastiak, K. A., Sparks, S., Myers, M., Collins, E. J., Frelinger, J. A., Van Deventer, H., Collichio, F., *et al.* (2004). Dendritic cells can be rapidly expanded ex vivo and safely administered in patients with metastatic breast cancer. *Cancer Immunol Immunother* *53*, 777-785.
- DeGrendele, H. (2003). The anti-HER2 monoclonal antibody pertuzumab may be effective in androgen-independent prostate cancer. *Clin Prostate Cancer* *2*, 143-145.
- DeLeo, A. B., Jay, G., Appella, E., Dubois, G. C., Law, L. W., and Old, L. J. (1979). Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* *76*, 2420-2424.
- Diaz, A., Alfonso, M., Alonso, R., Saurez, G., Troche, M., Catala, M., Diaz, R. M., Perez, R., and Vazquez, A. M. (2003). Immune responses in breast cancer patients immunized with an anti-idiotypic antibody mimicking NeuGc-containing gangliosides. *Clin Immunol* *107*, 80-89.
- Disis, M. L., Gooley, T. A., Rinn, K., Davis, D., Piepkorn, M., Cheever, M. A., Knutson, K. L., and Schiffman, K. (2002). Generation of T-cell immunity to the HER-2/neu protein after active immunization with HER-2/neu peptide-based vaccines. *J Clin Oncol* *20*, 2624-2632.
- Disis, M. L., Grabstein, K. H., Sleath, P. R., and Cheever, M. A. (1999). Generation of immunity to the HER-2/neu oncogenic protein in patients with breast and ovarian cancer using a peptide-based vaccine. *Clin Cancer Res* *5*, 1289-1297.
- Disis, M. L., Pupa, S. M., Gralow, J. R., Dittadi, R., Menard, S., and Cheever, M. A. (1997). High-titer HER-2/neu protein-specific antibody can be detected in patients with early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* *15*, 3363-3367.

- Disis, M. L., Schiffman, K., Gooley, T. A., McNeel, D. G., Rinn, K., and Knutson, K. L. (2000). Delayed-type hypersensitivity response is a predictor of peripheral blood T-cell immunity after HER-2/neu peptide immunization. *Clin Cancer Res* 6, 1347-1350.
- Disis, M. L., Schiffman, K., Guthrie, K., Salazar, L. G., Knutson, K. L., Goodell, V., dela Rosa, C., and Cheever, M. A. (2004). Effect of dose on immune response in patients vaccinated with an her-2/neu intracellular domain protein--based vaccine. *J Clin Oncol* 22, 1916-1925.
- Dols, A., Meijer, S. L., Hu, H. M., Goodell, V., Disis, M. L., Von Mensdorff-Pouilly, S., Verheijen, R., Alvord, W. G., Smith, J. W., 2nd, Urba, W. J., and Fox, B. A. (2003a). Identification of tumor-specific antibodies in patients with breast cancer vaccinated with gene-modified allogeneic tumor cells. *J Immunother* 26, 163-170.
- Dols, A., Smith, J. W., 2nd, Meijer, S. L., Fox, B. A., Hu, H. M., Walker, E., Rosenheim, S., Moudgil, T., Doran, T., Wood, W., *et al.* (2003b). Vaccination of women with metastatic breast cancer, using a costimulatory gene (CD80)-modified, HLA-A2-matched, allogeneic, breast cancer cell line: clinical and immunological results. *Hum Gene Ther* 14, 1117-1123.
- Dontu, G., Abdallah, W. M., Foley, J. M., Jackson, K. W., Clarke, M. F., Kawamura, M. J., and Wicha, M. S. (2003). In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev* 17, 1253-1270.
- Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Robbins, P. F., Yang, J. C., Hwu, P., Schwartzentruber, D. J., Topalian, S. L., Sherry, R., Restifo, N. P., Hubicki, A. M., *et al.* (2002). Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298, 850-854.
- Ehrlich, P. (1909). Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneesk* 5, 273-290.
- Elbashir, S. M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15, 188-200.
- Eliasson, M., Olsson, A., Palmcrantz, E., Wiberg, K., Inganas, M., Guss, B., Lindberg, M., and Uhlen, M. (1988). Chimeric IgG-binding receptors engineered from staphylococcal protein A and streptococcal protein G. *J Biol Chem* 263, 4323-4327.
- Emens, L. A., and Jaffee, E. M. (2003). Cancer vaccines: an old idea comes of age. *Cancer Biol Ther* 2, S161-168.
- Emens, L. A., Reilly, R. T., and Jaffee, E. M. (2005). Breast cancer vaccines: maximizing cancer treatment by tapping into host immunity. *Endocr Relat Cancer* 12, 1-17.
- Espinoza-Delgado, I. (2002). Cancer vaccines. *Oncologist* 7 *Suppl* 3, 20-33.
- Fawcett, J., and Harris, A. L. (1992). Cell adhesion molecules and cancer. *Curr Opin Oncol* 4, 142-148.
- Feigelson, H. S., and Henderson, B. E. (2000). Future possibilities in the prevention of breast cancer: role of genetic variation in breast cancer prevention. *Breast Cancer Res* 2, 277-282.
- Ferrara, N. (2002). Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol* 29, 10-14.

- Fields, S., and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-246.
- Foon, K. A., Yang, X. D., Weiner, L. M., Belldegrun, A. S., Figlin, R. A., Crawford, J., Rowinsky, E. K., Dutcher, J. P., Vogelzang, N. J., Gollub, J., *et al.* (2004). Preclinical and clinical evaluations of ABX-EGF, a fully human anti-epidermal growth factor receptor antibody. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **58**, 984-990.
- Funato, T., Shitara, T., Tone, T., Jiao, L., Kashani-Sabet, M., and Scanlon, K. J. (1994). Suppression of H-ras-mediated transformation in NIH3T3 cells by a ras ribozyme. *Biochem Pharmacol* **48**, 1471-1475.
- Futreal, P. A., Coin, L., Marshall, M., Down, T., Hubbard, T., Wooster, R., Rahman, N., and Stratton, M. R. (2004). A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer* **4**, 177-183.
- Gambaletta, D., Marchetti, A., Benedetti, L., Mercurio, A. M., Sacchi, A., and Falcioni, R. (2000). Cooperative signaling between alpha(6)beta(4) integrin and ErbB-2 receptor is required to promote phosphatidylinositol 3-kinase-dependent invasion. *J Biol Chem* **275**, 10604-10610.
- Gangnus, R., Langer, S., Breit, E., Pantel, K., and Speicher, M. R. (2004). Genomic profiling of viable and proliferative micrometastatic cells from early-stage breast cancer patients. *Clin Cancer Res* **10**, 3457-3464.
- Gilboa, E. (2004). The promise of cancer vaccines. *Nat Rev Cancer* **4**, 401-411.
- Gilewski, T., Adluri, S., Ragupathi, G., Zhang, S., Yao, T. J., Panageas, K., Moynahan, M., Houghton, A., Norton, L., and Livingston, P. O. (2000). Vaccination of high-risk breast cancer patients with mucin-1 (MUC1) keyhole limpet hemocyanin conjugate plus QS-21. *Clin Cancer Res* **6**, 1693-1701.
- Gilewski, T., Ragupathi, G., Bhuta, S., Williams, L. J., Musselli, C., Zhang, X. F., Bornmann, W. G., Spassova, M., Bencsath, K. P., Panageas, K. S., *et al.* (2001). Immunization of metastatic breast cancer patients with a fully synthetic globo H conjugate: a phase I trial. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3270-3275.
- Glennie, J. M., and Van de Winkel, J. G. (2003). Resistance to cancer therapeutic antibodies. *Drug Discov Today* **8**, 503-510.
- Goldsby, R. A., Kindt, T. J., Kuby, J., and Osborne, B. A. (2002). *Immunology*, 5. edn. W H Freeman publishers, New York.
- Golemis, E. A., Serebriiskii, I., Finley, R. L., Kolonin, M. G., Gyuris, J., and Brent, R. (2001). *Current protocols in Molecular Biology*.
- Gribskov, M., and Burgess, R. R. (1983). Overexpression and purification of the sigma subunit of Escherichia coli RNA polymerase. *Gene* **26**, 109-118.
- Groh, V., Li, Y. Q., Cioca, D., Hunder, N. N., Wang, W., Riddell, S. R., Yee, C., and Spies, T. (2005). From The Cover: Efficient cross-priming of tumor antigen-specific T cells by dendritic cells sensitized with diverse anti-MICA opsonized tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 6461-6466.

- Gure, A. O., Altorki, N. K., Stockert, E., Scanlan, M. J., Old, L. J., and Chen, Y. T. (1998). Human lung cancer antigens recognized by autologous antibodies: definition of a novel cDNA derived from the tumor suppressor gene locus on chromosome 3p21.3. *Cancer Res* 58, 1034-1041.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Harris, H. (2005). A long view of fashions in cancer research. *Bioessays* 27, 833-838.
- Harwerth, I. M., Wels, W., Marte, B. M., and Hynes, N. E. (1992). Monoclonal antibodies against the extracellular domain of the erbB-2 receptor function as partial ligand agonists. *J Biol Chem* 267, 15160-15167.
- Harwerth, I. M., Wels, W., Schlegel, J., Muller, M., and Hynes, N. E. (1993). Monoclonal antibodies directed to the erbB-2 receptor inhibit in vivo tumour cell growth. *Br J Cancer* 68, 1140-1145.
- Haux, J. (2001). Infection and cancer. *Lancet* 358, 155-156.
- Heino, J. (1993). Integrin-type extracellular matrix receptors in cancer and inflammation. *Ann Med* 25, 335-342.
- Helms, J. B., and Zurzolo, C. (2004). Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking. *Traffic* 5, 247-254.
- Hobohm, U. (2001). Fever and cancer in perspective. *Cancer Immunol Immunother* 50, 391-396.
- Hortobagyi, G. N. (1998). Progress in endocrine therapy for breast carcinoma. *Cancer* 83, 1-6.
- Howe, H. L., Wingo, P. A., Thun, M. J., Ries, L. A., Rosenberg, H. M., Feigal, E. G., and Edwards, B. K. (2001). Annual report to the nation on the status of cancer (1973 through 1998), featuring cancers with recent increasing trends. *J Natl Cancer Inst* 93, 824-842.
- Huber, C. H., and Wolfel, T. (2004). Immunotherapy of cancer: from vision to standard clinical practice. *J Cancer Res Clin Oncol* 130, 367-374.
- Ibrahim, N. K., Murray, J., Parker, J., Finke, L., and Miles, D. (2004). Humoral immune responses to naturally occurring STn in metastatic breast cancer patients (MBC pts) treated with STn-KLH vaccine. *Proceedings of the American Society of Clinical Oncology* 23, 174.
- Ibrahim, N. K., and Murray, J. L. (2003). Clinical development of the STn-KLH vaccine (Theratope). *Clin Breast Cancer* 3 *Suppl* 4, S139-143.
- Jager, D., Saller, E., Zippelius, A., Frei, C., Gerlinger, M., Bartnick, T., Jaeger, E., and Knuth, A. (2004). The breast differentiation antigen NY-BR-1: A novel target antigen for active immunotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 22, 2575.
- Jäger, D., Stockert, E., Gure, A., Scanlan, M., Karbach, J., Jäger, E., Knuth, A., Old, L., and Chen, Y. (2001). Identification of a tissue-specific putative transcription factor in

breast tissue by serological screening of a breast cancer library. *Cancer Res* 61, 2055-2061.

Jager, D., Stockert, E., Jager, E., Gure, A. O., Scanlan, M. J., Knuth, A., Old, L. J., and Chen, Y. T. (2000a). Serological cloning of a melanocyte rab guanosine 5'-triphosphate-binding protein and a chromosome condensation protein from a melanoma complementary DNA library. *Cancer Res* 60, 3584-3591.

Jäger, D., Stockert, E., Karbach, J., Herrlinger, K., Atmaca, A., Arand, M., Chen, Y. T., Gnjatic, S., Old, L. J., Knuth, A., and Jäger, E. (2002a). Urine antibody against human cancer antigen NY-ESO-1. *Cancer Immun* 2, 10.

Jäger, D., Taverna, C., Zippelius, A., and Knuth, A. (2004). Identification of tumor antigens as potential target antigens for immunotherapy by serological expression cloning. *Cancer Immunol Immunother*.

Jäger, D., Unkelbach, M., Frei, C., Bert, F., Scanlan, M. J., Jäger, E., Old, L. J., Chen, Y. T., and Knuth, A. (2002b). Identification of tumor-restricted antigens NY-BR-1, SCP-1, and a new cancer/testis-like antigen NW-BR-3 by serological screening of a testicular library with breast cancer serum. *Cancer Immun* 2, 5.

Jager, E., Gnjatic, S., Nagata, Y., Stockert, E., Jager, D., Karbach, J., Neumann, A., Rieckenberg, J., Chen, Y. T., Ritter, G., *et al.* (2000b). Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8+ T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1+ cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12198-12203.

Jager, E., Jager, D., and Knuth, A. (2002). Clinical cancer vaccine trials. *Curr Opin Immunol* 14, 178-182.

Ji, X., Woodard, A. S., Rimm, D. L., and Fearon, E. R. (1997). Transcriptional defects underlie loss of E-cadherin expression in breast cancer. *Cell Growth Differ* 8, 773-778.

Jiang, Y., Harlocker, S. L., Molesh, D. A., Dillon, D. C., Stolk, J. A., Houghton, R. L., Repasky, E. A., Badaro, R., Reed, S. G., and Xu, J. (2002). Discovery of differentially expressed genes in human breast cancer using subtracted cDNA libraries and cDNA microarrays. *Oncogene* 21, 2270-2282.

