

**Immuntherapeutische Ansätze beim
Rhabdomyosarkom:
Therapeutische Antikörper und Phagozytose**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Delia Herrmann
aus Ulm

Tübingen
2011

Tag der mündlichen Qualifikation:

29.11.2011

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Sorin Armeanu-Ebinger

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Olaf Rieß

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung.....	1
1.1 Das Rhabdomyosarkom (RMS)	1
1.1.1 “Klassisches” ERMS.....	2
1.1.2 ARMS	2
1.2 Tumorummunologie	4
1.2.1 Spezifische Tumorerkennung	4
1.2.2 Unspezifische Mechanismen	8
1.2.3 Immunevasion von Tumoren	10
1.3 Krebsimmuntherapie	11
1.3.1 Tumorstimmulierung	11
1.3.2 Adoptive zelluläre Immuntherapie	12
1.3.3 Antikörpertherapie	12
1.4 Zielsetzung der Arbeit	14
2. Material und Methoden.....	15
2.1 Materialien	15
2.1.1 Chemikalien.....	15
2.1.2 Reagenziensysteme (Kits) und Fertiglösungen	16
2.1.3 Lösungen und Puffer	17
2.1.4 Zellkulturlösungen und verwendete Zellen	21
2.1.5 Vektoren, Proteinstandard und Antikörper.....	23
2.1.6 Patientenmaterial und Versuchstiere	25
2.1.7 Geräte und Hilfsmittel	26
2.1.8 Verbrauchsmaterial	28
2.1.9 Computerprogramme	29
2.2 Zellbiologische Methoden	31
2.2.1 Zellkultur	31
2.2.2 Transfektion und Transduktion	34
2.2.3 Durchflusszytometrie	36
2.2.4 GLuc-Messung	36
2.2.5 Bestimmung der Vitalität (MTT-Test).....	37
2.2.6 Immunzytochemie	38
2.2.7 Antikörpervermittelter Zytotoxizitätstest (ADCC)	38
2.2.8 Phagozytostest	39

2.3 Histologische Methoden	41
2.3.1 Fixieren und Einbetten	41
2.3.2 Herstellen von Gewebeschnitten	41
2.3.3 Immunhistochemie.....	42
2.3.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	43
2.4 Molekularbiologische Methoden	45
2.4.1 Isolierung von RNA aus Geweben und Zelllinien.....	45
2.4.2 RNA Quantitäts- und Qualitätsbestimmung	45
2.4.3 Mikroarray Expressionsanalyse	46
2.4.4 Funktionelle Analyse von Expressionsprofilen.....	47
2.5 Proteinbiochemische Methoden	48
2.5.1 Proteinextraktion aus Zelllinien	48
2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	48
2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	49
2.5.4 Western Blot und Immundetektion	50
2.5.5 Silberfärbung	51
2.5.6 Immunpräzipitation	51
2.5.7 Proteinidentifikation mittels LC/MS-Analyse	52
2.6 Tierexperimentelle Methoden	54
2.6.1 Xenotransplantation	54
2.6.2 Blutentnahme und Plasmagewinnung	54
2.6.3 GLuc-Bestimmung im Plasma	55
2.6.4 <i>In vivo</i> Bildgebung: Lumineszenz und Fluoreszenz	55
2.6.5 <i>In vivo</i> Bildgebung: PET/MRT	56
2.6.6 Tötung und Tumorexplantation	57
3. Ergebnisse	59
3.1 Evaluierung von Cetuximab bei RMS.....	59
3.1.1 Zielstrukturen bei RMS für eine Antikörpertherapie	59
3.1.2 Aktivierung von EGFR durch EGF und Cetuximab	61
3.1.3 Cetuximab-vermittelte Zytotoxizität gegen RMS-Zellen	63
3.2 Etablierung eines monoklonalen Antikörpers	65
3.2.1 Charakterisierung monoklonaler Antikörper.....	65
3.2.2 Expression des 58B1A2-Antigens in RMS.....	66
3.2.3 58B1A2-vermittelte Zytotoxizität gegen RMS-Zellen	68
3.2.4 Charakterisierung des unbekanntes Antigens	69
3.3 Phagozytose bei RMS.....	71
3.3.1 Expression von CD47 und Calreticulin in RMS.....	71
3.3.2 CD47-vermittelte Zytotoxizität gegen RMS-Zellen	74
3.3.3 CD47-modulierte Phagozytose	75
3.3.4 Alternative Mechanismen zur Modulation der Phagozytose	77

3.4 <i>In vivo</i> Modell zur Evaluierung immuntherapeutischer Ansätze	82
3.4.1 Beobachtung des Tumorwachstums durch Plasma-GLuc.....	82
3.4.2 Detektion der Tumoren durch optische Bildgebung.....	83
3.4.3 Lokalisation der Tumoren mittels PET/MRT	86
3.4.4 Vergleich verschiedener PET-Tracer.....	88
3.4.5 Optische Bildgebung der exponierten Organe.....	89
3.4.6 Histologie der Tumoren	92
4. Diskussion.....	95
4.1 Evaluierung von Cetuximab bei RMS.....	95
4.2 Etablierung eines monoklonalen Antikörpers	99
4.3 Phagozytose bei RMS.....	101
4.4 <i>In vivo</i> Modell zur Evaluierung immuntherapeutischer Ansätze	104
5. Zusammenfassung	109
6. Referenzen.....	111
7. Anhang.....	119
7.1 Differenziell regulierte Transkripte - ARMS vs. ERMS	119
7.1.1 Hochregulierte Gene (211)	119
7.1.2 Herunterregulierte Gene (323)	124
7.2 LC/MS-Analysen	132
7.2.1 Unbekannte Bande bei 60-70 kDa.....	132
7.2.2 Unbekannte Bande bei 250 kDa.....	133
7.2.3 Unbekannte Bande bei 45 kDa.....	135
7.3 Danksagung.....	137
7.4 Lebenslauf	138

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A-204	humane Rhabdomyosarkom-Zelllinie, embryonaler Typ
Ab	Antigenbindungsstelle
ABL	engl. <i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
ADCC	engl. <i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i> , antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
ADEPT	engl. <i>antibody-directed enzyme prodrug therapy</i> , antikörperabhängige Enzym-Prodrug-Therapie
ANOVA	engl. <i>analysis of variation</i> , Zweiweg-Varianzanalyse
APC	engl. <i>antigen-presenting cell</i> , antigenpräsentierende Zellen
APS	Ammoniumpersulfat
ARMS	alveoläres Rhabdomyosarkom
ATP	Adenosintriphosphat
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BCR	engl. <i>breakpoint cluster region</i>
bp	Basenpaar(e)
Bq	Becquerel
BS3	Bissulfosuccinimidyl Suberat
BSA	engl. <i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
[¹¹C]	radioaktives Kohlenstoffisotop
CAPS	3-Cyclohexylaminopropan-1-sulfonsäure
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i> , Unterscheidungsgruppen
CDC	engl. <i>complement-dependent cytotoxicity</i> , komplementabhängige Zytotoxizität
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
Cet	Cetuximab

cm	engl. <i>centimeter</i> , Zentimeter
cm²	engl. <i>cubic centimeter</i> , Quadratzentimeter
CMV	engl. <i>cytomegalovirus</i> , Zytomegalievirus
CO₂	Kohlenstoffdioxid
cRNA	engl. <i>complementary RNA</i> , komplementäre RNA
CT	Computertomographie
CTL	engl. <i>cytotoxic T-lymphocytes</i> , zytotoxische T-Lymphozyten
CTLA-4	engl. <i>cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i> , T-Zell-Lymphozyten-Antigen 4
[⁶⁴Cu]	radioaktives Kupferisotop
CUL1	Cullin 1
CWS	Cooperative Weichteilsarkom-Studie
d	Tag(e)
DC	dendritische Zellen
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNAM-1	engl. <i>DNAX accessory molecule-1</i>
DNAX	engl. <i>DNA polymerase III gamma and tau subunits</i>
Doxo	Doxorubicin
DRK	Deutsches Rotes Kreuz
DTSP	Dithiobissuccinimidyl Propionat
DTT	Dithiothreitol
ECL	engl. <i>enhanced chemoluminescence</i> , Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	engl. <i>epidermal growth factor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	engl. <i>epidermal growth factor receptor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
ELISA	engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> , enzymvermittelte Immunreaktion
engl.	englisch
ERMS	embryonales Rhabdomyosarkom
ESI	Elektrospray-Ionisation
et al.	lat. <i>et alii</i> , und andere
[¹⁸F]	radioaktives Fluorisotop

F_{ab}	engl. <i>antigen binding fragment</i> , Fragment der Antigenbindung
F_c	engl. <i>constant fragment</i> , konstante Region
F_cγR	F _c gamma Rezeptor
FACS	engl. <i>fluorescence-activated cell sorting</i> , Durchflusszytometrie
FCS	engl. <i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FDG	Fluordesoxyglucose
FFPE	engl. <i>formalin-fixed paraffin-embedded</i> , formalinfixiert und in Paraffin eingebettet
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKHR	engl. <i>forkhead in rhabdomyosarcoma</i>
FLT	Fluorthymidin
FMISO	Fluoromisonidazol
FSC	engl. <i>forward scatter</i> , Vorwärtsstreulicht
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
G	Gauge, Außendurchmesser
G418	Geneticin
GCRMA	engl. <i>guanine cytosine robust multi-array analysis</i>
GD₂	engl. <i>disialoganglioside</i>
GLuc	Gaussia Luciferase
GM-CSF	engl. <i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> , Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
GvHD	engl. <i>graft versus host disease</i> , Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung
h	engl. <i>hour</i> , Stunde(n)
HDACi	Histondeacetylase-Inhibitor
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPLC	engl. <i>high-performance liquid chromatographie</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	engl. <i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
i.p.	intraperitoneal
IL-1	Interleukin-1
IL-2	Interleukin-2
IL-4	Interleukin-4
IL-10	Interleukin-10

IL2Rγ	Interleukin-2-Rezeptor Gamma-Kette
IFN-α	Interferon-alpha
IFN-γ	Interferon-gamma
kDa	Kilodalton
KIR	engl. <i>killing inhibitory receptors</i> , tötunginhibierende Rezeptoren
l	Liter
LAR-PTP	engl. <i>leukocyte antigen-related protein tyrosine phosphatase</i>
lat.	lateinisch
LFA-1	engl. <i>lymphocyte function-associated antigen-1</i>
LOH	engl. <i>loss of heterozygosity</i> , Verlust der Heterozygotie
LRP	engl. <i>low-density lipoprotein-related protein</i>
m	männlich
M	molar
MAP2K4	engl. <i>mitogen-activated protein kinase kinase 4</i> , mitogenaktivierte Proteinkinase
MART-1	engl. <i>melanoma antigen recognized by T-cells</i> , Melanozyten-Antigen
MCL1	engl. <i>myeloid cell leukemia sequence 1</i> , myeloische Zellleukämie Sequenz 1
Melan-A	engl. <i>melanocyte antigen</i> , Melanozyten-Antigen
MET	engl. <i>mesenchymal epithelial transition factor</i>
mg	Milligramm
MHC	engl. <i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
MICA/B	engl. <i>MHC-class I chain genes A and B</i> , MHC-Klasse I Gene A und B
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm²	Quadratmillimeter
mm³	Kubikmillimeter
Mol.-Gew.	Molekulargewicht
MOWSE	engl. <i>molecular weight search</i>
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
MRT	Magnetresonanztomographie

MTT	Thiazolylblau Tetrazoliumbromid
n	Anzahl
NCBI	engl. <i>national center for biotechnology information</i> , US-amerikanisches Institut für Datenverarbeitung und -speicherung
NCR	engl. <i>natural cytotoxicity receptors</i> , natürliche zytotoxische Rezeptoren
NEAA	engl. <i>non essential amino acids</i> , nicht-essentielle Aminosäuren
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NKG2D	engl. <i>natural killer group 2 member D</i>
nm	Nanometer
NOD	engl. <i>non-obese diabetes</i> , nicht-adipöse Diabetes
O₂	Sauerstoff
ORF	engl. <i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
p	Signifikanzwert
p.a.	lat. <i>pro analysi</i> , für die Analyse
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAX3	engl. <i>paired box 3</i>
PAX7	engl. <i>paired box 7</i>
PBMCs	engl. <i>peripheral blood mononuclear cells</i> , periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-Salz-Puffer
PBST	Phosphat-Salz-Puffer mit Tween 20
pCMV	engl. <i>promoter of human cytomegalovirus</i>
PE	Phycoerythrin
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen- Konzentration
PI	Propidiumiodid
PIK3R3	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PS	Polystyrol
PTSM	Pyruvaldehyd-bis(N4-methylthiosemicarbazon)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R²	Bestimmtheitsmaß

RAS	engl. <i>rat sarcoma</i>
RD	humane Rhabdomyosarkom-Zelllinie, embryonaler Typ
Rh30	humane Rhabdomyosarkom-Zelllinie, alveolärer Typ
RIPA	engl. <i>radioimmunoprecipitation assay</i>
RLU	engl. <i>relative light unit</i> , relative Lichteinheit
RMS	Rhabdomyosarkom
RNA	engl. <i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SAHA	Suberoyl-anilid-Hydroxaminsäure
scid	engl. <i>severe combined immunodeficiency</i> , schwere Immundefizienz
SDS	engl. <i>sodium dodecyl sulphate</i> , Natriumlaurylsulfat
SIRPα	engl. <i>signal regulatory protein α</i>
SSC	eng. <i>side scatter</i> , Seitwärtsstreuung
St	Stück
SUV	engl. <i>standardized uptake value</i> , standardisierter Aufnahmewert
t	Translokation
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF-β	engl. <i>transforming growth factor beta</i> , transformierender Wachstumsfaktor beta
TGFβR2	engl. <i>TGF-β receptor 2</i> , TGF- β Rezeptor II
TNAP	engl. <i>tissue non-specific alkaline phosphatase</i> , nicht-gewebespezifische alkalische Phosphatase
TNF	engl. <i>tumor necrosis factor</i> , Tumornekrosefaktor
TRAIL	engl. <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
U	Unit
UV	ultraviolett
V	Volt
VEGF	engl. <i>vascular endothelial growth factor</i> , vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
w	weiblich

1. Einleitung

1.1 Das Rhabdomyosarkom (RMS)

Die wichtigste Gruppe der pädiatrischen Weichteilsarkome sind die Rhabdomyosarkome (RMS). Bei 7-8 % aller soliden malignen Tumorerkrankungen und zwei Dritteln aller diagnostizierten Sarkome im Kindesalter handelt es sich um RMS (1). Prinzipiell zählt RMS zu den hochmalignen Tumoren, die man histopathologisch in embryonale (ERMS, 75 % aller RMS) und alveoläre RMS (ARMS, 25 %) unterteilt (2). Des Weiteren wurde eine Klassifikation nach Prognosegruppen erarbeitet, die im Rahmen der Therapiestrategien der Cooperativen Weichteilsarkom-Studie (CWS) erreicht werden (siehe Tabelle 1) (3).

Tabelle 1: Internationale Klassifikation der Rhabdomyosarkome.

Günstige Prognose
Embryonale Rhabdomyosarkome vom botryoiden Subtyp
Embryonale Rhabdomyosarkome vom Spindelzelltyp
Intermediäre Prognose
„Klassische“ embryonale Rhabdomyosarkome (alle embryonalen Rhabdomyosarkome außer botryoidem Sub- und Spindelzelltyp)
Ungünstige Prognose
Alveoläre Rhabdomyosarkome einschließlich der „soliden Variante“

Das RMS ist mesenchymalen Ursprungs, es leitet sich hauptsächlich aus entarteten Vorläuferzellen des Muskelgewebes ab (4). Über Ursachen und Auslöser des RMS wird spekuliert. Es gibt Hinweise für ein erhöhtes Risiko bei Patienten mit Neurofibromatose Typ 1 (5), Beckwith-Wiedemann-Syndrom (6), Rubinstein-Taybi-Syndrom (7) und Roberts-Syndrom (8). Auch beim Li-Fraumeni-Syndrom wurde ein vermehrtes Auftreten von RMS beschrieben (9).

Das Therapieprotokoll besteht aus einer multimodalen Therapie aus chirurgischer Resektion, Chemotherapie, sowie teilweise Radiotherapie (10). Das Chemotherapie-Schema wird von der Risiko-Gruppe bestimmt und besteht aus

einer Kombination von Actinomycin D und Vincristin, hinzu kommen Ifosfamid und eventuell Doxorubicin.

Dennoch ist die Prognose bei RMS im fortgeschrittenen Stadium nach wie vor ungünstig (11). Im Wesentlichen verhindern Metastasierung, lokale Tumorrezidive bzw. Chemotherapie-Resistenzen den klinischen Therapieerfolg. Aus diesem Grund werden spezifischere, effektivere und weniger toxische Behandlungsformen angestrebt. Hierbei gewinnt das Konzept der Immuntherapie, insbesondere mit monoklonalen Antikörpern, zunehmend an Bedeutung (12).

Zunächst werden die beiden Tumortypen „klassisches“ ERMS und ARMS näher charakterisiert.

1.1.1 „Klassisches“ ERMS

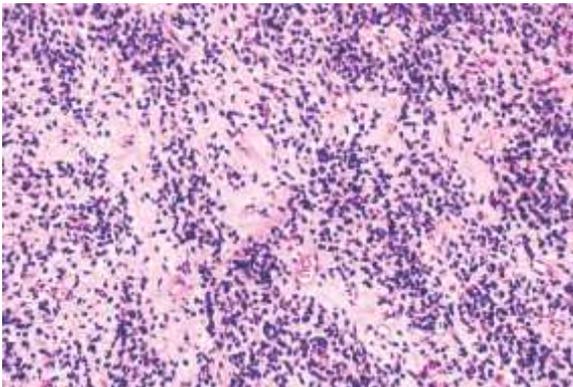
„Klassische“ ERMS manifestieren sich vorwiegend im Kindesalter (< 15 Jahre), eine besonders hohe Inzidenz wird zwischen dem 1. und 5. Lebensjahr beobachtet (13). Zu dieser Gruppe gehören auch die pleomorphen RMS des Kindes- und Jugendlichenalters. Neben dem Kopf-Hals-Bereich (46 %) und dem Urogenitalbereich (28 %) kommen ERMS in allen Regionen des Körpers vor. Im Bereich der Extremitäten sind ERMS sehr selten (8 %), wohingegen sie im Bereich der Harnblase und Prostata als einzige Tumorgruppe vertreten sind (14). Der Tumor besteht aus spindeligen bis ovalen Zellen und kann vom umgebenden Gewebe nicht klar abgegrenzt werden. Molekulargenetisch ist ein *loss of heterozygosity* (LOH) auf dem Chromosom 11p15.5 bekannt, wobei das betroffene Gen noch nicht bekannt ist (15). Gute Heilungschancen für ERMS wurden vermehrt bei einer Tumorlokalisation im Bereich der Augenhöhle sowie im Hodensack beschrieben (16). Das krankheitsfreie Überleben nach 5 Jahren bei Patienten mit „klassischem“ ERMS beträgt 69 % und das Gesamtüberleben liegt bei 86 % (17).

1.1.2 ARMS

ARMS treten bei Kindern vor dem 1. Lebensjahr sehr selten auf (4,7 % aller ARMS). Bis zum 5. Lebensjahr steigt die Inzidenz an, danach ist eine relativ gleichmäßige Verteilung bis in das frühe Erwachsenenalter beschrieben (13). Geringfügig häufiger vom ARMS betroffen ist das männliche Geschlecht (m:w = 1,17:1) (13). ARMS manifestieren sich vorwiegend an den Extremitäten (45 %), außerdem im Kopf-Hals-Bereich (22 %) und Rumpf (12 %) (14).

Histomorphologisch ist der Tumor durch rundliche Zellen charakterisiert, die in großen soliden Komplexen angeordnet sind, durchzogen von „Alveolen“-artigen Hohlräumen. ARMS sind in 55 % der Fälle durch eine spezifische t(2;13)(q35;q14)-Translokation charakterisiert (18). Diese betrifft das PAX3-Gen auf Chromosom 2 und das FKHR-Gen auf Chromosom 13, es resultiert ein PAX3-FKHR Fusionsprotein. Bei 22 % der ARMS ist eine t(1;13)(p36;q14)-Translokation beschrieben (19). Hierbei entsteht ein PAX7-FKHR Fusionsprotein, da neben dem FKHR-Gen auf Chromosom 13 das PAX7-Gen auf Chromosom 1 involviert ist. Oft findet sich bereits zum Zeitpunkt der Diagnose eine deutlich höhere Metastasierungsrate als beim ERMS, die Prognose ist entsprechend erheblich schlechter (20). Nach 5 Jahren liegt das krankheitsfreie Überleben bei 48 %, beim Gesamtüberleben der Patienten werden 62 % erreicht (17). Für die t(1;13)-Translokation wird im Vergleich zur t(2;13)-Translokation eine günstigere Prognose beschrieben (21).

ERMS



ARMS

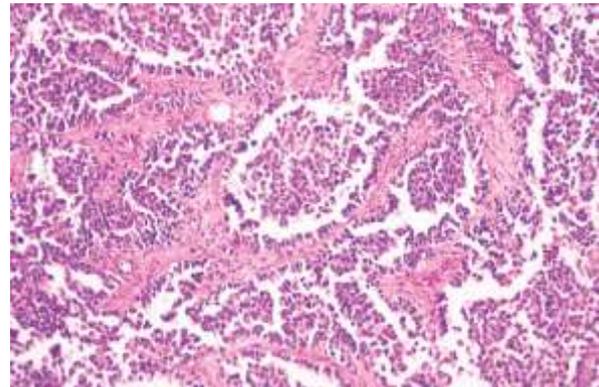


Abbildung 1: Histologisches Bild eines ERMS und ARMS, HE-Färbung. Nachdruck mit Genehmigung von Dariusz Borys (22), Copyright 2009 – 2011.

1.2 Tumormmunologie

Ziel der immunologischen Krebstherapie ist die Anregung des körpereigenen Abwehrsystems, um eine Erkennung und Lyse von Tumorzellen zu erreichen. Hierbei kommen sowohl spezifische (zellulär und humoral) als auch unspezifische Mechanismen zum Einsatz und werden im Folgenden näher erläutert.

1.2.1 Spezifische Tumorerkennung

1.2.1.1 Zelluläre Immunantwort

Bei der zellulären Immunantwort spielen in erster Linie die antigenspezifischen T-Zellen eine Rolle. Voraussetzung sind spezifische Tumorantigene, die von antigenpräsentierenden Zellen (APC) prozessiert und als kurze Peptide in MHC-Komplexen der Klasse I und II auf der Zelloberfläche präsentiert werden (Abbildung 2). Der T-Zellrezeptor der $CD8^+$ -T-Zellen interagiert mit dem MHC-Klasse I-Komplex, erkennt das Antigen und wird aktiviert. Nach klonaler Expansion dieser spezifischen T-Zellen entstehen die zytolytischen $CD8^+$ -T-Zellen (CTL). Diese erkennen die Tumorantigene auf der Tumorzelle und lösen durch die Ausschüttung von Perforinen und Granzymen die Zytolyse aus. Unterstützt werden sie hierbei von den $CD4^+$ -T-Zellen. Diese erkennen das Tumorantigen im Kontext von MHC-Klasse II auf den APC. Durch Rezeptor-Aktivierung der $CD4^+$ -T-Helferzellen werden Zytokine freigesetzt, je nach Unterart Interferon-gamma ($IFN-\gamma$) von den T_H1 - bzw. Interleukin-4 (IL-4) von den T_H2 -Zellen. Neben einer sich selbst erhaltenden Amplifizierung entsteht bei der zellulären Immunantwort ein immunologisches Gedächtnis. Dabei handelt es sich um eine besondere Population von Gedächtnis-T-Zellen (23), die nach erneuter Antigenpräsentation eine rasche Wiederherstellung zytotoxischer T-Zellen gewährleisten. Beide Eigenschaften führen dazu, dass die zelluläre Immunantwort als der effektivste Mechanismus gegen maligne Tumoren angesehen wird.

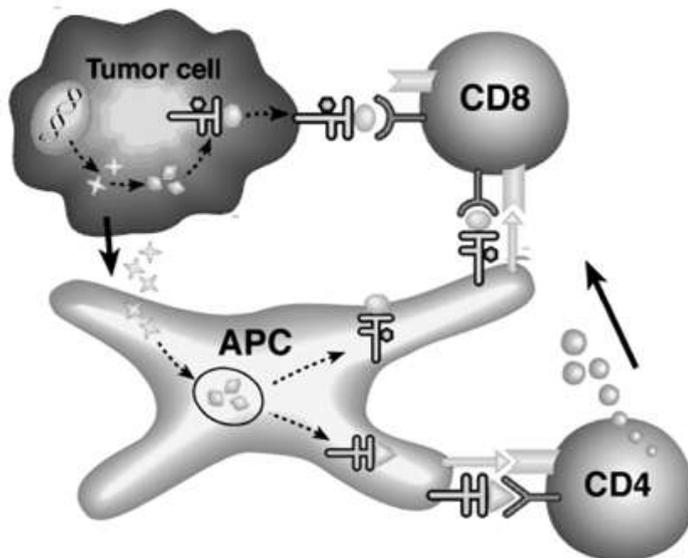


Abbildung 2: Zelluläre Immunantwort. Tumorzellen präsentieren ihr Antigen entweder direkt auf der Zelloberfläche oder es wird ausgeschüttet und von den antigenpräsentierenden Zellen (APC) aufgenommen. Diese verarbeiten das Antigen und präsentieren es in MHC-Klasse II bzw. I den CD4⁺- bzw. CD8⁺-T-Zellen. CD4⁺-T-Zellen unterstützen die CD8⁺-T-Zellen durch Freisetzung von Zytokinen. Nachdruck mit Genehmigung von John Wiley & Sons, Inc.: Current Protocols in Human Genetics (24), Copyright 2001.

1.2.1.2 Humorale Immunantwort

Trotzdem darf die Wirkung der humoralen Immunantwort, beruhend auf hochspezifischen Immunglobulinen (Abbildung 3), nicht unterschätzt werden. Humorale Antikörper erkennen fast ausschließlich Tumorantigene auf der Zelloberfläche und führen dann zur antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC) oder zur komplementabhängigen Zytotoxizität (CDC) (25). Beide Mechanismen haben das Ziel der Tumorzelllyse. Die ADCC wird über den F_c-Teil des Antikörpers vermittelt. Hat das Immunglobulin an der F_{ab}-Region gebunden, wird das F_c-Fragment von F_c-Rezeptor tragenden Effektorzellen wie NK-Zellen und Makrophagen erkannt. Die CDC wird direkt über die Komplementbindungsstelle in der F_c-Region des Antikörpers ausgelöst. Sie führt über eine Kaskade löslicher Serumproteine zur Bildung eines zytolytischen Membrankomplexes.

Neben ADCC und CDC können monoklonale Antikörper auch verwendet werden, um Substanzen spezifisch an die Tumorzellen zu transportieren. Sie dienen als Vehikel für Zytostatika (*drug targeting*) oder Radioisotope. Auch enzymatisch wirksame Moleküle werden eingesetzt, die am Zielort eine Umwandlung von inaktiven Zytostatikaderivaten (Prodrugs; (26)) in das aktive Zytostatikum vornehmen (antikörperabhängige Enzym-Prodrug-Therapie, ADEPT) (27).

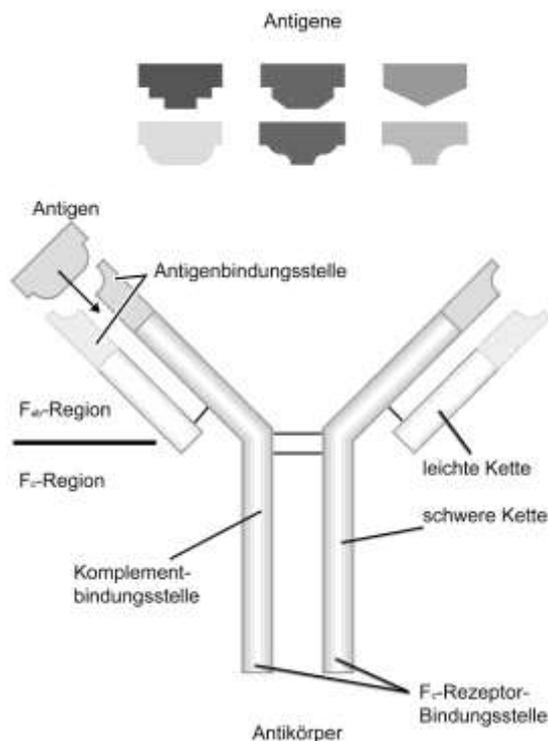


Abbildung 3: Der allgemeine strukturelle Aufbau eines Immunglobulins. Jedes Antikörpermolekül besteht aus zwei schweren und zwei leichten Ketten, die über Disulfidbrücken verbunden sind. Die antigenbindenden F_{ab} -Fragmente können enzymatisch von der F_c -Region abgespalten werden. Nachdruck mit Genehmigung von The National Human Genome Research Institute (28).

Monoklonale tumorspezifische Antikörper können neben ihrer passiven Wirkung auch aktiv über das antiidiotypische Netzwerk agieren. Hierbei wird eine humorale Immunantwort gegen die Antigenbindungsstelle eines Idiotypantikörpers (Ab1) induziert. Auf diese Weise erhält man den Antiidiotypantikörper (Ab2), bei dem es sich um ein Spiegelbild des Originalantikörpers Ab1 handelt (29). Durch Induktion einer humoralen Immunantwort gegen den Ab2-Antikörper kann ein weiterer Spiegelbildantikörper gebildet werden, den man als Anti-Antiidiotypantikörper (Ab3) bezeichnet. Dieser verfügt über dieselbe Antigenspezifität wie Ab1. In der Therapie werden beispielsweise den Patienten Ab2-Antikörper kombiniert mit Adjuvantien im Rahmen einer aktiven Immunisierung verabreicht. Der Patient bildet über eine humorale Immunantwort Ab3, der das Tumorantigen erkennt und die Tumorzellen über ADCC und CDC lysiert. Bei B-Zell-Lymphomen wird ein patientenspezifischer Therapieansatz angewandt. Die Tumorzellen exprimieren für jeden Patienten charakteristische Ab1-Immunglobuline auf ihrer Oberfläche. Nach deren Isolierung wird ein Ab2-Idiotypenimpfstoff hergestellt, der eine Antilymphomwirkung (Ab3) induziert (30).

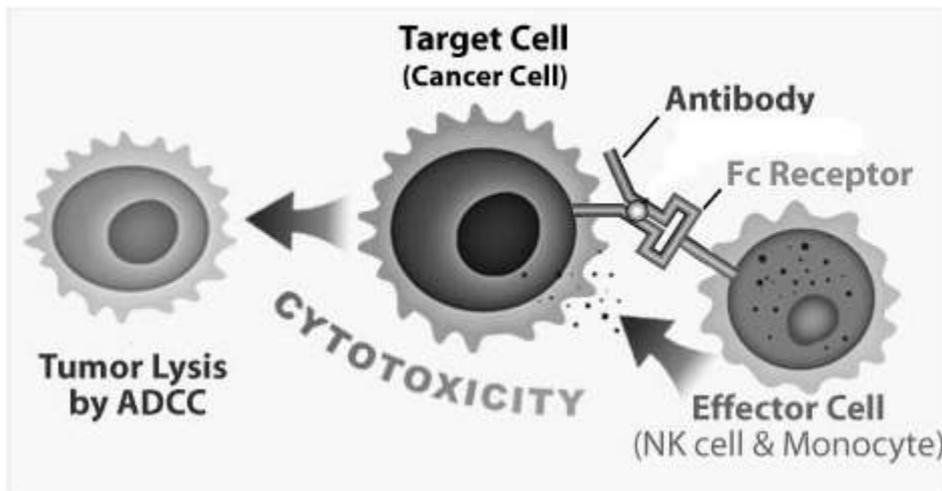


Abbildung 4: Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität. Effektorzellen wie beispielsweise NK-Zellen binden über Fc-Rezeptoren an mit spezifischen IgG-Molekülen markierte Zielzellen (Tumorzellen) und zerstören diese durch Ausschüttung von Granula. Nachdruck mit Genehmigung von GeneCopoeia and Eureka Therapeutics, Inc.: Trends in Biopharmaceutical Industry (31), Copyright 2009.

