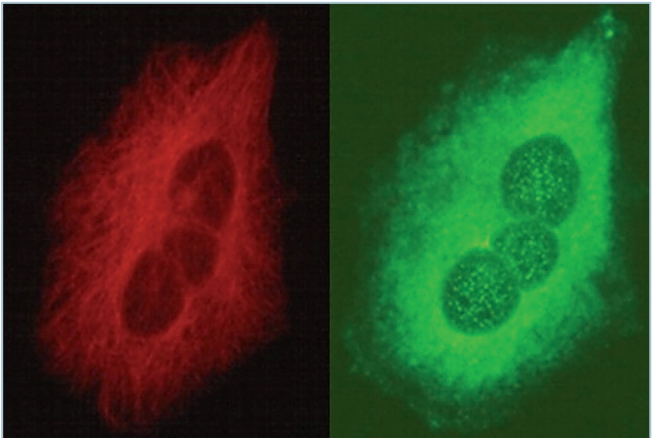


Laborinformation

Tumorassoziierte Autoantikörper I Autoantikörper gegen IGF-II mRNA-Bindungsproteine (IMP)

Prof. Dr. med. H.-P. Seelig



HEp-2-Zelle. Immunfluoreszenz von Tubulin α (links) und IGF-II mRNA-Bindungsprotein 2 (rechts).



Labor Prof. Dr. med. H.-P. Seelig und Kollegen

Kriegsstraße 99 · 76133 Karlsruhe
Telefon: 07 21 / 85 00 00 · www.laborseelig.de

© 2008

Die Assoziation von Autoantikörpern mit malignen Tumoren ist nicht ungewöhnlich. Die Ursachen hierfür werden in einer vermehrten und/oder ektopen Expression von Onkogenen, onkofetalen oder anderen tumorassoziierten Antigenen gesehen. Die aus maligne transformierten Zellen freigesetzten natürlichen oder aufgrund genetischer bzw. somatischer Mutationen oder epigenetischer Prozesse strukturell und/oder funktionell veränderten Antigene können das Immunsystem zur Bildung von Autoantikörpern stimulieren. Beispiele hierfür sind Autoantikörper gegen Zellzyklusregulatoren (anti-*c-myc*), mutierte Tumorsuppressorproteine (anti-p53) oder Onkogene (anti-HER-2/*neu*). Auch mRNA-bindende und stabilisierende onkoneurale Proteine wie HuD und Ri, die eine wichtige Rolle bei paraneoplastischen Neuropathien spielen, können die Bildung von Autoantikörpern auslösen, die schon vor der klinischen Manifestation des Tumors auftreten und von denen vermutet wird, dass sie sogar das Wachstum und die Progression von Tumoren im Sinne einer Immunüberwachung (Immunsurveillance) beeinflussen. Eine weitere Gruppe immunogener, tumorassoziiierter mRNA stabilisierender Proteine stellen die Insulin-like growth factor-II (IGF-II) mRNA bindenden Proteine (IMP1, IMP2, IMP3) dar. Autoantikörper gegen IMP (anti-IMP) wurden erstmals bei Patienten mit hepatozellulären Karzinomen (HCC) beschrieben (ZHANG et al. 1999). Bemerkenswert ist, dass diese Autoantikörper mit dem Zeitpunkt des Übergangs einer vorbestehenden chronischen Hepatitis oder Leberzirrhose in ein hepatozelluläres Karzinom aufzutreten scheinen. Hoffnungen, mit dem Nachweis dieser Antikörper ein hepatozelluläres Karzinom im Frühstadium zu entdecken oder Risikopatienten mit chronischen Hepatitiden auf dem Boden von HBV- oder HCV-Infektionen effektiv zu überwachen, haben sich bisher allerdings nicht erfüllt, da anti-IMPs auch bei zahlreichen anderen Karzinomen gefunden werden.