Kashani-Sabet, M., Liu, Y., Fong, S., Desprez, P. Y., Liu, S., Tu, G., Nosrati, M., Handumrongkul, C., Liggitt, D., Thor, A. D., and Debs, R. J. (2002). Identification of gene function and functional pathways by systemic plasmid-based ribozyme targeting in adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3878-3883.

King, I., and Sartorelli, A. C. (1989). Epidermal growth factor receptor gene expression, protein kinase activity, and terminal differentiation of human malignant epidermal cells. *Cancer Res* 49, 5677-5681.

Klapper, L. N., Kirschbaum, M. H., Sela, M., and Yarden, Y. (2000a). Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signaling network of growth factor receptors. *Adv Cancer Res* 77, 25-79.

Klapper, L. N., Waterman, H., Sela, M., and Yarden, Y. (2000b). Tumor-inhibitory antibodies to HER-2/ErbB-2 may act by recruiting c-Cbl and enhancing ubiquitination of HER-2. *Cancer Res* 60, 3384-3388.

- Knutson, K. L., Schiffman, K., Cheever, M. A., and Disis, M. L. (2002). Immunization of cancer patients with a HER-2/neu, HLA-A2 peptide, p369-377, results in short-lived peptide-specific immunity. *Clin Cancer Res* 8, 1014-1018.
- Knutson, K. L., Schiffman, K., and Disis, M. L. (2001). Immunization with a HER-2/neu helper peptide vaccine generates HER-2/neu CD8 T-cell immunity in cancer patients. *J Clin Invest* 107, 477-484.
- Kozak, M. (1984). Point mutations close to the AUG initiator codon affect the efficiency of translation of rat preproinsulin in vivo. *Nature* 308, 241-246.
- Kurreck, J. (2003). Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem* 270, 1628-1644.
- Kyte, J., and Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157, 105-132.
- Lacroix, M., Toillon, R. A., and Leclercq, G. (2004). Stable 'portrait' of breast tumors during progression: data from biology, pathology and genetics. *Endocr Relat Cancer* 11, 497-522.
- Laemmli, U. K., Beguin, F., and Gujer-Kellenberger, G. (1970). A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol Biol* 47, 69-85.
- Lavery, K. S., and King, T. H. (2003). Antisense and RNAi: powerful tools in drug target discovery and validation. *Curr Opin Drug Discov Devel* 6, 561-569.
- Leclerc, G. J., Leclerc, G. M., and Barredo, J. C. (2002). Real-time RT-PCR analysis of mRNA decay: half-life of Beta-actin mRNA in human leukemia CCRF-CEM and Nalm-6 cell lines. *Cancer Cell Int* 2, 1.
- Lee, Y. T., Sheikh, K. M., Quismorio, F. P., Jr., and Friou, G. J. (1985). Circulating anti-tumor and autoantibodies in breast carcinoma: relationship to stage and prognosis. *Breast Cancer Res Treat* 6, 57-65.
- Legler, D. F., Doucey, M. A., Schneider, P., Chapatte, L., Bender, F. C., and Bron, C. (2005). Differential insertion of GPI-anchored GFPs into lipid rafts of live cells. *Faseb J* 19, 73-75.
- Liyanage, U. K., Moore, T. T., Joo, H. G., Tanaka, Y., Herrmann, V., Doherty, G., Drebin, J. A., Strasberg, S. M., Eberlein, T. J., Goedegebuure, P. S., and Linehan, D. C. (2002). Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 169, 2756-2761.
- Ludewig, B., Ochsenbein, A. F., Odermatt, B., Paulin, D., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. (2000). Immunotherapy with dendritic cells directed against tumor antigens shared with normal host cells results in severe autoimmune disease. *J Exp Med* 191, 795-804.
- Maloney, D. G., Smith, B., and Rose, A. (2002). Rituximab: mechanism of action and resistance. *Semin Oncol* 29, 2-9.
- Mayordomo, J. I., Milla, A., Morales, S., Yubero, A., Lorenzo, A., Baena, J. M., Modolell, A., Sanz, J., Illarramendi, J., Garcia, M. J., *et al.* (2004). Biweekly docetaxel and

- vinorelbine as first-line chemotherapy in metastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer* 5, 131-135.
- Mendelsohn, J., and Baselga, J. (2000). The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* 19, 6550-6565.
- Mendoza, N., Phillips, G. L., Silva, J., Schwall, R., and Wickramasinghe, D. (2002). Inhibition of ligand-mediated HER2 activation in androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res* 62, 5485-5488.
- Milenic, D. E. (2002). Monoclonal antibody-based therapy strategies: providing options for the cancer patient. *Curr Pharm Des* 8, 1749-1764.
- Miles, D. W., Towlson, K. E., Graham, R., Reddish, M., Longenecker, B. M., Taylor-Papadimitriou, J., and Rubens, R. D. (1996). A randomised phase II study of sialyl-Tn and DETOX-B adjuvant with or without cyclophosphamide pretreatment for the active specific immunotherapy of breast cancer. *Br J Cancer* 74, 1292-1296.
- Mischo, A., Wadle, A., Watzig, K., Jäger, D., Stockert, E., Santiago, D., Ritter, G., Regitz, E., Jäger, E., Knuth, A., *et al.* (2003). Recombinant antigen expression on yeast surface (RAYS) for the detection of serological immune responses in cancer patients. *Cancer Immun* 3, 5.
- Monastyrskaya, K., Hostettler, A., Buergi, S., and Draeger, A. (2005). The NK1 receptor localizes to the plasma membrane microdomains, and its activation is dependent on lipid raft integrity. *J Biol Chem* 280, 7135-7146.
- Murray, J. L., Gillogly, M. E., Przepiorka, D., Brewer, H., Ibrahim, N. K., Booser, D. J., Hortobagyi, G. N., Kudelka, A. P., Grabstein, K. H., Cheever, M. A., and Ioannides, C. G. (2002). Toxicity, immunogenicity, and induction of E75-specific tumor-lytic CTLs by HER-2 peptide E75 (369-377) combined with granulocyte macrophage colony-stimulating factor in HLA-A2+ patients with metastatic breast and ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 8, 3407-3418.
- Musselli, C., Ragupathi, G., Gilewski, T., Panageas, K. S., Spinat, Y., and Livingston, P. O. (2002). Reevaluation of the cellular immune response in breast cancer patients vaccinated with MUC1. *Int J Cancer* 97, 660-667.
- Nagorsen, D., Scheibenbogen, C., Marincola, F. M., Letsch, A., and Keilholz, U. (2003). Natural T cell immunity against cancer. *Clin Cancer Res* 9, 4296-4303.
- Nathanson, K. L., Wooster, R., and Weber, B. L. (2001). Breast cancer genetics: what we know and what we need. *Nat Med* 7, 552-556.
- Nemunaitis, J., Sterman, D., Jablons, D., Smith, J. W., 2nd, Fox, B., Maples, P., Hamilton, S., Borellini, F., Lin, A., Morali, S., and Hege, K. (2004). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene-modified autologous tumor vaccines in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 96, 326-331.
- Nestle, F. O. (2002). Dendritic cell vaccination for the treatment of skin cancer. *Recent Results Cancer Res* 160, 165-169.
- Nygren, P. A., Eliasson, M., Abrahmsen, L., Uhlen, M., and Palmcrantz, E. (1988). Analysis and use of the serum albumin binding domains of streptococcal protein G. *J Mol Recognit* 1, 69-74.

- Obata, Y., T, T. A., Tamaki, H., Tominaga, S., Murai, H., Iwase, T., Iwata, H., Mizutani, M., Chen, Y. T., Old, L. J., and Miura, S. (1999). Identification of Cancer Antigens in Breast Cancer by the SEREX Expression Cloning Method. *Breast Cancer* 6, 305-311.
- Old, L. J. (1981). Cancer immunology: the search for specificity--G. H. A. Clowes Memorial lecture. *Cancer Res* 41, 361-375.
- Overwijk, W. W., Lee, D. S., Surman, D. R., Irvine, K. R., Touloukian, C. E., Chan, C. C., Carroll, M. W., Moss, B., Rosenberg, S. A., and Restifo, N. P. (1999). Vaccination with a recombinant vaccinia virus encoding a "self" antigen induces autoimmune vitiligo and tumor cell destruction in mice: requirement for CD4(+) T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2982-2987.
- Pellegrini, P., Berghella, A. M., Del Beato, T., Maccarone, D., Cencioni, S., Adorno, D., and Casciani, C. U. (1997). The sCEA molecule suppressive role in NK and TH1 cell functions in colorectal cancer. *Cancer Biother Radiopharm* 12, 257-264.
- Petersen, O. W., Gudjonsson, T., Villadsen, R., Bissell, M. J., and Ronnov-Jessen, L. (2003). Epithelial progenitor cell lines as models of normal breast morphogenesis and neoplasia. *Cell Prolif* 36 *Suppl* 1, 33-44.
- Peto, R., Boreham, J., Clarke, M., Davies, C., and Beral, V. (2000). UK and USA breast cancer deaths down 25% in year 2000 at ages 20-69 years. *Lancet* 355, 1822.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.
- Pockaj, B. A., Basu, G. D., Pathangey, L. B., Gray, R. J., Hernandez, J. L., Gendler, S. J., and Mukherjee, P. (2004). Reduced T-cell and dendritic cell function is related to cyclooxygenase-2 overexpression and prostaglandin E2 secretion in patients with breast cancer. *Ann Surg Oncol* 11, 328-339.
- Radvanyi, L. (2004). Discovery and immunologic validation of new antigens for therapeutic cancer vaccines. *Int Arch Allergy Immunol* 133, 179-197.
- Radvanyi, L., Singh-Sandhu, D., Gallichan, S., Lovitt, C., Pedyczak, A., Mallo, G., Gish, K., Kwok, K., Hanna, W., Zubovits, J., *et al.* (2005). The gene associated with trichorhinophalangeal syndrome in humans is overexpressed in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 11005-11010.
- Ramaswamy, S., Ross, K. N., Lander, E. S., and Golub, T. R. (2003). A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet* 33, 49-54.
- Ravetch, J. V., and Perussia, B. (1989). Alternative membrane forms of Fc gamma RIII(CD16) on human natural killer cells and neutrophils. Cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions. *J Exp Med* 170, 481-497.
- Real, F. X., Mattes, M. J., Houghton, A. N., Oettgen, H. F., Lloyd, K. O., and Old, L. J. (1984). Class 1 (unique) tumor antigens of human melanoma. Identification of a 90,000 dalton cell surface glycoprotein by autologous antibody. *J Exp Med* 160, 1219-1233
- Reddish, M. A., MacLean, G. D., Poppema, S., Berg, A., and Longenecker, B. M. (1996). Pre-immunotherapy serum CA27.29 (MUC-1) mucin level and CD69+ lymphocytes

correlate with effects of Theratope sialyl-Tn-KLH cancer vaccine in active specific immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 42, 303-309.

Reece, D. E., Foon, K. A., Bhattacharya-Chatterjee, M., Adkins, D., Broun, E. R., Connaghan, D. G., Dipersio, J. F., Holland, H. K., Howard, D. A., Hale, G. A., *et al.* (2003). Use of the anti-idiotypic breast cancer vaccine 11D10 in conjunction with autologous stem cell transplantation in patients with metastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer* 3 *Suppl* 4, S152-157.

Reinholz, M. M., Nibbe, A., Jonart, L. M., Kitzmann, K., Suman, V. J., Ingle, J. N., Houghton, R., Zehentner, B., Roche, P. C., and Lingle, W. L. (2005). Evaluation of a panel of tumor markers for molecular detection of circulating cancer cells in women with suspected breast cancer. *Clin Cancer Res* 11, 3722-3732.

Renkvist, N., Castelli, C., Robbins, P. F., and Parmiani, G. (2001). A listing of human tumor antigens recognized by T cells. *Cancer Immunol Immunother* 50, 3-15.

Robbins, J., Dilworth, S. M., Laskey, R. A., and Dingwall, C. (1991). Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* 64, 615-623.

Rohrbach, F., Weth, R., Kursar, M., Sloots, A., Mittrucker, H. W., and Wels, W. S. (2005). Targeted delivery of the ErbB2/HER2 tumor antigen to professional APCs results in effective antitumor immunity. *J Immunol* 174, 5481-5489.

Rosenberg, S. A. (1997). Cancer vaccines based on the identification of genes encoding cancer regression antigens. *Immunol Today* 18, 175-182.

Rosorius, O., Heger, P., Stelz, G., Hirschmann, N., Hauber, J., and Stauber, R. H. (1999). Direct observation of nucleo-cytoplasmic transport by microinjection of GFP-tagged proteins in living cells. *BioTechniques* 27, 350-355.

Roth, A., Rohrbach, F., Weth, R., Frisch, B., Schuber, F., and Wels, W. S. (2005). Induction of effective and antigen-specific antitumor immunity by a liposomal ErbB2/HER2 peptide-based vaccination construct. *Br J Cancer* 92, 1421-1429.

Sahin, U., Tureci, O., and Pfreundschuh, M. (1997). Serological identification of human tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 9, 709-716.

Sahin, U., Tureci, O., Schmitt, H., Cochlovius, B., Johannes, T., Schmits, R., Stenner, F., Luo, G., Schobert, I., and Pfreundschuh, M. (1995). Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11810-11813.

Salazar, L. G., Fikes, J., Southwood, S., Ishioka, G., Knutson, K. L., Gooley, T. A., Schiffman, K., and Disis, M. L. (2003). Immunization of cancer patients with HER-2/neu-derived peptides demonstrating high-affinity binding to multiple class II alleles. *Clin Cancer Res* 9, 5559-5565.