1.2.1.3 Tumorantigene

Tumorantigene müssen einerseits vom Immunsystem präsentiert und erkannt werden, um eine Immunantwort auszulösen. Andererseits sollten sie idealerweise nur von Tumorzellen und nicht auf Normalgewebe exprimiert werden, um Autoimmunreaktionen zu vermeiden (tumorspezifische Antigene). Die sogenannten tumorassoziierten Antigene werden zwar in Tumorzellen überexprimiert, kommen aber in geringem Maße auch in normalen Zellen vor (32). Ein Beispiel hierfür ist das Enzym Tyrosinase, das von normalen Melanozyten exprimiert wird. In malignen Melanozyten wird es jedoch wesentlich stärker exprimiert, so dass im Blut von Melanompatienten tyrosinasespezifische T-Zellen gefunden werden können (33). Bedingt durch die veränderte Genexpression in Tumorzellen können auch Proteine entstehen, die normalerweise nur in der Embryonalentwicklung vorhanden sind. Bei Leber- und Eierstock-Tumoren sowie verschiedenen Adenokarzinomen wird beispielsweise das α -1-Fetoprotein und das karzinoembryonale Antigen exprimiert (34-35). Um völlig neue Antigene, sogenannte Neoantigene, handelt es sich bei mutierten endogenen Proteinen (z.B. p53, RAS (36)) oder Fusionsproteinen, hervorgerufen durch chromosomale Translokationen (z.B. BCR/ABL bei chronisch myeloischer Leukämie (37)). Diese tumorspezifischen Antigene, deren Epitope beispielsweise auch Bestandteile eines Virus (z.B. E6 oder E7 des humanen Papillomavirus (38)) enthalten können, werden vom Tumor exprimiert, in den APC prozessiert und in MHC-Klasse I präsentiert. Sie werden nicht auf Normalgewebe

exprimiert, allerdings besteht eine Konkurrenz gegenüber der Vielzahl an normalen Membranproteinen, so dass tumorspezifische Antigene nur in geringer Zahl von Tumorzellen präsentiert werden (39).

1.2.2 Unspezifische Mechanismen

1.2.2.1 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) können fremde Zellen, Tumorzellen oder virusinfizierte Zellen ohne vorherige Aktivierung oder Immunisierung töten. Die Aktivität der NK-Zellen resultiert aus einem komplexen Zusammenspiel zahlreicher aktivierender, inhibierender und kostimulierender Rezeptoren (40). NK-Zellen haben keinen T-Zellrezeptor, körpereigene MHC I-Moleküle werden aber mittels Immunglobulinähnlicher Rezeptoren („*killing inhibitory receptors*“ KIRs) (41) und CD94-NKG2A Heterodimeren (42) erkannt und die NK-vermittelte Zytotoxizität verhindert (43). Findet keine Erkennung statt, kommt eine Vielzahl aktivierender NK-Oberflächenrezeptoren zum Einsatz, hierzu gehören „*natural cytotoxicity receptors*“ NCR, NKG2D, DNAM-1 und LFA-1 (44). Diese interagieren mit verschiedenen nicht-MHC-Liganden auf tumor- oder virusinfizierten Zellen (40, 44). Durch die Interaktion der Liganden werden apoptotische Vorgänge induziert. Der häufigste Mechanismus der NK-vermittelten Zytotoxizität ist die Freisetzung lytischer Granula, darunter Perforin und Granzyme. Außerdem können NK-Zellen über den ADCC-Mechanismus antikörperbeladene Zielzellen töten.

Für eine Zytolyse ist die Balance der aktivierenden und inhibierenden Signale ausschlaggebend. Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi) wie z.B. Suberoyl-anilid-Hydroxaminsäure (SAHA) regulieren die MICA/B Expression auf soliden und leukämischen Tumorzellen hoch (45-47). MICA/B wiederum fungieren als Liganden des aktivierenden NKG2D-Rezeptors und durch SAHA wird letztlich die Balance derart beeinflusst, dass Tumorzellen gezielt lysiert werden.

1.2.2.2 Makrophagen

Ähnlich wie bei den NK-Zellen gestaltet sich auch die Interaktion zwischen Makrophagen und Tumorzellen. Makrophagen verfügen über eine direkte unspezifische antitumorale Wirkung, sind aber auch bei der spezifischen T-zellvermittelten Antitumor-Immunität von Bedeutung. Der direkte Effekt aktivierter Makrophagen wird über sekretorische Produkte wie Tumornekrosefaktor (TNF), Interleukin-1 (IL-1), freie Sauerstoffradikale, Proteasen und Stickstoffmonoxid

vermittelt. Durch Antigenpräsentation in MHC-Klasse II erfolgt ihre spezifische Wirkung. Darüber hinaus zählen die Makrophagen neben den Granulozyten zu den wichtigsten Effektoren von ADCC-Reaktionen.

Die beiden Oberflächenproteine CD47 und Calreticulin sind nicht nur für die Bildung einer phagozytischen Synapse zwischen apoptotischen Zellen und Makrophagen von Bedeutung (Abbildung 5), sondern spielen auch eine Rolle bei der Elimination von Tumorzellen. Das Makrophagen aktivierende Protein Calreticulin wird von gesunden Zellen kaum gebildet, wohingegen es auf zahlreichen Tumorzellen hoch exprimiert wird (48-49). CD47 wird sowohl auf Tumorzellen als auch auf normalem Gewebe überexprimiert (50) und interagiert mit dem inhibitorischen Makrophagen-Rezeptor SIRP α . Auf diese Weise schützen sich die Tumorzellen vor einem Angriff der Makrophagen. Die Blockierung dieses negativen Regulators durch Antikörper kann die Balance der Signale zugunsten der Phagozytose verschieben (49). Calreticulin aktiviert die Makrophagen und neben der Elimination von Tumorzellen wird durch Antigenpräsentation eine verstärkte spezifische Immunantwort erreicht. Ein weiterer positiver Aspekt dieser externen Regulation von CD47 ist die gezielte Aktivierung und Steuerung der Makrophagen. Sind diese einmal in den Tumor eingewandert, sogenannte tumorassoziierte Makrophagen (TAM), werden diese von den Tumorzellen „umprogrammiert“, das Tumorstadium zu fördern, anstatt es zu hemmen (51).

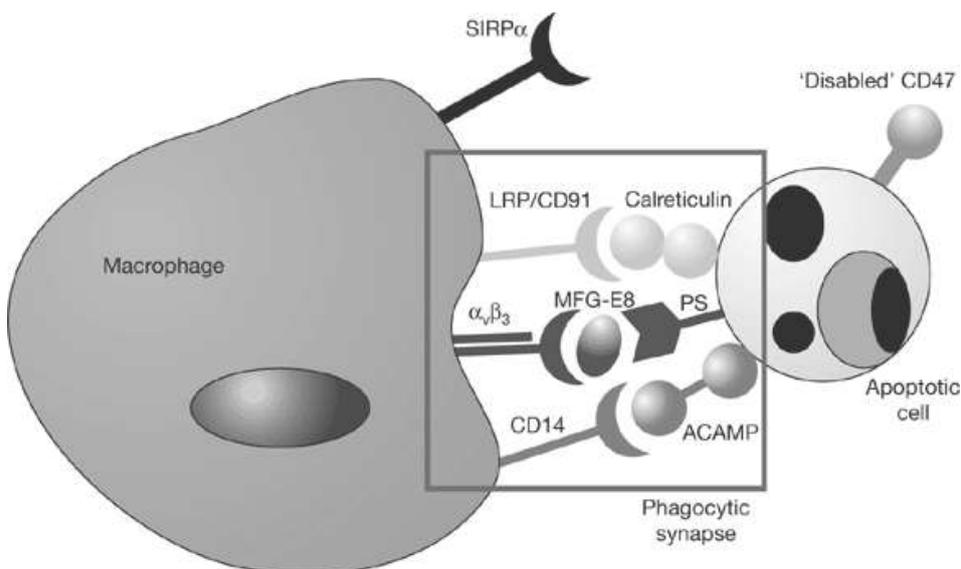


Abbildung 5: Formierung einer phagozytischen Synapse zwischen einer apoptotischen Zelle und einer Makrophage. Das Oberflächenprotein Calreticulin fungiert als Ligand des aktivierenden Makrophagen-Rezeptors LRP/CD91. Etwas abseits ist der infolge der Apoptose inaktivierte CD47-Ligand dargestellt. Dieser kann nicht mehr mit dem inhibitorischen SIRP α -Rezeptor interagieren. Nachdruck mit Genehmigung von Macmillan Publishes Ltd: Nature Cell Biology (52), Copyright 2005.

1.2.3 Immunevasion von Tumoren

Um einer Immunantwort zu entgehen und das Tumorstadium zu ermöglichen, wurden von den Tumorzellen weitere Immun-„escape“-Mechanismen entwickelt (53). Die Präsentation von Tumorantigenen an der Zelloberfläche ist ein sehr komplexer Prozess, der auf mehreren Ebenen gestört werden kann. Insbesondere im fortgeschrittenen, metastasierten Krankheitsstadium sind die MHC-Klasse I-Moleküle auf der Zelloberfläche stark reduziert oder fehlen völlig, so dass die Tumorantigene nicht mehr von den T-Zellen erkannt werden können (54). Auch ein genereller Verlust der Antigenexpression und Defekte bei der Prozessierung verhindern eine Immunantwort (z.B. Melan-A/MART-1 (55)). Kostimulatorische Moleküle (z.B. CD80 (B7-1), CD86 (B7-2)), die für eine effektive Aktivierung von T-Zellen erforderlich sind, werden auf Tumorzellen oft gering exprimiert (56). Hierdurch wird anstatt einer Aktivierung eine Anergie ausgelöst, die T-Zelle wird inaktiviert und toleriert das Antigen. Zytokine wiederum (z.B. IL-4, IL-10, TGF- β , VEGF) werden von Tumorzellen überexprimiert, um die Antigenpräsentation zu inhibieren und eine Immunsuppression hervorzurufen (57). Darüber hinaus fehlen in den Tumorzellen häufig wichtige Signale für den programmierten Zelltod (58), z.B. durch Herabregulation der Todesrezeptoren CD95/Fas (59) und TRAIL (60). Diese Vielzahl an „escape“-Mechanismen führt zu ernüchternden Erfolgsraten immuntherapeutischer Ansätze. Der Einsatz dieser Therapieform bei weit fortgeschrittenen Tumoren erfordert eine zusätzliche Elimination/Inhibition der Evasionsmechanismen.

1.3 Krebsimmuntherapie

Zur Verstärkung der aktiven, unspezifischen Immunität wurden bei frühen immuntherapeutischen Ansätzen Adjuvanzien eingesetzt. Mit dem Ziel, unter anderem die tumorspezifische Immunantwort zu steigern, wurden vorwiegend bakterielle Antigenmischungen verwendet, darunter der abgeschwächte Mykobakterienstamm Bacillus Calmette-Guérin (BCG). Erfolge wurden erstmals beim oberflächlichen Blasenkrebs nachgewiesen, wo BCG bis heute als Standardverfahren eingesetzt wird (61). Im Rahmen passiver, unspezifischer Immunisierungen wurden Zytokine systemisch appliziert. Hierbei konnten sich IL-2 und IFN- α etablieren (62-63). Allerdings war erneut nur bei wenigen Tumorerkrankungen eine therapeutische Wirksamkeit zu verzeichnen, darunter maligne Melanome und Nierenzellkarzinome.

Das zunehmende Verständnis des Immunsystems hat die Entwicklung spezifischer immuntherapeutischer Ansätze begünstigt. Im Folgenden soll neben der aktiven Immunisierung (Vakzine) die passive Krebsimmuntherapie näher erläutert werden. Diese umfasst den adoptiven Transfer aktivierter Immunzellen sowie den Einsatz von Antikörpern.

1.3.1 Tumorstimmtherapie

Bei der Tumorstimmtherapie kommen Tumorzelllysate, tumorspezifische Proteine/Peptide, Tumorzell-mRNA oder die cDNA von Tumorantigenen zum Einsatz. Ziel ist es, durch die Präsentation tumorspezifischer Antigene eine tumorantigen-spezifische T-Zell-Antwort zu induzieren. Um eine effiziente Aktivierung des Immunsystems zu erreichen, werden meist potente Adjuvanzien oder APCs, wie z.B. dendritische Zellen (DC), mit der Tumorstimmung kombiniert (64-65). Während die Überwindung der immunologischen Selbsttoleranz für Tumorstimmtherapie-Strategien kein Hindernis zu sein scheint, stoßen sie bei der Entwicklung allergischer Reaktionen oder Autoimmunerkrankungen an ihre Grenzen (z.B. CTLA-4 (66)). Die individuellen Eigenschaften des Patienten stehen bei einer effektiven Tumorstimmtherapie im Vordergrund. Dies erfordert eine komplexe und zeitaufwändige Entwicklung patientenspezifischer Tumorstimmungsmittel (67).

1.3.2 Adoptive zelluläre Immuntherapie

Bei der adoptiven Immuntherapie werden gegen den Tumor gerichtete Effektorzellen appliziert (68). Hierbei handelt es sich um tumorspezifische T-Zellen und/oder NK-Zellen, die autolog aus dem Patienten gewonnen werden. Nach Aktivierung mit hohen Dosen IL-2 und Expansion *in vitro* wurden vielversprechende Ergebnisse erzielt (69). Eine große Herausforderung stellt allerdings die qualitative und quantitative Herstellung tumorspezifischer Effektorzellen dar. Aus diesem Grund wurde auf die allogene, patientenunabhängige Transplantation ausgewichen. Hierbei kam es jedoch zu einer heftigen Abstoßungsreaktion gegen die Spender-T-Zellen, der sogenannten Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (*graft versus host disease*, GvHD), die zum Tod des Patienten führen kann (70). Da allogene NK-Zellen im Gegensatz zu allogenen T-Zellen keine unerwünschte GvHD verursachen (71), wurden die T- und B-Lymphozyten des Spenders im Transplantat selektiv depletiert (72). Auf diese Weise konnte die GvHD vermieden werden, zusätzlich wurde jedoch auch der immuntherapeutische Effekt reduziert und eine gesteigerte Rezidivrate beobachtet.

1.3.3 Antikörpertherapie

Die Immuntherapie mit spezifischen monoklonalen Antikörpern scheint ein vielversprechender Ansatz zu sein (12). Diese werden in der Maus mit der Hybridomtechnologie hergestellt, wobei B-Zellen aus der Milz immunisierter Mäuse mit immortalisierten Myelomzelllinien zu Hybridomen fusioniert werden (73). Murine Antikörper tragen das Suffix „-omab“. Um einer humanen Anti-Maus-Antikörperbildung entgegen zu wirken und gleichzeitig die Halbwertszeit nativer Antikörper zu verlängern, werden therapeutische Antikörper humanisiert (74). Humane Antikörper werden namentlich durch das Suffix „-umab“ charakterisiert. Bei durch die Endung „-zumab“ gekennzeichneten humanisierten Antikörpern bestehen lediglich die Antigenbindungsstellen der F_{ab} -Region aus Mausprotein. Gentechnologisch hergestellte, chimäre Antikörper bestehen aus einer murinen variablen und humanen konstanten Region („-ximab“).

Bereits zugelassene monoklonale Antikörper, die bei Leukämien aufgrund ihrer spezifischen Bindung an Lymphozyten eingesetzt werden, sind Alemtuzumab, Ibritumomab, Rituximab und Tositumomab (U.S. Food and Drug Administration). Bevacizumab bindet an den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor-A (VEGF-

A) und verhindert so die Vaskularisierung und damit die Versorgung solider Tumoren mit Sauerstoff und Nährstoffen (12). Die Entdeckung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) als Onkogen führte zu der Entwicklung und Zulassung von Cetuximab und Panitumumab, eingesetzt bei der Behandlung des metastasierenden Kolonkarzinoms, sowie Trastuzumab, das in der Brustkrebstherapie verwendet wird (12). Eine Reihe tumorspezifischer Antikörper befindet sich in klinischer Phase-II/III-Prüfung. Darunter der chimäre Antigangliosid-GD₂-Antikörper ch14.18 (75). Vielversprechende Ansprechraten konnten in diesen Studien bei einigen Neuroblastompatienten beobachtet werden. Auch Kombinationen dieses Antikörpers mit Zytokinen (IL-2 und GM-CSF) werden derzeit klinisch untersucht (76-77). Darüber hinaus zeigt ein Antiidiotypantikörper zu ch14.18, als 1A7 bezeichnet, in ersten klinischen Ergebnissen therapeutische Erfolge bei Melanompatienten (78).

Die Wirkung monoklonaler Antikörper beruht auf ihrer Bindung an Zielstrukturen, die sich auf der Oberfläche der Zielzelle befinden. Sie können dabei entweder direkt oder indirekt wirken (79). Bei der direkten Wirkung können die Antikörper durch Kreuzvernetzung des Tumorantigens eine intrazelluläre Signalkaskade in der Krebszelle auslösen. Dies kann einen antiproliferativen Effekt oder eine unmittelbare Apoptose der Zielzelle zur Folge haben (80-81). Rituximab beispielsweise kann durch die Kreuzvernetzung des Tumorantigens CD20 die Apoptose auslösen (82). Andererseits bewirkt die Kreuzvernetzung von CD22, CD33 oder HLA II in der Zielzelle antiproliferative Effekte (83-85). Monoklonale Antikörper können allerdings auch durch die Blockade von bestimmten Liganden auf die Krebszellen wirken. So blockiert z.B. Cetuximab EGFR und kann so einer Progression im Zellzyklus (81, 86), in der Angiogenese und in der Metastasierung entgegen wirken (87). Trastuzumab hingegen blockiert den Her2/neu-Rezeptor und stört so die Signalkette zum epidermalen Wachstumsfaktor, was ebenfalls in einer verminderten Proliferation und damit einem verlangsamten Tumorwachstum resultiert (88). Für viele therapeutische Antikörper wie beispielsweise Rituximab, Alemtuzumab, Trastuzumab oder Cetuximab ist die ADCC der wichtigste Wirkmechanismus (89). Makrophagen und Granulozyten können ebenfalls über das F_c-Fragment aktiviert werden und die mit dem Antikörper markierte Zelle phagozytieren (90).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Weichteilsarkome sind die vierthäufigsten, extrakraniell lokalisierten soliden bösartigen Tumoren im Kindesalter. Das bei Kindern und Jugendlichen häufigste Weichteilsarkom ist das RMS. Die Standardtherapie des RMS, bestehend aus einer multimodalen Therapie mit Chemotherapie, chirurgischer Resektion und Strahlentherapie, konnte keine wesentliche Verbesserung des Überlebens in den letzten Jahren erzielen.

Innovative Therapieansätze, vor allem eine Stimulation des Immunsystems, erscheinen vielversprechend in der Tumorthherapie und sollten hier für RMS untersucht werden. Spezifische Zielgene oder therapeutische Antikörper für eine Immuntherapie des RMS sind bislang nicht bekannt. Die Fragestellungen der vorliegenden Arbeit waren:

- A) Für eine Antikörperbindung geeignete Zielstrukturen beim RMS basierend auf einer Genexpressionsanalyse von ARMS- und ERMS-Gewebeproben zu finden und darauf aufbauend den therapeutischen Antikörper Cetuximab bei RMS *in vitro* zu evaluieren.
- B) Einen unbekanntenen monoklonalen Antikörper mit hoher Bindungsaffinität an RMS-Zellen und -Geweben zu etablieren und das gebundene Antigen zu charakterisieren.
- C) Ein breites Ansprechen des Immunsystems für eine verbesserte Immuntherapie des RMS durch Aktivierung einer gezielten Phagozytose zu erlangen. Hierzu sollten Zielstrukturen auf RMS, darunter CD47 und Calreticulin, durch den Einsatz von Antikörpern, Zytostatika und epigenetischer Intervention *in vitro* moduliert werden.
- D) Ein Mausmodell des metastasierenden RMS zur Evaluierung immuntherapeutischer Ansätze zu etablieren, welches eine Beobachtung des Tumorwachstums sowie des Therapieansprechens *in vivo* ermöglicht.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren in p. a.-Qualität. Sofern nicht gesondert indiziert, befindet sich der Firmensitz in Deutschland.

Aceton	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, München
Bisbenzimid Hoechst 33342	Sigma-Aldrich, München
Bissulfosuccinimidyl Suberat (BS3)	Sigma-Aldrich, München
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, München
Coelenterazin	P.J.K., Kleinblittersdorf
Dithiobissuccinimidyl Propionat (DTSP)	Sigma-Aldrich, München
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, München
Eosin G	Merck, Darmstadt
Essigsäure 100% (Eisessig)	Roth, Karlsruhe
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, München
Formaldehydlösung min. 37%	Merck, Darmstadt
Glutardialdehydlösung 25%	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, München
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
Methanol	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver Sucofin	TSI, Zeven
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, München
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdeoxycholat	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid	Universitätsapotheker, Tübingen
Natriumlaurylsulfat (SDS) Pellets	Roth, Karlsruhe

Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, München
Natriumperiodat	Sigma-Aldrich, München
Natronlauge 1 M	Merck, Darmstadt
Nonidet P40	BDH Chemicals, Poole, Großbritannien
2-Propanol	Merck, Darmstadt
Salzsäure 1 M	Merck, Darmstadt
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	AppliChem, Darmstadt
Thiazolylblau Tetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich, München
Trizma base	Sigma-Aldrich, München
Tris Hydrochlorid	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München
Trypanblau	AppliChem, Darmstadt
Tween 20	Sigma-Aldrich, München
Xylol	Merck, Darmstadt
Zitronensäure	Merck, Darmstadt

2.1.2 Reagenziensysteme (Kits) und Fertiglösungen

Biocoll Trennlösung	Biochrom, Berlin
DC Protein Assay	Bio-Rad, München
Delfia BATDA	Perkin-Elmer, Rodgau
DePeX Eindeckmedium	Serva, Heidelberg
Europiumlösung	Perkin-Elmer, Rodgau
EZ4U Zellproliferationsassay	Biomedica, Wien, Österreich
FACS-Flow	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Rinse	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Safe	Becton Dickinson, Heidelberg
Fluorescence Mounting Medium	Dako, Glostrup, Dänemark
Gaussia Glow Juice	P.J.K., Kleinblittersdorf
GeneChip Expression One Cycle cDNA Kit	Affymetrix, Santa Clara, USA
HiPerFect	Qiagen, Hilden
Mayers Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt
Miltenyi CD56 MicroBeads human	Miltenyi, Bergisch Gladbach
miRNeasy FFPE Kit	Qiagen, Hilden

Phosphatpuffer (PBS) steril	Biochrom, Berlin
Phosphatpuffer (PBS) Tabletten	Sigma-Aldrich, München
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, München
RNA6000 Nano Reagents & Supplies Kit	Agilent, Böblingen
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Rotiphorese 10x SDS-PAGE Laufpuffer	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Roti-Black NSeq Silberfärbungskit	Roth, Karlsruhe
Roti-Lumin	Roth, Karlsruhe
10x Tris/CAPS Puffer	Bio-Rad, München
Trypsin/EDTA-Lösung (10x)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Ziegenserum	Dako, Glostrup, Dänemark

2.1.3 Lösungen und Puffer

Blocking-Lösung

5 % Milchpulver	5 g	
ad 100 ml Waschlösung		<i>Lagerung 4 °C</i>

Citrat-Puffer

Stammlösung A	0,1 M Zitronensäure	0,2 g	
	ad 9 ml Reinstwasser		
Stammlösung B	0,1 M Natriumcitrat	1,2 g	
	ad 41 ml Reinstwasser		
Arbeitslösung	Stammlösung A	9 ml	
	Stammlösung B	41 ml	
	ad 500 ml Reinstwasser, pH 6		<i>Lagerung RT</i>

Coelenterazin

Saures Methanol	2 mM Salzsäure ad 10 ml Methanol	20 µl	<i>Lagerung RT</i>
Stammlösung	12 µM Coelenterazin ad 200 µl saures Methanol	1 mg	<i>Lagerung -20 °C</i>
Arbeitslösung	Stammlösung ad 150 µl PBS steril	20 µl	<i>Sofortgebrauch</i>

Crosslinking-Puffer

1 mM Magnesiumchlorid	9,5 mg	
0,02 % Natriumazid	20 mg	
ad 100 ml PBS, pH 8,3		<i>Lagerung 4 °C</i>

Eosin-Lösung

0,1 % Eosin G	1 g	
Eisessig	1,6 ml	
ad 1 l Reinstwasser, Lösung filtrieren		<i>Lagerung RT</i> <i>lichtgeschützt</i>

FACS-Puffer

2 mM EDTA	0,6 g	
0,005 % Natriumazid	50 mg	
2 % FCS	20 ml	
ad 1 l PBS		<i>Lagerung 4 °C</i>

Lämmli-Puffer

62,5 mM Tris Hydrochlorid	0,5 g	
2 % SDS	1 g	
10 % Glycerin	5 ml	
50 mM DTT	0,4 g	
0,01 % Bromphenolblau	5 mg	
ad 50 ml Reinstwasser, pH 6,8		<i>Lagerung -20 °C</i>

MTT-Lösungen

Reagenz	12 mM Thiazolylblau Tetrazoliumbromid	0,1 g	
	ad 20 ml PBS		<i>Lagerung -20 °C</i>
Stopplösung	10 % SDS	1 g	
	20 mM Salzsäure	0,2 ml	
	ad 10 ml Reinstwasser		<i>Sofortgebrauch</i>

Periodat-Lösung

Lösung A	0,1 M Natriumacetat	1,4 g	
	ad 100 ml Reinstwasser, pH 4,5		<i>Lagerung RT</i>
Periodat-Lösung	10 mM Natriumperiodat	64 mg	
	ad 30 ml Lösung A		<i>Lagerung RT</i> <i>lichtgeschützt</i>

Quenching-Puffer

100 mM Tris Hydrochlorid	1,6 g	
140 mM Natriumchlorid	0,8 g	
ad 100 ml Reinstwasser, pH 8		<i>Lagerung 4 °C</i>

RIPA-Puffer (*Radio Immuno Precipitation Assay Buffer*)

Lösung A	10 % Nonidet P40 ad 10 ml Reinstwasser	1 ml	
Lösung B	0,2 % Nonidet P40 ad 10 ml Reinstwasser	20 µl	
Lösung C	10 % Natriumdeoxycholat ad 10 ml Reinstwasser	1 g	<i>Lagerung RT lichtgeschützt</i>
Lösung D	100 mM EDTA ad 5 ml Reinstwasser, pH 7,4	0,15 g	<i>Lagerung RT</i>
Lösung E	200 mM Natriumorthovanadat ad 100 ml Reinstwasser, pH 10 gelbe Lösung erhitzen bis klar bei RT wieder pH 10 einstellen	3,7 g	<i>Lagerung -20 °C</i>
Lösung F	200 mM Natriumfluorid ad 5 ml Reinstwasser	17 mg	<i>Lagerung RT lichtgeschützt</i>

Lysepuffer

Stammlösung	50 mM Trizma base	0,8 g	
	150 mM Natriumchlorid	0,9 g	
	Lösung A	10 ml	
	Lösung C	2,5 ml	
	Lösung D	1 ml	
	ad 100 ml Reinstwasser, pH 7,4		<i>Lagerung 4 °C</i>
Arbeitslösung	1 % Protease Inhibitor Cocktail	0,1 ml	
	Lösung E	50 µl	
	Lösung F	50 µl	
	ad 10 ml Stammlösung		<i>Sofortgebrauch</i>

Waschpuffer			
Stammlösung	50 mM Trizma base	0,8 g	
	150 mM Natriumchlorid	0,9 g	
	Lösung B	10 ml	
	Lösung C	2,5 ml	
	Lösung D	1 ml	
	ad 100 ml Reinstwasser, pH 7,4		<i>Lagerung 4 °C</i>
Arbeitslösung	1 % Protease Inhibitor Cocktail	0,1 ml	
	Lösung E	50 µl	
	Lösung F	50 µl	
	ad 10 ml Stammlösung		<i>Sofortgebrauch</i>

Sammelpuffer

0,625 M Trizma base	38 g	
ad 500 ml Reinstwasser, pH 6,8		<i>Lagerung RT</i>

Trennpuffer

1,5 M Trizma base	91 g	
ad 500 ml Reinstwasser, pH 8,8		<i>Lagerung RT</i>

Waschlösung (PBST)

PBS Tabletten	5 St	
0,1 % Tween 20	1 ml	
ad 1 l Reinstwasser		<i>Lagerung RT</i>

2.1.4 Zellkulturlösungen und verwendete Zellen

2.1.4.1 Medien

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Biochrom, Berlin
Quantum 263	PAA, Cölbe
RPMI 1640	Biochrom, Berlin
X-VIVO 20	Lonza, Köln

2.1.4.2 Medienzusätze

Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt
Doxorubicin (Doxo)	Cell Pharm, Hannover
Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	Sigma-Aldrich, München
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Genitacin (G418)	Sigma-Aldrich, München
L-Glutamin, 200 mM	Biochrom, Berlin
Granulozyten Makrophagen Kolonie-stimulierener Faktor (GM-CSF)	Becton Dickinson, Heidelberg
Interleukin-2 (IL-2)	Chiron, Ratingen
Natriumpyruvat-Lösung, 100 mM	Biochrom, Berlin
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)	Gibco/Invitrogen, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Polybren (Hexadimethrine bromide)	Gibco/Invitrogen, Darmstadt
Puromycin	Sigma-Aldrich, München
Suberoylanilid Hydroxamsäure (SAHA)	MSD Sharp & Dohme, Haar
Vincristin	GRY Pharma, Kirchzarten

2.1.4.3 Medienrezepturen

Tumorzellen	10 % FCS	50 ml
	1 % L-Glutamin	5 ml
	1 % Penicillin/Streptomycin	5 ml
	ad 500 ml DMEM	
Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs)	10 % FCS	50 ml
	1 % L-Glutamin	5 ml
	1 % Penicillin/Streptomycin	5 ml
	ad 500 ml RPMI 1640	
Makrophagen	10 % FCS	50 ml
	1 % L-Glutamin	5 ml
	1 % Penicillin/Streptomycin	5 ml
	1 % Natriumpyruvat-Lösung	5 ml
	1 % NEAA	5 ml
	ad 500 ml RPMI 1640	

Einfriermedium	Tumorzell-/PBMC-/Makro- phagenmedium	8 ml
	10 % FCS zusätzlich	1 ml
	DMSO	1 ml

2.1.4.4 Verwendete Zellen

Es wurden die folgenden humanen Rhabdomyosarkom-Zelllinien eingesetzt:

Rh30	alveolärer Typ	ATCC, Manassas, USA
RD	embryonaler Typ	ATCC, Manassas, USA
A-204	embryonaler Typ	DSMZ, Braunschweig

Alle Zelllinien wachsen epithelähnlich, einschichtig und sind adhärent. Die alveoläre Zelllinie Rh30 zeichnet sich durch eine p53 Mutation und eine t(2;13)(q35;q14) Translokation aus und wurde aus einer Knochenmarkmetastase eines 17-jährigen Mannes gewonnen. Die embryonalen Zelllinien RD und A-204 stammen aus den Tumoren eines 7-jährigen bzw. 1-jährigen Mädchens.