► Insulin-like Growth Factor (IGF)

Die Insulin-like growth factors IGF-I und IGF-II sind Liganden eines komplexen Kommunikationssystems (Wachstumshormon/IGF-Achse), dem noch die Membranrezeptoren IGF1R und IGF2R, sechs IGF-Bindungsproteine (IGF-BP₁₋₆) und IGF-BP-assoziierte Proteasen angehören. IGF-I und IGF-II besitzen neben insulinähnlichen vor allem mitogene Eigenschaften. Sie stimulieren die DNA- und RNA-Synthese sowie die Proliferationsrate zahlreicher Zellen.

IGF-I (Somatomedin C; 7,6 kDa) ist vor allem an postnatalen Wachstumsprozessen beteiligt. Nach Stimulation durch Wachstumshormon aktiviert der vorwiegend in der Leber gebildete IGF-I die Zellproliferation und hemmt die Apoptose.

IGF-II (Somatomedin A; 7,5 kDa; Abb. 1, 2) ist für die fetale Entwicklung von Bedeutung. IGF-II defiziente Mäuse haben ein auf 60% vermindertes Geburtsgewicht, IGF-II überexprimierende Tiere sind größer als der Wildtyp. Das beim Menschen mit erhöhten IGF-II-Spiegeln assoziierte Beckwith-Wiedemann Syndrom kann mit vermehrtem Geburtsgewicht, größerer Körperlänge, asymmetrischem Größenwachstum, Viszeromegalie, Makroglossie u. a. einhergehen. IGF-II wird in zahlreichen Karzinomen wie z. B. Leberzell-, Mamma-, Ovar-, Prostata-, Endometriumkarzinomen, Neuroblastomen oder Rhabdomyosarkomen vermehrt exprimiert.

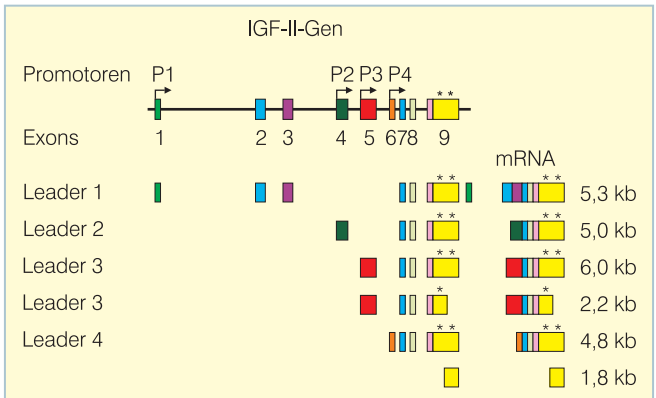


Abbildung 1 Struktur und Transkription des IGF-II Gens

Das konservierte, 30 kb lange, genetisch geprägte IGF-II Gen (nur das paternal vererbte Gen wird exprimiert, das maternale IGF-II Allel ist geprägt (imprinted) und wird daher nicht transkribiert) enthält 9 Exons (farbige Rechtecke) und 4 Promotoren (P1-4), von denen die monoallelisch (paternalen) exprimierten Promotoren P2, P3 und P4 in fetalen Geweben, der biallelisch exprimierte Promotor P1 auch in der adulten Leber aktiv sind. Jeder Promotor startet die Transkription der IGF-II prä-mRNA mit einer individuellen **un**translatierten 5' Region (5' UTR, sog. leader), welche an die codierenden Sequenzen der Exons 7, 8 und 9 gespleißt werden. Promotor P1 liegt vor (5') Exon 1 und generiert eine mRNA von 5,3 kb, bestehend aus den Exons 1, 2, 3 als 5' UTR und den protein-codierenden Exons 7, 8 und 9. Promotor P2 ist für eine 5 kb mRNA mit dem Exon 4 als 5' UTR verantwortlich. Dem Promotor P3 können zwei mRNAs mit 6,0 bzw. 2,2 kb zugeordnet werden, die beide Exon 5 als 5' UTR tragen, jedoch zwei verschiedene Polyadenylierungsstellen (*) in Exon 9 benutzen. Der Promotor P4 exprimiert eine 4,8 kb mRNA. Die 1,8 kb mRNA enthält nur den 3' Bereich aus Exon 9.