Salgaller, M. L. (2003). Technology evaluation: bevacizumab, Genentech/Roche. *Curr Opin Mol Ther* 5, 657-667.

Salgia, R., Lynch, T., Skarin, A., Lucca, J., Lynch, C., Jung, K., Hodi, F. S., Jaklitsch, M., Mentzer, S., Swanson, S., *et al.* (2003). Vaccination with irradiated autologous tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments

- antitumor immunity in some patients with metastatic non-small-cell lung carcinoma. *J Clin Oncol* 21, 624-630.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
- Scanlan, M., and Jäger, D. (2001). Challenges to the development of antigen-specific breast cancer vaccines. *Breast Cancer Res* 3, 95-98.
- Scanlan, M. J., Chen, Y. T., Williamson, B., Gure, A. O., Stockert, E., Gordan, J. D., Tureci, O., Sahin, U., Pfreundschuh, M., and Old, L. J. (1998). Characterization of human colon cancer antigens recognized by autologous antibodies. *Int J Cancer* 76, 652-658.
- Scanlan, M. J., Gure, A. O., Jungbluth, A. A., Old, L. J., and Chen, Y. T. (2002). Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev* 188, 22-32.
- Schlom, J. (1991). Antibodies in cancer therapy: basic principles of monoclonal antibodies. *Biologic Therapy of Cancer*, 464-481.
- Schlom, J., Kantor, J., Abrams, S., Tsang, K. Y., Panicali, D., and Hamilton, J. M. (1996). Strategies for the development of recombinant vaccines for the immunotherapy of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 38, 27-39.
- Schulein, R. (2004). The early stages of the intracellular transport of membrane proteins: clinical and pharmacological implications. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 151, 45-91.
- Schulz, H., Winkler, U., Staak, J. O., and Engert, A. (2000). The Monoclonal Antibodies Campath-1H and Rituximab in the Therapy of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Onkologie* 23, 526-532.
- Selvaraj, P., Carpen, O., Hibbs, M. L., and Springer, T. A. (1989). Natural killer cell and granulocyte Fc gamma receptor III (CD16) differ in membrane anchor and signal transduction. *J Immunol* 143, 3283-3288.
- Sheikh, K. M., Quismorio, F. P., Friou, G. J., and Lee, Y. T. (1979). Ductular carcinoma of the breast: serum antibodies to tumor-associated antigens. *Cancer* 44, 2083-2089.
- Shiio, Y., Eisenman, R. N., Yi, E. C., Donohoe, S., Goodlett, D. R., and Aebersold, R. (2003). Quantitative proteomic analysis of chromatin-associated factors. *J Am Soc Mass Spectrom* 14, 696-703.
- Shiku, H., Takahashi, T., Bean, M. A., Hammerling, U., Oettgen, H. F., and Old, L. J. (1976). Surface phenotype of nonadherent peritoneal cells effecting cell-mediated cytotoxicity in vitro for allogeneic and syngeneic murine sarcoma cells. *Isr J Med Sci* 12, 425-434.
- Shogomori, H., and Futerman, A. H. (2001). Cholesterol depletion by methyl-beta-cyclodextrin blocks cholera toxin transport from endosomes to the Golgi apparatus in hippocampal neurons. *J Neurochem* 78, 991-999.

- Simons, J. W., Jaffee, E. M., Weber, C. E., Levitsky, H. I., Nelson, W. G., Carducci, M. A., Lazenby, A. J., Cohen, L. K., Finn, C. C., Clift, S. M., *et al.* (1997). Bioactivity of autologous irradiated renal cell carcinoma vaccines generated by ex vivo granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene transfer. *Cancer Res* 57, 1537-1546.
- Simons, J. W., Mikhak, B., Chang, J. F., DeMarzo, A. M., Carducci, M. A., Lim, M., Weber, C. E., Baccala, A. A., Goemann, M. A., Clift, S. M., *et al.* (1999). Induction of immunity to prostate cancer antigens: results of a clinical trial of vaccination with irradiated autologous prostate tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using ex vivo gene transfer. *Cancer Res* 59, 5160-5168.
- Simons, K., and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.
- Simons, K., and Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 31-39.
- Simpson, A. J., Caballero, O. L., Jungbluth, A., Chen, Y. T., and Old, L. J. (2005a). Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer* 5, 615-625.
- Simpson, P. T., Reis-Filho, J. S., Gale, T., and Lakhani, S. R. (2005b). Molecular evolution of breast cancer. *J Pathol* 205, 248-254.
- Sliwkowski, M. X., Lofgren, J. A., Lewis, G. D., Hotaling, T. E., Fendly, B. M., and Fox, J. A. (1999). Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). *Semin Oncol* 26, 60-70.
- Smalley, M., and Ashworth, A. (2003). Stem cells and breast cancer: A field in transit. *Nat Rev Cancer* 3, 832-844.
- Snijdewint, F. G., von Mensdorff-Pouilly, S., Karuntu-Wanamarta, A. H., Verstraeten, A. A., Livingston, P. O., Hilgers, J., and Kenemans, P. (2001). Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity can be induced by MUC1 peptide vaccination of breast cancer patients. *Int J Cancer* 93, 97-106.
- Soares, M. M., Mehta, V., and Finn, O. J. (2001). Three different vaccines based on the 140-amino acid MUC1 peptide with seven tandemly repeated tumor-specific epitopes elicit distinct immune effector mechanisms in wild-type versus MUC1-transgenic mice with different potential for tumor rejection. *J Immunol* 166, 6555-6563.
- Soiffer, R., Hodi, F. S., Haluska, F., Jung, K., Gillissen, S., Singer, S., Tanabe, K., Duda, R., Mentzer, S., Jaklitsch, M., *et al.* (2003). Vaccination with irradiated, autologous melanoma cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by adenoviral-mediated gene transfer augments antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 21, 3343-3350.
- Soiffer, R., Lynch, T., Mihm, M., Jung, K., Rhuda, C., Schmollinger, J. C., Hodi, F. S., Liebster, L., Lam, P., Mentzer, S., *et al.* (1998). Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13141-13146.
- Spivak-Kroizman, T., Rotin, D., Pinchasi, D., Ullrich, A., Schlessinger, J., and Lax, I. (1992). Heterodimerization of c-erbB2 with different epidermal growth factor receptor mutants elicits stimulatory or inhibitory responses. *J Biol Chem* 267, 8056-8063.

- Stagljar, I., Korostensky, C., Johnsson, N., and te Heesen, S. (1998). A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5187-5192.
- Stauber, R. H., Horie, K., Carney, P., Hudson, E. A., Tarasova, N. I., Gaitanaris, G. A., and Pavlakis, G. N. (1998). Development and applications of enhanced green fluorescent protein mutants. *Biotechniques* 24, 462-466, 468-471.
- Stelzl, U., Worm, U., Lalowski, M., Haenig, C., Brembeck, F. H., Goehler, H., Stroedicke, M., Zenkner, M., Schoenherr, A., Koeppen, S., *et al.* (2005). A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome. *Cell* 122, 957-968.
- Stingl, J., Eaves, C. J., Zandieh, I., and Emerman, J. T. (2001). Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue. *Breast Cancer Res Treat* 67, 93-109.
- Strunnikov, A. V., Hogan, E., and Koshland, D. (1995). SMC2, a *Saccharomyces cerevisiae* gene essential for chromosome segregation and condensation, defines a subgroup within the SMC family. *Genes Dev* 9, 587-599.
- Sugita, Y., Wada, H., Fujita, S., Nakata, T., Sato, S., Noguchi, Y., Jungbluth, A. A., Yamaguchi, M., Chen, Y. T., Stockert, E., *et al.* (2004). NY-ESO-1 expression and immunogenicity in malignant and benign breast tumors. *Cancer Res* 64, 2199-2204.
- Svane, I. M., Pedersen, A. E., Johnsen, H. E., Nielsen, D., Kamby, C., Gaarsdal, E., Nikolajsen, K., Buus, S., and Claesson, M. H. (2004). Vaccination with p53-peptide-pulsed dendritic cells, of patients with advanced breast cancer: report from a phase I study. *Cancer Immunol Immunother* 53, 633-641.
- Tanaka, Y., Amos, K. D., Fleming, T. P., Eberlein, T. J., and Goedegebuure, P. S. (2003). Mammaglobin-A is a tumor-associated antigen in human breast carcinoma. *Surgery* 133, 74-80.
- Tang, B. L., and Teng, F. Y. H. (2005). Concepts of Protein Sorting or Targeting Signals and Membrane Topology in Undergraduate Teaching. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 33, 188-193.
- Tilli, M. T., Frech, M. S., Steed, M. E., Hruska, K. S., Johnson, M. D., Flaws, J. A., and Furth, P. A. (2003). Introduction of estrogen receptor-alpha into the tTA/TAG conditional mouse model precipitates the development of estrogen-responsive mammary adenocarcinoma. *Am J Pathol* 163, 1713-1719.
- Tornell, J., and Snaith, M. (2002). Transgenic systems in drug discovery: from target identification to humanized mice. *Drug Discov Today* 7, 461-470.
- Trosko, J. E., Chang, C. C., Upham, B. L., and Tai, M. H. (2004). Ignored hallmarks of carcinogenesis: stem cells and cell-cell communication. *Ann N Y Acad Sci* 1028, 192-201.
- Tureci, O., Sahin, U., Zwick, C., Koslowski, M., Seitz, G., and Pfreundschuh, M. (1998). Identification of a meiosis-specific protein as a member of the class of cancer/testis antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5211-5216.

- Ueda, R., Shiku, H., Pfreundschuh, M., Takahashi, T., Li, L. T., Whitmore, W. F., Oettgen, H. F., and Old, L. J. (1979). Cell surface antigens of human renal cancer defined by autologous typing. *J Exp Med* 150, 564-579.
- Valentijn, A. J., Zouq, N., and Gilmore, A. P. (2004). Anoikis. *Biochem Soc Trans* 32, 421-425.
- van 't Veer, L. J., Dai, H., van de Vijver, M. J., He, Y. D., Hart, A. A., Mao, M., Peterse, H. L., van der Kooy, K., Marton, M. J., Witteveen, A. T., *et al.* (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415, 530-536.
- van de Vijver, M. (2005). Gene-expression profiling and the future of adjuvant therapy. *Oncologist* 10 Suppl 2, 30-34.
- van de Vijver, M. J., He, Y. D., van't Veer, L. J., Dai, H., Hart, A. A., Voskuil, D. W., Schreiber, G. J., Peterse, J. L., Roberts, C., Marton, M. J., *et al.* (2002). A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 347, 1999-2009.
- van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., and Boon, T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254, 1643-1647.
- Van Der Bruggen, P., Zhang, Y., Chaux, P., Stroobant, V., Panichelli, C., Schultz, E. S., Chapiro, J., Van Den Eynde, B. J., Basseur, F., and Boon, T. (2002). Tumor-specific shared antigenic peptides recognized by human T cells. *Immunol Rev* 188, 51-64.
- van Elsas, A., Suttmuller, R. P., Hurwitz, A. A., Ziskin, J., Villasenor, J., Medema, J. P., Overwijk, W. W., Restifo, N. P., Melief, C. J., Offringa, R., and Allison, J. P. (2001). Elucidating the autoimmune and antitumor effector mechanisms of a treatment based on cytotoxic T lymphocyte antigen-4 blockade in combination with a B16 melanoma vaccine: comparison of prophylaxis and therapy. *J Exp Med* 194, 481-489.
- van Endert, P. M. (1999). Genes regulating MHC class I processing of antigen. *Curr Opin Immunol* 11, 82-88.
- Vogel, C. L., Cobleigh, M. A., Tripathy, D., Gutheil, J. C., Harris, L. N., Fehrenbacher, L., Slamon, D. J., Murphy, M., Novotny, W. F., Burchmore, M., *et al.* (2002). Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 20, 719-726.
- Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1993). The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 9, 138-141.
- Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10, 789-799.
- von Minckwitz, G., Harder, S., Hovelmann, S., Jager, E., Al-Batran, S. E., Loibl, S., Atmaca, A., Cimpoiasu, C., Neumann, A., Abera, A., *et al.* (2005). Phase I clinical study of the recombinant antibody toxin scFv(FRP5)-ETA specific for the ErbB2/HER2 receptor in patients with advanced solid malignomas. *Breast Cancer Res* 7, R617-626.
- Watanabe, T., Pukel, C. S., Takeyama, H., Lloyd, K. O., Shiku, H., Li, L. T., Travassos, L. R., Oettgen, H. F., and Old, L. J. (1982). Human melanoma antigen AH is an autoantigenic ganglioside related to GD2. *J Exp Med* 156, 1884-1889.