2.1.5 Vektoren, Proteinstandard und Antikörper

2.1.5.1 Vektoren

pCMV-GLuc Control Plasmid	New England Biolabs, Frankfurt a. Main
<i>mCherry</i> Lentifect lentivirale Partikel	GeneCopoeia, Rockville, USA

2.1.5.2 Proteinstandard

Precision Plus Protein Standard	Bio-Rad, München
---------------------------------	------------------

2.1.5.3 Antikörper

Folgende primäre und sekundäre Antikörper wurden verwendet:

Tabelle 2: Verwendete Primärantikörper

Antigen	Klon/Name	Typ/Wirt	Reaktivität	Anbieter
EGFR	Cetuximab (Erbix®)	chimär	Mensch	Merck, Darmstadt
CD20	Rituximab (MabThera®)	chimär	Mensch	Roche, Mannheim
EGFR		polyklonal, Schaf	Mensch	DPC Biermann, Bad Nauheim
	58B1A2	monoklonal, Maus	Mensch	Dr. Bühring, Abteilung Innere Medizin II, Universitätsklinikum Tübingen
CD47	B6H12	monoklonal, Maus	Mensch	Becton Dickinson, Heidelberg
Calreticulin	FMC75	monoklonal, Maus	Mensch	Enzo Life Sciences, Lörrach

Tabelle 3: Verwendete Sekundärantikörper

Immunkonjugat	Wirt	Reaktivität	Anbieter
Alexa Fluor 546 (rote Fluoreszenz)	Ziege	Maus	Invitrogen, Darmstadt
FITC (grüne Fluoreszenz)	Ziege	Mensch	Chemicon, Hofheim
FITC	Ziege	Maus	Jackson/Dianova, Hamburg
HRP (Peroxidase)	Schaf	Maus	Amersham/GE Healthcare, München
Magnetperlen Dynabeads M-280 (Magnetbeads)	Schaf	Maus	Dynal Biotec, Oslo, Norwegen
PE (gelbrote Fluoreszenz)	Maus	Mensch	Sigma-Aldrich, München

2.1.6 Patientenmaterial und Versuchstiere

2.1.6.1 Patientenproben

Die in dieser Arbeit verwendeten Tumorproben von 13 RMS-Patienten wurden von der Tübinger Ethikkommission genehmigt (Antrag 418/2004V) und sind in der folgenden Tabelle aufgelistet:

Tabelle 4: RMS-Tumorgewebe

Patienten-ID	Diagnose	Alter	Tumorlokalisation
I6R_002a01	ERMS	1	Bauchraum
I6R_002a03	ARMS	2	Oberschenkel
I6R_002a05	ERMS	11	Unbekannt
I6R_002a06	ARMS	10	Unterarm
I6R_002b01	ARMS	15	Unterarm
I6R_002c02	ARMS	15	Fuß
I6R_002c03	ERMS	9	Becken
I6R_002c04	ARMS	3	Brustkorb
I6R_002c05	ERMS	0	Bauchraum
I6R_002c06	ERMS	2	Bauchraum
I6R_002c07	ERMS	7	Zwerchfell
RMS_18	ARMS	7	Brustkorb
RMS_25	ERMS	11	Zwerchfell

2.1.6.2 Versuchstiere

Es wurden männliche NOD/LtSz-*scid IL2Ry^{null}* Mäuse verwendet (Tierversuchs-Nr. K 2/10). *IL2Ry* kodiert für die Gamma-Kette des Interleukin-2-Rezeptors und spielt eine Rolle während des Wachstums und der Differenzierung von T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und Monozyten. Eine Deletion dieses X-chromosomal lokalisierten Gens verursacht eine schwere Immundefizienz (*scid* = *severe combined immunodeficiency*). Aus diesem Grund zeichnen sich insbesondere die männlichen Tiere durch eine hohe Anwachsrate xenotransplanteder Tumorzellen aus.

Die NOD/LtSz-*scid IL2Ry^{null}* Mäuse wurden im Tierstall der Kinderklinik Tübingen unter spezifiziert-pathogen-freien Bedingungen gezüchtet und mit autoklaviertem Wasser und folgenden bestrahlten Pellets *ad libitum* gefüttert:

ssniff M-Z, extrudiert

ssniff Spezialdiäten, Soest

2.1.7 Geräte und Hilfsmittel

Bildgebungsgerät Aequoria MDS	Hamamatsu, Herrsching
Blotkammer Trans-Blot SD	Bio-Rad, München
Brutschrank BBD 6220	Heraeus, Hanau
Dampfdrucktopf Sanoclav	Sanoclav, Bad Überkingen
Dampfsterilisator Varioklav	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Einbettautomat Shandon Pathcentre	Thermo Scientific, Langenselbold
Eismaschine	Scotsman, Ipswich
Elektrophorese Mini-PROTEAN 3 Cell	Bio-Rad, München
ELISA-Reader Milenia Kinetic Analyzer	Milenia, Gießen
Entwicklungsmaschine Agfa Classic E.O.S.	Agfa, Köln
FACS Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Feuchtekkammer	Roth, Karlsruhe
Flüssigchromatograph nanoHPLC Ultimate	Dionex, Idstein
Folienschweißgerät Folio	Severin, Sundern
GeneChip Fluidics Station 450	Affymetrix, Santa Clara, USA
GeneChip Hybridization Oven 640	Affymetrix, Santa Clara, USA
GeneChip Scanner	Affymetrix, Santa Clara, USA
Gefrierschrank -80 °C HFU586 Basic	Heraeus, Hanau
Heizplatte HI 1220	Leica, Nussloch
Kamera AxioCam MR colour	Zeiss, Jena
Kamera SensiCam 12 Bit Cooled Imaging	Zeiss, Jena
Kapillarelektrophorese Bioanalyzer 2100	Agilent, Böblingen
Kleintier-PET Scanner Inveon	Siemens Preclinical Solutions, Knoxville, USA
Kleintier-MRT 7 Tesla ClinScan	Bruker BioSpin, Ettlingen
Kochplatte	E.G.O., Heinfels, Österreich
Kryo-Einfrierbehälter Mr. Frosty	Nalgene/Thermo Fisher, Langenselbold
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr, Ochsenhausen
Microm HM 560 Kryostat	Microm, Walldorf
Magnetrührer Ikamog RH	Janke & Kunkel, Staufen
Magnetständer MagnaRack	Invitrogen, Darmstadt

Massenspektrometer QStar Pulsar i	Applied Biosystems, Darmstadt
Mikroskop Axioskop 40	Zeiss, Jena
Mikroskop Axiovert 135	Zeiss, Jena
Mikroskop Leitz Fluovert FS	Leica, Nussloch
Mikrotiterplatten-Reader Wallac Victor 1420	Perkin-Elmer, Rodgau
Mikrotom Leika RM 2155	Leica, Nussloch
Milli-Q Reinstwasser-System	Millipore, Schwalbach
Multipette Eppendorf Xstream	Eppendorf, Hamburg
Narkosegasverdampfer Vapor 19.1	Dräger, Lübeck
Neubauer Zählkammer	Roth, Karlsruhe
pH-Meter Lab 850	Schott Instruments, Mainz
Photometer Eppendorf BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Spritze Hamilton 100 µl	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Stickstofftank CryoSystem 4000	MVE/Chart, Ball Ground, USA
Pipetboy acu	Integra, Chur, Schweiz
Pipetten (verstellbar)	Eppendorf, Hamburg
Pipette Multikanal	Titertek, Huntsville, USA
Power Supply Power Pac Basic	Bio-Rad, München
Rotator Roto-Rack	Fisher, Schwerte
Spektrophotometer NanoDrop ND-1000	NanoDrop, Wilmington, USA
Spülmaschine Mielabor G 7783 CD	Miele, Gütersloh
Sterilbank MSC Advantage	Thermo Scientific, Langenselbold
Taumler Logic Shaker	Neolab, Heidelberg
Taumler Rocky 3D	Labortechnik Fröbel, Lindau
Thermomixer Eppendorf Grant-Bio	Eppendorf, Hamburg
Vortexer VF2	Janke & Kunkel, Staufen
Waage Analytic	Sartorius, Göttingen
Waage Excellence	Sartorius, Göttingen
Wärmeunterlage Mäuse ThermoLux	Witte + Sutor, Murrhardt
Wasserbad HI 1210	Leica, Nussloch
Wasserbad Typ 1003	GFL, Burgwedel
Zentrifuge Biofuge 15R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Eppendorf Mini Spin	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Multifuge 1S-R	Heraeus, Hanau

Zentrifuge Rotixa/AP	Hettich, Tuttlingen
Vakuumpumpe EcoVac Absaugsystem	Schuett Biotec, Göttingen

2.1.8 Verbrauchsmaterial

Alufolie	Papstar, Kall
Augensalbe Isopto-Max	Alcon Pharma, Freiburg
Combitips Eppendorf Biopur plus	Eppendorf, Hamburg
Deckgläser 24 x 60 mm	Langenbrinck, Emmendingen
Desinfektionsspray Softasept N	Braun, Melsungen
Desinfektionsspray Descosept AF	Braun, Melsungen
Einbettkassetten Universal	Langenbrink, Teningen
Enthaarungscreme Veet For Men	Reckitt Benckiser, Mannheim
Entsorgungsbeutel Plastibrand	Braun, Melsungen
Kryo-Einbettgeschälchen 17 x 17 x 5 mm	Medite, Burgdorf
Einwegpinzetten, steril	Servoprax, Wesel
Einwegskalpelle, steril	Braun, Melsungen
FACS-Röhrchen 12 x 75 mm steril, 5 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Fettstift Dako Cytomation Pen	Dako, Glostrup, Dänemark
Frischhalte-Folie	Papstar, Kall
Immersionsöl Immersol 518N	Zeiss, Jena
Immunzytochemie μ -Slide 8-Well	Ibidi, Martinsried
Inhalationsnarkose Isofluran	Baxter, Deerfield, USA
Insulinspritze Micro-Fine U-40 1 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Kanüle Microlance 3, 26 G 3/8", braun	Becton Dickinson, Heidelberg
Kapillare Hämatokrit für Blutentnahme	Hirschmann, Eberstadt
Kryo-Einbettmedium Tissue-Tek O.C.T.	Sakura, Zoeterwoude, Niederlande
Kryoröhrchen Cryo.s 2 ml	Greiner, Frickenhausen
Küvetten Uvette 220 – 1600 nm	Eppendorf, Hamburg
Laborhandschuhe DermaClean	Ansell, München
Membran Roti-PVDF	Roth, Karlsruhe
Mikrotiterplatte F-Form PS 96-Well	Greiner, Frickenhausen
Mikrotiterplatte U-Form Cellstar 96-Well	Greiner, Frickenhausen
Microtom-Klingen Typ R35	Feather, Osaka, Japan

Mikroarray Human Genome U133 Plus 2.0	Affymetrix, Santa Clara, USA
Mikrotiterplatten 6-; 12-; 24-; 96-Well	Becton Dickinson, Heidelberg
Mikrotiterplatten weiß 96-Well	Greiner, Frickenhausen
Objektträger SuperFrost Plus	Langenbrinck, Emmendingen
Parafilm M Verschlussfolie	Pechiney, Chicago, USA
Pasteurpipetten 230 mm	WU, Mainz
PET Tracer [¹⁸ F]FDG, [¹⁸ F]FLT, [¹¹ C]Cholin	Radiologie, Universitätsklinikum Tübingen
Pipettenspitzen	Biozym Scientific, Oldendorf
Reaktionsgefäße 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml	Eppendorf, Hamburg
RNase-Spray RNase AWAY	Invitrogen, Darmstadt
Röntgenfilm Hyperfilm ECL	Amersham/GE Healthcare, München
S-Monovette EDTA 9 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Schräghalsflaschen 25 cm ² ; 80 cm ²	Corning, Corning, USA
Schraubdeckelröhrchen 15 ml; 50 ml	Greiner, Frickenhausen
Serologische Pipetten 2 ml; 5 ml; 10 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Spritzen 1 ml; 5 ml; 10 ml	Braun Melsungen, Melsungen
Whatman Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellkulturschalen 100 x 20 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber Costar	Corning, Corning, USA
Zytostatika Schutzhandschuhe Z ^{Plus}	Berner, Elmshorn

2.1.9 Computerprogramme

Adobe Reader, Adobe Photoshop	Adobe Systems, München
Alpha DigiDoc RT 4.0.1	Alpha Innotech, San Leandro, USA
ArrayAssist 4.0	Stratagene/Agilent, Böblingen
AxioVision 3.1	Carl Zeiss, Jena
AxioVision Viewer 3.0	Carl Zeiss, Jena
Bio Sizing Version B.02.03.SI307	Agilent, Böblingen
CellQuest, Version 3.1	Becton Dickinson, Heidelberg
FCS Express V3	De Novo Software, Los Angeles, USA
GraphPad Prism Version 4.00	GraphPad Software, La Jolla, USA
Ingenuity Pathways Analysis	Ingenuity Systems, Redwood City, USA
Inveon Research Workplace Software	Siemens Preclinical Solutions, Knoxville, USA

Mascot Version 2.2	Matrix Science, London, Großbritannien
Microarray Suite MAS 5.0	Affymetrix, Santa Clara, USA
Office 2002, 2007 (Access, Excel, Word)	Microsoft, Unterschleißheim
Reference Manager 11	Thomson ResearchSoft, Carlsbad, USA
SOFTmax PRO 3.0	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Wallac 1420 Workstation 3.0	Perkin-Elmer, Rodgau

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Zellkultur

Sämtliche Zelllinien wurden in Zellkulturschalen, Makrophagen und periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) in Zellkulturflaschen in einem Begasungsbrutschrank bei 5 % CO₂ und 37 °C kultiviert. Um eine Kontamination der Zellen zu vermeiden, wurden alle Arbeiten unter sterilen Bedingungen an Laminar-Flow Reinluftwerkbänken durchgeführt. Alle verwendeten Materialien und Lösungen wurden entweder sterilfiltriert oder autoklaviert bzw. steril verpackt vom Hersteller geliefert. Die Arbeitsfläche des Laminar-Flows wurde vor und nach Benutzung mit Descosept und UV-Licht desinfiziert. Des Weiteren wurden alle benutzten Gegenstände sowie die behandschuhten Hände mit Descosept gereinigt.

2.2.1.1 Passagieren

Bei der Subkultivierung von Zellen, dem Passagieren, wurde die Kultur, abhängig von Zelldichte und Wachstumsgeschwindigkeit, reduziert. Adhärente Kulturen mussten zunächst enzymatisch vom Plattenboden abgelöst werden. Hierzu wurde die Protease Trypsin verwendet. Dessen optimale Wirkung wird bei 37 °C erzielt, so dass vor Beginn der Arbeiten frisches Medium, PBS und Trypsin/EDTA-Lösung im Wasserbad auf 37 °C erwärmt wurden. Nach Absaugen des verbrauchten Mediums wurde der Zellrasen mit PBS gewaschen, da sowohl das im Kulturmedium enthaltene Magnesium wie auch das Calcium die Protease Trypsin hemmen. Die Zellen wurden mit Trypsin/EDTA-Lösung überschichtet, wobei der Chelator EDTA übriges Calcium und andere zweiwertige Kationen komplexiert. Nach zweiminütiger Inkubation im Brutschrank wurde optisch kontrolliert, ob sich die Zellen abgekugelt und vom Schalenboden getrennt haben. Durch leichtes Klopfen wurden hartnäckig haftende Zellen gelöst. Die Proteolyse wurde schnellstmöglich durch Zugabe von Kulturmedium abgestoppt, die Zellsuspension anschließend in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt. Suspensionskulturen konnten direkt abgenommen, in Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 600 x g und RT zentrifugiert werden. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in einem definierten Volumen frischen Mediums resuspendiert. Ein Aliquot der Suspension konnte entweder direkt in ein neues Zellkulturgefäß mit vorgelegtem frischem Medium übernommen werden oder zunächst einer Zellzahlbestimmung unterzogen werden.

2.2.1.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Vor Gebrauch wurde die gereinigte Neubauer-Zählkammer leicht angefeuchtet und das Deckglas mit leichtem Druck angebracht, Newtonsche Ringe bestätigten den korrekten Sitz des Deckglases auf den Trägerstegen. Nach Herstellung einer geeigneten Verdünnung und Mischung im Verhältnis 1:2 mit Trypanblaulösung, wurden 10 µl Zellsuspension seitlich aufgetropft und durch Kapillarkraft in die normierte Zählkammer gesaugt. Unter dem Mikroskop wurden die ungefärbten, vitalen Zellen in vier Großquadraten mit je 16 Kleinquadraten mäanderförmig ausgezählt. Das doppelte Zählen von Zellen, die auf Linien des Zählnetzes lagen, wurde durch Diskriminierung zweier Ränder vermieden. Das aus den vier Großquadraten gebildete arithmetische Mittel wurde mit dem Kammerfaktor 10^4 multipliziert. Dieser ergibt sich aus der Fläche eines Großquadrates (0,1 mm²) und der Kammertiefe von 0,1 mm, woraus sich ein Volumen von 0,1 µl errechnet. Durch Einbeziehen des Kammerfaktors konnte die ermittelte Zellzahl auf einen Milliliter bezogen werden, wobei zusätzlich der Verdünnungsfaktor berücksichtigt werden musste. Die Zählkammer wurde nach Gebrauch mit Descosept gereinigt.

2.2.1.3 Langzeitlagerung von Zellen

Die langfristige Lagerung von Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196 °C.

Einfrieren

Die Zellen wurden - wie unter 2.2.1.1 und 2.2.1.2 beschrieben - ausgezählt und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in einer Konzentration von $2-3 \times 10^6$ Zellen/ml durch Zugabe eines definierten Volumens an Einfriermedium resuspendiert. Das enthaltene DMSO hemmt die Bildung von Eiskristallen während des Einfrierprozesses, welche andernfalls die Zelle zerstören würden. Je 1,5 ml Zellsuspension wurden in Kryoröhrchen überführt, in einen Kryo-Einfrierbehälter gegeben und bei -80 °C langsam und kontinuierlich um ca. -1 °C/min abgekühlt, um eine optimale Zellausbeute und Lagerung zu gewährleisten. Nach Erreichen der Gefriertemperatur wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

Auftauen

Das Kryoröhrchen mit den aufzutauenden Zellen wurde im Wasserbad bei 37 °C erwärmt und der Inhalt in ein Zentrifugenröhrchen mit 5 ml vorgelegtem Kulturmedium überführt. Nach Zentrifugation bei 600 x g für 5 min bei RT wurde das Zellpellet in 10 ml Medium resuspendiert und in ein Zellkulturgefäß gegeben. Nach 24 h wurde das Kulturmedium nochmals gewechselt, um eventuell verbliebene Reste von DMSO sowie abgestorbene Zellen zu entfernen.

2.2.1.4 Isolation von PBMCs und Makrophagen

Isolation von PBMCs aus EDTA-Blutproben

PBMCs enthalten Lymphozyten und Monozyten des peripheren Blutes. Mittels Biocoll-Trennlösung und Gradientenzentrifugation PBS-verdünnter EDTA-Blutproben (9 ml) wurden weitere Bestandteile wie Thrombozyten, Erythrozyten und Granulozyten aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte weitgehend abgetrennt. Die Zentrifugation fand bei 1.000 x g für 20 min mit ausgeschalteter Bremse bei RT statt. Die entstandene und leicht zu entfernende weißliche Interphase mit den PBMCs wurde abpipettiert und dreimal mit PBS gewaschen (1.000 x g, 10 min). Anschließend erfolgte eine Inkubation in Kulturmedium unter Zugabe von 200 U/ml des T-Zell-Wachstumsfaktors IL-2 für bis zu 18 h im Brutschrank.

Isolation von Makrophagen aus *buffy coats*

Die Blutkonserven (500 ml heparinisiertes Vollblut) gesunder Blutspender wurden zentrifugiert (1000 x g, 25 min ohne Bremse, RT), der Plasmaanteil und die Erythrozyten vom *buffy coat* abgetrennt und in verschiedene Konservenbeutel überführt. Die *buffy coats* wurden mit freundlicher Genehmigung der Blutspendezentrale des DRK-Blutspendedienstes und des Universitätsklinikums Tübingen zur Verfügung gestellt. Nach Verdünnung in PBS (1:3) und Zugabe von Biocoll wurde eine Gradientenzentrifugation - wie im vorigen Abschnitt beschrieben - durchgeführt. Die gewonnenen PMBCs wurden in 80 cm² Zellkulturflaschen in serumfreiem X-VIVO 20 Medium für 1 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden nicht-adhärenente Zellen durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Adhärenente Zellen wurden in Makrophagen-Medium für 6 Tage kultiviert, bei regelmäßigem Mediumwechsel nach 2 und 4 Tagen. Am 6. Tag wurden 50 U/ml GM-CSF zur Differenzierung der Vorläuferzellen in Makrophagen zugegeben und am 7. Tag nach Isolation wurden die Zellen für 5 min in PBS

inkubiert und mit einem Zellschaber entnommen. Nach Zentrifugation und Resuspension in Kulturmedium konnten diese in Makrophagen-Assays eingesetzt werden.

2.2.2 Transfektion und Transduktion

2.2.2.1 Transfektion mit pCMV-GLuc-Plasmid

Die vom marinen Ruderfußkrebs *Gaussia princeps* stammende Gaussia Luciferase (GLuc) ist eine der hellsten bekannten Luciferasen. Hierbei handelt es sich um ein sehr sensitives Fluoreszenzprotein. Das Enzym wird natürlich sezerniert, so dass keine Zellyse erforderlich ist. Es ist selbst bei höheren Temperaturen stabil und ATP-unabhängig. Lediglich Coelenterazin und Sauerstoff werden als Substrate für die Enzymreaktion benötigt. Beim verwendeten Plasmid befindet sich das Gaussia Luciferase-Gen unter Kontrolle eines konstitutiven CMV-Promotors und wird dauerhaft exprimiert (Abbildung 6). Außerdem ist das Resistenzgen gegen das Antibiotikum G418 (Geneticin, ein Neomycin-Analog) enthalten.

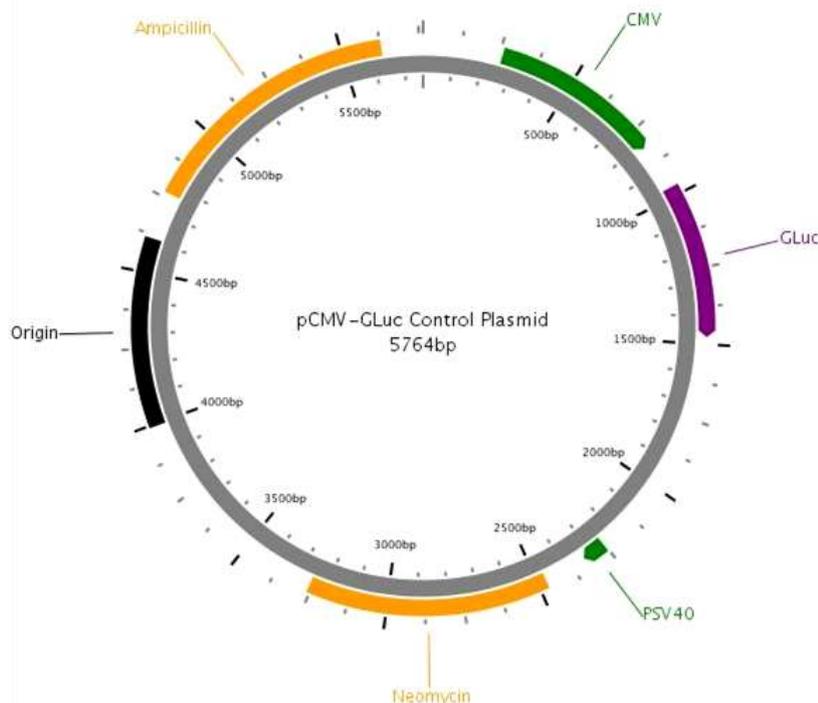


Abbildung 6: Schematische Plasmidkarte von pCMV-GLuc. Neben dem CMV-Promoter und dem Replikationsursprung sind die Gene für die Ampicillin- und Neomycinresistenz eingezeichnet. Die Plasmidkarte wurde hergestellt mit PlasMapper Version 2.0 (91).

Die zu transfizierenden adhärenen RMS-Zellen wurden wie unter 2.2.1.1 beschrieben mit Trypsin gelöst und ihre Zellzahl ermittelt (siehe 2.2.1.2). Nach Zentrifugation wurde eine Konzentration von $3,2 \times 10^5$ Zellen/ml eingestellt. Je 500 μ l wurden in einer 24-Well Platte ausgesät und im Brutschrank aufbewahrt, während der Transfektionsmix vorbereitet wurde. Die Transfektion wurde mittels des auf dem Prinzip der Lipofektion basierenden HiPerFect-Transfektionsreagenzes nach

Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei 0,5 µg Plasmid und 3 µl HiPerFect je Well eingesetzt wurden. Für die Kontrollen wurde der gleiche Mix ohne Plasmid angesetzt. Nachdem der Transfektionsmix auf die bereits ausgesäten Zellen verteilt worden war, wurden diese über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und zur Selektion der erfolgreich transfizierten Zellen das Antibiotikum G418 zugegeben. Zunächst wurde eine 1:100-Verdünnung der 30.000 U/ml enthaltenden G418-Stammlösung verwendet. Die Konzentration wurde in den folgenden Tagen kontinuierlich erhöht, bis alle nicht-transfizierten Kontrollzellen sich abgekugelt hatten und verstorben waren (Endkonzentrationen Rh30: 1:30, RD: 1:100 und A-204: 1:50). Daraufhin konnte die Selektion beendet werden und die stabil transfizierten Zellen wurden in Tumorzellmedium weiterkultiviert bzw. als Rückhalt eingefroren.

2.2.2.2 Transduktion mit Lentifect mCherry

Die lentiviralen Partikel enthalten einen CMV-Promotor für die effiziente Expression des rot fluoreszierenden Proteins *mCherry* sowie einen Puromycin Resistenzmarker (Abbildung 7). Das Reporterprotein *mCherry* wurde aus der Scheibenanemone gewonnen und zeichnet sich gegenüber anderen roten Fluoreszenzproteinen durch eine überragende Photostabilität und ein geringes Molekulargewicht aus.

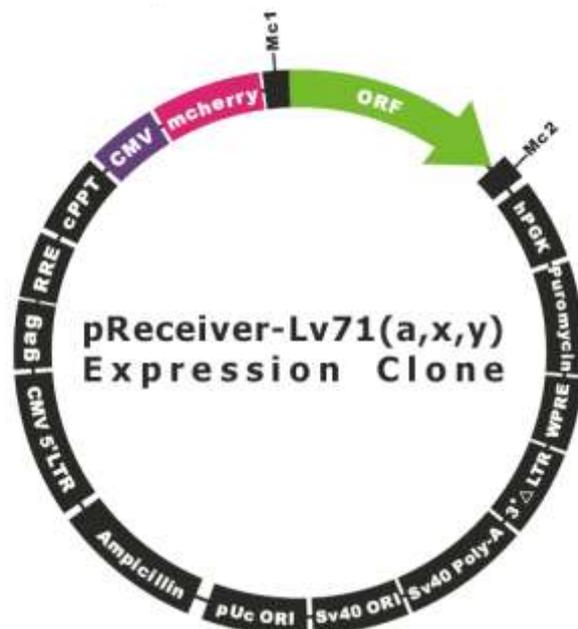


Abbildung 7: Schematische Vektorkarte des lentiviralen Expressionsplasmids mit dem Reporterprotein *mCherry*. Neben dem CMV-Promotor und dem Replikationsursprung sind die Gene für die Ampicillin- und Puromycinresistenz eingezeichnet. Nachdruck mit Genehmigung von GeneCopoeia.

Zur Transduktion wurde eine 24-Well Platte, 80 % konfluent mit RMS-Zellen bewachsen, mit 6 µg/ml Polybren versetzt. Polybren ist ein Polykation und wurde verwendet, um durch Abschirmung von Ladungen auf der Zelloberfläche das

Eindringen von Viren in die Zelle zu erleichtern. Daraufhin wurden je Well 10 μ l Lentifect *mCherry* lentivirale Partikel zugegeben und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag wurde das Medium gewechselt, der Lentiviren-Überstand chemisch abgetötet und zur Selektion 0,3 μ g/ml (Rh30, RD) bzw. 0,6 μ g/ml (A-204) Puromycin zugegeben. Die Zugabe von Puromycin erfolgte bei jedem Mediumwechsel, bis die Kontrollansätze keine lebenden Zellen mehr enthielten. Die Selektion wurde beendet und die stabil transduzierten Zellen weiterkultiviert bzw. als Rückhalt eingefroren.

2.2.3 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie werden ungefärbte oder zuvor fluoreszenzmarkierte Zellen aus einer Zellsuspension mit hoher Geschwindigkeit an einem oder mehreren Lasern vorbeigeführt (beim BD FACSCalibur: 488 nm Argon-Laser). Die dabei entstehende Streuung des Lichts wird mittels verschiedener Detektoren gemessen. Dazu gehören das Vorwärtsstreulicht (FSC, Zellgröße), die Seitwärtsstreuung (SSC, Granularität), sowie die Fluoreszenzintensitäten verschiedener Wellenlängen (Filter für FITC: 530 nm und PE/PI: 585 nm).

Die zu analysierenden Zellsuspensionen wurden in 5 ml FACS-Röhrchen vorgelegt und mit FACS-Puffer gewaschen. Für eine intrazelluläre durchflusszytometrische Analyse wurden die Zellen zunächst in 3,7%iger Formaldehydlösung für 30 min bei 4 °C fixiert und die Zellmembran durch 0,2 % Tween 20 in PBS für 15 min bei 37 °C permeabilisiert. Anschließend erfolgte - wie auch bei extrazellulärer Analyse - die Inkubation mit dem gewünschten Primärantikörper für 30 min bei 4 °C. Nach einem Waschschrift mit FACS-Puffer wurde die Inkubation mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper durchgeführt, ebenfalls für 30 min bei 4 °C. Zur Analyse der unspezifischen Bindung des Sekundärantikörpers wurden Kontrollen ohne Bindung des Primärantikörpers mitgeführt. Überschüssige Antikörper wurden mit FACS-Puffer heraus gewaschen und die Zellsuspension am FACSCalibur analysiert und mit der Software CellQuest oder FCS Express ausgewertet.

2.2.4 GLuc-Messung

Hierbei handelt es sich um eine enzymatische Reaktion, die eine Aussage über die Zellvitalität erlaubt. Das Enzym Gaussia Luciferase wird von den stabil transfizierten

Zellen ins Medium sekretiert. Nach enzymatischer Umsetzung des zugegebenen Substrates Coelenterazin unter Anwesenheit von Sauerstoff kann die Lumineszenzaktivität bestimmt werden.

Hierzu wurde der Gaussia Glow-Juice verwendet. Zunächst wurden 5 µl Zellkulturüberstand in weiße 96-Well Platten überführt. Der Gaussia Glow-Juice wurde entsprechend dem Herstellerprotokoll angesetzt und 50 µl des Substratgemischs direkt am Mikrotiterplatten-Reader unmittelbar vor der Messung in jedes Well pipettiert. Die in Folge des Substratumsatzes entstandene Lumineszenz wurde für 1 s gemessen, als Kontrollen wurden Medium ohne Enzym und Substratmix mitgeführt.

2.2.5 Bestimmung der Vitalität (MTT-Test)

Die Zellvitalität wurde mittels Dimethylthiazol-Tetrazolium-Bromid-Test (MTT-Test) bestimmt. Der Nachweis beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen, namensgebenden Farbstoffs in violette, wasserunlösliches Formazan. Diese Umwandlung erfolgt durch die mitochondrialen Dehydrogenasen der Zelle. Das Produkt kann mit geeigneten Detergenzien aus den Zellen herausgelöst und photometrisch bestimmt werden. Dabei korreliert die gemessene Konzentration an Formazan mit der vitalen Zellzahl.

1×10^4 RMS-Zellen in 100 µl Kulturmedium wurden in einer 96-Well Platte ausgesät und je nach Versuch behandelt. Für die Messung der Zellproliferation nach 72 h Inkubation wurde das EZ4U-Kit nach Angaben des Herstellers verwendet, wobei 20 µl der frisch angesetzten Substratlösung je Well einer 96-Well Mikrotiterplatte zugegeben wurden. Nach 1 h Inkubation im Brutschrank erfolgte die Absorptionsmessung am Milenia Kinetic Analyzer bei 450 nm. Alternativ wurden 25 µl MTT Reagenz je Well pipettiert und für 3 h bei 37 °C inkubiert. Die Reduktion wurde durch Zugabe der MTT Stopplösung beendet und die Formazankristalle gelöst. Nach Inkubation im Dunkeln und über Nacht bei RT wurde die Absorption bei 570 nm photometrisch am Milenia Kinetic Analyzer bestimmt. Alle Ansätze wurden in Dreifachbestimmungen ausgeführt und die prozentuale Vitalität wurde durch Normalisierung zwischen dem Leerwert (0 %) und den unbehandelten Kontrollansätzen (100 %) mit der GraphPad-Software errechnet.

2.2.6 Immunzytochemie

Der Zweck dieser Methode ist der Nachweis von Zellbestandteilen mit Antigencharakter an fixierten Zellkulturen durch Einsatz einer Antigen-Antikörper-Interaktion. Alle Inkubationsschritte, sofern nicht gesondert angegeben, erfolgten bei RT und für 5 min. Das in der Waschlösung enthaltene Detergens Tween 20 unterstützt das Auswaschen unspezifisch gebundener Antikörper und erhöht so die Spezifität der Immunfärbung, der Hintergrund wird reduziert.