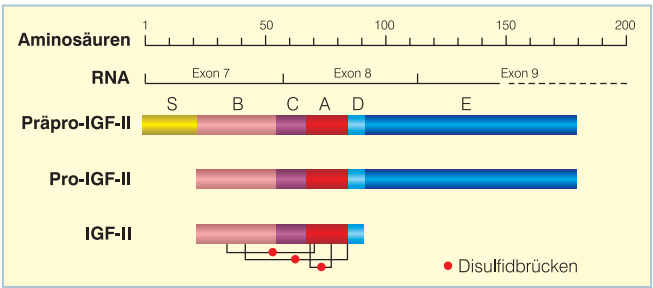


Abbildung 2 IGF-II Protein

Das Primärtranskript (Präpro-IGF-II) der IGF mRNA besteht aus dem Signalpeptid (S) und den Domänen A-E. IGF-II entsteht durch proteolytische Spaltung von Präpro-IGF über Pro-IGF und enthält drei intramolekulare Disulfidbrücken.

Die Aminosäurereste der Domänen A und B von IGF-I und IGF-II zeigen untereinander eine Homologie von 70% und gegenüber Insulin eine Homologie von 50%. Bei der dem C-Peptid des Insulins entsprechenden Domäne C bestehen keine Homologien.

► IGF-II mRNA und ihre Bindungsproteine (IMP₁₋₃)

Bisher wurden drei **Insulin growth factor II mRNA bindende Proteine (IMP)** beschrieben (Abbildung 3), die in fetalen Geweben (Leber, Lunge, Niere, Thymus und Plazenta), nicht aber in normalen adulten Geweben vorkommen. Sie regulieren die posttranskriptionelle Verarbeitung der IGF-II mRNA (leader 3 Isoform). Weitere Bindungspartner für IMPs sind *c-myc*-mRNA, H19-RNA und tau-mRNA. Durch die Bindung von IMP an die IGF-II mRNA im Zellkern wird ein in das Zytoplasma exportierbarer Ribonukleoproteinkomplex erhalten. Dort wird die mRNA entweder direkt translatiert, gelagert oder abgebaut, bzw. in Transportkomplexe inkorporiert entlang des Zytoskeletts in bestimmte subzelluläre Kompartimente an die vorgesehenen Orte der Proteinsynthese transportiert (Titelbild). Hierdurch wird eine effiziente und regulierte Verteilung von Proteinen, d. h. eine polarisierte genetische Information am Ort der Proteinsynthese erreicht. IMPs sind an der Zelladhäsion, der Zytoplasmakompartimentierung und Invadopodienbildung beteiligt. Eine Störung der IMP1-Expression führt bei Mäusen zu Zwergwuchs, gestörter Darmentwicklung und erhöhter perinataler Letalität. IMP werden zu den onkofetalen Antigenen gezählt, da sie auch in zahlreichen malignen Tumoren wie hepatozellulären Karzinomen, Mamma-, Ovarial-, Cervix-, Bronchial-, Pankreas- oder Nierenkarzinomen vermehrt exprimiert werden. IMP2 wurde auch in einzelnen Hepatozyten zirrhotischer Knoten nachgewiesen.