- Weigelt, B., Peterse, J. L., and van 't Veer, L. J. (2005). Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer* 5, 591-602.
- Weiss, J. R., Moysich, K. B., and Swede, H. (2005). Epidemiology of male breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14, 20-26.
- Wimberger, P., Xiang, W., Mayr, D., Diebold, J., Dreier, T., Baeuerle, P. A., and Kimmig, R. (2003). Efficient tumor cell lysis by autologous, tumor-resident T lymphocytes in primary ovarian cancer samples by an EP-CAM-/CD3-bispecific antibody. *Int J Cancer* 105, 241-248.
- Wiseman, C. L. (1995). Inflammatory breast cancer: 10-year follow-up of a trial of surgery, chemotherapy, and allogeneic tumor cell/BCG immunotherapy. *Cancer Invest* 13, 267-271.
- Wolf, A. M., Wolf, D., Steurer, M., Gastl, G., Gunsilius, E., and Grubeck-Loebenstien, B. (2003). Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res* 9, 606-612.
- Xiong, D., Xu, Y., Liu, H., Peng, H., Shao, X., Lai, Z., Fan, D., Yang, M., Han, J., Xie, Y., *et al.* (2002). Efficient inhibition of human B-cell lymphoma xenografts with an anti-CD20 x anti-CD3 bispecific diabody. *Cancer Lett* 177, 29-39.
- Yang, X. D., Jia, X. C., Corvalan, J. R., Wang, P., and Davis, C. G. (2001). Development of ABX-EGF, a fully human anti-EGF receptor monoclonal antibody, for cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 38, 17-23.
- Zehentner, B. K., Dillon, D. C., Jiang, Y., Xu, J., Bennington, A., Molesh, D. A., Zhang, X., Reed, S. G., Persing, D., and Houghton, R. L. (2002). Application of a multigene reverse transcription-PCR assay for detection of mammaglobin and complementary transcribed genes in breast cancer lymph nodes. *Clin Chem* 48, 1225-1231.
- Zotter, S., Hageman, P. C., Lossnitzer, A., van den Tweel, J., Hilkens, J., Mooi, W. J., and Hilgers, J. (1988). Monoclonal antibodies to epithelial sialomucins recognize epitopes at different cellular sites in adenolymphomas of the parotid gland. *Int J Cancer Suppl* 3, 38-44.
- Zou, W. (2005). Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* 5, 263-274.
- zum Buschenfelde, C. M., Hermann, C., Schmidt, B., Peschel, C., and Bernhard, H. (2002). Antihuman epidermal growth factor receptor 2 (HER2) monoclonal antibody trastuzumab enhances cytolytic activity of class I-restricted HER2-specific T lymphocytes against HER2-overexpressing tumor cells. *Cancer Res* 62, 2244-2247.

6 Abkürzungsverzeichnis

% v/v	Volumenprozent
% w/v	Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
μ	mikro
aa	Aminosäure
Abb.	Abbildung
Acc.No.	„Accession number“
ADCC	„Antibody dependent cellular cytotoxicity“
amp	Ampicillin
APC	„Antigen presenting cell“
AR	„Ankyrin repeat“
ARR	„Ankyrin repeat region“
ATCC	„American type culture collection“
bidest.	doppelt destilliert
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ci	Curie
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
CTL	„cytotoxic T lymphocyte“
Cy3	Carbocyanin 3
DC	„Dendritic cell“
DCIS	„Ductal carcinoma <i>in situ</i> “
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	Doppelstrang
DTT	Dithiothreitol
ECL	„Enhanced chemiluminescence“
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Östrogen Rezeptor
FACS	„Fluorescence-activated cell sorting“
FCS	„Fetal calf serum“
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GFP	„Green fluorescent protein“
GPI	Glykophosphatidylinositol
GSH	Georg-Speyer-Haus
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HD	„Healthy donor“
His-„tag“	Histidin-„tag“ (englisch für Fortsatz, Anhang)
HLA	„Human leukocyte antigen“
HRP	„Horseradish peroxidase“
IDC	„Invasive ductal carcinoma“
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie

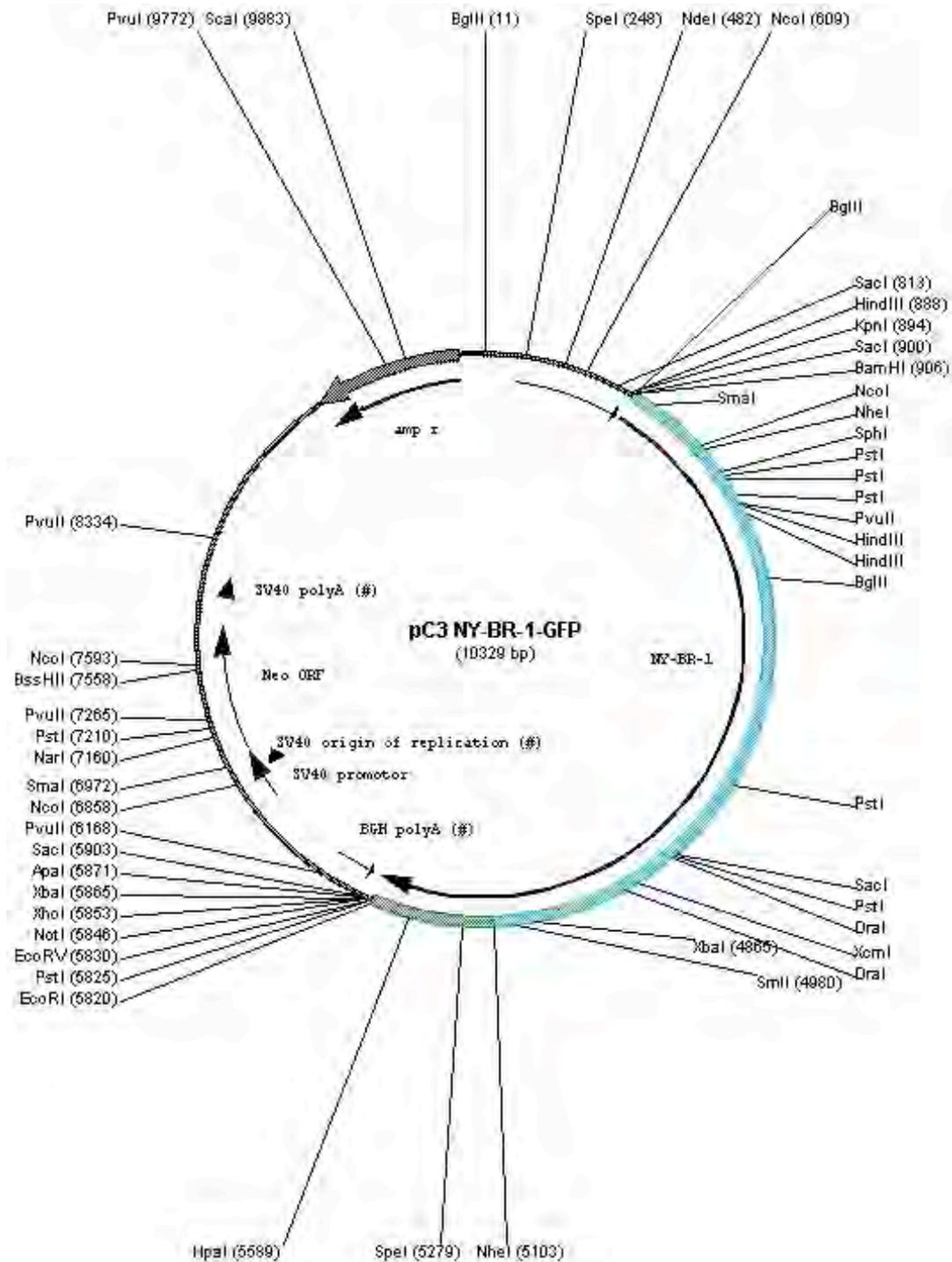
IL	Interleukin
ILC	„Invasive lobular carcinoma“
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
m	milli
M	molar
mAB	monoklonaler Antikörper
MCS	„Multiple Cloning Site“ (englisch: Multiple Klonierungsstelle)
MDC	Max-Dellbrück-Centrum
MHC I/II	„Major histocompatibility complex I/II“
min	Minute
MOPS	4-Morpholinopropanesulfonic acid
mRNA	„Messenger“-Ribonukleinsäure
MW	Molekulargewicht
NCT	Nationales Centrum für Tumorerkrankungen
NK	„Natural killer“
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
Nukl.	Nukleoplasmin
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm
ORF	„Open reading frame“
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	„Phosphate buffered saline“
PCR	„Polymerase Chain Reaction“ (englisch: Polymerase Kettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
PEI	Polyethylenimin
PMSF	Phenyl-methyl-sulfonylfluorid
PR	Progesteron Rezeptor
r	Resistenzgen
RACE	„Rapid amplification of cDNA ends“
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	„RNA interference“
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
rpm	„rounds per minute“
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEREX	„Serological analysis of cDNA expression libraries“
siRNA	„Small interfering RNA“
SSH	„Subtractive suppression hybridization“
SV40	„Simian virus 40“
TAA	„Tumor associated antigen“
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N'-tetramethyl-ethylene-diamine
T _H	T Helferzellen
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
U	Unit (µmol Substrat pro Minute)

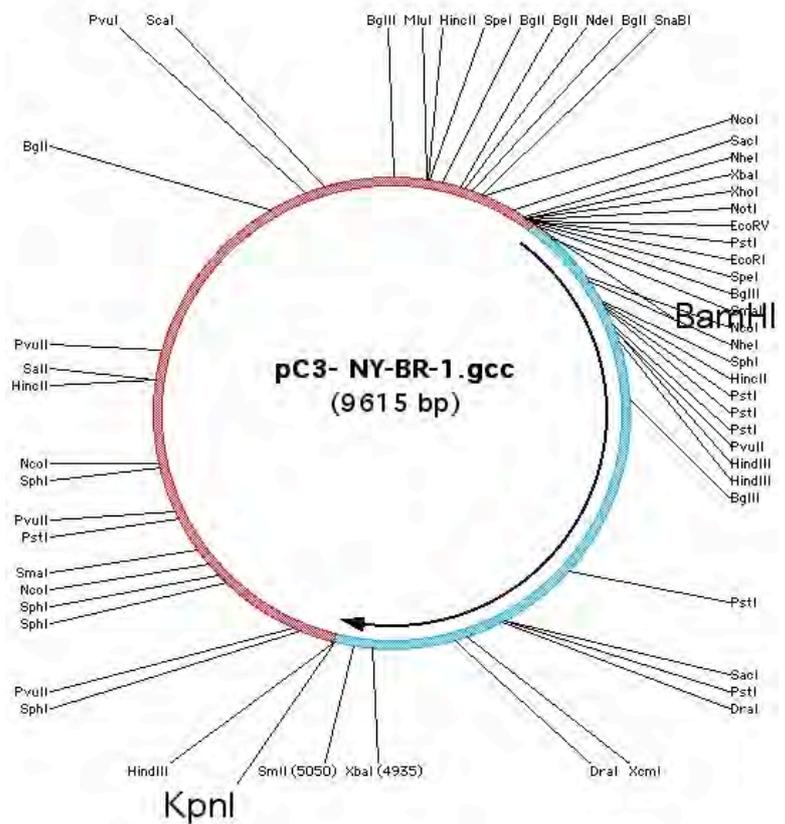
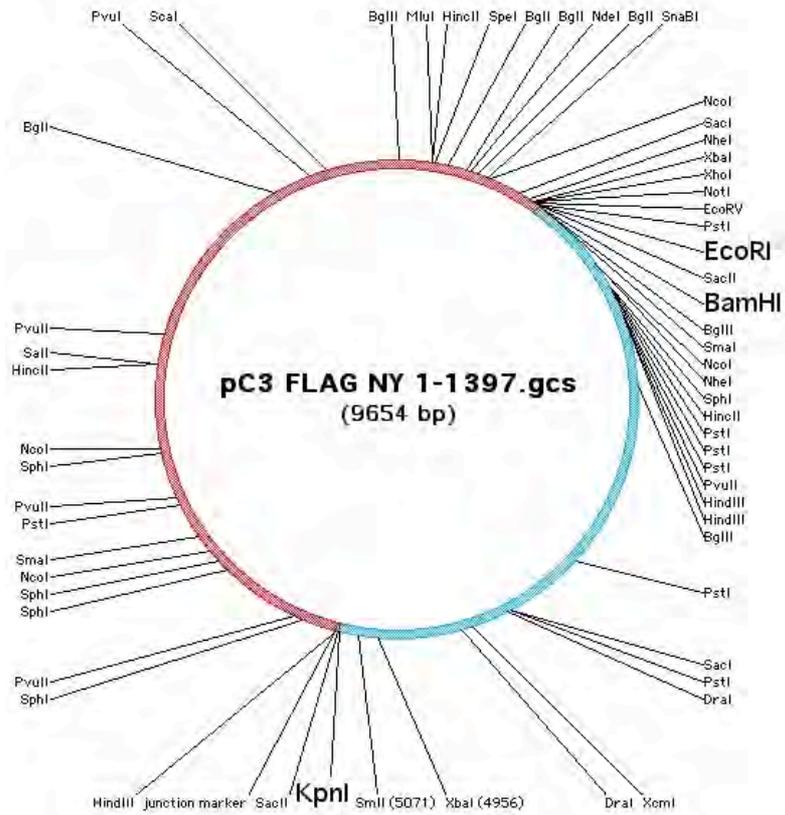
Symbole für Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

7 Anhang

Plasmidkarten





8 Veröffentlichungen

Publikationen

Inka Seil, Claudia Frei, Knut Engels, Holger Sültmann, Shirley Knauer, Elke Jäger, Kurt Zatloukal, Alexander Knuth, Holger Moch, Zsuzsanna Varga, Achim Jungbluth, Michael Pfreunds Schuh, Lloyd J. Old, Yao-Tseng Chen, Roland H. Stauber and Dirk Jäger. „The differentiation antigen NY-BR-1 is a potential target for antibody based therapies in breast cancer“. (Manuskript eingereicht)

Dirk Jäger, Valeriy Filonenko, Ivan Gouth, Denise Frosina, Susannah Eastlake-Wade, Sandra Castelli, Zsuzsanna Varga⁵, Holger Moch, Yao-Tseng Chen, Klaus J. Busam, Inka Seil, Lloyd J. Old, Aviram Nissan, Claudia Frei, Ali O. Gure, Alexander Knuth, Achim A. Jungbluth. „ NY-BR-1 is a Differentiation Antigen of the Mammary Gland“. (Manuskript eingereicht)

Dirk Jäger, Julia Karbach, Claudia Pauligk, Inka Seil, Claudia Frei, Alexander Knuth, Yao-Tseng Chen, Lloyd Old, and Elke Jäger. „Humoral and cellular immune responses against the breast cancer antigen NY-BR-1: Definition of two HLA-A2 restricted peptide epitopes“. (Manuskript zur Publikation akzeptiert)

Linka N, Hurka H, Lang BF, Burger G, Winkler HH, Stamme C, Urbany C, Seil I, Kusch J, Neuhaus HE. „Phylogenetic relationships of non-mitochondrial nucleotide transport proteins in bacteria and eukaryotes.“ Gene. 2003 Mar 13;306:27-35

Posterpräsentation

12th International AEK/AIO Cancer Congress, März 2003, Würzburg: „Functional Characterization of the breast tumor antigen NY-BR-1“. Inka Seil, Silke Deckert, Negusse Habtemichael, Dirk Jäger, and Roland H. Stauber .