Zur immunzytochemischen Analyse wurden 90 % konfluent bewachsene Objektträger mit geschlossenen Zellkulturkammern (μ -Slides) zunächst für 10 min in 3,7%iger Formaldehydlösung und anschließend in $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühltem Aceton-Methanol-Gemisch (1:1) fixiert. Nach einem Waschschrift mit PBST wurden unspezifische Bindungen durch Inkubation für 30 min in 1 % Ziegen Serum blockiert. Daraufhin wurde der Primärantikörper, in PBST auf $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ verdünnt, für 30 min zugegeben. Zur Kontrolle unspezifischer Bindungen des Sekundärantikörpers wurden Kontrollen ohne Inkubation mit dem Primärantikörper mitgeführt. Nach dreimaligem Waschen in PBST wurde für 30 min im Dunkeln mit dem fluoreszenzkonjugierten Sekundärantikörper inkubiert. Zur Gegenfärbung der Zellkerne wurde gleichzeitig mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff Hoechst 33342 in einer 1:2000-Verdünnung gefärbt. Erneut wurden überschüssige Antikörper durch drei Waschschriffe mit PBST entfernt, die Zellkulturkammern mit PBST überschichtet und die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert bzw. kurzfristig abgedunkelt im Kühlschrank gelagert.

2.2.7 Antikörpervermittelter Zytotoxizitätstest (ADCC)

Hierbei wird die Fähigkeit bestimmter Antikörper untersucht, *in vitro* mit antigentragenden Zellen zu interagieren und durch Aktivierung zytotoxischer Immunzellen die gebundenen Zielzellen zu zerstören. Es wurde der nicht-radioaktive Europium-Zytotoxizitätstest durchgeführt, wobei die Zellen zunächst mit dem Acetoxymethylester BATDA markiert wurden. Dieses Reagenz durchdringt leicht die Zellmembran und wird innerhalb der Zelle hydrolysiert, so dass es die intakte Zellmembran nicht länger passieren kann. Erst im Falle einer Zytolyse gelangt es aus der Zelle und kann im Kulturmedium durch Europiumlösung nachgewiesen werden. Hierbei bildet sich ein stabiler fluoreszierender Komplex und die gemessene Fluoreszenzintensität korreliert mit der Anzahl lysierter Zellen.

Eine 80-90 % konfluent mit RMS-Zellen bewachsene Zellkulturschale wurde mit PBS gewaschen und nach Zugabe von 1 ml Kulturmedium und 2,5 µl BATDA-Ligand für 30 min im Brutschrank inkubiert. Überschüssiges BATDA wurde in fünf Waschschrritten mit Kulturmedium entfernt. Anschließend wurden die Zellen wie unter 2.2.1.1 beschrieben trypsiniert und ausgezählt (2.2.1.2). 5×10^4 Zellen/ml wurden eingestellt und je 100 µl in einer U-förmigen 96-Well Mikrotiterplatte ausgesät, wobei eine Hintergrundkontrolle ohne Zugabe der Zielzellen mitgeführt wurde. Daraufhin wurden 20 µl Antikörperlösung in einer absteigenden Konzentrationsreihe (10; 1; 0,5; 0,1; 0,05 µg/ml) zugegeben, die Kontrollen (Hintergrund, Spontanlyse und Maximallyse) und die Ansätze ohne Antikörper erhielten 20 µl Kulturmedium. Nach Antigen-Antikörper-Interaktion im Brutschrank für 30 min wurden 100 µl PBMCs als Effektorzellen in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben (Effektor-Zielzellen-Verhältnisse 80:1 = 4×10^6 Zellen/ml; 40:1 = 2×10^6 Zellen/ml; 20:1 = 10^6 Zellen/ml; 10:1 = 5×10^5 Zellen/ml und 5:1 = $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml). Zu den Kontrollen wurden 100 µl PBMC-Medium gegeben, zur Maximallyse zusätzlich 2 % Triton. Die Platte wurde kurz anzenrifugiert (100 x g, 2 min, Bremse 3) und im Brutschrank inkubiert. Nach 4 h wurde die Lyse der Zielzellen untersucht, hierzu wurde die Platte erneut zentrifugiert (200 x g, 5 min, Bremse 3), 20 µl aus dem Überstand in flache 96-Well Mikrotiterplatten überführt und jedes Well mit 200 µl Europiumlösung versetzt. Nach einem Inkubationsschritt für 20 min bei RT, abgedunkelt auf einem Schüttler, wurde die Fluoreszenz des komplexierten Europiums am Wallac Victor Multilabel Counter gemessen. Der Prozentsatz lysierter Zellen wurde nach Abzug der Hintergrundkontrolle anhand folgender Formel ermittelt:

$$\text{Spezifische Zytolyse} = \frac{\text{Probe} - \text{Spontanlyse}}{\text{Maximallyse} - \text{Spontanlyse}} \times 100$$

2.2.8 Phagozytostest

In Anlehnung an den Zytotoxizitätstest wird untersucht, ob und in welchem Maße Zielzellen durch Makrophagen phagozytiert werden. Hierbei können Antikörper zur Aktivierung der Makrophagen oder verschiedene Wirkstoffe zur Sensibilisierung der Zielzellen eingesetzt werden, wie z.B. die Zytostatika Vincristin und Doxorubicin oder der HDACi SAHA.

1×10^4 RMS-Zellen wurden in 96-Well Mikrotiterplatten ausgesät, teilweise mit 0,1 ng/ml Vincristin, 10 μ M Doxorubicin oder 0,5 μ M SAHA versetzt und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag wurde zu ausgewählten Ansätzen 10 μ g/ml CD47-Antikörper gegeben und die Platte erneut für 30 min bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurden die Makrophagen in einem Effektor-Zielzellen-Verhältnis von 2:1 zugegeben und die Platte für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch und mittels MTT-Test (siehe 2.2.5).

2.3 Histologische Methoden

2.3.1 Fixieren und Einbetten

2.3.1.1 Konservierung in Paraffin

Das biologische Material wurde umgehend in 3,7%iger Formaldehydlösung für etwa 24 h fixiert, um Beeinträchtigungen des Gewebes zu unterbinden und es im ursprünglichen Zustand der Entnahme zu erhalten. Daraufhin wurden die Gewebeproben gründlich mit Reinstwasser gewaschen und freundlicherweise in der Abteilung für Pathologie am Universitätsklinikum Tübingen in Paraffin eingebettet. Im dort vorhandenen Einbettautomaten wurde das in der Probe enthaltene Wasser in einer aufsteigenden Ethanolreihe entzogen. Der Alkohol wurde durch Xylol ersetzt und das Gewebe abschließend in Paraffin eingebettet, um es zu festigen und die Durchführung von Schnitten zu ermöglichen. Die Paraffinblöcke wurden bei RT gelagert.

2.3.1.2 Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung wurde das biologische Material umgehend in das Einbettmedium Tissue-Tek O.C.T. gegeben und auf Trockeneis oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Einbettmedium besteht aus wasserlöslichen Glykolen und Harzen und durch die schnelle Abkühlung wird die Bildung von Eiskristallen, die zu Gefrierschäden im Material führen, verhindert. Das Gefrieren erfüllt den zweifachen Zweck, die Gewebeproben im Zustand der Entnahme zu fixieren und zu verfestigen, damit Schnitte angefertigt werden können. Die eingebetteten Gewebestücke wurden bei -80 °C gelagert.

2.3.2 Herstellen von Gewebeschnitten

2.3.2.1 Paraffinschnitte

Die in Paraffin eingebetteten Gewebeproben wurden am Vortag bei -20 °C eingefroren, um eine möglichst harte Konsistenz des Paraffins beim Schneiden zu gewährleisten. Die Gewebelöcke wurden in der Aufnahme des Mikrotoms verankert und 5 µm dünne Gewebelamellen geschnitten. Diese wurden mit einem Pinsel auf eine Wasseroberfläche (45 °C) überführt, um die Schnitte durch die Oberflächenspannung zu glätten. In gestrecktem Zustand wurden diese auf Objektträger überführt und nach Trocknung auf einer 60 °C warmen Heizplatte bis zur Weiterverarbeitung bei RT gelagert.

2.3.2.2 Kryoschnitte

Die eingebetteten Gewebestücke wurden mit Einfriermedium auf dem Probentisch des auf -20 °C vorgekühlten Kryostaten aufgefroren. Der Tisch wurde eingespannt und Schnitte mit einer Schichtdicke von 10 µM angefertigt. Diese wurden durch den am Messer angebrachten Schnittstrecker gestreckt, direkt auf Objektträger aufgenommen und auf Trockeneis bzw. bei -80 °C gelagert.

2.3.3 Immunhistochemie

Mit Hilfe der Immunhistochemie gelingt der Nachweis von Gewebestrukturen mit Antigencharakter in fixierten Gewebeschnitten durch Einsatz einer Antigen-Antikörper-Interaktion. Alle Inkubationsschritte, sofern nicht gesondert angegeben, erfolgten bei RT für 5 min. Des Weiteren in einer geschlossenen, feuchten Kammer, um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern, da mit sehr geringen Flüssigkeitsmengen gearbeitet wurde.

2.3.3.1 Paraffinschnitte

Über eine absteigende Alkoholreihe, beginnend mit drei Xylol-Bädern, wurde das Paraffin aus den zu untersuchenden Gewebeschnitten entfernt. Es folgten zwei Bäder mit 100 % Ethanol, dann 95 % und 70 % Ethanol. Die Objektträger wurden kurz in Reinstwasser geschwenkt und anschließend die Antigene in einem Bad mit Citratpuffer demaskiert. Hierzu wurden die Gewebeschnitte in einem Dampfdrucktopf für 5 min auf 100 °C erhitzt, um die formalinbedingten Eiweißvernetzungen aufzuschließen. Nach dem Abkühlen wurden die Schnitte in Reinstwasser gewaschen und mit einem Fettstift umrandet. Unspezifische Bindungen wurden durch 30-minütige Inkubation in 1 % Ziegen Serum blockiert. Daraufhin wurde der Primärantikörper, in PBST auf 10 µg/ml verdünnt, für 30 min zugegeben. Zur Kontrolle unspezifischer Bindungen des Sekundärantikörpers wurden Kontrollen ohne Inkubation mit dem Primärantikörper mitgeführt. Nach dreimaligem Waschen in PBST wurde für 30 min im Dunkeln mit dem fluoreszenzkonjugierten Sekundärantikörper inkubiert. Zur Gegenfärbung der Zellkerne wurde gleichzeitig mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff Hoechst 33342 in einer 1:2000-Verdünnung gefärbt. Erneut wurden überschüssige Antikörper durch drei Waschschrte mit PBST entfernt und ein spezielles Eindeckmedium (Fluorescence Mounting Medium) auf die Präparate aufgebracht, welches das Ausbleichen der Fluoreszenz verzögert. Die Objektträger wurden mit Deckgläsern versehen und

nach vollständigem Austrocknen des Eindeckmediums unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert bzw. bis zu einem Monat abgedunkelt im Kühlschrank gelagert.

2.3.3.2 Kryoschnitte

Aus gefrorenem Gewebe gewonnene Schnitte werden bei RT immunhistochemisch untersucht, so dass eine chemische Fixierung nach dem Schneiden erforderlich ist. Hierzu wurden die Objektträger in -20 °C gekühltem Aceton-Methanol-Gemisch (1:1) inkubiert und anschließend auf Zellstoff gelagert, bis die Fixierlösung verfliegen war. Anschließend wurden die Schnitte mit einem Fettstift umrandet und mit PBST bedeckt. Die Blockade der unspezifischen Bindungen, die Antikörperdetektion und das Eindecken erfolgten wie unter 2.3.2.1 beschrieben.

2.3.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung, abgekürzt HE-Färbung, besteht aus zwei verschiedenen Einzelfärbungen und ist eine Routinefärbemethode für morphologische Untersuchungen. Bei Hämatoxylin handelt es sich um einen natürlichen Farbstoff aus dem Blauholzbaum, der in Form des basischen Hämaun alle sauren Strukturen intensiv blau färbt. Hierzu gehören vor allem die Zellkerne mit der darin enthaltenen DNA und das mit Ribosomen angereicherte raue endoplasmatische Retikulum. Eosin hingegen ist ein synthetischer saurer Farbstoff und färbt alle basischen Zellstrukturen rot, was insbesondere die Zellplasmaproteine betrifft.

Über eine absteigende Alkoholreihe, beginnend mit drei Xylol-Bädern zu je 5 min, wurde das Paraffin aus den zu untersuchenden Gewebeschnitten eliminiert. Es folgten zwei Bäder mit 100 % Ethanol, dann 95 % und 70 % Ethanol, jeweils für 5 min. Die Objektträger wurden kurz in Reinstwasser geschwenkt, daraufhin für 2 min in Mayers Hämaunlösung gebadet und für 5 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Hierbei schlägt der Farbton der zunächst rötlich-braun gefärbten Zellkerne durch eine Erhöhung des pH-Wertes in das typische Blauviolett um. Die Objektträger wurden anschließend 5-mal in Eosin-Lösung getaucht und 30 sec unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 95 %, 100 %, 100 % Ethanol für je 5 min) wurde den Gewebeschnitten das Wasser wieder entzogen und in drei Xylol-Bädern à 5 min geklärt. Letztlich wurden die Objektträger mit Eindeckmedium (DePeX) und

Deckgläsern versehen. Nach vollständigem Austrocknen des Eindeckmediums konnten die Schnitte mikroskopisch analysiert bzw. bei RT gelagert werden.

2.4 Molekularbiologische Methoden

Aufgrund der ubiquitären Verbreitung und der hohen Stabilität von RNAsen wurden alle Arbeiten mit RNA an einem gesonderten Laborplatz durchgeführt. Die Arbeitsfläche sowie alle Utensilien und die verwendeten Handschuhe wurden mit dem RNase-Hemmer RNase AWAY gereinigt. Außerdem wurden nur sterile gestopfte Pipettenspitzen benutzt.

2.4.1 Isolierung von RNA aus Geweben und Zelllinien

Das Grundprinzip der RNA-Isolierung basiert auf der Phenol-Chloroform-Extraktion. Zunächst wird das Material lysiert, wobei gleichzeitig Proteine denaturiert und zusammen mit den RNAsen inaktiviert werden. Daraufhin erfolgt die Zugabe von Phenol, wodurch sich ein Zwei-Phasen-System bildet. In diesem sammeln sich die Proteine in der unteren, organischen Phase an, die DNA an der Phasengrenze und die RNA ist in der oberen wässrigen Phase gelöst. Die RNA wird letztlich durch eine Fällung mit Ethanol aus der wässrigen Phase gewonnen, auf Silica-Säulen in mehreren Waschschrritten gereinigt und schließlich mit RNase-freiem Wasser eluiert.

Für die Isolierung der Gesamt-RNA aus in Paraffin konservierten Gewebeproben wurde das miRNeasy FFPE Kit verwendet. Die Durchführung erfolgte entsprechend dem Herstellerprotokoll, wobei je Probe sechs 5 µm dünne Gewebeschnitte eingesetzt wurden. Die Elution erfolgte in 20 µl RNase-freiem Wasser.

Die Gesamt-RNA aus Zelllinien wurde mittels des RNeasy Kits gewonnen. Die Durchführung erfolgte entsprechend dem Herstellerprotokoll für Tierzellen. Es wurden 1×10^5 Zellen nach Trypsinierung (2.2.1.1) abzentrifugiert und eingesetzt. Vor der RNA-Isolierung wurden diese in zum Kit gehörendem Lysepuffer aufgeschlossen und homogenisiert. Die Elution erfolgte in 30 µl RNase-freiem Wasser.

2.4.2 RNA Quantitäts- und Qualitätsbestimmung

Quantität sowie Qualität der isolierten RNA wurden in der Abteilung für Medizinische Genetik am Universitätsklinikum Tübingen bestimmt.

Mit Hilfe des NanoDrop-Gerätes wurde die RNA-Konzentration photometrisch ermittelt. Hierbei wurden lediglich 1,5 µl Probe benötigt. Die Messungen erfolgten

bei 260 nm (Absorptionsmaximum Nukleinsäuren), 280 nm (Absorptionsmaximum Proteine) und 320 nm (Hintergrund).

Die Qualität der isolierten RNA wurde mittels Kapillarelektrophorese und Fluoreszenzdetektion im Bioanalyzer 2100 bestimmt. Hierzu wurde das RNA6000 Nano Reagents & Supplies Kit derselben Firma entsprechend dem Herstellerprotokoll verwendet. Als Maß für die RNA-Qualität wurden die von der Bio Sizing Software berechneten RIN-Nummern verwendet (0 = sehr schlechte Qualität, 10 = höchste Qualität, siehe (92)).

2.4.3 Mikroarray Expressionsanalyse

Die Mikroarray-Technologie ermöglicht die massenhafte, simultane Durchführung von Hybridisierungsreaktionen an einem festen Träger. Hierbei binden markierte DNA- oder RNA-Moleküle an komplementäre, genspezifische Sequenzen, die als Sonden auf der Oberfläche einer Festphase immobilisiert sind. Der Durchmesser eines jeden Sonden-Spots ist kleiner als 250 µm, tausende solcher Spots bilden einen Mikroarray. So werden bei relativ geringem Material-, Platz- und Zeitbedarf am häufigsten Genexpressionsanalysen mittels eines Mikroarrays durchgeführt. Meist werden sogenannte Oligonukleotid-Mikroarrays verwendet, diese basieren auf der *in situ*-Synthese der Sondenmoleküle (20-30 Nukleotide lang) direkt auf der Chipfläche.

In der vorliegenden Arbeit wurde der *Human Genome* U133 Plus 2.0 Oligonukleotid-Array verwendet, dieser enthält etwa 1.300.000 Oligonukleotide. Dies entspricht 54.671 Probensätzen, welche ca. 47.400 Transkripte bzw. 38.500 gut charakterisierte humane Gene erfassen. Um eine hohe Sensitivität und Spezifität zu erzielen, enthält der Array Hybridisierungskontrollen, für manche Transkripte mehrere Probensätze sowie für alle Proben Kontroll-Sonden zur Erkennung von unspezifischen Interaktionen und Hintergrundsignalen. Sonde und Kontroll-Sonde bilden ein Probenpaar, ein Probensatz besteht aus elf verschiedenen Probenpaaren mit einer Länge von je 25 bp, die einen ca. 300 bp großen Bereich eines Transkripts abdecken.

Die Arbeitsschritte der Expressionsanalyse in ARMS und ERMS Gewebeproben wurden entsprechend dem Herstellerprotokoll „One-Cycle“ von der Microarray Facility Tübingen durchgeführt. Im Anschluss an die Hybridisierung erfolgte die

Färbung der eingesetzten biotinylierten und fragmentierten cRNA mit Streptavidin-Phycoerythrin. Die Fluoreszenz der einzelnen Probensätze wurde mit dem GeneChip-Scanner detektiert, wobei die gemessene Intensität mit der Menge an gebundener cRNA korrelierte. Die Signalintensitäten wurden aus den Rohdaten mit dem Algorithmus der Affymetrix Microarray Suite berechnet. Die abschließende Datenanalyse erfolgte mit der ArrayAssist Software, wodurch nach GCRMA Normalisierung und Welch-Test alle signifikant differenziell regulierten Transkripte mit einem *fold change* größer oder kleiner zwei und einem p-Wert kleiner 0,005 selektiert wurden.

2.4.4 Funktionelle Analyse von Expressionsprofilen

Die Untersuchung biologischer Mechanismen, Signalwege und Funktionen der mittels Mikroarray identifizierten differenziell regulierten Gene in ARMS versus ERMS wurde mit der Ingenuity Pathways Analysis Software durchgeführt. Hierzu wurden die Bezeichnungen der Probensätze mit entsprechenden *fold change*-Daten und p-Werten in die Anwendung implementiert. Jeder Probensatz-Bezeichnung wurde - sofern bekannt - der entsprechende Gen-Name und die Funktion zugeordnet, wobei die Ingenuity Pathways Knowledge Datenbank als Quelle herangezogen wurde. Aus den differenziell exprimierten Genen mit funktioneller Bedeutung konnten Genregulationsnetzwerke erstellt werden, deren Interaktionen in wissenschaftlichen Publikationen experimentell belegt wurden und aus diesem Grund in der Ingenuity Datenbank enthalten waren.

2.5 Proteinbiochemische Methoden

Zur Verringerung des Proteinabbaus fanden alle Bearbeitungsschritte - sofern nicht anderweitig deklariert - auf Eis bzw. bei 4 °C statt.

2.5.1 Proteinextraktion aus Zelllinien

Mittels Standardextraktion werden lösliche Proteine des Cytosols sowie Membranproteine gewonnen. Durch das Detergens Nonidet P40 werden die meisten Membranproteine aus der hydrophoben Wechselwirkung mit den Phospholipiden gelöst und in Form komplexer Mizellen solubilisiert. Bei diesem Vorgang werden auch membrangebundene Proteasen in Lösung gebracht, die das Zielprotein degradieren können. Die unerwünschte Proteolyse wird durch verschiedene Protease-Hemmer im Lysepuffer (EDTA, Inhibitor Cocktail) vermieden. Außerdem werden Phosphatase-Hemmer zur Verhinderung einer Dephosphorylierung (Natriumorthovanadat und Natriumfluorid) eingesetzt.

Für die Isolierung des Gesamtproteins wurden 80 % konfluent bewachsene Zellkulturschalen mit kaltem PBS gespült und daraufhin mit PBS überschichtet. Nach Abschaben der Zellen von der Oberfläche wurden diese mit PBS in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 100 x *g* für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 300 µl RIPA-Lysepuffer resuspendiert. Nach einer 30minütigen Inkubation auf Eis, unterbrochen durch mehrmaliges Vortexen, wurde bei 18.000 x *g* für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Zuletzt wurde der Überstand in ein frisches Eppi überführt und bei -80 °C gelagert.

2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit dem *DC Protein Assay* von Bio-Rad durchgeführt, bei dem es sich um eine optimierte Variante der kolorimetrischen Methode nach Lowry handelt. Hierbei bilden die Proteine mit Kupfer(II)-Ionen in alkalischer Lösung einen blau-violetten Komplex (Biuret-Reaktion). Im zweiten Schritt werden die Kupfer(II)-Ionen des Komplexes zu Kupfer(I)-Ionen reduziert, die wiederum das gelbe Folin-Reagenz zu Molybdänblau reduzieren. Die resultierende intensive Blaufärbung wird photometrisch gemessen.

Abweichend vom Herstellerprotokoll wurden 20 µl Proteinextrakt unverdünnt bzw. mit RIPA-Lysepuffer verdünnt in Küvetten vorgelegt und ein Leerwert mitgeführt.

Pro Küvette wurden 100 µl Reagenz A' (bestehend aus Reagenz A und 2 % Reagenz S) hergestellt. Nach Zugabe von 800 µl Reagenz B (Folin-Reagenz) wurde die Küvette mit Parafilm geschlossen, invertiert und 30 min im Dunkeln inkubiert. Die Extinktion der einzelnen Proben wurde photometrisch bei 595 nm gegen den Leerwert bestimmt. Zur Berechnung der Proteinkonzentration wurde eine BSA-Kalibriergerade (Verdünnungsreihe von 0,2 µg/µl bis 2 µg/µl in zehn Stufen) herangezogen. Anhand der Gleichung der linearen Regressionsgeraden wurde der Proteingehalt unbekannter Proben nach folgender Formel errechnet:

$$\text{Proteingehalt [mg/ml]} = \frac{\text{Extinktion}^{595} - 0,05}{0,06}$$

2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) denaturiert das Detergens SDS Proteine, so dass sich diese nur noch in ihrer Größe, bei vergleichbaren hydrodynamischen Eigenschaften, unterscheiden. Bei der Gelelektrophorese wandern die SDS-Protein-Komplexe im elektrischen Feld zum Pluspol und der Molekularsiebeffekt der Polyacrylamid-Matrix trennt sie nach ihrem Molekulargewicht auf. Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE, bestehend aus Sammel- und Trenngel, wird eine höhere Bandenschärfe erzielt. Die beiden Gele unterscheiden sich neben der Porengröße insbesondere in ihrem pH-Wert.

Zur Denaturierung wurden die Proteinextrakte mit Lämmli-Puffer für 3 min auf 95 °C erhitzt und bei 18.000 x g für 2 min bei 4 °C zentrifugiert. Alle Bestandteile des Trenngels wurden gemischt, zügig zwischen die beiden mit 70%igem Ethanol gereinigten Glasplatten der Elektrophorese-Apparatur gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach Auspolymerisierung, wofür APS als Radikalstarter und TEMED als Katalysator verantwortlich sind, wurde das Isopropanol abgegossen und die Sammelgelbestandteile gemischt und auf das Trenngel pipettiert. Umgehend wurde ein Kamm zur Taschenformung luftblasenfrei eingesetzt. Das auspolymerisierte Gel wurde sofort weiterverwendet oder in Frischhalte-Folie verpackt und über Nacht bei 4 °C gelagert.

Tabelle 5: Protokoll diskontinuierliches Polyacrylamidgel 7 cm x 8 cm

	Trenngel (8 %, 4 ml)	Sammelgel (6 %, 2 ml)
Trennpuffer	0,8 ml	-
Sammelpuffer	-	500 µl
Reinstwasser	2 ml	1,1 ml
Gel 30	1,1 ml	430 µl
20 % SDS	20 µl	-
10 % APS	20 µl	20 µl
TEMED	4 µl	2 µl

Für die Gelelektrophorese wurde das Gel in die Kammer gespannt. Sowohl Anoden- als auch Kathodentank wurden mit Laufpuffer gefüllt. Nach Entfernen des Taschenformers wurden die Geltaschen mit einer Hamilton-Spritze gespült und Luftblasen unterhalb des Gels beseitigt. Die vorbereiteten Proben sowie ein gefärbter Größenstandard wurden mit einer Hamilton-Spritze aufgetragen und die Elektrophorese für 35 min bei 200 V durchgeführt.

2.5.4 Western Blot und Immundetektion

Beim Western Blot werden die Proteine eines SDS-Gels elektrophoretisch auf eine Membran übertragen. Diese eignet sich für eine anschließende Immunfärbung, basierend auf einer Antigen-Antikörper-Interaktion zur Identifizierung spezifischer Proteine. Es werden peroxidasegekoppelte Sekundärantikörper verwendet, die durch Oxidation von Luminol eine Chemolumineszenz auslösen. Das entstehende Licht wird mittels Röntgenfilm gemessen.

2.5.4.1 Halbtrockener Elektroblot

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden unter Verwendung des halbtrockenen Elektroblot-Verfahrens auf eine PVDF-Membran übertragen. Nach Aktivierung der Membran für 15 min in Methanol wurde diese in Reinstwasser geschwenkt. Das Gel wurde aus den Glasplatten entnommen, das Sammelgel verworfen und das Trenngel ebenfalls in Reinstwasser überführt. Zwei auf die Größe des Trenngels zurechtgeschnittene Whatman Filterpapiere wurden mit Anoden- bzw. Kathodenpuffer benetzt. Das Blotsandwich wurde unter Vermeidung von Luftblasen im Elektroblot aufgebaut, wobei die Membran mit der rauen Seite

zur Anode, mit der glatten Seite in Richtung Gel und Kathode positioniert wurde. Der Transfer erfolgte für 30 min bei einer Spannung von 10 V.

2.5.4.2 Antikörpermarkierung

Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran in Blocking-Lösung für 1 h bei RT auf einem Taumler inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit dem in Blocking-Lösung verdünnten primären Antikörper in Folie eingeschweißt und 18 h bei 4 °C auf dem Taumler inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe für jeweils 5 min mit PBST und anschließend die Inkubation mit dem sekundären HRP-konjugierten Antikörper für 45 min bei RT. Nach erneutem Waschen der Membran wurde eine Chemolumineszenz-Reaktion durchgeführt. Hierzu wurde Roti-Lumin nach Angaben des Herstellers verwendet. Anschließend wurde die Membran zwischen zwei lichtdurchlässige Klarsichtfolien gelegt, in einer Röntgenkassette mit einem Röntgenfilm überschichtet und der Film anschließend entwickelt.

2.5.5 Silberfärbung

Die Silberfärbung ist ein Verfahren zur Anfärbung von Proteinen nach SDS-PAGE. Im Vergleich zur Coomassie-Färbung zeichnet sich diese Methode durch eine höhere Sensitivität aus, die Nachweisgrenze liegt bei 0,1-1 ng pro Bande.

Es wurde der Roti-Black NSeq Silberfärbungskit verwendet. Dieser ist eigentlich für die Anfärbung von DNA in Sequenziergelen vorgesehen, funktioniert aber auch mit Proteingelen. Die Durchführung erfolgte entsprechend dem Herstellerprotokoll, wobei eine Fixierzeit von 1 h und eine Entwicklungszeit von 5 min gewählt wurden. Das gefärbte Gel wurde eingeschweißt und fotografisch dokumentiert.

2.5.6 Immunpräzipitation

Durch Immunpräzipitation wird mittels eines Antikörpers ein Antigen aus einer Lösung aufkonzentriert. Teilweise wird zuvor eine chemische Vernetzung (*Crosslinking*) durchgeführt, um die Bindung von Antikörper und Antigen zu festigen.

Es wurden 5×10^6 Zellen nach Trypsinierung (2.2.1.1) abzentrifugiert, in 2 ml PBS resuspendiert und mit 20 µg Antikörper auf einem Rotator bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss an die Antigen-Antikörper-Interaktion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 2 ml Crosslinking-Puffer aufgenommen. Zur Kreuzvernetzung

wurden 1 mM BS3 - gelöst in Reinstwasser, 100 mM DTSP - gelöst in DMSO oder 2,5 % Glutardialdehydlösung zugegeben und für 30 min bei RT unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und mit Quenching-Puffer gewaschen, um die Kreuzvernetzungsreaktion zu stoppen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 750 µl RIPA-Lysepuffer resuspendiert und die Proteinisolierung - wie unter 2.5.1 beschrieben - durchgeführt.

50 µl Magnetbeads je Ansatz wurden dreimal mit Lysepuffer unter Zuhilfenahme eines Magnetständers gewaschen. Hierdurch wurden die Beads an der Gefäßwand fixiert, so dass die verbleibende flüssige Phase abpipettiert werden konnte. Nach Zugabe der Magnetbeads zu den gewonnenen Proteinlysaten wurden die Proben zur Antigen-Antikörper-Interaktion 1 h auf dem Rotator bei 4 °C inkubiert. Der Komplex aus Protein, Antikörper und Magnetbeads wurde dreimal mit RIPA-Waschpuffer gewaschen und in 30 µl denaturierendem Lämmli-Puffer aufgenommen. Durch Erhitzung für 3 min bei 95 °C wurden Protein und Magnetbeads getrennt, die Beads mittels Magnetständer entfernt und der gewonnene Proteinextrakt in einer SDS-PAGE (2.5.3) aufgetrennt und durch Silberfärbung (2.5.5) detektiert.

2.5.7 Proteinidentifikation mittels LC/MS-Analyse

Der beispielsweise nach einer Immunpräzipitation gewonnene Proteinextrakt kann durch massenspektrometrische Methoden analysiert und die enthaltenen unbekannt Proteine charakterisiert werden.

Hierzu wurde zunächst im Proteome Center der Universität Tübingen eine Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE durchgeführt. Nach Coomassie-Färbung wurde die zu charakterisierende Bande aus dem Gel extrahiert und entfärbt. Durch Trypsin wurden die Proteine im Gel verdaut und nach Elution mittels nanoHPLC aufgereinigt. Direkt anschließend wurde die Peptidlösung mittels Elektrospray-Ionisation (ESI) in feinste Tröpfchen versprüht, im gekoppelten Massenspektrometer analysiert und die Molekulargewichte der entstandenen Peptide bestimmt. Schon die Molekulargewichte von drei Peptiden charakterisieren das unbekannte Protein fast so eindeutig wie die Aminosäuresequenz. Um das unbekannte Protein zu identifizieren, folgte ein Abgleich der Molekularmassen der

gemessenen Peptide mit einem *in silico*-Verdau von Proteinen in der NCBI-Datenbank unter Verwendung des in Mascot implementierten MOWSE-Algorithmus.