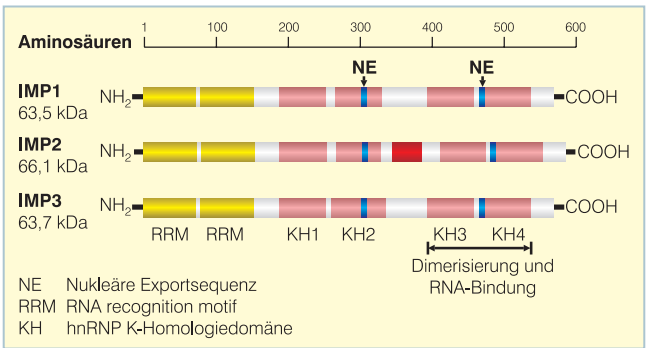


Abbildung 3 IGF-II mRNA-Bindungsproteine (IMP)

IMPs zählen zu den Zipcode-bindenden Proteinen, einer Familie RNA bindender Proteine mit zwei N-terminalen RNA-Erkennungsmotiven (RRM = RNA recognition motif) und vier K-Homologie (KH)-Domänen (= zu dem heterogenen nukleären Ribonukleoprotein K homologe Domänen). In der KH2 und KH4-Domäne finden sich Sequenzmotive für den nukleären Im- und Export (NE). Die Bindung an die leader 3 mRNA erfolgt über die KH3- und KH4-Domänen. Für eine stabile Bindung ist eine Homo- oder Heterodimerisierung der IMP notwendig, die sequentiell und kooperativ erfolgt. Cis-Elemente für solche Bindungen befinden sich auf der 5'-UTR (leader), 3'-UTR (trailer) und in den codierenden Sequenzen der mRNA.

► IMP-Autoantikörper

Autoantikörper gegen IMP2 (anti-IMP2) wurden erstmals bei einem chinesischen Patienten mit hepatozellulärem Karzinom (HCC) gefunden. Sie richteten sich gegen ein p62 genanntes Protein, das als Spleißvariante von IMP2 identifiziert wurde. Die Prävalenz von anti-IMP2 bei chinesischen HCC-Patienten (N=95) betrug 21% (vgl. Tabelle 1 mit Angaben aus nachfolgenden Untersuchungen). Anti-IMP ließen sich nicht bei HBs-Ag-Trägern, akuten und chronischen Hepatitiden oder gesunden Personen nachweisen. Weit niedriger war die Prävalenz von anti-IMP bei japanischen HCC-Patienten (5,8 %, Tabelle 1). In Japan wurden anti-IMP auch bei Patienten mit Leberzirrhose und chronischer Hepatitis gefunden. Die Antikörpertiter waren jedoch wesentlich niedriger als in der HCC-Gruppe. Möglicherweise sind epidemiologische Faktoren für die diskrepante Prävalenz der Antikörper in China und Japan verantwortlich, beruht doch die chronische Hepatitis in China vorwiegend auf einer Infektion mit HBV, in Japan aber mit HCV. Bei einigen Patienten konnte das Auftreten von anti-IMP in einen zeitlichen Zusammenhang mit der Entwicklung des hepatozellulären

Tabelle 1

Prävalenz von anti-IMP bei chinesischen und japanischer Patienten mit Leberkarzinomen, Leberzirrhose, chronischer Hepatitis und sonstigen Tumoren sowie bei amerikanischen Kontrollgruppen.

Patientengruppen	N	% anti-			
		IMP1	IMP2	IMP3	IMP ₁₋₃
Hepatozelluläre Karzinome, China	140	15,4	11,4	15,7	24-31
Hepatozelluläre Karzinome, Japan	86	3,5	1,2	4,7	5,8
Leberzirrhose, Japan	21	4,8	0,0	4,8	
Chronische Hepatitis, Japan	18	5,6	0,0	5,6	
Akute Hepatitis, Henan	31		0,0		
HBs-Ag-Träger, Henan	26		0,0		
Mammakarzinome, China	162	7,8	6,2	13,0	16-22
Lungenkarzinome, China	140	7,1	19,3	7,9	24-34
Kolorektale Karzinome, China	110	13,3	10,0	11,8	20-22
Ösophagus-Karzinome, China	119		16,8	12,6	24
Magen-Karzinome, China	226	16,5	8,0	17,3	19-31
Pharynx-Karzinome, China	56		16,1	10,7	23
Ovarialkarzinome, China	33		9,1	3,0	9
Uteruskarzinome, China	40		15,0	7,5	23
Lymphome, China	72		11,1	11,1	18
Prostatakarzinome, USA	206	8,7	25,2	9,2	35
SLE, USA	62	3,2	1,6	1,6	
Sjögren Syndrom, USA	41	0,0	0,0	0,0	0,0
Autoimmunerkrankungen, USA	139		4,3	3,6	4
Gesunde, USA, China, Japan	508	< 2	< 2	< 2	< 2