2nd International Conference „Strategies for immune therapy“, März 2004, Würzburg: „Functional Characterization of the breast tumor antigen NY-BR-1“. Inka Seil, Silke Deckert, Negusse Habtemichael, Dirk Jäger, and Roland H. Stauber.

13th International AEK/AIO Cancer Congress, März 2005, Würzburg: „The breast cancer antigen NY-BR-1 is expressed at the cell surface“. Inka Seil, Silke Deckert, Dirk Jäger and Roland H. Stauber .

Cancer Immunotherapy, Mai 2005, Mainz: „The differentiation antigen NY-BR-1 is overexpressed in mammary tumors and encodes a novel membrane protein - a potential target for immunotherapy“. Inka Seil, Silke Deckert, Claudia Frei, Knut Engels, Ralf Lieberz, Kurt Zatloukal, Holger Sültmann, Elke Jäger, Alexander Knuth, Dirk Jäger and Roland H. Stauber.

Vorträge

Seminarpräsentation bei Prof. Dr. A. Knuth/PD Dr. D. Jäger, Universitätsspital Zürich, März 2004: „Functional characterization of the breast cancer antigen NY-BR-1“

The differentiation antigen NY-BR-1 is a potential target for antibody based therapies in breast cancer

Inka Seil^{1,2}, Claudia Frei², Knut Engels³, Holger Sültmann⁴, Shirley Knauer¹, Elke Jäger⁵, Kurt Zatloukal⁶, Alexander Knuth⁷, Holger Moch⁸, Zsuzsanna Varga⁸, Achim Jungbluth⁹, Michael Pfreundschuh¹⁰, Lloyd J. Old¹¹, Yao-Tseng Chen¹², Roland H. Stauber^{1,*} and Dirk Jäger^{2,*‡}

¹Georg-Speyer-Haus, Institute for Biomedical Research, Paul-Ehrlich Strasse 42-44, 60596 Frankfurt, Germany; ²Medical Oncology, National Center for Tumor Diseases, University Hospital Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 350, 69120 Heidelberg, Germany; ³Department of Pathology, University Hospital Frankfurt, Theodor Stern Kai 7, 60596 Frankfurt, Germany; ⁴Division of Molecular Genetics, Deutsches Krebsforschungszentrum, Im Neuenheimer Feld 280, Heidelberg, Germany; ⁵II. Medizinische Klinik Hämatologie–Onkologie, Krankenhaus Nordwest, Im Steinbacher Hohl 2-26, 60488 Frankfurt, Germany; ⁶University of Graz, Department of Pathology, Auenbruggerplatz 25, 8036 Graz, Austria; ⁷Medical Oncology, University Hospital Zurich, Raemistrasse 100, 8091 Zürich, Switzerland; ⁸Department of Pathology, University Hospital Zurich, Schmelzbergstrasse 12, 8091 Zürich, Switzerland; ⁹Ludwig Institute for Cancer Research, New York Branch at Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, 1275 York Avenue, New York, NY 10021, USA; ¹⁰Universitätsklinikum des Saarlandes, Kirrberger Strasse, 66424 Homburg/Saar, Germany; ¹¹Ludwig Institute for Cancer Research, New York Branch at Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, 1275 York Avenue, New York, NY 10021, USA; ¹²Department of Pathology, Weill Medical College of Cornell University, 1300 York Avenue, New York, NY 10021, USA.

*Both authors contributed equally to this work

‡Corresponding author:

Dirk Jäger, MD

Medical Oncology, National Center for Tumor Diseases, University Hospital Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 350, D-69120 Heidelberg, Germany.

Phone: (+49) 6221 56 7228

Fax: (+49) 6221 56 7225

E-mail: dirk.jaeger@med.uni-heidelberg.de

Manuscript information:

Text pages: 19, figure: 5, tables: 1.

Word and character counts: abstract: 202 words, paper: 46.450 characters.

Abbreviation footnote: monoclonal antibody (mAb)

Abstract

Cancer immunotherapy depends on the identification and functional characterization of potential target antigens and the development of potent antibodies recognizing the target antigen. Here we report the expression analysis, molecular characterization and subcellular localization analysis of the differentiation antigen NY-BR-1 that we previously identified by SEREX (serological analysis of recombinant tumor cDNA expression libraries). Corroborating methodologies, including mRNA quantitation, immunoblot and immunohistochemistry demonstrated that NY-BR-1 was expressed in >70% of breast tumors as analyzed in a series of 125 patients with primary breast cancer. In contrast, most of the breast cancer cell lines tested did not express NY-BR-1. NY-BR-1 was confirmed as an immunogenic tumor antigen since we found spontaneous antibody responses in breast cancer patients, albeit with a low frequency. Confocal microscopy revealed that NY-BR-1 localizes to the cytoplasm and the plasma membrane in cell line models. NY-BR-1 membrane localization is mediated by a N- and a C-terminal membrane targeting domain. Additional biochemical as well as immunological methods characterized NY-BR-1 as a membrane associated protein, which could be specifically recognized by a monoclonal antibody in vital cells. The expression profile and the subcellular localization now annotate NY-BR-1 as a highly attractive target antigen for antibody based therapies in breast cancer.

Introduction

Antigen-specific immunotherapeutic approaches in cancer, both cell-mediated and antibody-based, rely on the identification of target antigens expressed in cancer cells. The most promising target antigens are those that show tumor specific expression and homogenous distribution throughout the tumor. For cancer vaccines, the subcellular localization of the tumor antigen is irrelevant, as endogenous antigens are processed by immune proteasomes and presented by MHC-I molecules as short peptides on the cell surface. However, if tumor antigens are also cell surface antigens, they would be accessible to antibodies and can thus be potential targets for antibody-based immunotherapy as well. Different techniques have been developed to identify tumor antigens suitable for immunotherapy approaches, mainly for cancer vaccines. The T cell epitope cloning technique identifies tumor antigens based on a spontaneous antigen-specific response of cytotoxic T cells (CD8⁺ T cells) (1). Using this approach, several tumor antigens were identified and some of them were evaluated as targets in clinical immunotherapy trials (2). Over the past 10 years, a growing number of tumor antigens that elicited spontaneous humoral immune responses were identified following a

serological cloning strategy (SEREX) (3). We previously used this technique to analyze breast cancer and identified a new breast differentiation antigen designated as NY-BR-1 (5). In preliminary expression analysis we found NY-BR-1 mRNA to be expressed in about 80% of breast cancers, in normal breast tissue and in testis. Here we systematically analyze the frequency of NY-BR-1 mRNA expression in primary breast cancer and the frequency of spontaneous antibody responses in those patients. To evaluate whether NY-BR-1 can also be a target antigen for antibody-based therapy, we examined the subcellular localization of NY-BR-1 and showed that NY-BR-1 is expressed at the cell surface and is accessible for monoclonal antibodies in cell culture systems. In summary, our data show that NY-BR-1, in addition to being a candidate antigen for therapeutic cancer vaccine, is a highly attractive target antigen for antibody based immunotherapy approaches in breast cancer.

Results

NY-BR-1 is overexpressed in the majority of breast cancers. To systematically examine the expression of NY-BR-1 in breast cancer patients, we analyzed 125 patients who underwent surgery for primary breast cancer.

NY-BR-1 mRNA levels in patients from Germany, Switzerland and Austria were analyzed by microarrays, quantitative RT-PCR and conventional RT-PCR, respectively. Fig. 1A shows that NY-BR-1 was overexpressed in 80% of breast cancer patients analyzed by quantitative RT-PCR (20 out of 25 patients). Microarray analysis of 49 patients demonstrated that in comparison to the Universal Human Reference RNA, NY-BR-1 was upregulated >2-fold in 69% of the patients (34 out of 49 patients) (Fig. 1B). Likewise, 78% of the patients examined (43 out of 55) were positive for NY-BR-1 RNA by conventional RT-PCR analysis (Fig. 1C). The frequency of NY-BR-1 mRNA expression in breast cancer is thus highly consistent using various methodologies.

To confirm the NY-BR-1 expression pattern also at the protein level, a monoclonal anti-NY-BR-1 antibody was used for immunohistochemistry. Specificity of the antibody was confirmed by immunoblot analysis of lysates from 293T transfectants in which anti-NY-BR-1 specifically identified full length NY-BR-1, NY-BR-1_GFP and NY-BR-1_609/1397_GFP (Fig. 1D). In contrast, no unspecific binding was observed in lysates from 293T cells, which do not express NY-BR-1 as analyzed by RT-PCR. Anti-GFP antibody further validated these results, recognizing the NY-BR-1_GFP and NY-BR-1_609/1397_GFP. Since the antibody was a highly specific tool to detect NY-BR-1 expression, we analyzed primary breast cancers by immunohistochemistry. Strong staining of tumor cells was observed, whereas the surrounding normal, stromal breast

tissue was negative (Fig. 1E and data not shown). No staining was observed in other tumors examined (Varga et al., manuscript submitted).

Evaluation of Spontaneous NY-BR-1 Specific Antibody Responses. Spontaneous NY-BR-1 specific antibody responses indicate immunogenicity of the protein. A total of 43 sera from patients with primary NY-BR-1 positive breast cancer were analyzed for NY-BR-1 specific antibodies. Fig. 2 shows a representative western blot for a positive (P4) and a negative (P5) patient serum. The serum of patient 4 detects NY-BR-1 protein in the lysate of NY-BR-1 expressing 293T cells (NY), whereas mock transfected cells (\emptyset) served as the negative control. Out of 43 sera analyzed, NY-BR-1 specific antibodies were detected in 3 patients (7%).

NY-BR-1 encodes a plasma membrane protein. Cell culture models are valuable tools to dissect the biological functions of proteins. Thus, we analyzed NY-BR-1 expression in several breast cancer and other tumor cell lines by qRT-PCR and western blot. However, in contrast to the patient samples, NY-BR-1 expression was almost undetectable in the cell lines investigated, showing only marginal expression in 3 of 11 breast cancer cell lines (MDA-MB-453, BT474, and T47D) and none of the other cell lines tested (MDA-MB-361, 435, 468, BT549, SK-BR-3, MCF7, MCF-10A, HBL-100, and non-breast lines HeLa, 293T, A431, and 1624). Since no appropriate cell line was available to study endogenous NY-BR-1, we utilized cell lines transfected with tagged- and untagged-versions of NY-BR-1 to investigate the subcellular localization of NY-BR-1. Indirect immunofluorescence revealed that NY-BR-1, FLAG_NY-BR-1 as well as NY-BR-1_GFP localized to the cytoplasm with a predominant cell surface staining in 293T and MCF-10A cells (Fig. 3A/B) as well as in other cell lines examined (Table 1). Plasma membrane localization was verified by marking the cell surface with rhodamine labeled WGA. Cells that weakly expressed NY-BR-1 showed primarily cell membrane localization while strong expressors also showed cytoplasmic staining, and no nuclear localization was observed. Subsequently, NY-BR-1 membrane association was verified in patient specimens by western blot analysis. The anti-NY-BR-1 mAb specifically detected NY-BR-1 in the insoluble fraction (m), comprising all cellular membranes and organelles, from a normal breast lysate, whereas the soluble fraction (s) was negative (Fig. 3C). Lysates from NY-BR-1 negative MCF-7 cells served as a control. NY-BR-1 was also detected only in the membrane fraction of breast cancer metastases (Fig. 3D). To control the quality of the membrane preparation, we rehybridized the membrane with an anti-ErbB2 antibody. ErbB2 is a transmembrane protein overexpressed in breast cancer and was detected in the metastases but not in normal breast tissue.

NY-BR-1 contains two plasma membrane targeting domains. Expression of NY-BR-1 deletion mutants revealed that NY-BR-1_1/367 and NY-BR-1_908/1397 proteins were associated with the plasma membrane, whereas NY-BR-1_609/1125 was cytoplasmic and nuclear in several cell lines examined (Fig. 4A and Table 1). These results are consistent with the protein sequence analysis using the Kyte & Doolittle algorithm (15), which indicates potential hydrophobic membrane targeting domains in these two regions (Fig. 4B). Since a transmembrane association for the aa 908-1397 was predicted with a rather low probability, we experimentally confirmed its membrane targeting activity by fusion to the RevM10-BFP protein. In contrast to the reporter protein RevM10-BFP, which exclusively localized to the nucleolus, the NY-BR-1_908/1397_RevM10-BFP fusion localized to the plasma membrane (Fig. 4C). These results unequivocally identified two plasma membrane targeting domains in NY-BR-1.

Anti-NY-BR-1 antibody recognizes living NY-BR-1 expressing cells. To qualify as a target antigen for antibody based immunotherapy, the protein has to be expressed on the cell surface being accessible for monoclonal antibodies.