2.6 Tierexperimentelle Methoden

Sämtliche Tierexperimente wurden entsprechend eines vorliegenden und genehmigten Tierversuchsantrags (Tierversuch-Nr. K 2/10, Regierungspräsidium Tübingen) unter der Leitung von PD Dr. Guido Seitz und stellvertretend Prof. Dr. Bernd Pichler im Tierstall der Kinderklinik und im Labor für Präklinische Bildgebung der Universität Tübingen unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Alle Experimentatoren wurden vor den Versuchen über den sachgemäßen Umgang mit Versuchstieren geschult und besaßen die erforderlichen Qualifikationen.

2.6.1 Xenotransplantation

Bei der Xenotransplantation handelt es sich um eine Übertragung vitaler Zellen zwischen verschiedenen Spezies. In der vorliegenden Arbeit wurden humane RMS-Tumorzellen in männliche NOD/LtSz-*scid IL2Rγ^{null}* Mäuse implantiert.

Für die Injektion der Tumorzellen in 4-6 Wochen alte Mäuse wurden 1×10^6 RMS-Zellen, transfiziert mit GLuc und transduziert mit mCherry, trypsiniert (2.2.1.1). Nach Waschen mit PBS, Zentrifugation und Aufnahme in 200 μ l DMEM ohne Zusätze wurde die Zellsuspension intraperitoneal injiziert. Im weiteren Verlauf wurde das Tumorwachstum wöchentlich durch Messung der Plasma-GLuc-Konzentration überwacht und dokumentiert (siehe 2.6.2 und 2.6.3).

2.6.2 Blutentnahme und Plasmagewinnung

Zur retrobulbären Blutentnahme wurden die Mäuse mit einem CO₂/O₂-Gemisch (70 % CO₂, 30 % O₂) oder Isofluran (1,5-2 %) narkotisiert. Nach Erlöschen des Schmerzempfindens wurde eine Hämatokrit-Kapillare im inneren Augenwinkel eingeführt und am Augapfel vorbei durch leichte Rotation der Venenkomplex im Innern der Augenhöhle angestochen. Etwa 50 μ l des aus der Glaskapillare tropfenden Blutes wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit darin befindlichem EDTA-Koagulationskügelchen aufgefangen und durch Schwenken mit dem Gerinnungshemmer gemischt.

Für die Plasmagewinnung wurde das Blut sofort im Anschluss für 3 min bei 3000 x g zentrifugiert, um die zellulären Bestandteile abzutrennen. Das überstehende Plasma wurde abpipettiert und umgehend einer GLuc-Bestimmung unterzogen bzw. bei -20° C eingefroren.

2.6.3 GLuc-Bestimmung im Plasma

Für die Messung des von den transplantierten Tumorzellen ins Plasma sekretierten Enzyms Gaussia Luciferase wurde der Gaussia Glow-Juice verwendet. Die Durchführung erfolgte wie unter 2.2.4 beschrieben, wobei die Enzymaktivität in 5 µl Plasma gemessen wurde.

2.6.4 *In vivo* Bildgebung: Lumineszenz und Fluoreszenz

Zur *in vivo* Bildgebung wurden die Versuchstiere in Transportkäfigen in den Tierstall des Labors für Präklinische Bildgebung der Universität Tübingen überführt. Nach Betäubung durch eine Inhalationsnarkose mit Isofluran wurde den Tieren das Bauchfell mit warmem Wasser und Veet Enthaarungscreme entfernt, um in der anschließenden Messung die durch das weiße Fell verursachten störenden Hintergrundsignale zu reduzieren. Den Mäusen wurde zum Schutz vor Austrocknung Augensalbe aufgetragen. Anschließend wurden sie im Bildgebungsgerät Aequoria unter Isofluranversorgung (1,5 %) auf einer beheizten Unterlage auf dem Rücken positioniert, wobei zunächst die Lumineszenz gemessen wurde. Hierzu wurden 150 µl des GLuc-Substrates Coelenterazin intraperitoneal mit Insulinspritzen injiziert. Zwei Minuten nach Injektion wurde die Lumineszenz für 60 s und anschließend für 120 s aufgezeichnet. Im Anschluss wurde die Fluoreszenz bedingt durch mCherry (Anregung: 560 nm, Emission: 630 nm) für 20 s detektiert. Die Aufnahmen wurden mit der Bildanalysesoftware DigiDoc ausgewertet. Bei der Fluoreszenzmessung wurden die Intensitäten der einzelnen Tumoren bestimmt, bei den Biolumineszenz-Aufnahmen die Intensität des gesamten Bauchraums je Tier ermittelt. Zusätzlich wurde bei den Fluoreszenzaufnahmen die Fläche der einzelnen Tumoren vermessen. Die gewonnenen Daten in Pixel² wurden anhand eines Größenstandards in mm² umgerechnet:

$$\text{Fläche [mm}^2\text{]} = \frac{\text{Fläche [Pixel}^2\text{]}}{4900}$$

Die Korrelation der Intensitäten und Flächen mit anderen Parametern wurde mit der Software GraphPad durchgeführt. Hierzu wurde die nichtlineare Regression als Analyseverfahren herangezogen und die Daten an eine exponentielle Wachstumsfunktion angenähert. Das ausgegebene Bestimmtheitsmaß R^2 gibt an,

inwiefern die Annäherung der Daten an das Modell brauchbar ist. Werte zwischen 0,8 und 1 sprechen für eine starke positive Korrelation.

2.6.5 *In vivo* Bildgebung: PET/MRT

Die Kombination aus Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und Magnetresonanztomographie (MRT) erlaubt neben der Bildmorphologie auch eine Aussage über die Vitalität der untersuchten Tumoren.

Die PET/MRT-Messungen wurden im Labor für Präklinische Bildgebung der Universität Tübingen durchgeführt. Als radioaktiv markierte Tracer wurden Fluordesoxyglucose ($[^{18}\text{F}]\text{FDG}$), Deoxyfluorthymidin ($[^{18}\text{F}]\text{FLT}$) und Cholin ($[^{11}\text{C}]\text{Cholin}$) verwendet. $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ erlaubt die regionale Messung des Glucoseverbrauchs und wird passiv mittels Glucosetransporter aus dem Blut aufgenommen. Nach Phosphorylierung von $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ durch die Hexokinase innerhalb der Zellen ist keine weitere Verstoffwechslung möglich. Die Rückreaktion erfolgt – mit Ausnahme der Leber – in allen Organen und im Tumorgewebe sehr langsam. Eine verstärkte Anreicherung wird im Gehirn, in den Nieren und in den ableitenden Harnwegen beobachtet. Bei soliden Tumoren und Metastasen wird häufig $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ eingesetzt. $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ wird innerhalb der Zelle durch die Thymidinkinase, die in Tumorzellen bis zu 15-fach erhöht exprimiert wird, umgesetzt und akkumuliert. Der Einbau in die DNA ist umstritten. $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ zeigt im normalen Hirngewebe keine Aufnahme und eignet sich für die Beurteilung von Hirn- und Lungentumoren. Cholin ist wichtig für die Herstellung von Phosphatidylcholin, einem essentiellen Bestandteil der Zellmembran. Aufgrund der schnellen Teilung der Tumorzellen ist deren Bedarf an Substraten zur Biosynthese von Zellmembran-Bestandteilen deutlich erhöht, was zu einer verstärkten Aufnahme von $[^{11}\text{C}]\text{Cholin}$ führt. $[^{11}\text{C}]\text{Cholin}$ wird nicht in der Blase akkumuliert und u.a. bei der Diagnostik von Darmtumoren verwendet.

Unter Isofluran-Inhalationsnarkose wurden den Mäusen die radioaktiven Tracer intravenös in die Schwanzvene injiziert. Bei den ^{18}F Radionukliden waren die Tiere während der anschließenden 1-stündigen Aufnahmezeit der Tracer bei Bewusstsein (Halbwertszeit 110 min) und wurden für die PET- und MRT-Messung erneut anästhesiert und auf dem Tierbett positioniert. Die Halbwertszeit von ^{11}C beträgt 20 min und die PET-Messung konnte bereits 5 min nach Injektion gestartet werden. Es erfolgte eine statische PET-Aufnahme für 10 min, daraufhin wurden die

Mäuse im Tierbett in den MRT-Scanner überführt und gemessen. Letztlich wurden die PET- und MRT-Aufnahmen überlagert und ausgewertet. Die Tumorumfänge wurden anhand der MRT-Bilder mit der Inveon Research Software vermessen. Die mittels PET gemessenen Zählraten wurden mit dem gerätespezifischen Kalibrierfaktor und der Messdauer verrechnet, um die lokalen Aktivitätskonzentrationen [Bq/mm³] zu ermitteln. Diese sind abhängig von der [¹⁸F]FDG-Konzentration an der jeweiligen Position, von der insgesamt applizierten Aktivität und vom Körpergewicht der Tiere. All diese Faktoren fließen in den sogenannten standardisierten Aufnahmewert (SUV, *standardized uptake value*) ein. Hierbei handelt es sich um eine dimensionslose Zahl, die einen vorsichtigen Vergleich verschiedener Messungen ermöglicht.

$$\text{SUV} = \frac{\text{Aktivitätskonzentration [Bq/mm}^3\text{]} \times \text{Körpergewicht [g]}}{\text{injizierte Aktivität [Bq]}}$$

2.6.6 Tötung und Tumorexplantation

Nach Messung in PET- und MRT-Scanner wurden die Versuchstiere durch CO₂ und Genickbruch getötet und die Bauchdecke geöffnet. Nach Entfernung der Organe aus der Bauchhöhle wurden diese getrennt auf ihre Fluoreszenzintensität untersucht (siehe 2.6.4) und alle detektierten Tumoren sowie die mit PBS gespülten Därme anschließend für histologische Untersuchungen in 3,7%iger Formaldehydlösung asserviert (2.3.1.1).

3. Ergebnisse

3.1 Evaluierung von Cetuximab bei RMS

3.1.1 Zielstrukturen bei RMS für eine Antikörpertherapie

Eine Mikroarray-Genexpressionsanalyse in 7 ARMS und 5 ERMS Gewebeproben ergab 534 Gene, deren Expression sich bei einem direkten Vergleich der beiden RMS-Untertypen signifikant unterschied ($p\text{-Wert} \leq 0,005$ und $fold\ change \geq |2|$). Hiervon waren 211 Gene in ARMS-Proben verglichen mit ERMS hochreguliert, 323 Gene herunterreguliert. Die Gesamtliste der differenziell regulierten Gene wird im Anhang zur Verfügung gestellt.

Die differenziell regulierten Transkripte wurden mittels Ingenuity Pathways Analysis in kanonische Netzwerke eingeordnet. Hierbei wurde die Signifikanz der Assoziation des jeweiligen Transkripts mit dem kanonischen Signalweg durch den exakten Fisher-Test bestimmt. Der errechnete p-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass die Assoziation zwischen den Genen des Datensatzes und dem kanonischen Signalweg nur zufällig geschieht. Das wahrscheinlichste Netzwerk aus den zwischen ARMS und ERMS differenziell exprimierten Transkripten ist in Abbildung 8 dargestellt. Es enthält 35 Gene des Datensatzes, wobei der zentrale Hauptmediator des Netzwerks der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) ist. Die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PIK3R3), die mitogenaktivierte Proteinkinase (MAP2K4) und Cullin 1 (CUL1) sind dem direkten oder indirekten Einfluss von EGFR unterworfen und spielen eine Rolle beim Ablauf des Zellzyklus.

Ein hohes Expressionsniveau der EGFR-Transkripte wurde sowohl in ARMS als auch in ERMS-Geweben festgestellt. Die logarithmische durchschnittliche Signalintensität beträgt 5,422 bzw. 7,450, bei einer 3,9-fach höheren Expression in ERMS (Abbildung 9). Da diese Ergebnisse eine zentrale Bedeutung von EGFR bei der Entstehung von ERMS-Tumoren vermuten ließen, wurde im Folgenden die Expression von EGFR auf ARMS- (Rh30) und ERMS-Zelllinien (RD, A-204) durchflusszytometrisch untersucht.

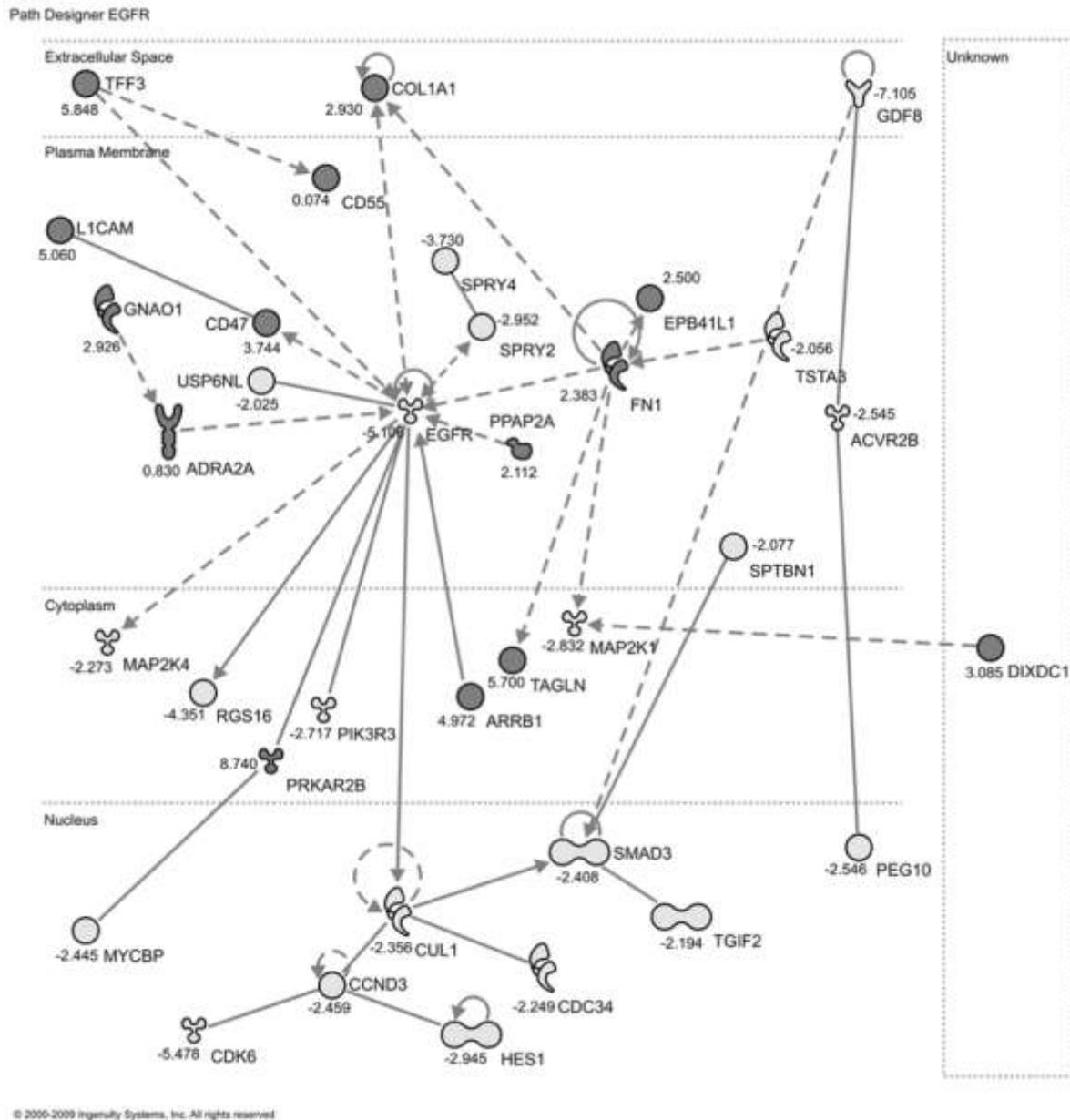


Abbildung 8: Netzwerkanalyse differenziell exprimierter Gene in ARMS und ERMS. Die Zahlen geben den *fold change* an, wobei (+) für eine Hochregulation und (-) für eine Herunterregulation in ARMS verglichen mit ERMS-Gewebe steht. Die dargestellten Formen geben die funktionelle Klasse des Genprodukts wieder. Bemerkenswert ist die zentrale Rolle von EGFR.

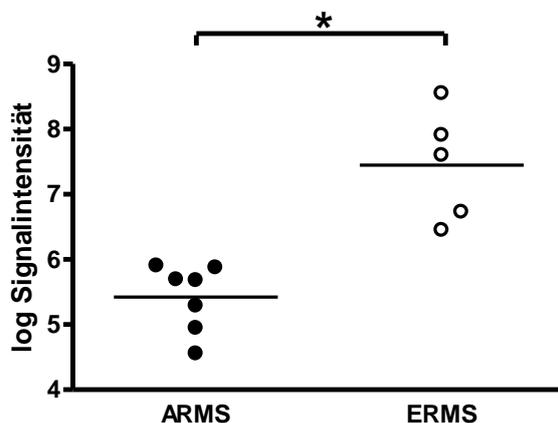


Abbildung 9: Genexpressionsanalyse von EGFR in RMS-Gewebe. Dargestellt sind die relativen Signalintensitäten des EGFR-Probensatzes je Gewebeprobe. Die Gruppe der ARMS (gefüllte Kreise) wurde mit der Gruppe der ERMS (leere Kreise) in einem ungepaarten t-Test verglichen und beide unterscheiden sich signifikant (p-Wert = 0,0004).

Eine hohe Oberflächenexpression von EGFR konnte auf Rh30- und RD-Zellen mit dem humanisierten Antikörper Cetuximab nachgewiesen werden (Abbildung 10). Keine Expression wurde auf embryonalen A-204-Zellen detektiert.

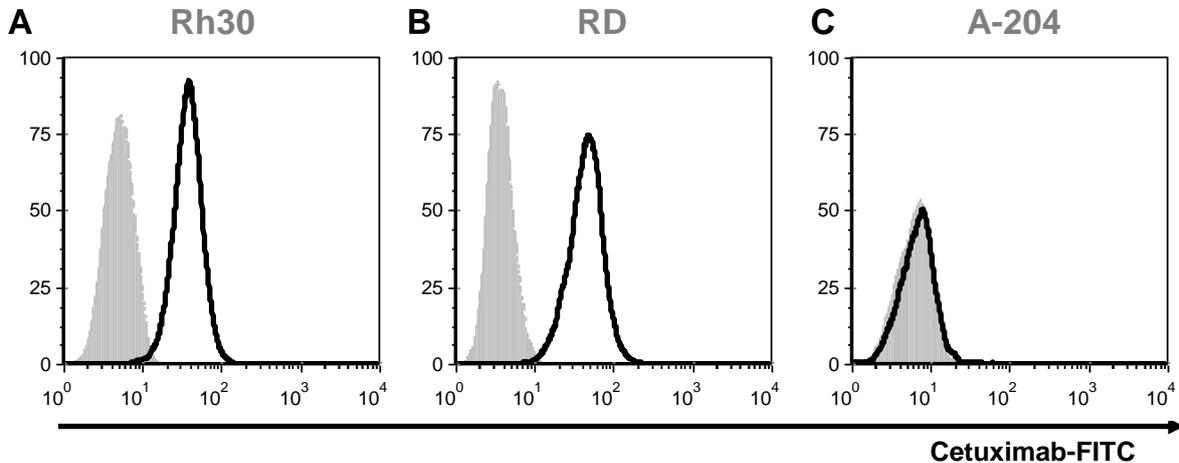


Abbildung 10: Expression von EGFR auf RMS-Zelllinien. Eine hohe Expression von EGFR konnte auf RD- und Rh30-Zellen durchflusszytometrisch nachgewiesen werden (schwarze Linien). Gleichzeitig ist die Kontrollfluoreszenz des Sekundärantikörpers dargestellt (graue Fläche).

3.1.2 Aktivierung von EGFR durch EGF und Cetuximab

Der Einfluss von Cetuximab auf die Vitalität der RMS-Zellen wurde durch MTT-Tests untersucht. Nachdem die RMS Zelllinien Rh30, RD und A-204 mit steigenden Konzentrationen von Cetuximab (1 – 100 µg/ml) für 48 Stunden kultiviert worden waren, lag die gemessene Zellvitalität zwischen 70 % und 104 % (Abbildung 11A). Es konnte kein signifikanter Einfluss von Cetuximab auf die Vitalität der RMS-Zellen nachgewiesen werden.

Serumfreies Medium wurde eingesetzt, um im nächsten Schritt den alleinigen Einfluss von EGF auf das Zellwachstum zu evaluieren. Die Vitalität der RMS-Zellen wurde durch 10 ng/ml EGF in Quantum 263 Medium verglichen zu Kontrollkulturen nicht signifikant beeinflusst (Abbildung 11A). Als dem gleichen Medium neben der Zugabe von EGF zusätzlich 1 µg/ml Cetuximab zugefügt wurden, nahm die Vitalität der Rh30-Zellen ab. Da Quantum 263 Hefeextrakt und einige Wachstumsfaktoren enthält, die vom Hersteller nicht bekannt gegeben werden, wurden die Versuche in DMEM ohne FCS wiederholt. Weder EGF noch Cetuximab beeinflussten die Vitalität der Rh30-, RD- und A-204-Zellen (Abbildung 11B). Allerdings hat das fehlende Serum die Vitalität der Rh30 Zellen um 30-40 % reduziert. Die Vitalität der RD- und A-204-Zellen ging verglichen mit Kulturen, denen 10 % FCS zugesetzt wurde, um

etwa 80 % und 60 % zurück. Die Zugabe des rekombinanten EGF konnte das fehlende Serum nicht kompensieren.

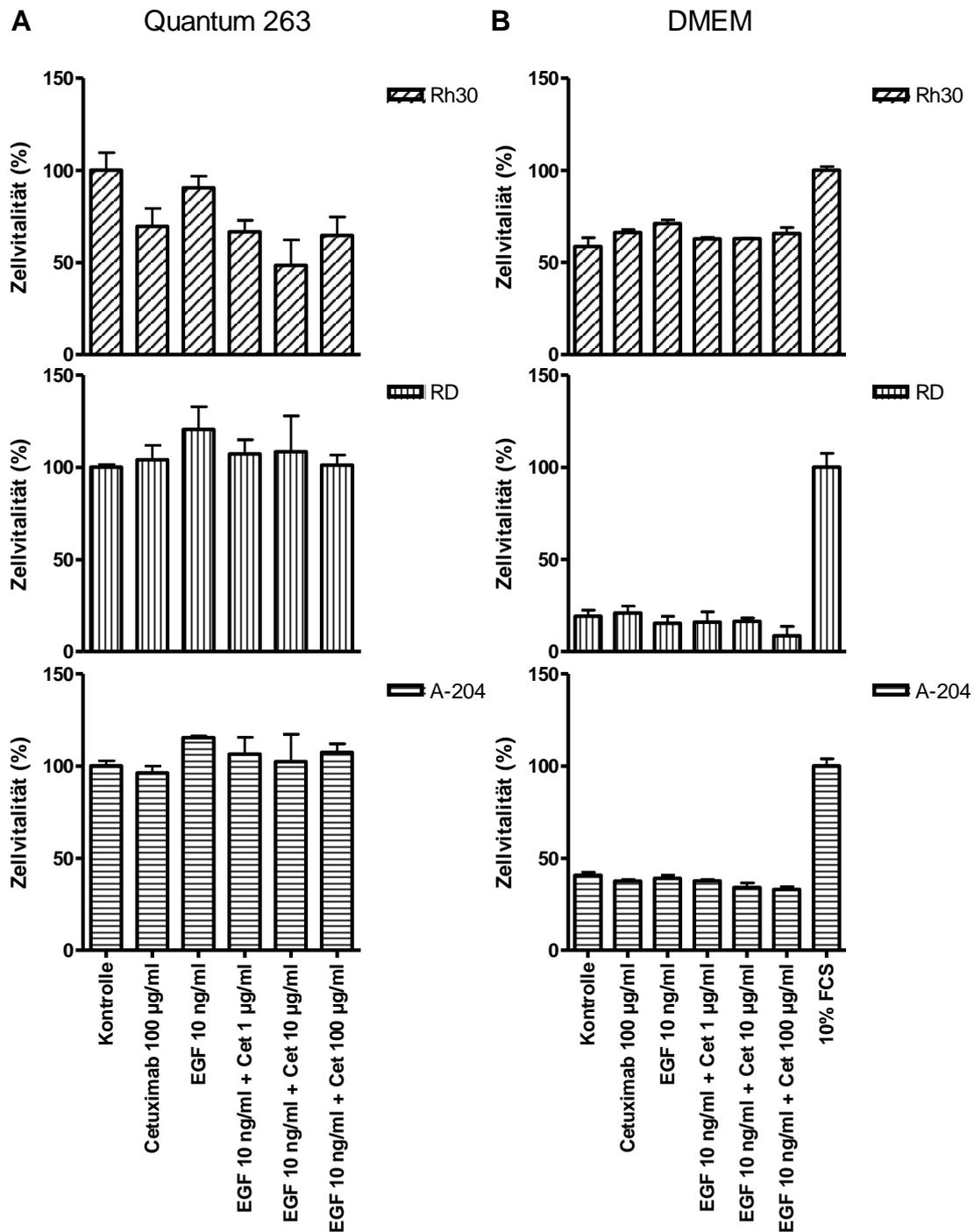


Abbildung 11: Einfluss von Cetuximab auf die Vitalität von RMS-Zellen. Rh30-, RD- und A-204-Zellen wurden in Quantum 263 Medium (A) oder in serumfreiem DMEM (B) kultiviert. Wie angegeben wurden 10 ng/ml EGF und steigende Konzentrationen von Cetuximab (Cet) zugegeben. Die Zellvitalität wurde nach 48 h mit dem EZ4U-Assay bestimmt. Ansätze ohne Antikörper wurden auf 100 % Vitalität gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Dreifachbestimmungen.

3.1.3 Cetuximab-vermittelte Zytotoxizität gegen RMS-Zellen

Therapeutische Antikörper können neben einer spezifischen Blockade des EGF-Rezeptors auch eine antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität induzieren. Humane PBMCs gesunder Spender wurden als Quelle zytotoxischer Zellen herangezogen. Diese wurden mit RMS-Zellen in unterschiedlichen Effektor-Zielzellen-Verhältnissen zwischen 5:1 und 40:1 in einem Zytotoxizitätstest eingesetzt (Abbildung 12). Bei einem Verhältnis von 20:1 wurden bis zu 20 % der Tumorzellen lysiert. Eine weitere Steigerung des Effektor-Zielzellen-Verhältnisses konnte die Lyse der RD- und A-204-Zellen nicht erhöhen.

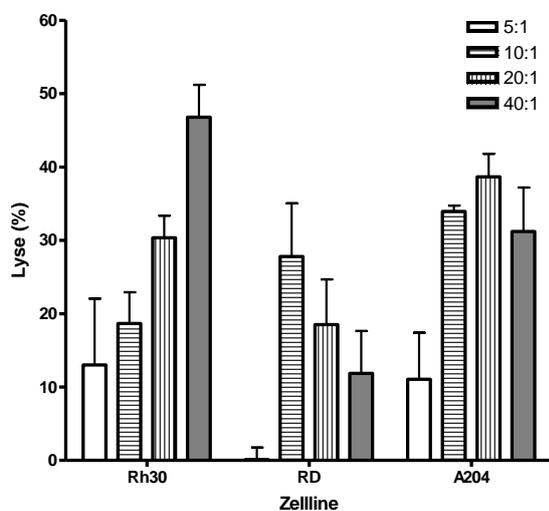


Abbildung 12: Einfluss von PBMCs auf die Vitalität von RMS-Zellen. Rh30-, RD- und A-204-Zellen wurden mit PBMCs in unterschiedlichen Effektor-Zielzellen-Verhältnissen inkubiert. Die Zelllyse wurde mittels Zytotoxizitätstest quantifiziert, dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Dreifachbestimmungen.

Aus diesem Grund wurde ein Verhältnis von 20:1 für die anschließenden antikörpervermittelten Zytotoxizitätstests gewählt. Die beobachtete Zelllyse von RD- und Rh30-Zellen war abhängig von der eingesetzten Cetuximab-Konzentration und dem PBMC-Spender (Abbildung 13). Die PBMC-Zellen beider Spender waren in der Lage, die RD-Zellen zu lysieren. Durch die Zugabe von Cetuximab konnte die spezifische Lyse 3- bis 4-fach gesteigert werden. Die PBMCs von Spender 1 lysierten einen großen Anteil der Rh30-Zellen (50 %), dies konnte durch Cetuximab bis zur Sättigung gesteigert werden. Die spezifische Lyse der Rh30-Zellen durch die PBMCs von Spender 2 lag unter 10 %. Allerdings konnte bereits durch die Anwesenheit von 0,05 µg/ml Cetuximab eine Lyse von über 80 % der Tumorzellen erzielt werden. Von den A-204-Zellen, die EGFR nicht exprimieren, wurde ein deutlicher Anteil lysiert (30-40 %). Die Vorinkubation mit dem therapeutischen Antikörper führte jedoch nicht zu einer Steigerung der gemessenen Tumorzelllyse. Diese Ergebnisse wurden durch eine Zweiweg-Varianzanalyse (ANOVA) statistisch

untermauert. Ein Vergleich zwischen unbehandelten Kontrollkulturen und den einzelnen Cetuximab-Konzentrationen lieferte signifikante Unterschiede im Falle der RD- und Rh30-Zellen. Für die A-204-Zellen konnte keine signifikante Lyse durch die Zugabe von Cetuximab nachgewiesen werden.

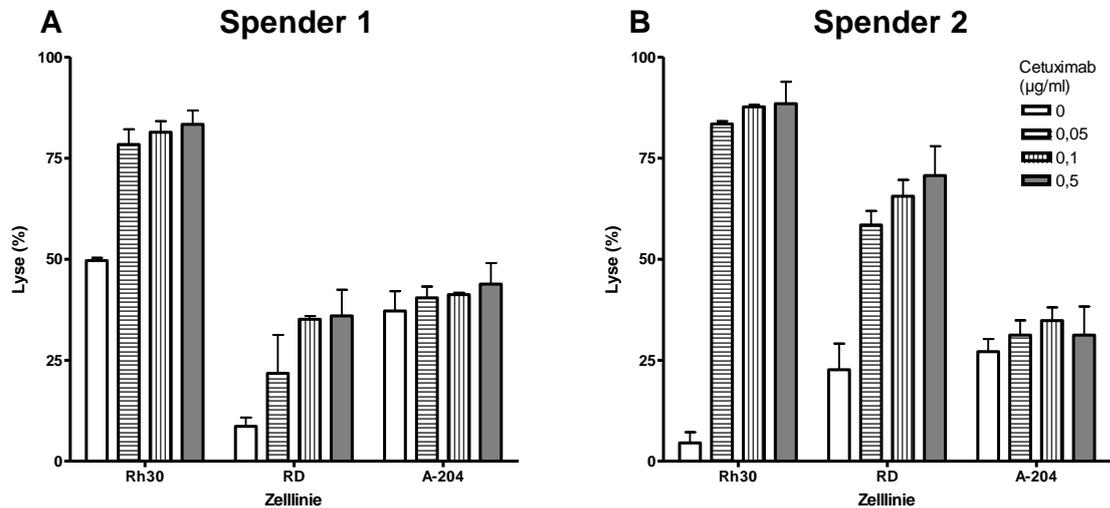


Abbildung 13: Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität von Cetuximab gegenüber RMS-Zellen. Die RMS-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen von Cetuximab inkubiert und PBMCs zweier gesunder Spender (A, B) in einem im Vorfeld festgelegten optimalen Effektor-Zielzellen-Verhältnis von 20:1 zugegeben. Die Zellyse wurde mittels Zytotoxizitätstest quantifiziert, dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Dreifachbestimmungen.

3.2 Etablierung eines monoklonalen Antikörpers

3.2.1 Charakterisierung monoklonaler Antikörper

Durch Immunisierung von Mäusen mit Gewebeproben aus kindlichen Tumoren wurde von Herrn Dr. Bühring (Abteilung Innere Medizin II, Universitätsklinikum Tübingen) eine Antikörperbank hergestellt. Die Bindungseigenschaften einiger dieser Antikörper gegenüber RMS-Zellen wurden durchflusszytometrisch charakterisiert (Tabelle 5).