Karzinoms gebracht werden. Anti-IMP fanden sich bereits bei noch wenig ausgedehnten Karzinomen (< 30 mm) und noch normalen α_1 -Fetoproteinspiegeln.

Weitere Untersuchungen vor allem chinesischer Tumorpatienten (Tabelle 1) ergaben, dass anti-IMP nicht für das HCC spezifisch sind, sondern dass sie auch bei zahlreichen anderen Tumoren vorkommen. Anti-IMP können zusammen mit anderen Autoantikörpern gegen tumorassoziierte Antigene (anti-p53, anti-c-myc oder anti-survivin) auftreten.

Die Prävalenzen von anti-IMP₁₋₃ bei deutschen Tumorpatienten sind in Tabelle 2 angegeben. Anti-IMP fanden sich nach diesen vorläufigen, orientierenden Untersuchungen am häufigsten bei Patienten mit hepatozellulären Karzinomen (18,4 %), deutlich weniger häufig bei Patienten mit stark erhöhten serologischen Tumormarkern. Die höchste Prävalenz (27,8 %) bestand bei den kryp-

Tabelle 2

Prävalenz von anti-IMP bei Patienten mit hepatozellulären Karzinomen, deutlich erhöhten Tumormarkern, HBV-DNA-, HCV-RNA-Trägern und Blutspendern in Deutschland.

Patientengruppen	N	% anti-			
		IMP1	IMP2	IMP3	IMP ₁₋₃
Hepatozelluläre Karzinome (HCC)	125	4,0	8,0	10,4	18,4
HCC (kryptogen)	18	5,6	11,1	11,1	27,8
HCC (alkoholinduziert)	47	6,4	10,6	12,8	19,1
HCC (nicht alkoholinduziert)	5	0,0	20,0	0,0	20,0
HCC (Hämochromatose)	7	0,0	14,3	14,3	14,3
HCC (andere)	5	0,0	0,0	0,0	0,0
HCV-induzierte HCC	29	3,4	3,4	10,3	13,8
HCV-RNA positive Seren	96	1,0	5,2	4,2	8,3
HBV induzierte HCC	19	0,0	0,0	5,3	5,3
HBV-DNA positive Seren	45	8,9	11,1	13,3	15,6
Pathologische Tumormarker*	535	2,1	2,6	0,9	3,9
CA12	54	0,0	5,6	0,0	5,6
CA15	33	0,0	3,0	0,0	3,0
CA19	25	1,6	3,2	0,8	3,2
CEA	154	3,2	1,9	0,0	4,5
α_1 -Fetoprotein	43	11,6	4,7	7,0	11,6
PSA	111	0,0	0,9	0,0	0,9
Blutspender	88	1,1	1,1	3,4	4,5

* Von 21 anti-IMP positiven Patienten waren in 15 Fällen die Diagnosen verfügbar. Es handelte sich um arzneimittelinduzierte Hepatitiden (2), benigne Prostatahyperplasie (1), Karzinome: Gallenblase (1), HCC (2), Magen (1), Pankreas (2), Rektum/Sigma (3), Ovar (3), Mamma (1). Die höchsten Antikörpertiter fanden sich bei den beiden hepatozellulären Karzinomen.

togenen HCC-Formen, denen keine Ursache zugeordnet werden konnte. Auffallend selten waren anti-IMP bei HCCs auf dem Boden einer chronischen HBV-Infektion zu finden (5,3 %), während der Anteil der anti-IMP positiven Fälle bei HBV-DNA-Trägern mit 15,6 % deutlich höher lag. Die höchsten Antikörpertiter fanden sich bei kryptogenen und alkoholbedingten HCCs sowie bei Patienten mit erhöhten α_1 -Fetoproteinspiegeln.