Cell surface biotinylation experiments verified biochemically that NY-BR-1 is a membrane protein exposed to the extracellular space (Fig. 5A). Ectopically expressed NY-BR-1_GFP could be labeled with membrane-impermeable biotin and precipitated with neutravidin-agarose beads from 293T cells. Fas-Ligand, a transmembrane protein and survivin-GFP, a strictly cytosolic protein, served as controls. Fig. 5B/C provides additional evidence that the anti-NY-BR-1 mAb can target NY-BR-1 in living cells. The antibody detected NY-BR-1 on the cell surface of vital NY-BR-1 expressing 293T cells as analyzed by FACS (Fig. 5B/a). Cell membrane integrity was controlled by the absence of staining in live survivin-GFP expressing cells using the anti-survivin antibody (Fig.5B/b). This result was confirmed by indirect Immunofluorescence (Fig. 5C). NY-BR-1 surface expression in NY-BR-1 expressing unfixed 293T cells could be detected by the anti-NY-BR-1 mAb (Fig. 5C/a). No signal was observed in control 293T cells or by using unspecific mouse IgG (data not shown). These results conclusively suggest NY-BR-1 as a target antigen for antibody based immunotherapy and suggest the anti-NY-BR-1 antibody as a potential targeting monoclonal.

We further studied whether the amino terminus of the FLAG_NY-BR-1 protein is also displayed at the cell surface. The NK1R_FLAG and the FasL_FLAG served as controls for cell surface FLAG and for cytoplasmic FLAG expression, respectively. Immunostaining of transfected 293T cells was performed with fixed and permeabilized cells as well as with living, unfixed cells using the anti-FLAG antibody. Fig 5C/b and c show that the FLAG-epitopes of FLAG_NY-BR-1 as well as of NK1R_FLAG, respectively are expressed at the

cell surface. Cell membrane integrity was controlled by the absence of staining in live FasL_FLAG expressing cells (Fig. 5C/e).

The same observation was made applying FACS analysis with either vital or fixed cells expressing FLAG_NY-BR-1, FasL_FLAG or Neurokinin-1 receptor_FLAG (data not shown). These findings clearly demonstrate that the NY-BR-1 N-terminal region is also extracellular and they are consistent with the topology prediction by the ConPred II algorithm (16), which maps two transmembrane domains (aa 147-167 and 208-228), an extracellular N-terminus as well as an extracellular C-terminus for NY-BR-1.

Discussion

Monoclonal antibodies targeting tumor-associated antigens are already part of routinely used protocols for the treatment of cancer. Rituximab, a monoclonal antibody directed against the CD20 surface marker on B cells, when used in combination with chemotherapy, has significantly improved long term survival in high grade B cell lymphoma and is considered a standard approach for the first line treatment (17). Similarly, Trastuzumab, a monoclonal antibody directed against the Her2/neu proto-oncogene product, has been shown to be effective in combination with chemotherapy in Her2/neu overexpressing breast cancer (18). Recently published data strongly support the use of Trastuzumab in the adjuvant setting of Her2/neu overexpressing breast cancer, and a significant survival benefit has already been shown after 2 years. However, Her2/neu is amplified in 15-30% of breast cancer, and less than one third of breast cancer patients can potentially benefit from this treatment (19). There is great need to identify other potential target antigens which are broadly expressed in breast cancer so that antibody based therapies can be accessible for most patients suffering from this disease. We previously showed NY-BR-1 as an immunogenic tumor antigen, with mRNA expressed in the majority of breast cancers but not expressed in normal tissues except normal mammary gland and testis (5) (20). This frequent expression of NY-BR-1 in breast cancer is now further confirmed by this study, both at the RNA levels as well as at the protein level by immunohistochemistry using a monoclonal anti-NY-BR-1 antibody. Importantly, NY-BR-1 expression in lymph node metastases highly correlates with the primary tumor, and the disease progression did not appear to lead to a decrease in the expression of this differentiation antigen (Varga et al., manuscript submitted).

Despite these favorable characteristics, surface expression would be a prerequisite for NY-BR-1 to be an antigenic target for treatment with monoclonal antibodies, and this issue

was vigorously examined in the present study using a cell culture transfection model and three experimental approaches: First, confocal laser scanning microscopy clearly demonstrated cell membrane association in cells expressing low levels of NY-BR-1; second, in cell surface biotinylation assays performed with transfected 293T cells, NY-BR-1 was detected in the biotinylated fraction, supporting its cell surface localization rather than intracellular association with the cell membrane. To exclude biotinylation of intracellular protein leaking through the membrane we used the strictly intracellularly expressed protein survivin as a negative control and the cell surface protein FasL representing the positive control. In contrast to survivin, only NY-BR-1 and FasL were detectable in the biotinylated fraction indicating cell surface expression and leakage of intracellular proteins through the cell membrane was ruled out. Third and most significantly, to convincingly prove the accessibility of NY-BR-1 for antigen-specific antibodies on intact vital cells, we used the monoclonal NY-BR-1 specific antibody in FACS analysis. On vital, transfected 293T cells, NY-BR-1 was recognized by the antibody, indicating that the C-terminus of NY-BR-1, the protein region carrying the antibody epitope, has a cell surface localization and is accessible to the NY-BR-1 monoclonal antibody. Immunofluorescence studies and FACS analysis with cells expressing the FLAG-tagged NY-BR-1 protein demonstrated that the N-terminus is also displayed on the cell surface. These experimental findings were further supported by bioinformatic analysis of the NY-BR-1 protein sequence with the ConPred II algorithm and by the finding of two hydrophobic regions at amino acids 147-167 and 208-228, consistent with the existence of extracellular N- and C-termini.

Ideally the above experiments should be performed on breast cancer cells normally expressing NY-BR-1. However, as most breast cancer lines have lost this differentiation antigen, it was necessary for us to carry out the experiments using transfected cell lines as an alternative. Although this raises the concern whether our observation might be biased, we believe that the possibility that a transfected NY-BR-1 overexpressing cell may express the protein on the membrane artificially due to overexpression is very unlikely, as the same cell transfected with survivin respects its strictly intracellular localization. We could not detect survivin on the cell surface of survivin transfected 293T cells by FACS analysis and the biotinylation assay detected survivin in the unbiotinylated fraction of the cell lysate. Furthermore, the membrane localization of NY-BR-1 is predominantly observed in cells expressing low levels of the protein, which is likely to correspond to physiological *in vivo* protein levels. This strongly indicates that our cell line model does

represent the physiological situation in NY-BR-1 positive cells. The only experimental finding that did not conclusively show NY-BR-1 membranous expression was the immunohistochemical staining on paraffin sections, which showed predominantly cytoplasmic staining. Nevertheless, a membrane staining of some NY-BR-1 positive breast cancer cells was observed, particularly in cells that showed less intense positivity (data not shown). This is consistent with our confocal microscopy findings on the cell lines, and we have concluded that NY-BR-1 is expressed in both cytoplasmic and membranous compartments. The immunoblotting experiments showed NY-BR-1 in the membrane fraction but not in the soluble protein fraction, suggesting that NY-BR-1 might exist in cytoplasm as a membranous protein in the organelles, rather than as a soluble cytosol protein.

In conclusion, we identified NY-BR-1 as a highly attractive target antigen for immunotherapy in breast cancer. Its frequent expression in breast cancer and its cell surface/membrane localization make NY-BR-1 a highly promising target for antibody based therapy, in addition to being a cancer vaccine target as was previously recognized. The monoclonal antibody specific for NY-BR-1 that we produced recognizes vital NY-BR-1 expressing cells, and studies to evaluate the efficacy of this antibody in NY-BR-1 expressing tumor models are warranted.

Materials and Methods

Patient Characteristics and Tissue Samples. Patient specimens were obtained from the Klinik und Poliklinik für Onkologie, Universitätsspital Zürich, Switzerland, Krankenhaus Nordwest, Frankfurt, Germany, and Klinik für Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinik Homurg, Germany and Department of Pathology University of Graz. Tissue samples, blood and serum samples were collected following patients' informed consent. The study was approved by the local ethic committees. All tissue samples were evaluated by the local pathology department of the individual institutions.

RNA Extraction, Reverse Transcription and Real-Time PCR. Total RNA was purified from patient material or cells using TRIzol® reagent (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, Germany). Changes in mRNA levels were compared by reverse transcription (RT) and subsequent quantitative real-time PCR analysis (qRT-PCR) as described (6). The expression ratio (R) of the target gene NY-BR-1 is calculated using the equation: $\text{Ratio} = 2^{-\Delta\text{CT}_{\beta\text{-actin}} - \Delta\text{CT}_{\text{NY-BR-1}}}$. Primers for qRT-PCR were: NY-BR-1, 5'-CAAGAGCTCTGCAGTGTGAGATTG-3' (sense) and 5'-

CTGGTATTGGTGTTCAGTGTGGC-3' (antisense); β -actin, 5'-
 GCGGGAAATCGTGCGTGACATT-3' (sense) and 5'-
 GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGTG-3' (antisense). SYBR green was used as
 fluorescent dye. Alternatively, RT-PCR was performed as described (5).

Probe Preparation and Microarray Expression Analysis. Custom-designed cDNA arrays consisting of 8,441 breast-specific cDNA clones (7) were hybridized with Cy-5 labeled tumor sample cDNA as described (8). The Universal Human Reference RNA (UHRR, Stratagene) labeled with Cy-3 served as a reference. On the array NY-BR-1 was represented by the RZPD-clone *ANKRD30A* (UniGene Hs.373787). Image quantification and data analysis was performed as described and NY-BR-1 expression levels in tumors were normalized to the Universal Human Reference RNA (8) (9). Values from duplicate spots and duplicate microarrays for each cDNA clone were averaged.

Plasmid Constructs

pc3NY-BR-1_aa1/1397 encodes the full length NY-BR-1 open reading frame as described (5). The plasmid was constructed by PCR amplification of NY-BR-1 from normal testis cDNA and cloned into pcDNA 3.1(-) (Invitrogen). pc3FLAG_NY-BR-1, pc3FLAG_NY-BR-1_1/367 encode N-terminal fusions of the FLAG-epitope and the indicated NY-BR-1 amino acids (aa), and were constructed by PCR cloning. pc3NY-BR-1_GFP, pc3NY-BR-1_609/1125_GFP and pc3NY-BR-1_908/1397_GFP encode NY-BR-1_GFP fusion proteins and were constructed by PCR amplification as described (10). pNY-BR-1_908/1397_RevM10_BFP encodes a fusion of the NY-BR-1 aa 908-1397 and RevM10BL_BFP (11) and was constructed as described earlier (11). pc3_Survivin_GFP encodes a survivin-GFP fusion protein, pc3FasL_FLAG encodes a FLAG-epitope tagged version of the Fas-ligand and pCi-NK1R encodes a FLAG-epitope tagged version of the Neurokinin-1 receptor (12). The bacterial expression constructs pET24a-NY-BR-1_851/928 encodes the His-tagged NY-BR-1 aa 851-928 and was cloned by PCR-amplification into pET24a (Novagen).

Cell Culture, Immunofluorescence and Imaging of Cells. Cell lines used in this study (Table 2, which is published as supporting information) were maintained under conditions recommended by the American Type Culture Collection and transfected as described (13). Immunofluorescence and microscopy using a Leica TCS SL LSM confocal microscope or an inverted fluorescent microscope (Zeiss AxioVert200) was carried out according to standard procedures (13) (14). Staining was performed using the monoclonal anti-FLAG antibody M2 (1:500, Sigma Aldrich) or the mouse monoclonal anti-NY-BR-1 antibody (1:100) and a Cy-3 conjugated anti-mouse antibody (Dianova). Rhodamine conjugated wheat germ agglutinin (WGA) (Molecular Probes) was used for staining of the plasma membrane and nuclei were marked by staining with TO-PRO®-3 iodide

(Molecular probes) as described (13). For surface stainings, cells were incubated with primary antibodies at 37°C in the presence of NaN₃ prior to fixation. To determine the average intracellular localization of the respective proteins, at least 100 fluorescent cells from two separate images were examined. The number of cells exhibiting cytoplasmic (C), cytoplasmic and plasma membrane (P/C), or nuclear (N) fluorescence was counted, the percentages of C, P/C and N cells calculated and standard deviations were determined.

Generation of NY-BR-1 Specific Monoclonal Antibodies. A recombinant His-tagged peptide (NY-BR-1 aa 851-928), showing no homologies to other known proteins was cloned into pET24a and purified from *E. coli* by Ni-NTA Sepharose chromatography (Novagen) according to the manufacturer's recommendations. The recombinant peptide was used to immunize BALB/c mice for the generation of monoclonal antibody as described (Jäger et al, manuscript submitted).

Immunoblotting and antibodies. Immunoblotting of whole cell lysates was performed according to standard protocols as described (10). Tissue specimens were homogenized using an Ultra-Turrax T25 homogenizer (IKA Labortechnik) in 0.5 ml modified RIPA buffer (50mM Tris-HCl, pH7.4, 150mM NaCl, 0.1%SDS, 1mM EDTA, 1%Na-deoxycholate, 1%Triton X-100) supplemented with protease inhibitor cocktail (Roche). Subsequently, the lysates were centrifuged (30min, 13.000xg, 4°C) and the soluble and the insoluble membrane fractions were subjected to PAGE and immunoblot analysis. Proteins were detected using the anti-NY-BR-1 antibody, a polyclonal anti-GFP antiserum (BD Biosciences), a polyclonal anti-ErbB2 (Santa Cruz) antiserum, a polyclonal anti-β actin antibody (Sigma Aldrich) or serum from breast cancer patients (1:100). Mouse IgG (Sigma Aldrich) served to control unspecific binding.