Tabelle 5: Phänotypisierung von RMS-Zellen. Die Bindungseigenschaften ausgewählter Antikörperklone wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt, wobei „+++“ für eine starke Bindung des Antikörpers an die jeweilige RMS-Zelllinie steht, „-“ bedeutet keine Bindung auf der Zelloberfläche. Wurde die Bindung bei einer Subpopulation der Zellen beobachtet, ist dies als „(+“ gekennzeichnet.

Antikörper	Antigen	RD	Rh30	A-204	Antikörper	Antigen	RD	Rh30	A-204
28D4C10	CD140b	(+)	++	(+)	9C4C3	CD326	-	(+)	-
W3C3		-	-	-		CD24	-	-	-
97C5A6	CD10	(+)	++	+		CD44	+++	+++	+++
W1C3		+	++	+		CD90	+++	++	++
W4A5		(+)	(+)	(+)	E4B4		-	-	(+)
43A1A9	CD34	-	-	-	1G2C1	CD105	+++	++	++
C4B2	CD318	-	-	-	7C5G1		-	-	-
HEK3D6C9		-	+	(+)	A3G2		-	-	-
W6D3A12	CD15	-	-	-	24D2	CD340	+	+	(+)
W5C5A8		-	-	-	4FR6D3	CD334	-	+	+
W5C4		+	(+)	++	58B1A2		+++	+++	+++
W3D5A9		-	-	-	104D2	CD117	-	-	(+)
W3C4E11	CD349	-	-	-	CH3A4	CD344	++	++	++
W8B2B10	TNAP	(+)	-	-	CUB2	CD318	-	-	-
W7C5A8	CD109	-	-	-	HEK-3D3		++	++	++
W3D2B10		-	-	-	HEK-6D6		(+)	(+)	(+)
67A4	CD324	-	-	-	HEK9-3C2		++	++	++
W8C3B3		-	+	+	W1D6		-	-	-
W7C6F10	LAR-PTP	+	++	++	W4A5		(+)	(+)	(+)
67D2	CD164	+	+	(+)	W5D3		++	++	++
39D5	CD56	++	+++	++	W6B3C1	CD133	-	-	-

Eine besonders starke Bindung an alle drei RMS-Zelllinien wurde bei CD44 und dem unbekanntem Antikörper 58B1A2 beobachtet. Aus diesem Grund sind die entsprechenden Histogramme in Abbildung 14 detailliert dargestellt.

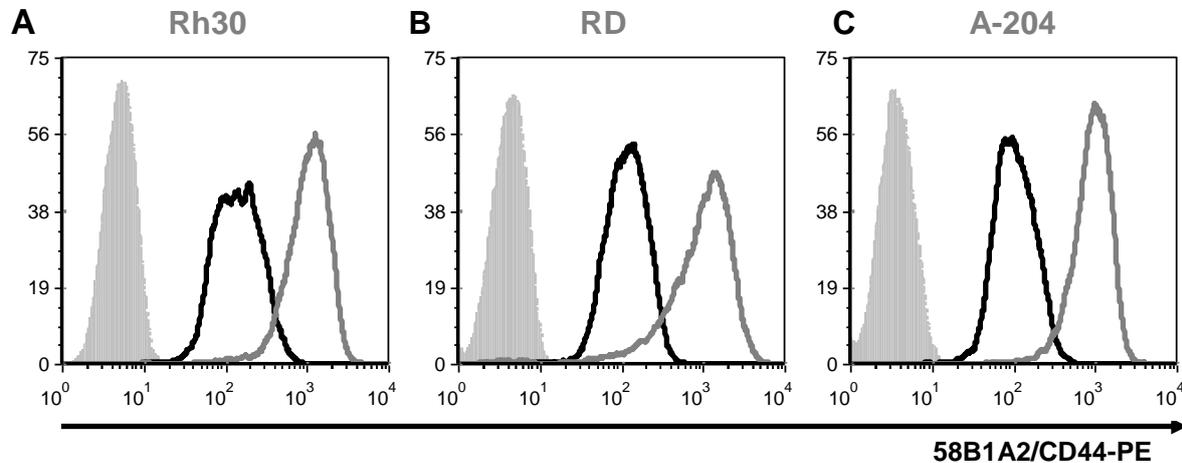


Abbildung 14: Expression von 58B1A2-Antigen und CD44 auf RMS-Zelllinien. Eine starke Bindung sowohl des 58B1A2-Antikörpers (schwarze Linien) als auch des CD44-Antikörpers (dunkelgraue Linien) an RMS-Zellen konnte durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Gleichzeitig ist die Kontrollfluoreszenz des Sekundärantikörpers dargestellt (graue Fläche).

CD44 wird ubiquitär exprimiert und zahlreiche Tumoren, darunter auch RMS, wurden bereits auf Zusammenhänge zwischen der CD44-Expression und der Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten untersucht (93). Weitere Studien beschäftigten sich mit der Rolle von CD44 bei der Tumorprogression (94). Aus diesem Grund konzentrierten wir uns im Folgenden auf den unbekanntem 58B1A2-Antikörper.

3.2.2 Expression des 58B1A2-Antigens in RMS

Aufbauend auf den Ergebnissen der Durchflusszytometrie wurde die Expression des 58B1A2-Antigens in RMS-Geweben und -Zellen näher charakterisiert. Auch immunhistochemisch konnte eine starke Bindung des 58B1A2-Antikörpers, unabhängig vom histologischen Subtyp, festgestellt werden (Abbildung 15). Eine Bindung von 58B1A2 auf Normalgewebe, wie z.B. Lebergewebe, wurde nicht beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Immunzytochemisch wurde insbesondere an den Zell-zu-Zell-Kontakten eine deutliche Fluoreszenzfärbung infolge der Antikörpermarkierung nachgewiesen. Ein Unterschied zwischen ARMS und ERMS konnte nicht festgestellt werden, es ist beispielhaft die Färbung der alveolären Rh30-Zellen in Abbildung 16 dargestellt.

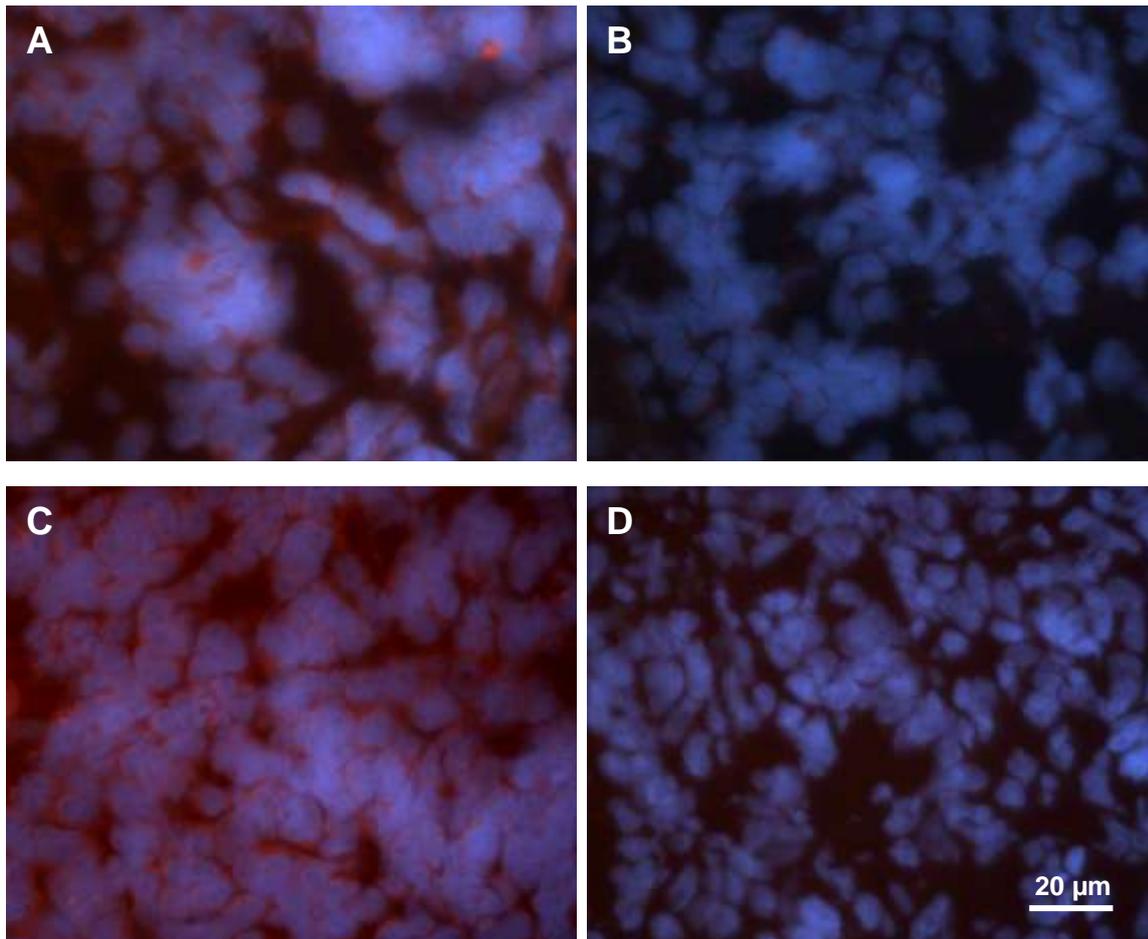


Abbildung 15: Expression des 58B1A2-Antigens in RMS-Gewebeproben. Immunhistochemische Analyse von (A) ARMS (RMS_18) und (C) ERMS (RMS_25) Patientenmaterial mit dem 58B1A2-Antikörper, detektiert mit einem rot-fluoreszierenden Sekundäntikörper. Die DNA wurde durch Hoechst 33342 blau angefärbt, Kontrollfärbungen ohne 58B1A2-Antikörper sind in (B) und (D) dargestellt.

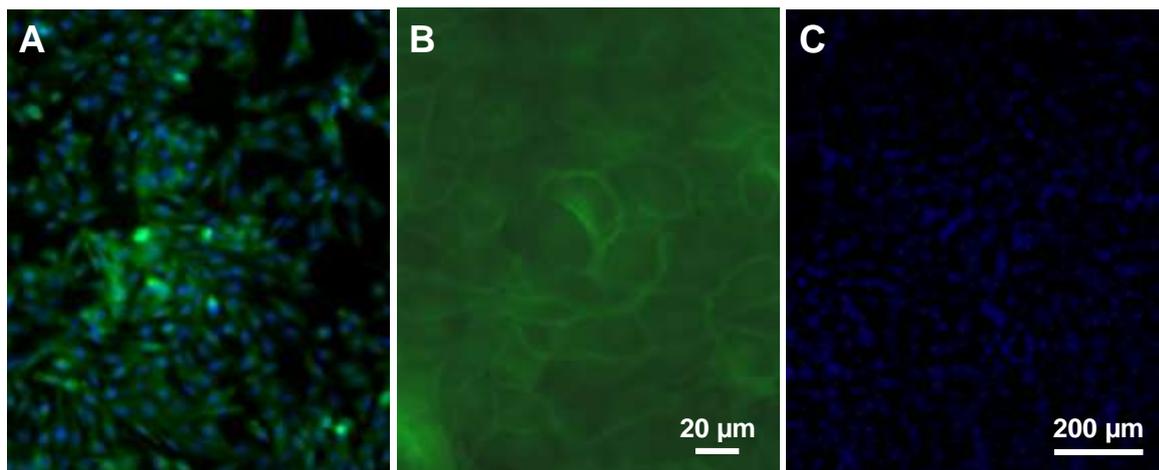


Abbildung 16: Expression des 58B1A2-Antigens in RMS-Zellen. Immunzytochemische Analyse von Rh30-Zellen mit dem 58B1A2-Antikörper, detektiert mit einem grün-fluoreszierenden Sekundäntikörper. Die DNA wurde mit Hoechst 33342 blau angefärbt. Dargestellt sind 10-fache (A) und 40-fache (B) Vergrößerung sowie die Kontrollfärbung ohne Primäntikörper (C).

3.2.3 58B1A2-vermittelte Zytotoxizität gegen RMS-Zellen

Um die antikörpervermittelte Zytotoxizität von 58B1A2 gegenüber RMS-Zellen zu untersuchen, wurde zunächst der Einfluss des Antikörpers auf die Vitalität der RMS-Zellen durch MTT-Tests analysiert. Die gemessene Zellvitalität lag zwischen 68 % und 85 % (Abbildung 17). Es konnte kein signifikanter Einfluss des 58B1A2-Antikörpers auf die Vitalität der RMS-Zellen nachgewiesen werden (Zweiweg-Varianzanalyse, $p < 0,001$).

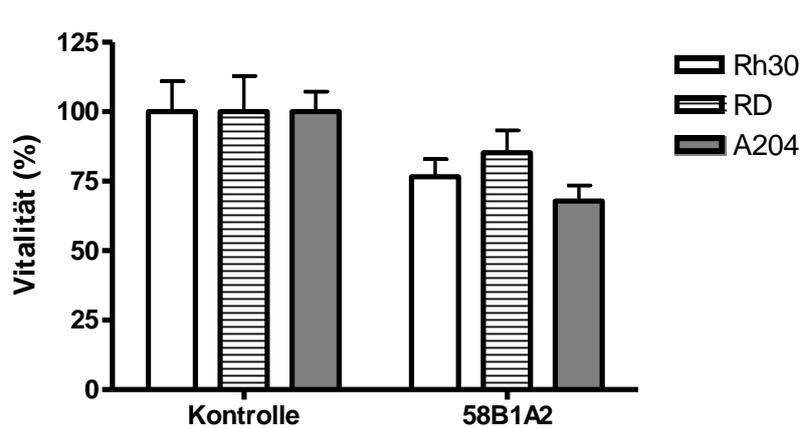


Abbildung 17: Einfluss des 58B1A2-Antikörpers auf die Vitalität von RMS-Zellen. Rh30-, RD- und A-204-Zellen wurden mit 0,1 µg/ml 58B1A2 inkubiert. Die Zellvitalität wurde nach 48 h mittels MTT-Test bestimmt. Ansätze ohne Antikörper wurden auf 100 % Vitalität gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Dreifachbestimmungen.

Für die antikörpervermittelten Zytotoxizitätstests wurde das bereits unter Abschnitt 3.1.3 ermittelte optimale Effektor-Zielzellen-Verhältnis von 20:1 verwendet. Die unspezifische Zellyse, hervorgerufen durch die Kokultur von PBMCs und RMS-Zellen, lag bei Rh30 bei 2 % und bei RD bei 3 % (Abbildung 18). Diese schwache Zytotoxizität wurde durch Zugabe des 58B1A2-Antikörpers (0,05-10 µg/ml) nicht beeinflusst.

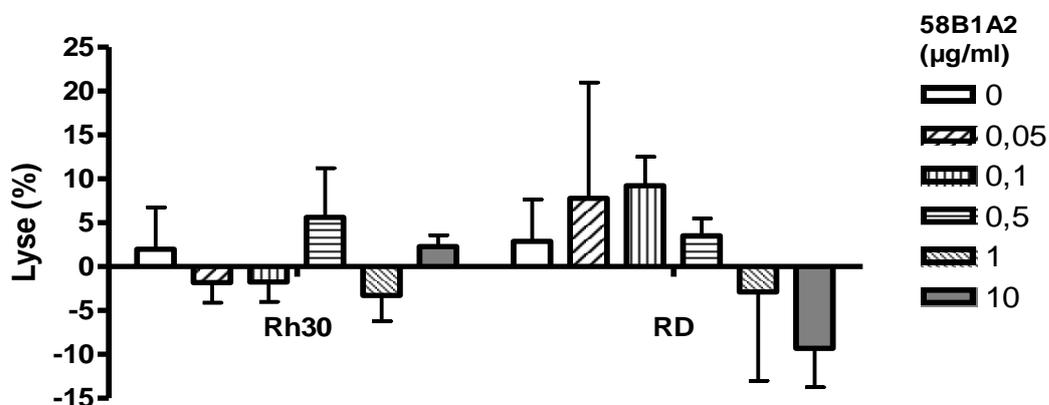


Abbildung 18: Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität des 58B1A2-Antikörpers gegenüber RMS-Zellen. Rh30 und RD wurden mit steigenden Antikörper-Konzentrationen inkubiert und PBMCs eines gesunden Spenders in einem Effektor-Zielzellen-Verhältnis von 20:1 zugegeben. Die Zellyse wurde mittels Zytotoxizitätstest quantifiziert, dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Dreifachbestimmungen.

3.2.4 Charakterisierung des unbekanntes Antigens

Da keine 58B1A2-vermittelte Zytotoxizität gegenüber RMS-Zellen festgestellt wurde, sollte das unbekannte Antigen näher charakterisiert werden. In Western Blots mit Proteinlysaten aus Rh30- und RD-Zellen konnten mit dem 58B1A2-Antikörper keinerlei Banden detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde das unbekannte Protein durch Immunpräzipitation gefällt, elektrophoretisch aufgetrennt und nach Silberfärbung zeigte sich eine unbekannte Bande bei 60-70 kDa (Abbildung 19). Des Weiteren waren die Antikörperbanden der verwendeten Antikörper bei ca. 25 und 50 kDa sichtbar. Eine LC/MS-Analyse der unbekanntes Bande bei 60-70 kDa ergab sowohl für Rh30 als auch für RD jeweils die höchste Sequenzabdeckung mit dem Protein Vimentin (vollständige Tabelle im Anhang). Hierbei handelt es sich um ein intrazelluläres Protein, das für den Aufbau der Lamina innerhalb der Zellkernhülle verantwortlich ist. Entsprechend der gewonnenen Ergebnisse aus Durchflusszytometrie (3.2.1) und Immunhistochemie (3.2.2) muss es sich beim 58B1A2-Antigen allerdings um ein extrazelluläres Protein handeln.

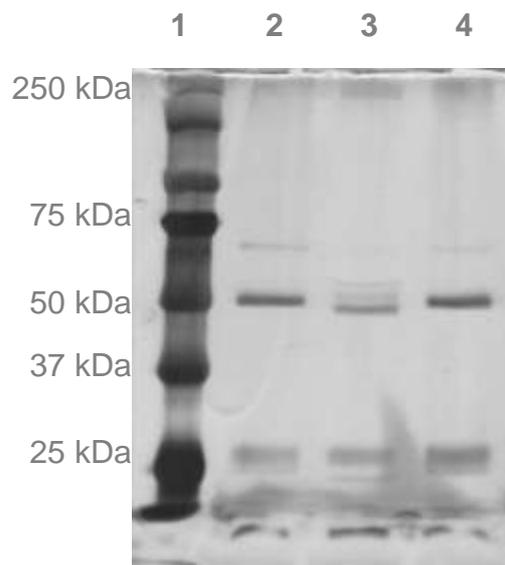


Abbildung 19: Silberfärbung nach Immunpräzipitation mit dem 58B1A2-Antikörper. RMS-Zelllysate von Rh30 (Spur 2) und RD (4) zeigten im Unterschied zur Negativkontrolle ohne Primärantikörper (3) eine schwache Bande bei 60-70 kDa. Die Antikörper-Banden sind bei ca. 25 und 50 kDa deutlich zu erkennen. In Spur 1 wurde der gefärbte Proteinstandard geladen.

Bei der Wiederholung der Versuche wurden zwei Änderungen vorgenommen. Bisher wurde mit dem Antikörper-Überstand von Hybridomazellen gearbeitet, nun wurde freundlicherweise von Dr. Bühring ein aufgereinigter 58B1A2-Antikörper zur Verfügung gestellt. Außerdem wurde eine chemische Vernetzung (*Crosslinking*) vorgenommen, um die Bindung von Antikörper und Antigen zu festigen. Mit dem gereinigten 58B1A2-Antikörper konnten im Western Blot wiederum keine Proteinbanden detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Nach Immunpräzipitation war die Vimentin-Bande nicht mehr sichtbar (Abbildung 20). Stattdessen wurden in den

vernetzten Ansätzen zwei unbekannte Banden beobachtet, eine bei ca. 250 kDa und die andere bei ca. 45 kDa. Beide wurden massenspektrometrisch analysiert und es ergab sich für die 250 kDa Bande die höchste Sequenzabdeckung mit dem Protein Myosin (Tabelle im Anhang). Die 45 kDa-Bande schien am ehesten dem Protein Aktin zu entsprechen. Erneut handelt es sich bei den detektierten Proteinen um zwei intrazelluläre Proteine, in diesem Fall aus dem Zytoskelett.

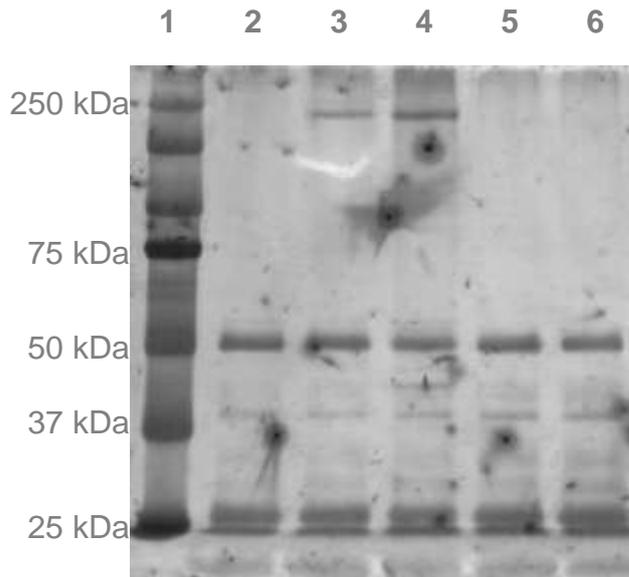


Abbildung 20: Silberfärbung nach quervernetzter Immunpräzipitation mit dem gereinigten 58B1A2-Antikörper. Gebundene Proteine aus Rh30-Zelllysaten wurden mit BS3 (Spur 3), DTSP (4) bzw. Glutardialdehyd (6) chemisch mit dem Antikörper vernetzt. Bei Ansatz 5 wurden die extrazellulären Antigene bereits vor Inkubation mit dem 58B1A2-Antikörper durch Glutardialdehyd fixiert. Als Kontrolle wurde bei Ansatz 2 kein *Crosslinking* vorgenommen, der Proteinstandard wurde in Spur 1 geladen. Deutliche Banden bei 45 kDa sind in allen Spuren zu erkennen. Nach BS3 und DTSP-Behandlung sind zusätzlich Banden bei ca. 250 kDa sichtbar.

Die bisherigen Ergebnisse ließen darauf schließen, dass es sich bei dem gesuchten 58B1A2-Epitop nicht um ein Peptid handelt. Folglich könnte eine Zuckerkette für die Bindung des 58B1A2-Antikörpers verantwortlich sein. Um diese Frage zu klären, wurde eine Periodat-Lösung eingesetzt. Periodat führt durch eine Oxidation der Glykoproteine zu einer chemischen Inaktivierung der terminalen Zuckerketten. Nach derartiger Vorbehandlung sollte die Bindung des 58B1A2-Antikörpers zurückgehen, da dessen Antigenstrukturen modifiziert wurden. Mittels Immunzytochemie konnte jedoch kein Rückgang der Bindung von 58B1A2 an RMS-Zellen nach Periodat-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

3.3 Phagozytose bei RMS

3.3.1 Expression von CD47 und Calreticulin in RMS

Die Interaktion von Calreticulin mit LRP (*low-density lipoprotein-related protein*) führt zu einer Aktivierung von Makrophagen. Andererseits ist CD47 der Ligand des inhibitorischen Makrophagenrezeptors SIRP α (*signal-regulatory protein alpha*). Um die funktionelle Bedeutung von CD47 und Calreticulin in RMS zu evaluieren, wurde die Expression dieser Proteine mittels Mikroarray-Analyse in Gewebeproben untersucht. Eine hohe Expression von CD47 wurde in 11 RMS-Proben nachgewiesen (Abbildung 21), wobei eine 1,2-fach signifikant höhere Expression in ARMS verglichen mit ERMS Geweben festgestellt wurde (p-Wert 0,02; Student-t-Verteilung). Ebenfalls hohe Expressionswerte ergaben sich für Calreticulin, allerdings unabhängig vom histologischen Subtyp (Median 0,7).

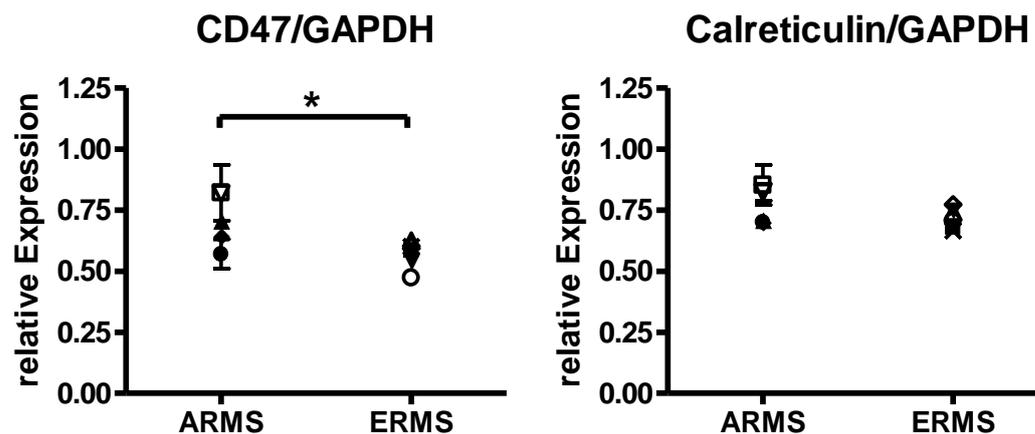


Abbildung 21: Expression von CD47 und Calreticulin in RMS-Gewebeproben. Dargestellt sind die Expressionswerte von CD47 relativ zu GAPDH je Gewebeprobe, die mittels Mikroarray analysiert wurden. Jeder Wert steht für den Mittelwert mit Standardabweichung aus zwei Probensätzen (*Student-t-Verteilung, p-Wert < 0,05).

Dementsprechend wurden auch hohe Expressionslevel von CD47 und Calreticulin mittels Immunhistochemie detektiert (Abbildung 22). Auf RMS-Zelllinien wurde anhand einer durchflusszytometrischen Untersuchung ebenfalls eine hohe extrazelluläre Expression von CD47 auf Rh30 und RD gemessen (Abbildung 23). Calreticulin hingegen konnte nicht auf der Zellmembran detektiert werden.

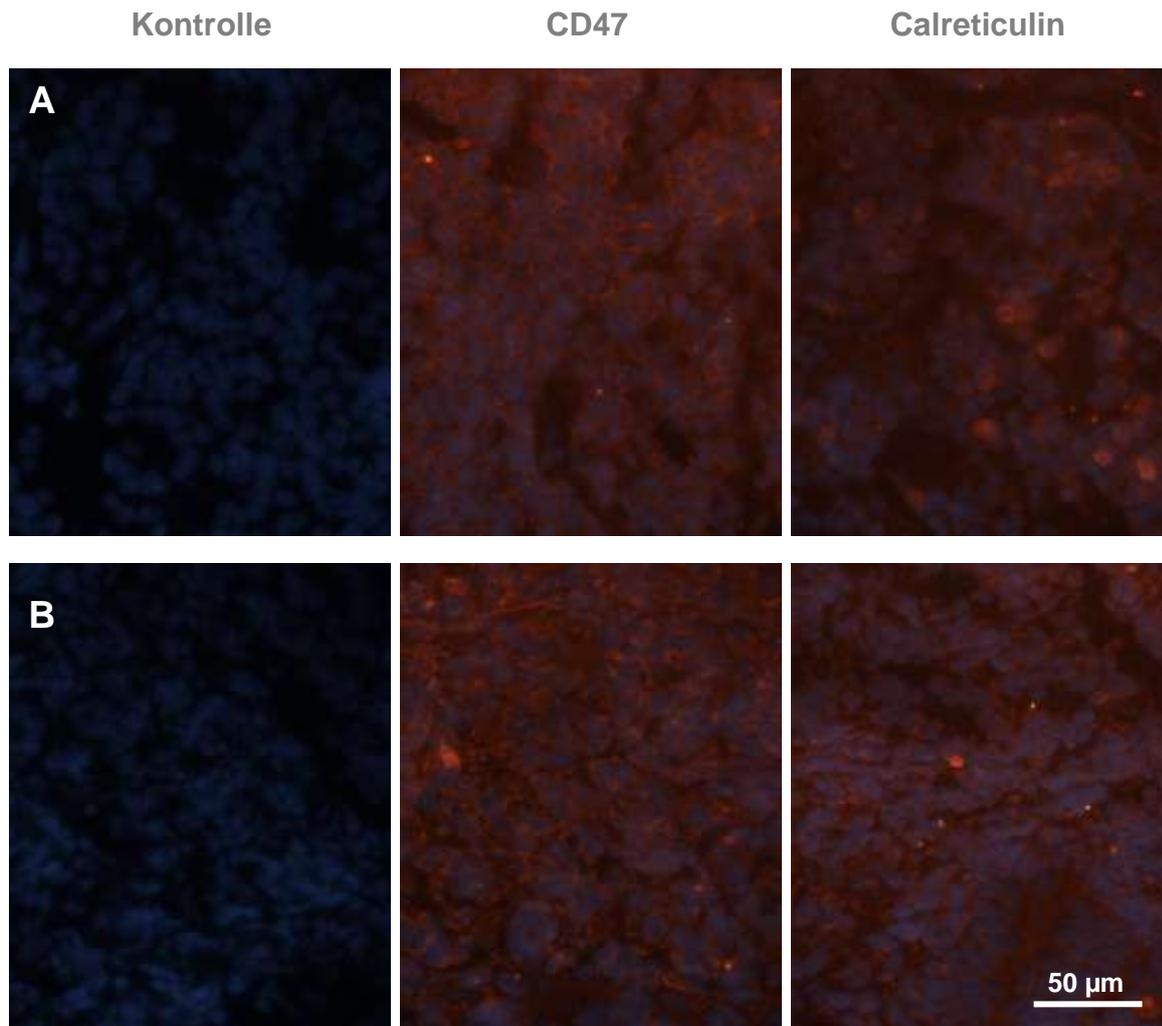


Abbildung 22: Immunhistochemische Analyse von ARMS (A) und ERMS-Gewebeproben (B) mit Antikörpern gegen CD47 und Calreticulin, gefolgt von einem rot-fluoreszierenden Sekundärantikörper. Die DNA wurde durch Hoechst 33342 blau angefärbt. Die Kontrollansätze wurden nicht mit den primären Antikörpern inkubiert.

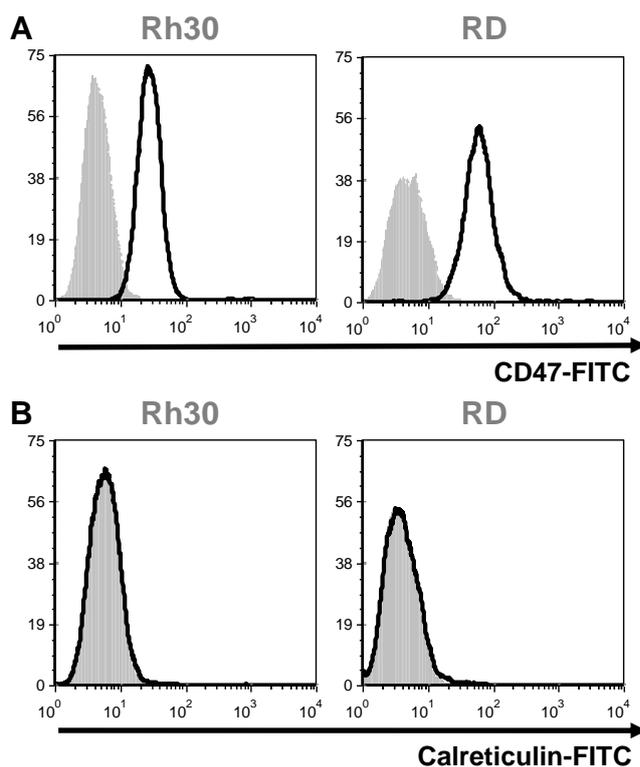


Abbildung 23: Expression von CD47 und Calreticulin in RMS-Zelllinien. (A) Eine hohe Expression von CD47 (schwarze Linien) wurde sowohl auf RD- als auch auf Rh30-Zellen durchflusszytometrisch detektiert. (B) Keine extrazelluläre Expression von Calreticulin konnte nachgewiesen werden. Die Kontrollfluoreszenz des Sekundärantikörpers ist jeweils als graues Histogramm dargestellt.