Sofern eine vermehrte Expression von IGF-II einen der zahlreichen Faktoren darstellt, die einer Zelle karzinogene Eigenschaften verleihen, wäre es denkbar, dass auch den IMPs eine Rolle bei der Tumorgenese zukommt. IMPs können die Expression von IGF-II durch die Beeinflussung der Stabilität seiner mRNA modulieren. IMPs werden in zahlreichen Tumorzelllinien und auch in zahlreichen humanen benignen und malignen Tumoren vermehrt exprimiert. Bei

einem Drittel der hepatozellulären Karzinome konnte eine ektope Bildung von IMP2 immunhistologisch nachgewiesen werden und in zirrhotischen Lebern fanden sich vereinzelt schon Hepatozyten, die vermehrt IMP2 bildeten. Es wäre daher denkbar, dass IMP2 an der abnormen Proliferation von Hepatozyten in zirrhotischen Knoten beteiligt ist. IMP2 könnte in diesen Fällen sowohl einen Indikator des beginnenden malignen Prozesses als auch einen Mitverursacher darstellen.

Die Inkorporation von IMP in zelluläre IGF-II-mRNA-IMP-Ribonukleoproteinpartikel könnte den IMPs eine verstärkte Immunogenität verleihen. Damit wären z. B. bei der Apoptose von Tumorzellen freigesetzte Partikel in der Lage, das Immunsystem zur Synthese von anti-IMP zu stimulieren. Dieser Vorgang wäre Prozessen vergleichbar, wie sie auch bei zahlreichen anderen Autoimmunerkrankungen anzutreffen sind, bei denen intrazelluläre Ribonukleoproteinpartikel eine Autoantikörperbildung induzieren (z. B. anti-RNP oder anti-Sm bei Kollagenosen). Die Expression von IMP in Karzinomen ist allerdings nicht zwangsläufig mit dem Auftreten von Autoantikörpern gegen IMP vergesellschaftet. Bei 33% der Patienten mit Leberzellkarzinomen konnte zwar eine verstärkte Expression von IMP2 im Tumor nachgewiesen werden, aber nur 22% der Patienten bildeten Antikörper gegen IMP2. Es ist daher fraglich, ob die vermehrte Expression von IMP allein für eine Stimulation der Immunantwort ausreicht oder ob nicht noch andere, auch wirtsspezifische Faktoren (MHC-Struktur) von Bedeutung sind.

Zwei weitere Beispiele für eine Assoziation von ektopter Expression RNA-bindender Proteine, Karzinogenese und Autoantikörperantwort sind die onconeuralen Antigene HuD und Ri/Nova. HuD-Proteine binden an die Adenosin-Uridin (AU)-reichen Elemente (ARE) zahlreicher kurzlebiger mRNAs und stabilisieren sie dadurch. Das Ri-Protein besitzt ebenso wie HuD drei KH-Domänen mit denen es mRNAs binden kann. HuD wird in kleinzelligen Bronchialkarzinomen, Ri in Mamma- und Lungenkarzinomen ektopt exprimiert. Autoantikörper (anti-HuD, anti-Ri) finden sich bei den mit diesen Karzinomen assoziierten paraneoplastischen Neuropathien (sensomotorische Neuropathie, limbische Enzephalitis bzw. Myoklonus/Opsoklonus-Symptome).

Der Versuch Autoantikörper als serologische Marker in die Tumordiagnostik einzubeziehen, ist immer wieder an der geringen Sensitivität dieser Marker gescheitert. Neuere Ansätze, die allerdings noch nicht routiniegängig sind, versuchen die Sensitivität durch die simultane Bestimmung multipler Markerantikörper (z. B. mit Mikroarray-Techniken) zu steigern.