Immunohistochemistry (IHC). A heat based antigen retrieval technique was used for antigen recovery on paraffin slides employing a household vegetable steamer (Oster, Boca Raton, FL) and various buffer solutions such as citrate buffer (10mM, pH6.0), EDTA (1mM, pH8.0), and DAKO hipH solution (DAKO Cytomation, Carpinteria, CA). After deparaffinization, slides were heated for 30 minutes in the buffer solution before the immunohistochemical staining. Primary antibody incubation was done overnight at 4°C followed by a biotinylated horse-anti-mouse secondary (1:200, Vector Labs, Burlingame, CA) and an avidin-biotin-complex system (Vector Elite, Vector Labs). Diaminobenzidine (liquid DAB, BioGenex, San Ramon, CA) was used as a chromogen.

Cell Surface Protein Biotinylation. The cell surface proteins of confluent 293T cells were labeled at 4°C with membrane-impermeable EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin (Perbio, Bonn, Germany) according to the manufacturer's instructions. Briefly, whole cell lysates (input) were subjected to precipitation with neutravidin beads and eluted with 50mM DTT

in 1XSDS-PAGE sample buffer after washing. The input, eluted precipitates and the beads after the elution step were immunoblotted. As a control, nonbiotinylated cell extracts were incubated with neutravidin beads.

Flow Cytometry Analysis. For cell surface protein detection, fixed or unfixed cells were incubated with saturating amounts of the respective antibodies and analyzed according to standard protocols as described (14). The following antibodies were used: anti-NY-BR-1 antibody, anti-Survivin antibody (NOVUS biologicals) and APC-conjugated goat anti-mouse Ig (BD Pharmingen).

Acknowledgment

We thank Silke Deckert and Gert Carra for excellent technical assistance, Martin Zörnig for advice with confocal microscopy and for providing the FasL-FLAG expression construct, and Bernd Groner for support. This work was supported by the EU FP6 *BRECOSM* (S.R.), the BMBF NGFN initiative (FKZ: 01GS0451/N1KR-S12T22 to S.R.) and by the Cancer Research Institute, New York.

References

1. Boon, T., Cerottini, J. C., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P. & Van Pel, A. (1994) *Annu Rev Immunol* 12, 337-365.
2. Jager, E., Jager, D. & Knuth, A. (2002) *Curr Opin Immunol* 14, 178-182.
3. Sahin, U., Tureci, O., Schmitt, H., Cochlovius, B., Johannes, T., Schmits, R., Stenner, F., Luo, G., Schobert, I. & Pfreundschuh, M. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11810-11813.
4. Jager, D., Taverna, C., Zippelius, A. & Knuth, A. (2004) *Cancer Immunol Immunother* 53, 144-147.
5. Jäger, D., Stockert, E., Gure, A., Scanlan, M., Karbach, J., Jäger, E., Knuth, A., Old, L. & Chen, Y. (2001) *Cancer Res.* 61, 2055-2061.
6. Schlingemann, J., Habtemichael, N., Ittrich, C., Toedt, G., Kramer, H., Hambek, M., Knecht, R., Lichter, P., Stauber, R. H. & Hahn, M. (2005) *Lab. Investigation* 85, 1024-1039.
7. Schneider, J., Bunes, A., Huber, W., Volz, J., Kioschis, P., Hafner, M., Poustka, A. & Sultmann, H. (2004) *BMC Genomics* 5, 29-38.
8. Sultmann, H., von Heydebreck, A., Huber, W., Kuner, R., Bunes, A., Vogt, M., Gunawan, B., Vingron, M., Fuzesi, L. & Poustka, A. (2005) *Clin Cancer Res* 11, 646-655.
9. Bunes, A., Huber, W., Steiner, K., Sultmann, H. & Poustka, A. (2005) *Bioinformatics* 21, 554-556.
10. Knauer, S. K., Carra, G. & Stauber, R. H. (2005) *Mol. Cell. Biol.* 25, 2573-2582.

11. Knauer, S. K. & Stauber, R. H. (2005) *Anal Chem* 77, 4815-4820.
12. Monastyrskaya, K., Hostettler, A., Buergi, S. & Draeger, A. (2005) *J Biol Chem* 280, 7135-7146.
13. Knauer, S. K., Moodt, S., Berg, T., Liebel, U., Pepperkok, R. & Stauber, R. H. (2005) *Traffic* 6, 1-13.
14. Stauber, R. H., Horie, K., Carney, P., Hudson, E. A., Tarasova, N. I., Gaitanaris, G. A. & Pavlakis, G. N. (1998) *BioTechniques* 24, 462-471.
15. Kyte, J. & Doolittle, R. F. (1982) *J Mol Biol* 157, 105-132.
16. Arai, M., Mitsuke, H., Ikeda, M., Xia, J. X., Kikuchi, T., Satake, M. & Shimizu, T. (2004) *Nucleic Acids Res* 32, 390-393.
17. Coiffier, B. (2002) *Semin Oncol* 29, 18-22.
18. Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J. & Norton, L. (2001) *N Engl J Med* 344, 783-792.
19. Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E., Levin, W. J., Stuart, S. G., Udove, J., Ullrich, A. & et al. (1989) *Science* 244, 707-712.
20. Jager, D., Unkelbach, M., Frei, C., Bert, F., Scanlan, M. J., Jager, E., Old, L. J., Chen, Y. T. & Knuth, A. (2002) *Cancer Immun* 2, 5-17.

Figure Legends:

Fig. 1. NY-BR-1 is overexpressed in breast cancer patients. NY-BR-1 mRNA levels were analyzed by: (A) qRT-PCR and normalized to β -actin. $\text{Ratio} = 2^{-(\Delta\text{CT } \beta\text{-actin} - \Delta\text{CT NY-BR-1})}$. PT: primary tumor; M: metastasis; PE: pleural effusion; N: normal breast. (B) DNA microarrays and normalized to the UHR. Fold change is indicated. (C) NY-BR-1 mRNA expression analysis of breast cancer samples by qualitative RT-PCR. Representative example showing specific signals in 13 out of 15 primary breast cancer samples. (D) Detection of NY-BR-1 expression in transfected 293T cells. Immunoblot analysis using the anti-NY-BR-1 mAb, anti-GFP and anti- β -actin antibodies (loading control). \emptyset : untransfected; lane 1: NY-BR-1_1/1397; 2: NY-BR-1_1/1397_GFP; 3: NY-BR-1_609/1397_GFP. (E) Immunohistochemistry using the anti-NY-BR-1 antibody demonstrates that NY-BR-1 is intensely expressed in the tumor cells of invasive ductal carcinoma (T) but only weakly in ductal epithelium of normal breast (N).

Fig. 2. Evaluation of NY-BR-1 specific antibody responses in breast cancer patients. Representative immunoblot for a positive (P4) and a negative (P5) patient serum. Serum P4 detected the NY-BR-1 protein in the lysate from NY-BR-1 expressing 293T cells (NY).

Mock transfected cells (\emptyset) served as the negative control. The anti-NY-BR-1 mAb was used to control specificity of staining, and β -actin as the loading control.

Fig. 3. NY-BR-1 encodes a membrane protein. (A) Confocal microscopy detected ectopically expressed NY-BR-1 and FLAG_NY-BR-1 in the cytoplasm and at the plasma membrane. The anti-NY-BR-1 mAb or an anti-FLAG antibody were used for indirect immunofluorescence. (B) A similar localization was observed for NY-BR-1_GFP. Plasma membranes were marked with rhodamine-labeled WGA (red), and nuclei were stained with TO-PRO[®]-3 (blue). Scale bars: 10 μ m. (C) Immunoblot analysis using the anti-NY-BR-1 mAb specifically detected NY-BR-1 in the insoluble membrane fraction (m) from a normal breast lysate, whereas the soluble fraction (s) was negative. NY-BR-1-negative MCF-7 cells served as a control. (D) NY-BR-1 and ErbB2 were also detectable only in the membrane fraction of normal breast (N) and breast cancer metastases (M). β -actin was used to control protein loading.

Fig. 4. Fluorescence microscopy reveals that NY-BR-1 contains two plasma membrane targeting domains. (A) Ectopically expressed FLAG_NY-BR-1_1/367 and NY-BR-1_908/1397_GFP associated with the plasma membrane, whereas NY-BR-1_609/1125_GFP was cytoplasmic and nuclear. FLAG_tagged protein was detected by indirect immunofluorescence using an anti-FLAG antibody (red). Nuclei were stained with TO-PRO[®]-3 (blue). (B) Prediction of potential membrane targeting domains in NY-BR-1 by the Kyte & Doolittle hydrophobicity algorithm. Hydrophobic residues have calculated values >0 . Black bars mark hydrophobic regions indicating potential (trans)membrane domains, which were confirmed experimentally. (C) NY-BR-1 aa 908-1397 (right panel) were sufficient to tether the nucleolar RevM10-BFP protein (left panel) to the plasma membrane. Scale bars: 10 μ m.

Fig. 5. NY-BR-1 is a cell surface protein accessible to the anti-NY-BR-1 mAb in living cells. (A) Ectopically expressed NY-BR-1-GFP could be labeled on the cell surface of 293T cells with membrane-impermeable biotin (+Biotin), precipitated with neutravidin-beads and detected by western blot analysis. Cells expressing the FLAG-tagged transmembrane protein FasL or survivin-GFP, a strictly cytosolic protein, served as controls. Precipitated proteins were identified by immunoblot using the anti-NY-BR-1 mAb, anti-FLAG and anti-GFP antibodies. No proteins were precipitated from unbiotinylated cells (-Biotin). \emptyset , mock-transfected cells; I, input; E, proteins eluted from neutravidin beads; b, beads after elution. (B) FACS analysis to detect NY-BR-1 surface expression in vital NY-BR-1 expressing 293T using the anti-NY-BR-1 mAb. (a). Survivin-GFP could not be detected on the surface of living 293T cells using an anti-survivin antibody (b). Cells transfected with the empty expression vector (pcDNA3.1) served as the negative control.

(C) Detection of FLAG-NY-BR-1 on the cell surface of life 293T cells by indirect immunofluorescence using the anti-NY-BR-1 mAb (a) or the anti-FLAG antibody (b). As indicated, cells were either untreated or fixed prior to staining to allow detection of cell surface protein or of total protein, respectively. The NK1R_FLAG protein, which expresses the FLAG-epitope extracellularly, can also be stained on the cell surface of living cells (c) as well as in fixed cells (d) with the anti-FLAG antibody. The control for cytoplasmic FLAG, the FasL_FLAG protein, which is not expressed on the cell surface (e), is only detectable in fixed cells (f). Scale bars: 10 μ m.