Mittels einer intrazellulären durchflusszytometrischen Analyse wurde jedoch eine schwache Expression von Calreticulin sowohl in Rh30- als auch in RD-Zellen nachgewiesen (Abbildung 24). In beiden Zelllinien wurde die zytoplasmatische Lokalisation von Calreticulin immunzytochemisch bestätigt. Im Gegensatz zur Messung mittels Durchflusszytometrie wurde eine hohe Expression von Calreticulin passend zu den vorherigen Mikroarray-Ergebnissen beobachtet.

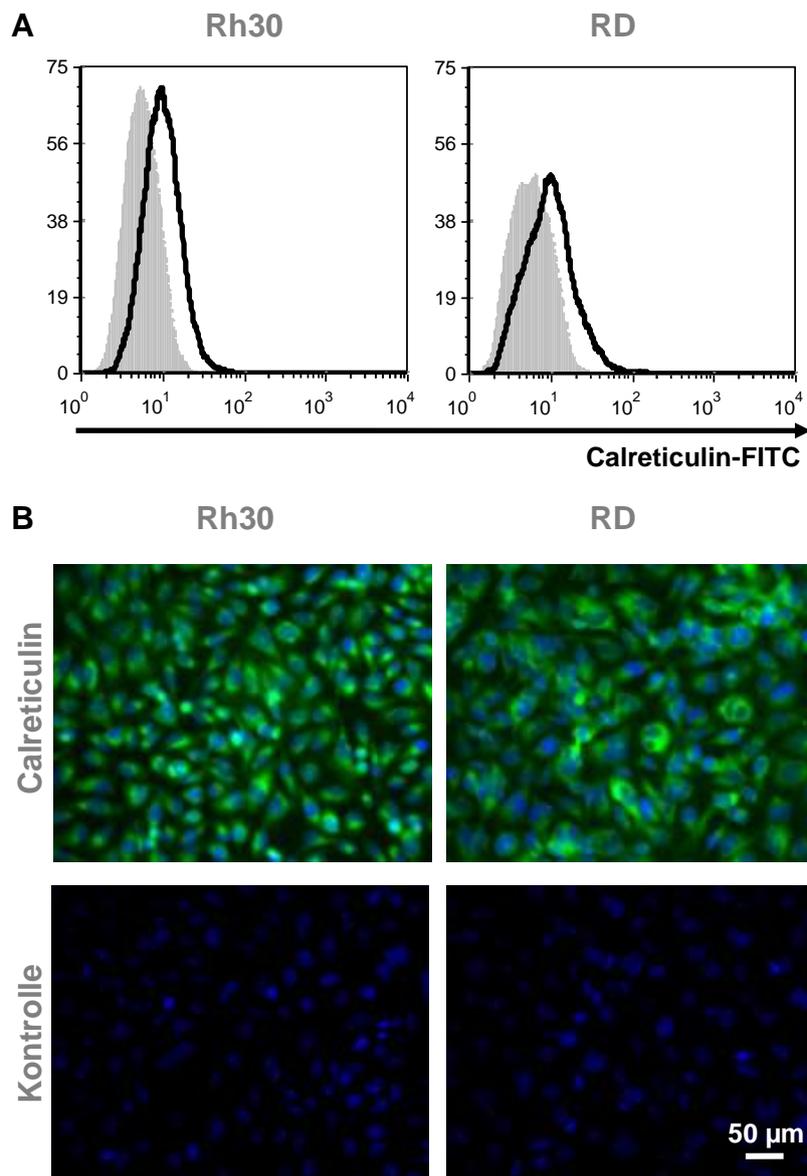


Abbildung 24: Expression von Calreticulin im Zytoplasma der RMS-Zellen, nachgewiesen durch intrazelluläre Durchflusszytometrie (A) und Immunzytochemie (B). (A) Die Kontrollfluoreszenz des Sekundärantikörpers ist durch das graue Histogramm repräsentiert. (B) Ein FITC-markierter Sekundärantikörper sowie der DNA-interkalierende Farbstoff Hoechst 33342 wurden verwendet. Kontrollen wurden nicht mit dem Primärantikörper inkubiert.

3.3.2 CD47-vermittelte Zytotoxizität gegen RMS-Zellen

Da eine hohe Expression von CD47 in RMS-Gewebe und -Zellen nachgewiesen werden konnte, wurde zunächst der Einfluss eines CD47 blockierenden monoklonalen Antikörpers auf die Vitalität der Zellkulturen näher untersucht. Die gemessene Zellvitalität lag zwischen 84 % und 101 % (Abbildung 25). Es konnte kein signifikanter Einfluss des CD47-Antikörpers auf die Vitalität der RMS-Zellen nachgewiesen werden (Zweiweg-Varianzanalyse, $p < 0,001$).

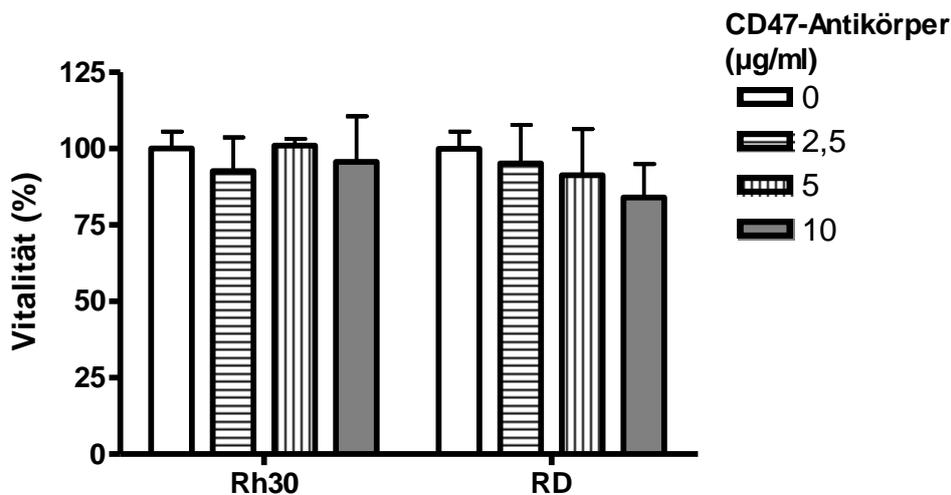


Abbildung 25: Einfluss des CD47-Antikörpers auf die Vitalität von RMS-Zellen. Rh30- und RD-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen des CD47-Antikörpers inkubiert. Die Zellvitalität wurde nach 72 h mit dem EZ4U-Kit bestimmt. Ansätze ohne Antikörper wurden auf 100 % Vitalität gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Dreifachbestimmungen.

Für die antikörpervermittelten Zytotoxizitätstests wurden PBMCs im bereits unter Abschnitt 3.1.3 ermittelten optimalen Effektor-Zielzellen-Verhältnis von 20:1 verwendet. Durch Kokultur mit RMS-Zellen wurde eine unspezifische Lyse von 2 % bei Rh30 und von 10 % bei RD beobachtet (Abbildung 26). Diese konnte unabhängig von der eingesetzten Antikörper-Konzentration (0,05-10 µg/ml) nicht gesteigert werden.

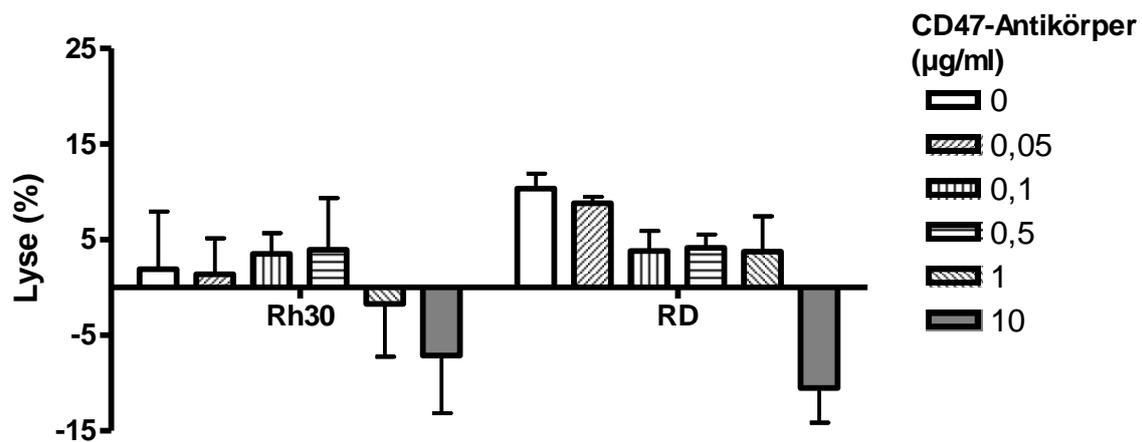


Abbildung 26: Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität des CD47-Antikörpers gegenüber RMS-Zellen. Rh30 und RD wurden mit steigenden Antikörper-Konzentrationen inkubiert und PBMCs eines gesunden Spenders in einem Effektor-Zielzellen-Verhältnis von 20:1 zugegeben. Die Zellyse wurde mittels Zytotoxizitätstest quantifiziert, dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Dreifachbestimmungen.

Neben der antikörpervermittelten Zytotoxizität und direkter Inhibition von CD47 können Antikörper die Funktion von CD47 bei der Phagozytose modulieren. Im Folgenden wurde der Einfluss des Antikörpers auf die Phagozytose der RMS-Zellen untersucht.

3.3.3 CD47-modulierte Phagozytose

Die Fähigkeit humaner Makrophagen, RMS-Zellen in Kokulturen bei einem Effektor-Zielzellen-Verhältnis von 2,5:1 zu phagozytieren, wurde bis zu 96 h beobachtet. Nach 24 h wurden wenige mehrkernige Zellen in der konfluent bewachsenen Tumorzellkultur detektiert. Definierte Löcher im Zellrasen, verursacht durch Phagozytose, wurden nach 96 h fotografisch dokumentiert (Abbildung 27A). Keine zellfreien Areale konnten in den Kontrollansätzen beobachtet werden. Die meisten und größten Löcher im Monolayer wurden in Anwesenheit des CD47-Antikörpers gemessen (Abbildung 27B). Ohne Antikörper-Behandlung wurden die Rh30-Zellen effizienter phagozytiert verglichen mit RD, bei einer zellfreien Fläche von 460 µm² im Gegensatz zu 250 µm². Die Blockade von CD47 mit einem Antikörper erhöhte die Phagozytoserate beider Zelllinien (RD: 1790 µm², Rh30: 1270 µm²). In Relation zur Gesamtfläche von 15181 µm² wurde durch Zugabe des CD47-Antikörpers eine 5%ige Steigerung der Phagozytose bei Rh30 sowie eine Erhöhung um 10% bei RD nachgewiesen.

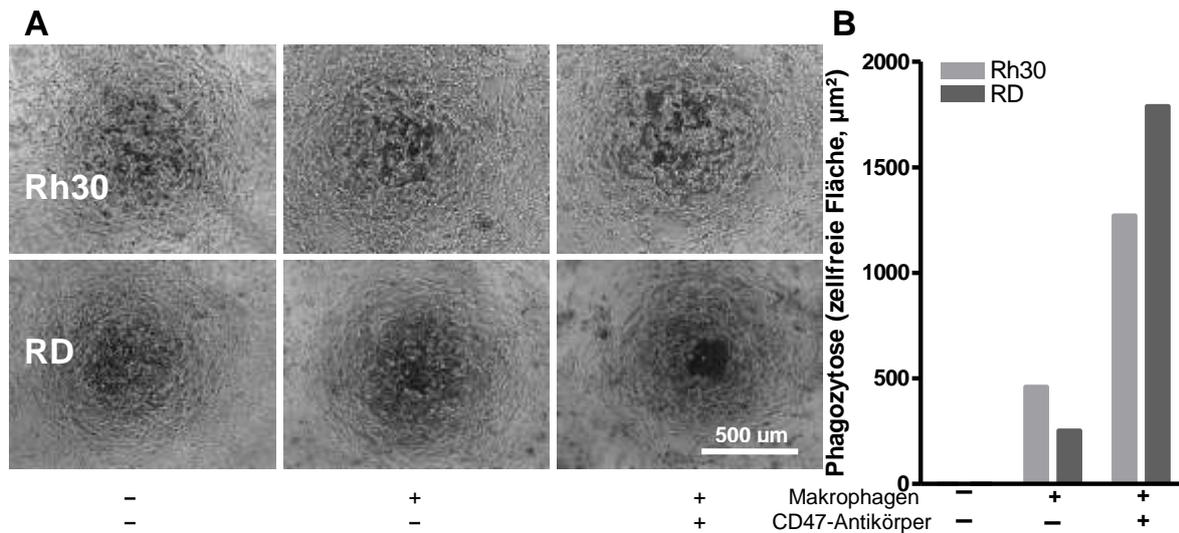


Abbildung 27: Empfindlichkeit von RMS-Zelllinien gegenüber makrophagenvermittelter Zytotoxizität. (A) Rh30- und RD-Zellen wurden mit Makrophagen für 96 h bei einem Effektor-Zielzellen-Verhältnis von 2,5:1 kokultiviert. CD47-Antikörper wurde in gekennzeichneten Ansätzen zugegeben. Die Bilder zeigen die zellfreien Flächen im Tumorzellrasen. (B) Die Phagozytose wurde durch Ausmessen der zellfreien Flächen im Tumorzellrasen relativ zur Gesamtfläche bestimmt.

Die Quantifizierung der Zytotoxizität in Kokulturen mittels Phagozytostest belegte eine spezifische Lyse beider RMS Zelllinien (Abbildung 28).

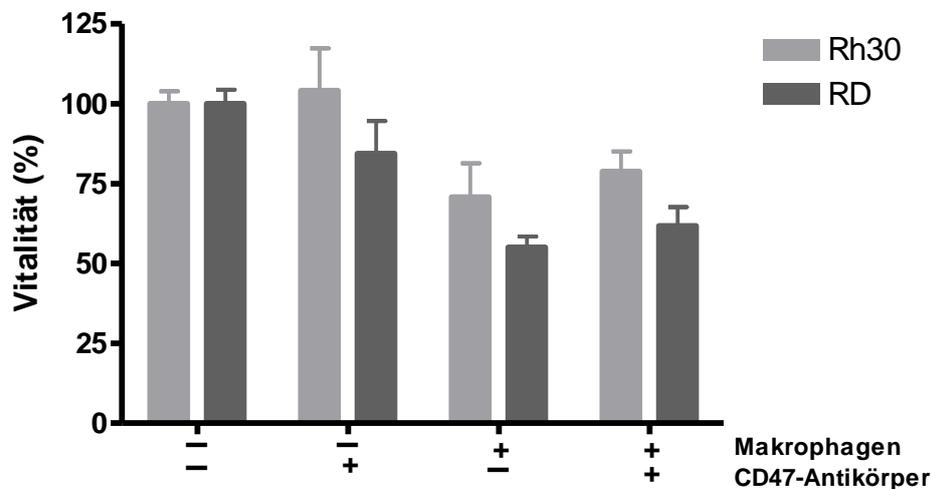


Abbildung 28: Einfluss des CD47-Antikörpers auf die makrophagenvermittelte Zytotoxizität gegenüber RMS-Zellen. Kokulturen von Rh30- und RD-Zellen mit Makrophagen (Effektor-Zielzellen-Verhältnis 2:1) wurden durchgeführt, nachdem die Tumorzellen 30 min mit dem CD47-Antikörper inkubiert worden waren. Der MTT-Test wurde 24 h später durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Zellvitalitäten aus Dreifachbestimmungen. Ansätze ohne Antikörper-Behandlung wurden als 100%ig vitale Referenz verwendet.

Nach Kokultur mit Makrophagen bei einem Effektor-Zielzellen-Verhältnis von 2:1 für 24 h, betrug die Vitalität der Rh30-Zellen 70 %, bei RD wurden 54 % gemessen. Nach zusätzlicher Zugabe des CD47-Antikörpers ergaben sich keine signifikanten Veränderungen in der Zellvitalität (Rh30: 80 %, RD: 60 %). Die alleinige Behandlung

mit dem blockierenden Antikörper in Kontrollansätzen beeinflusste die Vitalität der Rh30-Zellen nicht, die der RD-Zellen hingegen ging auf 85 % zurück.

3.3.4 Alternative Mechanismen zur Modulation der Phagozytose

Da die Phagozytoserate der RMS-Zellen durch die Blockade des phagozytose-inhibierenden Liganden CD47 im beobachteten Zeitraum nicht gesteigert werden konnte, wurden alternative Mechanismen untersucht. Da Makrophagen eine bedeutende Rolle bei der Entfernung sterbender und toter Zellen spielen, sollte durch eine Vincristin-verursachte Stressinduktion in RMS-Zellen deren Empfindlichkeit gegenüber den Fresszellen erhöht werden. Die gemessene mittlere inhibitorische Konzentration von Vincristin gegenüber den beiden RMS-Zelllinien betrug 0,5 ng/ml (Abbildung 29A). Für die Kokultur-Experimente wurde eine niedrige Vincristin-Konzentration ausgewählt (0,1 ng/ml), welche einerseits einen Effekt auf die Vitalität der RMS-Zellen zeigte, aber andererseits niedrig genug war, um starken Zelltod zu vermeiden und so die Messung der Phagozytoserate zu ermöglichen.

Die alleinige Behandlung mit Vincristin zeigte keine Auswirkungen auf die Morphologie und Vitalität der Rh30-Zellen, wohingegen die Vitalität der RD-Zellen auf 85 % zurückging (Abbildung 29B). Eine zusätzliche Behandlung mit dem CD47-Antikörper reduzierte die Vitalität von Rh30 auf 75 %, RD ging auf 60 % zurück. Diese Ergebnisse wurden durch die Zugabe von Makrophagen nicht weiter beeinflusst (Rh30 80 % bzw. RD 55 %). Vier verschiedene Behandlungsvarianten wurden als Kontrollansätze mitgeführt: A) Die alleinige Behandlung mit dem CD47-Antikörper hatte keinen Einfluss auf die Vitalität von Rh30, bei RD war ein Rückgang auf 85 % zu verzeichnen. B) Die Kokultur mit Makrophagen nach Antikörper-Behandlung reduzierte die Vitalität der Rh30-Zellen auf 80 % bzw. RD auf 60 %. C) Nach Kokultur nur mit Makrophagen waren 70 % der Rh30- und 45 % der RD-Zellen vital. D) Die Behandlung mit Vincristin und anschließende Kokultur mit Makrophagen ergab 75 % Vitalität bei Rh30 und 60 % bei RD. Letztlich konnte durch das apoptose-induzierende Zytostatikum Vincristin die Phagozytoserate der RMS-Zellen nicht gesteigert werden.

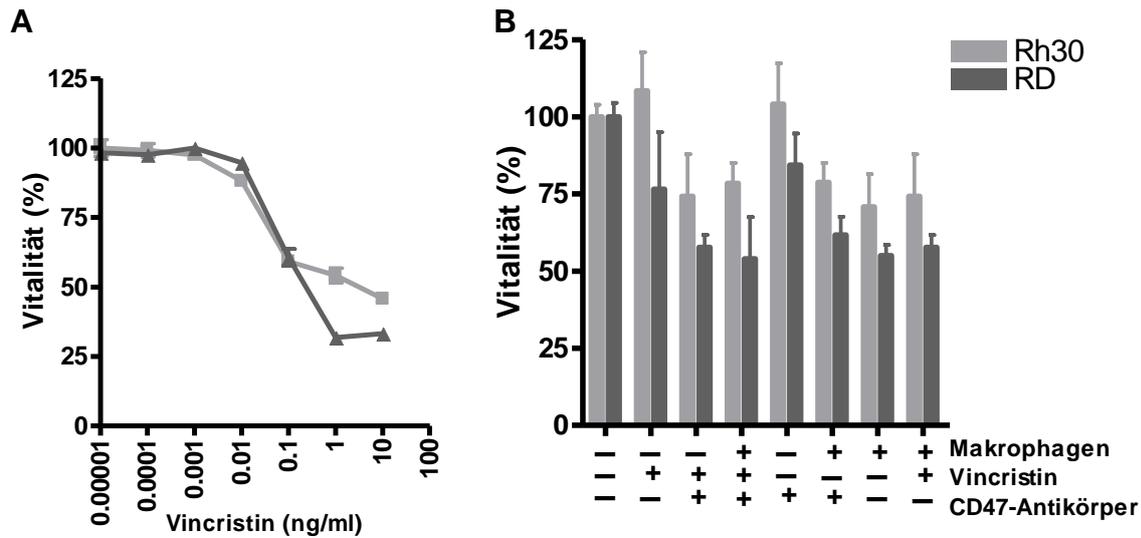


Abbildung 29: Phagozytose von RMS-Zellen nach Vorbehandlung mit Vincristin. (A) Rh30- und RD-Zellen wurden für 96 h mit steigenden Konzentrationen von Vincristin behandelt, anschließend der MTT-Test durchgeführt. Dargestellt sind relative Mittelwerte und Standardabweichungen aus Dreifachbestimmungen. (B) Sofern angegeben wurden die Zellen mit 0,1 ng/ml Vincristin für 24 h und dem CD47-Antikörper für 30 min inkubiert. Die Makrophagen wurden in einem Effektor-Zielzellen-Verhältnis von 2:1 zugegeben und der Phagozytostest 24 h später durchgeführt. Dargestellt sind relative Mittelwerte und Standardabweichungen aus Dreifachbestimmungen.

Es wurde zusätzlich der Einfluss des HDACi SAHA auf die Phagozytoserate von RMS-Zellen durch Makrophagen untersucht. Eine Behandlung mit SAHA führt zu einer veränderten Expression verschiedener Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Auf diese Weise kann die Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber den Immunzellen erhöht werden. Eine Konzentration von 0,5 μ M SAHA wurde - basierend auf Vitalitätstests von Rh30- und RD-Zellen - gewählt, da die Beeinträchtigung der Zellvitalität unter 20 % liegen sollte (95). Die Zugabe von SAHA allein reduzierte die Vitalität der Rh30-Zellen auf 85 %, wohingegen RD nicht beeinflusst wurde (Abbildung 30). Nach Kokultur mit Makrophagen waren noch 55 % der Rh30- und 60 % der RD-Zellen vital. Gleiche Ergebnisse wurden nach SAHA-Behandlung und anschließender Zugabe von Makrophagen erzielt (Rh30 und RD: 55 %).

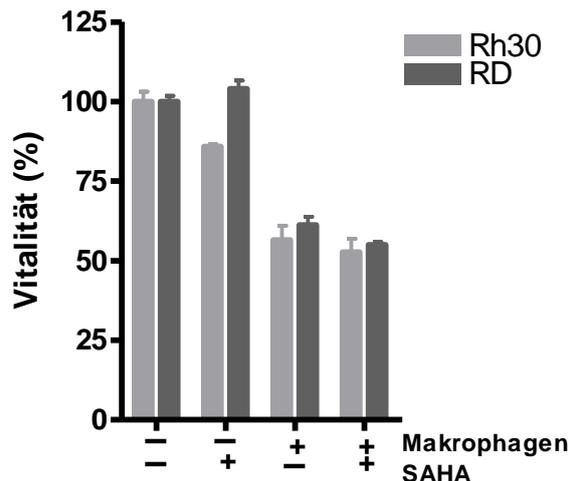


Abbildung 30: Einfluss des HDACi SAHA auf die Phagozytose von RMS-Zellen. Diese wurden mit 0,5 μ M SAHA für 24 h behandelt. Nach Zugabe der Makrophagen in einem Effektor-Zielzellen-Verhältnis von 2:1 wurde nach 24 h ein Phagozytostest durchgeführt. Dargestellt sind relative Mittelwerte und Standardabweichungen aus Dreifachbestimmungen.

Durch die Interaktion von Calreticulin mit LRP kann eine Aktivierung von Makrophagen erzielt werden. Vorversuche haben gezeigt, dass die RMS-Zellen kein Calreticulin auf ihrer Oberfläche exprimieren (vergleiche Abbildung 23). Aus diesem Grund sollte in einem dritten Ansatz die Expression von Calreticulin auf der Zelloberfläche von RMS-Zellen induziert werden. Die gemessene mittlere inhibitorische Konzentration von Doxorubicin gegenüber den beiden RMS-Zelllinien betrug 0,1 μ g/ml (Abbildung 31A). Für die durchflusszytometrische Messung von Calreticulin auf der Zelloberfläche und für die Kokultur-Experimente wurde zusätzlich eine niedrigere Konzentration mitgeführt (0,01 μ g/ml).

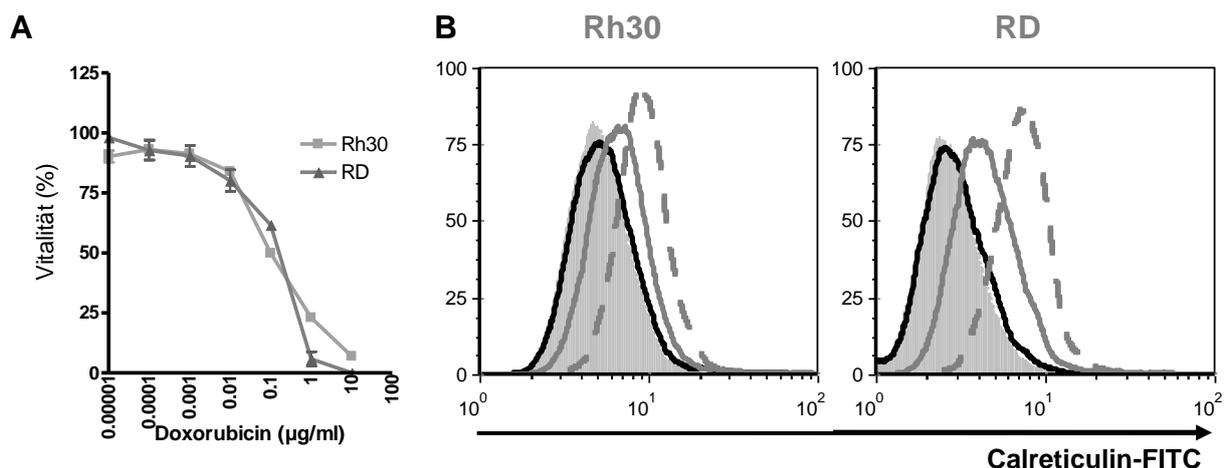


Abbildung 31: Vitalität und Calreticulin-Expression von RMS-Zellen nach Behandlung mit Doxorubicin. (A) Rh30- und RD-Zellen wurden für 96 h mit steigenden Konzentrationen von Doxorubicin inkubiert, anschließend der MTT-Test durchgeführt. Dargestellt sind relative Mittelwerte und Standardabweichungen aus Dreifachbestimmungen. (B) Eine Induktion der extrazellulären Expression von Calreticulin auf Rh30- und RD-Zellen nach Behandlung mit unterschiedlichen Doxorubicin-Konzentrationen (dunkelgraue Linie: 0,01 μ g/ml; gestrichelte dunkelgraue Linie: 0,1 μ g/ml) für 24 h konnte durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Ohne Doxorubicin-Behandlung war auf der Zelloberfläche kein Calreticulin detektierbar (schwarze Linien). Die Kontrollfluoreszenz des Sekundärantikörpers ist jeweils als graues Histogramm dargestellt.

Eine konzentrationsabhängige Präsentation von Calreticulin auf der Zelloberfläche konnte durchflusszytometrisch nachgewiesen werden (Abbildung 31B). Bei der RD-Zelllinie wurde bei beiden getesteten Konzentrationen im Vergleich zu Rh30 jeweils eine höhere Expression von Calreticulin auf der Zelloberfläche detektiert. Darauf aufbauend bestätigte der Phagozytostest, dass durch eine Vorbehandlung mit der höheren Doxorubicin-Konzentration (0,1 µg/ml) und anschließende Kokultur mit Makrophagen eine effiziente Phagozytoserate der RD-Zellen von bis zu 90 % erzielt wurde (Abbildung 32B). Dies konnte durch eine zusätzliche Behandlung mit dem CD47-Antikörper (10 µg/ml) nicht gesteigert werden (Vitalität RD 15 %). Bei den Rh30-Zellen wurde durch die mittlere inhibitorische Doxorubicin-Konzentration von 0,1 µg/ml und Kokultur mit Makrophagen eine Phagozytoserate von 65 % erzielt, unabhängig von der Zugabe des CD47-Antikörpers (Vitalität 35 % bzw. 40 %, siehe Abbildung 32A). Nach Vorbehandlung mit der niedrigeren Doxorubicin-Konzentration und Kokultur mit Makrophagen wurde die Vitalität beider RMS-Zellen um die Hälfte reduziert (Vitalität Rh30 55 % und RD 50 %). Auch hier war durch die zusätzliche Behandlung mit dem CD47-Antikörper keine Veränderung feststellbar (Vitalität Rh30 65 % bzw. RD 55 %). Vier verschiedene Behandlungsvarianten wurden als Kontrollansätze mitgeführt: A) Die Kokultur mit Makrophagen reduzierte die Vitalität der Rh30-Zellen auf 60 % bzw. RD auf 55 %. B) Nach Antikörper-Behandlung und Kokultur mit Makrophagen waren 65 % der Rh30- und 60 % der RD-Zellen vital. C) Die alleinige Behandlung mit der im Vorfeld evaluierten mittleren inhibitorischen Konzentration von Doxorubicin (0,1 µg/ml) führte zu einer Reduktion der Zellvitalität auf 55 % (vergleiche Abbildung 31A). D) Die getestete niedrigere Zytostatika-Konzentration (0,01 µg/ml) zeigte keine Auswirkungen auf die Morphologie und Vitalität der Rh30-Zellen (95 %), die Vitalität der RD-Zellen ging auf 85 % zurück.

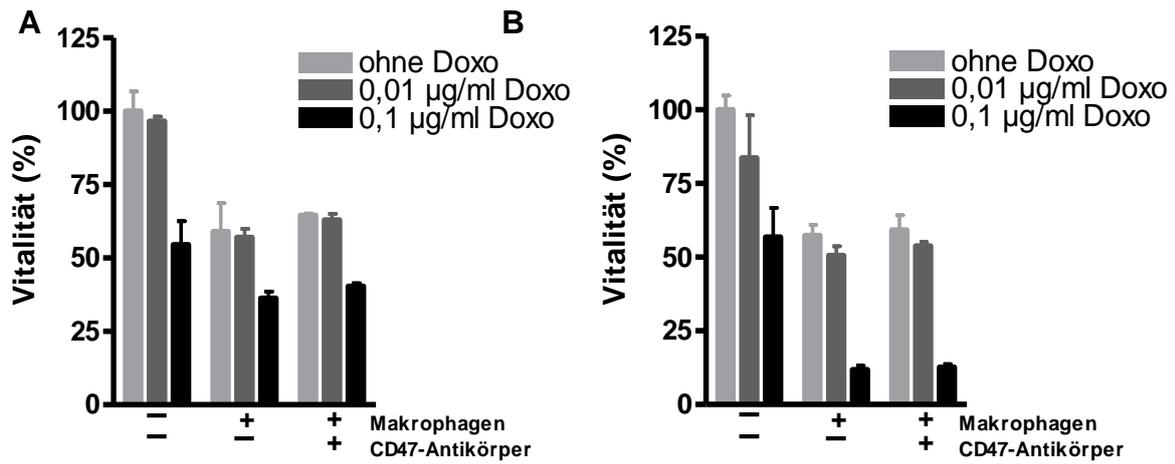


Abbildung 32: Phagozytose von RMS-Zellen nach Vorbehandlung mit Doxorubicin. Rh30- (A) und RD-Zellen (B) wurden mit 0,01 µg/ml bzw. 0,1 µg/ml Doxorubicin (Doxo) für 24 h und dem CD47-Antikörper für 30 min inkubiert. Die Makrophagen wurden in einem Effektor-Zielzellen-Verhältnis von 2:1 zugegeben und der Phagozytostest 24 h später durchgeführt. Dargestellt sind relative Mittelwerte und Standardabweichungen aus Dreifachbestimmungen.

3.4 *In vivo* Modell zur Evaluierung immuntherapeutischer Ansätze

Nach i.p.-Applikation von RMS-Zellen entwickelten sich nach drei Wochen im Abdomen von männlichen NOD/LtSz-*scid* *IL2R γ ^{null}* Mäusen bis zu 30 Tumoren unterschiedlicher Größe (Abbildung 33). Diese Tumoren konnten mittels Fluoreszenz und Biolumineszenz *in vivo* als auch durch die Luciferase-Aktivität im Plasma detektiert werden, da die Zellen mCherry und eine sezernierbare Form der Gaussia Luciferase stabil exprimierten.