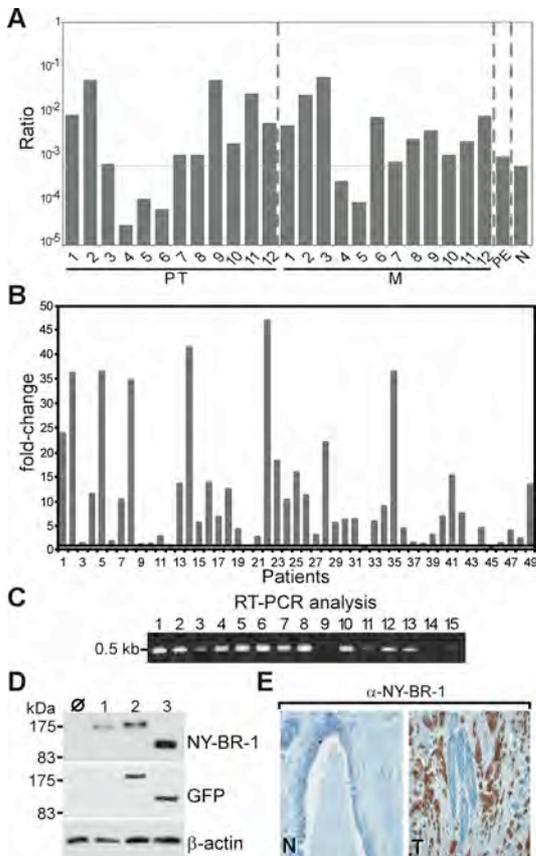


Figure 1

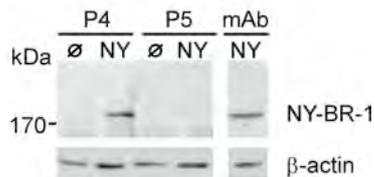


Figure 2

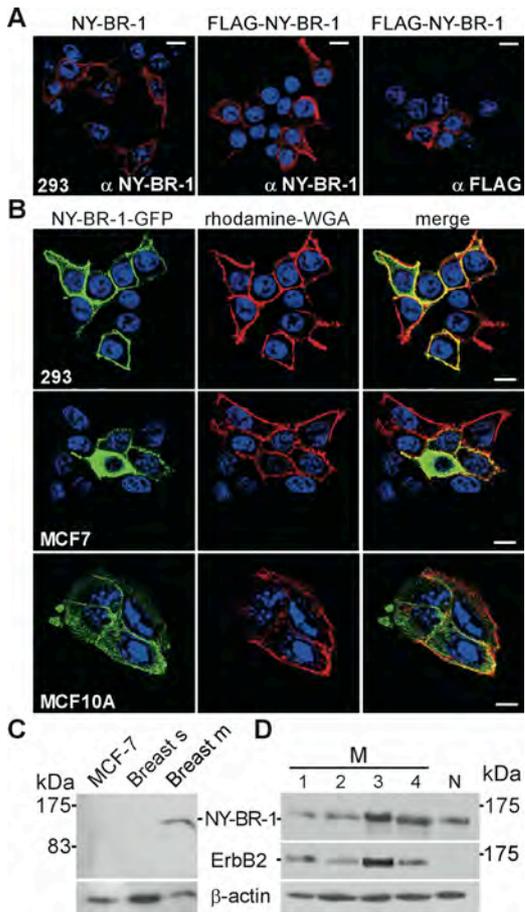


Figure 3

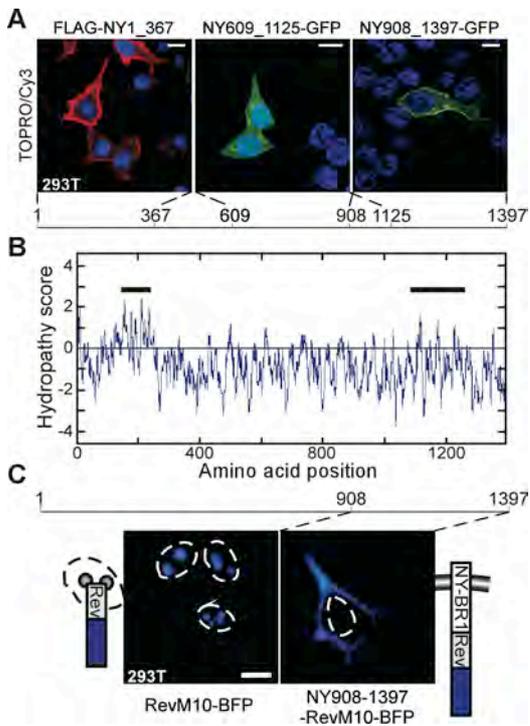


Figure 4

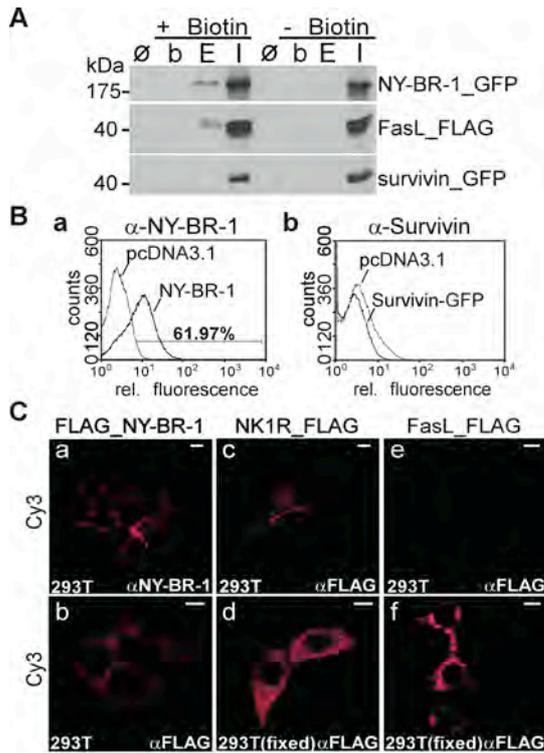


Figure 5

Table 1: Summary of NY-BR-1 expression constructs and intracellular localization following ectopic expression.

plasmid	protein expressed (NY-BR-1 aa)	cellular localization			
		P/C	C	N	cell lines tested
pc3NY-BR-1	f.l., NY-BR-1 (aa 1-1397)	++	+	-	293, H, M7
		*P	* ₋	* ₋	
pc3FLAG_NY-BR-1	f.l., FLAG-NY-BR-1 (aa 1-1397)	++	+	-	293, H, M7
		*P	* ₋	* ₋	
pc3FLAG-NY-BR-1_1-367	FLAG-NY-BR-1 (aa 1-367)	++	+	-	293, H
pc3NY-BR-1_GFP	f.l., NY-BR-1_GFP (aa 1-1397)	++	+	-	293, H, M7, M10
pc3NY-BR-1_609/1125_GFP	NY-BR-1_GFP (aa 609-1125)		++	+	293, H, M7
pc3NY-BR-1_908/1397-GFP	NY-BR-1_GFP (aa 908-1397)	++	+	-	293, H, M7
pc3NY-BR-1_908/1397_RevM10BL-BFP	NY-BR-1_RevM10BL_BFP (aa 908-1397)	++	+	-	293, H
pET24a-NY-BR-1_851/928	6xHis_NY-BR-1 (aa 851-928)				n.d.

P/C: plasmamembrane/cytoplasm; C: cytoplasm; N: nucleus; 293: 293 cells; H: HeLa cells; M7: MCF-7 cells; M10: MCF-10A cells; f.l., full length; *, living cells.

9 Zusammenfassung

Brustkrebs ist die häufigste Krebserkrankung bei Frauen. Trotz guter Behandlungsmöglichkeiten für lokalisierte Primärtumoren verläuft die fortgeschrittene Erkrankung, bei der sich bereits Metastasen gebildet haben, oft tödlich. Es besteht daher ein großer Bedarf an weiteren Tumormarkern für die Diagnostik und Verlaufsbeurteilung sowie an geeigneten Zielproteinen für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien. Neben Radio- und Chemotherapie hat in den letzten Jahren die Immuntherapie bei der Behandlung von Krebserkrankungen an Bedeutung gewonnen. Im Gegensatz zur systemischen Wirkungsweise der Zytostatika wird hierbei das zytolytische Potential des Immunsystems genutzt, um zielgerichtet Tumorzellen zu eliminieren. Sogenannte tumorassoziierte Antigene bzw. „Cancer/Testis“ Antigene repräsentieren potente und effektive Zielproteine sowohl für die Anwendung therapeutischer Antikörper als auch für Vakzinierungen. Besonders die auf dem Einsatz von Antikörpern basierenden Strategien haben sich in Kombination mit einer Chemotherapie in jüngster Zeit als erfolgreich erwiesen.

In einer brustspezifischen SEREX Analyse konnte vor wenigen Jahren das Tumorantigen NY-BR-1 identifiziert werden, für das eine gewebespezifische mRNA Expression in Testis, Brust sowie eine Überexpression in Mammakarzinomen beschrieben wurde. Bioinformatische Vorhersagen legten nahe, dass es sich bei diesem neuen, nicht charakterisierten Protein um einen Transkriptionsfaktor handeln könnte. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Brust Tumorantigen NY-BR-1 molekularbiologisch und biochemisch zu charakterisieren. Des Weiteren sollten dessen Expression in Zelllinien und Geweben untersucht und eine erste Evaluierung der klinischen Relevanz dieses Tumorantigens als Zielprotein für immuntherapeutische Strategien durchgeführt werden. Hierfür wurden zunächst ein NY-BR-1 Vollängen-Expressionskonstrukt kloniert sowie ein polyklonales anti-NY-BR-1 Antiserum hergestellt, das in der Lage ist, rekombinantes und überexprimiertes NY-BR-1 Protein zu detektieren. Für den Nachweis des endogenen Proteins konnte später ein monoklonaler anti-NY-BR-1 Antikörper verwendet werden, der im Rahmen dieser Arbeit bezüglich seiner Funktionalität und Spezifität in diversen Anwendungen (Western Blot, Immunpräzipitation, Immunfluoreszenz, Durchflusszytometrie, Immunhistochemie) getestet und eingesetzt wurde. Expressionsanalysen mittels quantitativer RT-PCR und cDNA-„Microarrays“ zeigten, dass *NY-BR-1* in normalem Brustgewebe, in primären Mammakarzinomen und in Brusttumormetastasen exprimiert ist, wobei im Vergleich zu Normalgewebe in 70% der Tumorproben eine Überexpression zu beobachten war. Interessanterweise wird NY-BR-1 auch in normalem Prostatagewebe und in einigen Prostatatumoren exprimiert. Es gelang in der vorliegenden

Arbeit erstmalig, die Expression des endogenen NY-BR-1 Proteins in normalem Brust-, Testis- und Prostatagewebe sowie entsprechenden Tumorproben im "Western Blot" nachzuweisen, wobei das Protein nur in der unlöslichen Membranfraktion einer Gewebelysatspräparation detektiert werden konnte. Es wurde mit verschiedenen biochemischen und zellbiologischen Methoden in transient transfizierten Zellen gezeigt, dass NY-BR-1 ein Membranprotein ist, dessen N- und C-Terminus sich auf der Zelloberfläche befinden. Immunfluoreszenz und FACS-Analysen belegen, dass der monoklonale Antikörper das NY-BR-1 Epitop auf der Zelloberfläche lebender transfizierter Zellen erkennt. Da NY-BR-1 in Pleuralergusszellen von Brustkrebspatientinnen sowie in etablierten Brust-Zelllinien nur in einigen Fällen auf mRNA Ebene, nicht jedoch auf Proteinebene nachweisbar war, wurde die Lokalisation des endogenen Proteins in Gewebeproben immunhistochemisch untersucht. Während NY-BR-1 in Brust-, Prostata- und Hodentumorzellen überwiegend im Zytoplasma gefunden wird und zum Teil vesikulär/aggregiert vorliegt, konnte in einigen Zellen der Brust- und Hodenkarzinome eine Membranlokalisierung des Proteins beobachtet werden. Die vorhergesagte Funktion von NY-BR-1 als Transkriptionsfaktor konnte experimentell nicht bestätigt werden.

Die Ergebnisse von Co-Immunpräzipitationsexperimenten legten nahe, dass das NY-BR-1 Protein Dimere oder Multimere mit sich selbst bzw. mit dem C-Terminus des Proteins bilden kann. Erste funktionelle Studien lassen eine direkte Beteiligung von NY-BR-1 an der malignen Transformation vermuten. In Weichagar Experimenten konnten NY-BR-1 exprimierende murine Fibroblasten (NIH3T3 Zellen) Kolonien bilden. Desweiteren wurde beobachtet, dass NY-BR-1 Expression in embryonalen Nierenzellen (293T Zellen) einen positiven Einfluß auf deren Adhäsionsverhalten an humane Endothelzellen zur Folge hat. Serologische Untersuchungen von über 50 Brustkrebs Patientenseren konnten bestätigen, dass NY-BR-1 ein Tumorantigen ist und ergaben, dass mindestens 5% der Patienten detektierbare anti-NY-BR-1 Serumantikörper entwickelten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten dazu beitragen, das Expressionsmuster, die zelluläre Lokalisation und die biologische Funktion des Tumorantigens NY-BR-1 näher zu untersuchen. Da NY-BR-1 gewebespezifisch in Brust, Testis und Prostata exprimiert ist und in 70% der Brust- und einigen Prostata Tumoren (über)exprimiert wird, ist NY-BR-1 ein geeigneter Tumormarker und ein attraktives Zielprotein für aktive und passive Immuntherapie bei Brust- und evtl. bei Prostatakrebspatienten. Speziell für auf Antikörpern basierenden Therapien stellt das Zelloberflächenantigen NY-BR-1 ein interessantes „target“ für zukünftige Therapiestudien dar.

Lebenslauf

Name	Inka Seil
Geburtsdatum, -ort	11.06.1974, Osnabrück
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulausbildung

06 1986 - 06 1994	Gymnasium Oesede, Georgsmarienhütte Blair Junior/Senior High School, Blair, Nebraska, USA Austauschschülerin von 06 1990 - 06 1991
-------------------	--

Akademische Ausbildung

10 1995 - 09 2000	Studium der Biologie an der Universität Osnabrück
02 2000 - 04 2000	University of Western Australia, Perth, Australien Laborpraktikum in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. PD C.A. Atkins, Botanisches Institut Thema: „Transformation of <i>Rhizobium NGR234</i> by performing a biparental mating with <i>E. coli</i> BW207676“
05 2000 - 01 2001	Universität Kaiserslautern Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. H.E. Neuhaus unter der Leitung von Dr. J. Tjaden; Abt. Pflanzenphysiologie Thema: „Untersuchungen zu mitochondrialen Transportproteinen aus Pflanzen“
03 2001 - 09 2001	Universität Kaiserslautern Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. H.E. Neuhaus; Abt. Pflanzenphysiologie DFG-Projekt: „ Evolution nicht-mitochondrialer Nukleotid-Transporter“
10 2001 - 02 2002	Uniklinik Frankfurt Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Martin Ruthardt
Seit 03 2002	Chemotherapeutisches Forschungsinstitut Georg-Speyer-Haus, Frankfurt Wissenschaftliche Mitarbeiterin/Doktorandin in der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Roland Stauber Thema der Dissertation: „Molekulare Charakterisierung und Expressionsanalyse des Brust Tumorantigens NY-BR-1“

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Roland Stauber für die Vergabe des interessanten Themas sowie für die Betreuung dieser Arbeit und seine fachliche Unterstützung bedanken.

Frau Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz danke ich sehr für die Betreuung der Arbeit seitens der Fakultät für Biowissenschaften der Universität Frankfurt. Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Bernd Groner für die Möglichkeit, diese Arbeit im Georg-Speyer-Haus anfertigen zu dürfen und bei Herrn Prof. Dr. Winfried Wels für die Übernahme der institutsinternen Betreuung dieser Arbeit.

Ein großes Dankeschön an die derzeitigen und ehemaligen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Stauber für die hervorragende Zusammenarbeit, die praktische Unterstützung und das ausgesprochen nette Arbeitsklima. Selbstverständlich gilt dieser Dank auch allen Kollegen im GSH, die sehr zu der guten Arbeitsatmosphäre durch ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft sowie durch kurzweilige Kaffeepausen beigetragen haben.

Den in dieser Arbeit genannten Kooperationspartnern, vor allem PD. Dr. Dirk Jäger und Claudia Frei danke ich herzlich für die Bereitstellung von Materialien, die ausgezeichnete Zusammenarbeit, für viele motivierende Gespräche und die Perspektive, die Arbeit an diesem Projekt fortführen zu können.

Mein besonderer Dank richtet sich an Martin, meine Familie und Freunde, die mich stets motiviert haben, diese Arbeit fertig zu stellen.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich keiner anderen Hilfsmittel als der angegebenen bedient habe. Entlehnungen aus anderen Schriften sind als solche kenntlich gemacht.

Frankfurt am Main, den

(Inka Seil)