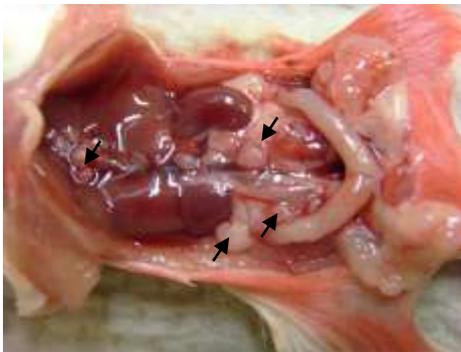


Abbildung 33: Metastasierendes Wachstum von alveolären RMS-Zellen (Rh30) in der Bauchhöhle einer NOD/LtSz-*scid* *IL2R γ ^{null}* Maus. Vorwiegend in der Leber und im Mesenterium entwickelten sich Tumorknoten. Die Diagnose eines ARMS konnte in den mit Pfeilen markierten Tumoren histochemisch bestätigt werden.

3.4.1 Beobachtung des Tumorwachstums durch Plasma-GLuc

Nach Xenotransplantation der RMS-Zellen wurde den Mäusen wöchentlich Blut retrobulbär abgenommen. Durch die Reaktion mit Coelenterazin wurde die Aktivität der Luciferase im Plasma bestimmt. Es wurden fünf Mäuse über einen Zeitraum von 35 Tagen beobachtet. In allen Tieren entwickelten sich Tumoren. Insbesondere bei den Rh30-Xenotransplantaten konnte ein exponentieller Anstieg der Luciferase-Aktivität im Plasma nachgewiesen werden (Abbildung 34). Das Tumorwachstum der RD-Zellen fiel geringer aus.

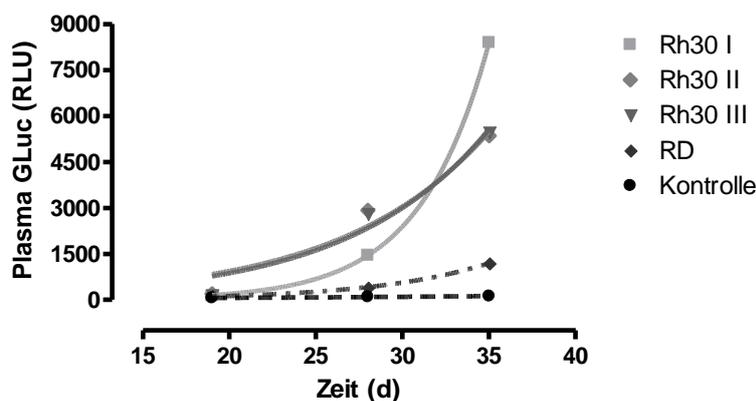


Abbildung 34: Entwicklung der intraperitonealen Tumoren. An den angegebenen Zeitpunkten wurde im Plasma die Aktivität der GLuc bestimmt (RLU). Die Aktivität steigt exponentiell mit der Zeit und ist vom Tumortyp abhängig. Der Kontrollmaus wurden keine Tumorzellen injiziert.

3.4.2 Detektion der Tumoren durch optische Bildgebung

Durch die optische Bildgebung wurden die Tumoren im Tier detektiert. Hierbei wurden sowohl die Biolumineszenz-Signale der *Gaussia Luciferase* als auch die Fluoreszenz von *mCherry* gemessen. Zunächst wurde eine Testmessung *in vitro* durchgeführt, wobei die Lumineszenz und Fluoreszenz von 1×10^6 RMS-Zellen in einer Mikrotiterplatte aufgenommen wurden. Die Rh30-Zellen zeigten - verglichen mit RD - eine geringere Biolumineszenz-Aktivität nach Zugabe des Substrates (Abbildung 35). Gleichzeitig wurde jedoch eine relativ stärkere Fluoreszenz bei Rh30 detektiert.

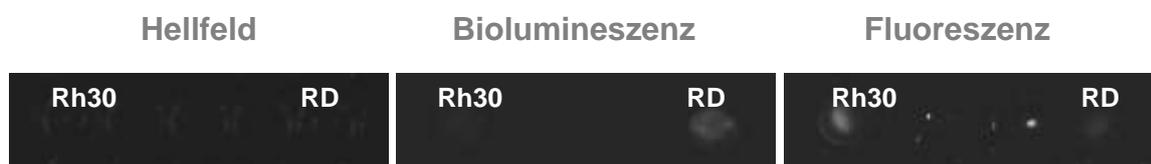


Abbildung 35: Testmessungen Biolumineszenz und Fluoreszenz *in vitro*. 1×10^6 RMS-Zellen wurden in einer Mikrotiterplatte vorgelegt und neben einer Hellfeld-Aufnahme wurden sowohl Lumineszenz (GLuc) als auch rote Fluoreszenz (*mCherry*) für jeweils 120 sec aufgezeichnet. Dargestellt sind die Schwarz-Weiß-Aufnahmen, helle Grautöne zeigen eine höhere Expression des Markerproteins.

Anschließend wurden die bereits genannten 5 Mäuse (siehe 3.4.1) 28 und 35 Tage nach Xenotransplantation im Bildgebungsgerät analysiert. Dargestellt sind die Aufnahmen nach 35 Tagen (Abbildung 36). Anhand der Fluoreszenz-Signale sind 2-4 (Rh30) bzw. 5 (RD) Tumoren je Maus detektiert worden. Diese befanden sich alle im Bauchraum. Außerdem wurden durch das weiße Fell bedingte Hintergrundsignale im Kopf-Nacken-Bereich und am unteren Rumpf beobachtet. In der Lumineszenzmessung war bei allen Tieren eine noch höhere Tumormast zu erkennen, allerdings waren die Signale im Vergleich zur Fluoreszenzmessung sehr heterogen im Bauchraum verteilt. Auch hier wurde ein Hintergrundrauschen aufgezeichnet.

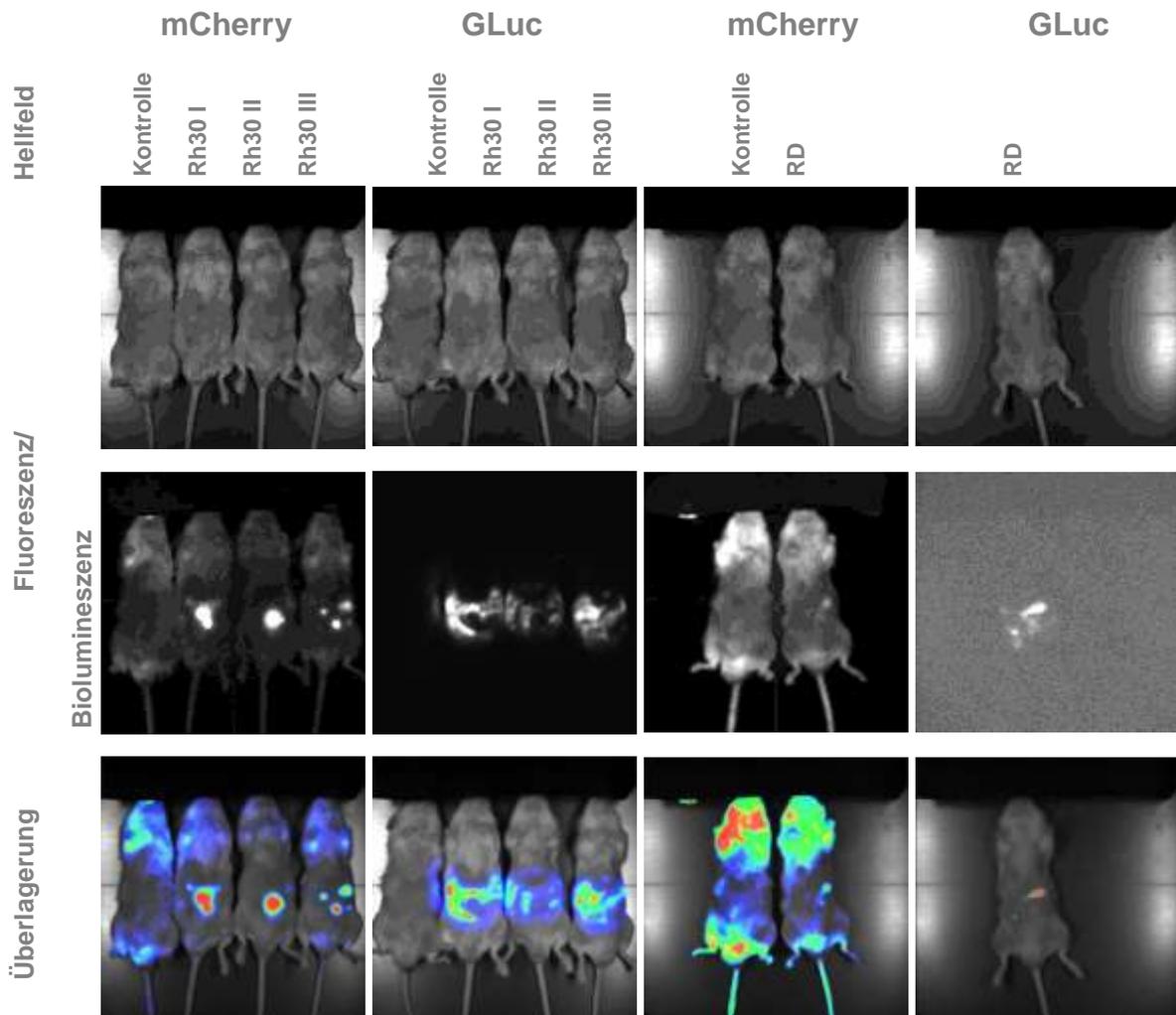


Abbildung 36: Detektion der RMS-Tumoren *in vivo*. 1×10^6 RMS-Zellen wurden i.p. in NOD/LtSz-*scid* *IL2Ry^{null}* Mäuse injiziert. Dargestellt ist die optische Bildgebung 35 Tage nach Xenotransplantation. Neben einer Hellfeld-Aufnahme wurden sowohl die Lumineszenz (GLuc, 2 min Substrataufnahme, 60 sec Aufnahmezeit) als auch die rote Fluoreszenz (mCherry, 20 sec) der intraperitonealen Tumoren aufgezeichnet.

Die Fluoreszenz-Intensitäten der einzelnen Tumoren ($n = 27$) sowie die Biolumineszenz-Intensität im gesamten Bauchraum wurden mit der Bildanalysesoftware DigiDoc bestimmt. Es zeigte sich eine positive Korrelation der *in vivo* gemessenen Fluoreszenz-Intensität mit der ermittelten Tumorfläche (siehe Abbildung 37). Des Weiteren wurde eine Zunahme in der Summe der Fluoreszenz-Intensität bei der zweiten Messung (35 d nach Xenotransplantation) im Vergleich zur ersten Messung (28 d) festgestellt. Diese Steigerung konnte auch im Falle der gemessenen Biolumineszenz-Intensitäten beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

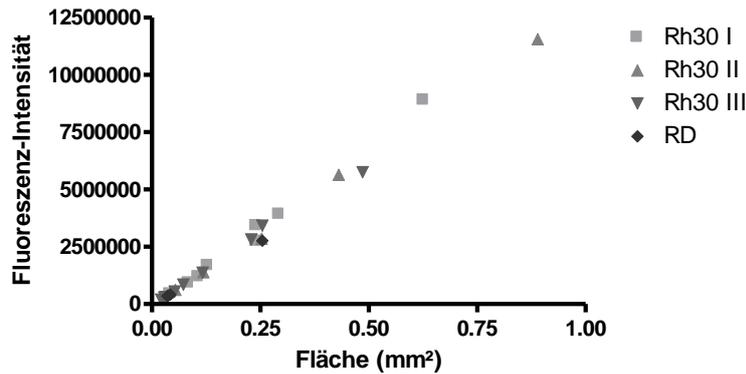


Abbildung 37: Korrelation der Fluoreszenz-Intensität mit der Tumorfläche *in vivo*. Mittels Bildanalyse wurden die Flächen und Fluoreszenz-Intensitäten der einzelnen Tumoren ermittelt, die im Bildgebungsgerät detektiert worden waren. Jeder Datenpunkt steht für einen Tumor in einer bestimmten Maus.

Bei einer Gegenüberstellung der Summen der *in vivo* gemessenen Fluoreszenz- und Biolumineszenz-Intensitäten je Maus und Zeitpunkt zu den gleichzeitig gemessenen logarithmierten Plasma-GLuc-Werten ergab sich ein exponentieller Zusammenhang (Abbildung 38). Dabei lag das Bestimmtheitsmaß R^2 in beiden Fällen bei $> 0,9$, dies spricht für eine gute Annäherung des Kurvenverlaufs an die Daten.

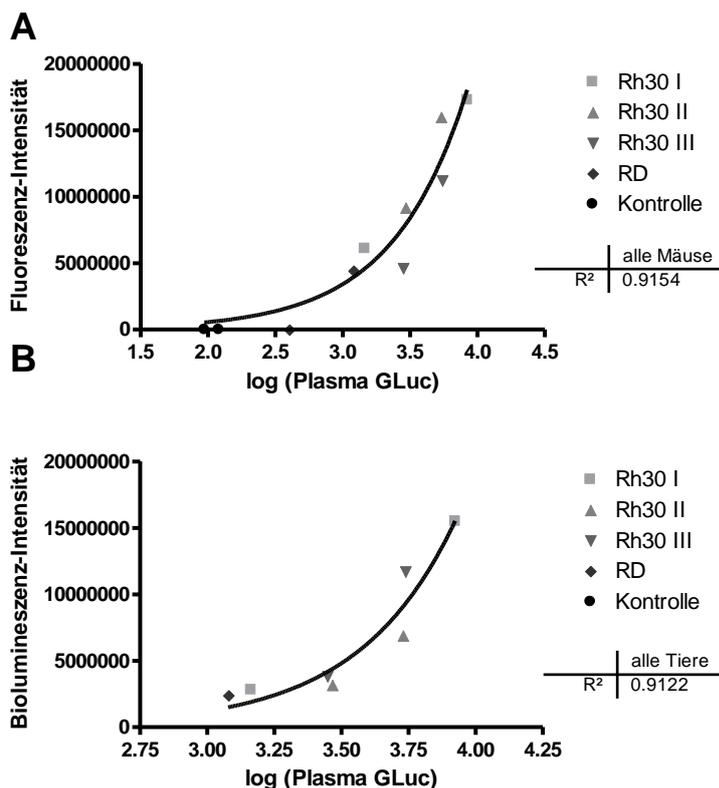


Abbildung 38: Exponentieller Zusammenhang der Fluoreszenz- und Biolumineszenz-Intensitäten *in vivo* mit dem Plasma-GLuc-Level. (A) Die Fluoreszenz-Intensitäten der einzelnen Tumoren je Zeitpunkt und Tier wurden aufsummiert bzw. (B) die Biolumineszenz-Intensität im gesamten Bauchraum bestimmt. Beide wurden den entsprechenden Plasma-GLuc-Werten ($\log(\text{RLU})$, vgl. 3.4.1) gegenüber gestellt. Es zeigte sich bei allen Mäusen eine gute Annäherung ($R^2 > 0,9$) an einen exponentiellen Kurvenverlauf (Fluoreszenz: $y = 15336 * e^{1,8x}$; Biolumineszenz: $y = 301,1 * e^{2,77x}$)

Da die gemessenen Fluoreszenz-Intensitäten sowohl mit der Tumorfläche als auch mit der Plasma-GLuc-Konzentration korrelierten, wurden anschließend die beiden letztgenannten Parameter direkt verglichen (Abbildung 39). Ein exponentieller Zusammenhang wurde bestätigt, der Determinationskoeffizient R^2 lag bei $> 0,9$.

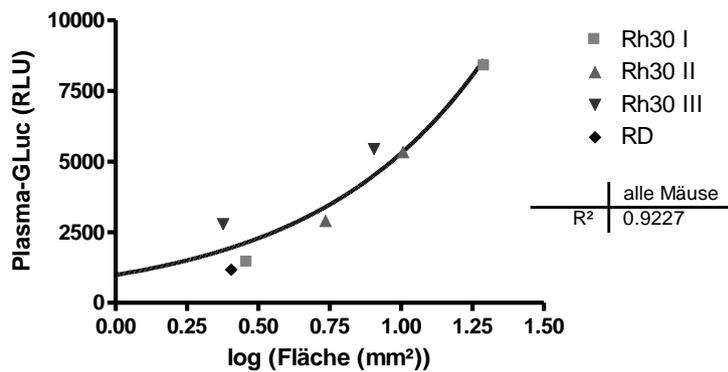


Abbildung 39: Exponentieller Zusammenhang der Plasma-GLuc-Konzentration mit der Tumorfläche *in vivo*. Es wurde je Maus und Zeitpunkt die Summe der gemessenen Tumorflächen gebildet und den entsprechenden Plasma-GLuc-Werten (vgl. 3.4.1) gegenüber gestellt. Es zeigte sich bei allen Mäusen eine gute Annäherung ($R^2 > 0,9$) an einen exponentiellen Kurvenverlauf ($y = 0,03 * e^{3,32x}$).

3.4.3 Lokalisation der Tumoren mittels PET/MRT

Durch die sequenziell durchgeführten PET/MRT-Messungen wurden die Tumoren im Tier lokalisiert und vitale, biologisch aktive Tumoranteile nachgewiesen. Die bereits mittels optischer Bildgebung beobachteten 5 Mäuse wurden 36 Tage nach Xenotransplantation mit dem radioaktiven Tracer [¹⁸F]FDG untersucht (Abbildung 40 und Abbildung 41).

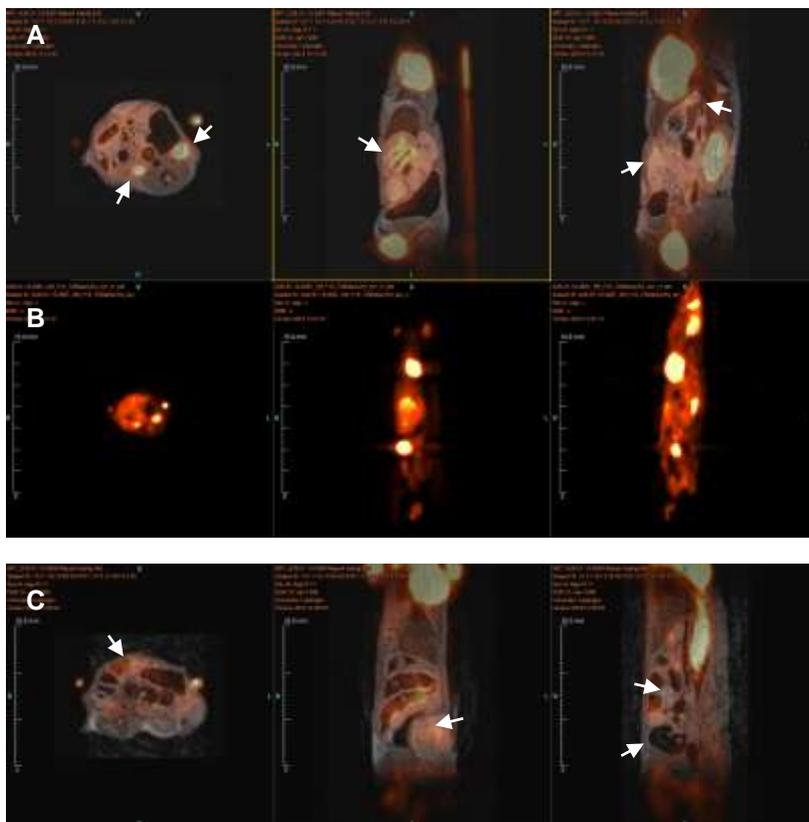


Abbildung 40: Lokalisation der RMS-Tumoren *in vivo*. 1×10^6 RMS-Zellen wurden i.p. in NOD/LtSz-*scid* IL2Ry^{null} Mäuse injiziert. Die PET/MRT-Messung wurde 36 Tage nach Xenotransplantation durchgeführt. Dargestellt sind die drei Körperebenen, von links nach rechts: Transversal-, Frontal- und Sagittalebene. (B) Die mittels PET und [¹⁸F]FDG detektierten Tumoren der Rh30 I-Maus sind gelblich dargestellt. (A) Die sequentielle MRT-Messung wurde überlagert und zeigt die Morphologie, die Tumoren wurden mit Pfeilen markiert. (C) Zu sehen sind die überlagerten PET/MRT-Aufnahmen von Rh30 II.

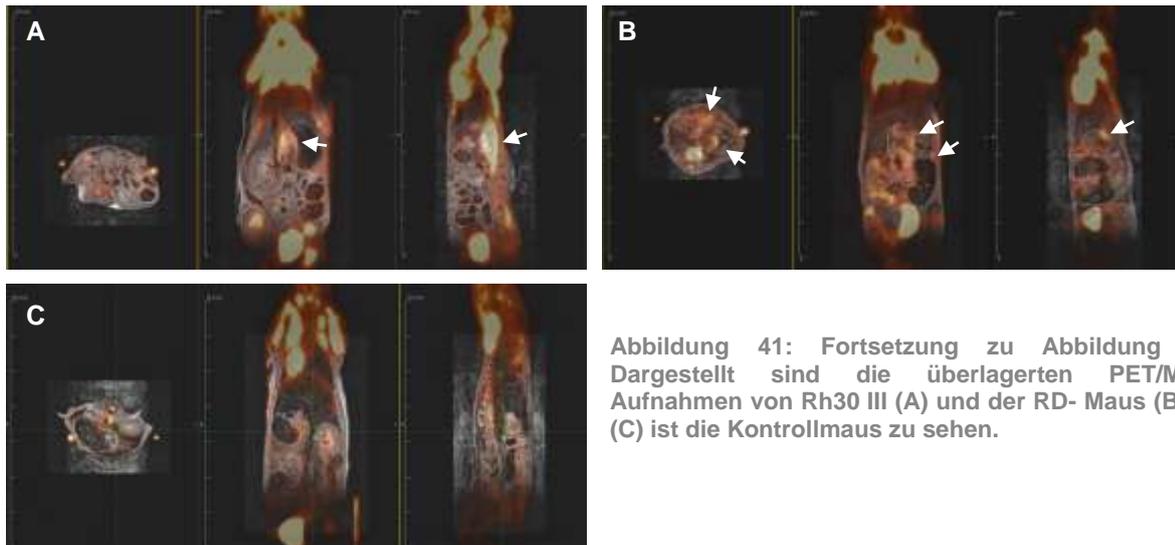


Abbildung 41: Fortsetzung zu Abbildung 33. Dargestellt sind die überlagerten PET/MRT-Aufnahmen von Rh30 III (A) und der RD-Maus (B). In (C) ist die Kontrollmaus zu sehen.

Bei den Rh30 Xenotransplantaten wurden mittels PET/MRT 3-7 Tumoren je Maus lokalisiert. Diese befanden sich ventral, in der Leber, zwischen den Nieren und im Magenbereich. Bei der RD Maus wurden zwei Tumoren im Bereich des Magens detektiert. Die Tumormassen der einzelnen Tumoren ($n = 17$) wurden anhand der MRT-Aufnahmen mit der Inveon Research Workplace Software bestimmt. Eine Gegenüberstellung der gesamten Tumorlast je Maus zu den kurz vor der MRT-Messung gewonnenen logarithmierten Plasma-GLuc-Werten ergab einen exponentiellen Zusammenhang (Abbildung 42). Dabei lag das Bestimmtheitsmaß R^2 bei $> 0,9$.

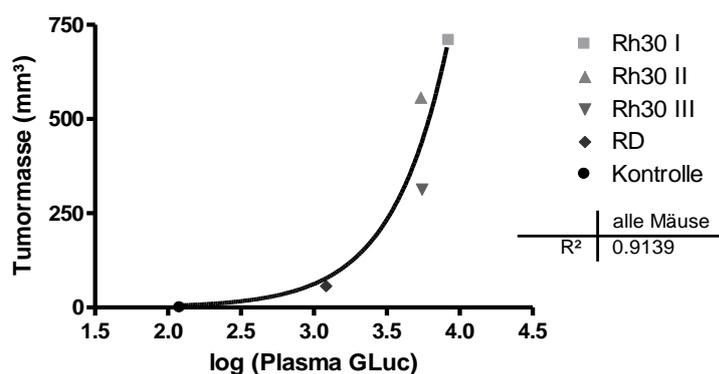


Abbildung 42: Exponentieller Zusammenhang der Plasma-GLuc-Konzentration mit der Tumormasse *in vivo*. Es wurde je Maus die Summe der gemessenen Tumorumfänge gebildet und den entsprechenden Plasma-GLuc-Werten (vgl. 3.4.1) gegenüber gestellt. Es zeigte sich bei allen Mäusen eine gute Annäherung ($R^2 > 0,9$) an einen exponentiellen Kurvenverlauf ($y = 0,02 * e^{2,64x}$).

Eine verstärkte Anreicherung des radioaktiven Tracers $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ wurde generell im Nackenmuskel und in der Blase beobachtet. Außerdem wurde in den mittels MRT detektierten Tumorebenen eine erhöhte Radioaktivität im Vergleich zum umgebenden Gewebe gemessen. Dies lässt auf einen aktiven Energiestoffwechsel

vitalen Tumorgewebes zurückschließen. Basierend auf den Aktivitätskonzentrationen der einzelnen Tumoren, dem Körpergewicht sowie der injizierten Aktivität wurden die standardisierten Aufnahmewerte (SUV) errechnet. Diese lagen bei allen Tumoren und Tieren in der Größenordnung von 0,5-1,0. Ein exponentieller Zusammenhang der aufsummierten SUVs je Tier gegenüber den logarithmierten Plasma-GLuc-Werten wurde festgestellt ($R^2 > 0,9$; Abbildung 43).

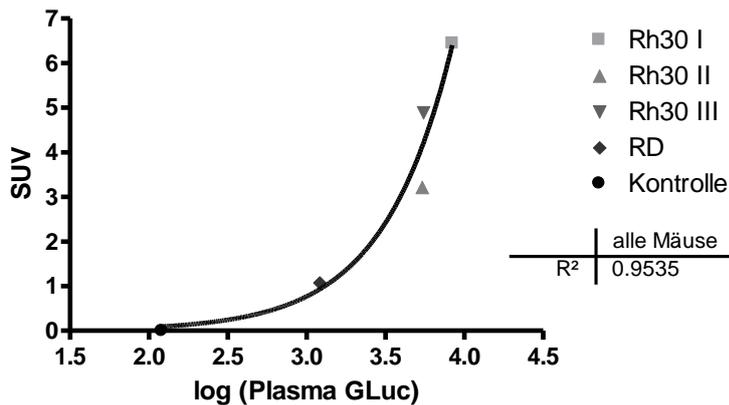


Abbildung 43: Exponentieller Zusammenhang der Plasma-GLuc-Konzentration mit der Tumorvitalität *in vivo*. Es wurde je Maus die Summe der standardisierten Aufnahmewerte (SUV) gebildet und den entsprechenden Plasma-GLuc-Werten (vgl. 3.4.1) gegenüber gestellt. Es zeigte sich bei allen Mäusen eine gute Annäherung ($R^2 > 0,9$) an einen exponentiellen Kurvenverlauf ($y = 0,0008 * e^{2,3x}$).

3.4.4 Vergleich verschiedener PET-Tracer

Aufgrund der Tatsache, dass mit [^{18}F]FDG eine verstärkte Anreicherung in der Blase und im Nackenfell beobachtet worden war und RMS-Tumoren generell in der Blase vorkommen können, wurden mit [^{18}F]FLT und [^{11}C]Cholin zwei weitere radioaktive Tracer auf ihren diagnostischen Einsatz beim RMS getestet. Hierzu wurde unabhängig von den bisher beschriebenen fünf Mäusen ein weiteres Tier mit RD-Zellen xenotransplantiert und der Messung mit beiden Tracern unterzogen. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von Cholin gibt es keine Interferenzen bei einer sequentiellen Messung. Neben MRT wurde auch die durch mCherry bedingte rote Fluoreszenz aufgenommen (Abbildung 44). Es wurde mit allen Nachweismethoden ein Tumor im Bereich der Blase detektiert.

Unspezifische Signale wurden mit [^{11}C]Cholin im Gehirn, im Bauchraum und im Bein der Maus detektiert. Die Blase hingegen zeigte keine Anreicherung des Tracers. Bei [^{18}F]FLT wiederum gab es ein starkes Signal der Blase, wohingegen der übrige Körper mit Ausnahme des Ohres kaum Hintergrundaktivität aufwies. Magen und Darmbereiche zeigten überhaupt keine Aufnahme des radioaktiven Markers. Zusammenfassend schien im Vergleich mit den im Vorfeld gewonnenen [^{18}F]FDG-

Daten (3.4.3) der [^{18}F]FLT-Tracer bei der Detektion von RMS-Tumoren am geeignetsten zu sein, da dieser die wenigsten Hintergrundsignale verursachte.

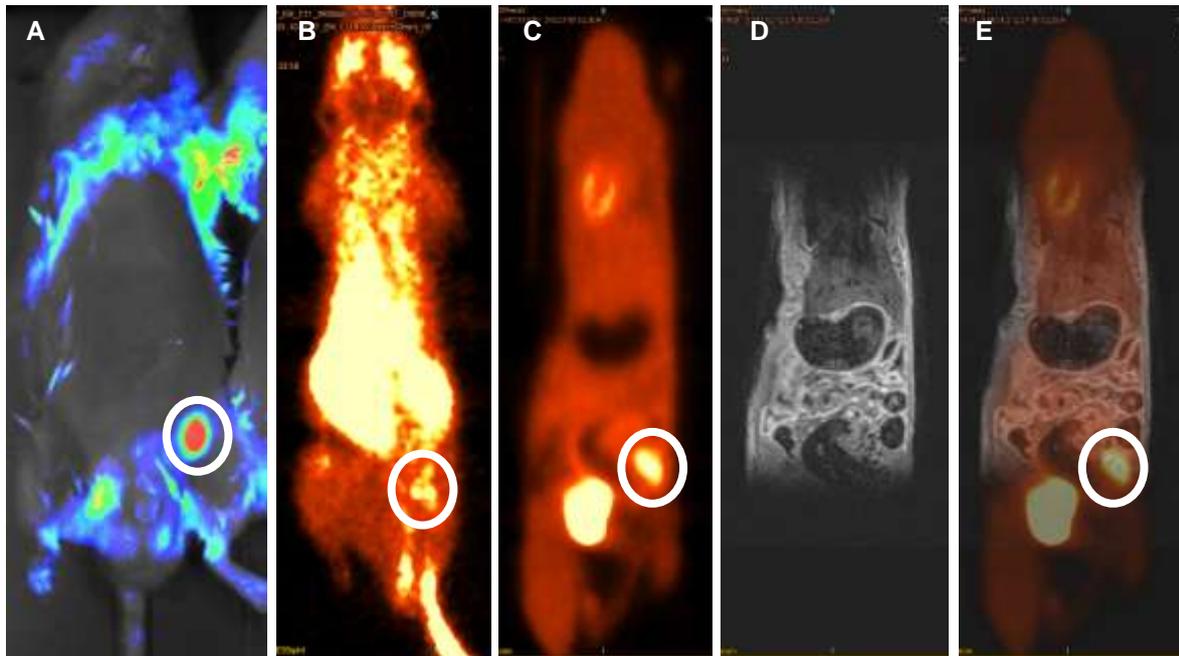


Abbildung 44: Vergleich verschiedener PET-Tracer bei RMS-Tumoren *in vivo*. 1×10^6 RD-Zellen wurden i.p. in eine NOD/LtSz-*scid IL2Ry^{null}* Maus injiziert. 32 Tage nach Xenotransplantation wurden zwei PET-Messungen, zuerst [^{11}C]Cholin (B), dann [^{18}F]FLT (C) und daraufhin ein MRT-Scan (D) durchgeführt. Am Folgetag wurde die Fluoreszenz *in vivo* detektiert (A). Der sequentiellen MRT-Messung wurde die [^{18}F]FLT-Aufnahme überlagert und zeigt die Morphologie (E). Der mit allen Nachweismethoden detektierte Tumor im Bereich der Blase wurde mit einem weißen Oval gekennzeichnet.

3.4.5 Optische Bildgebung der exponierten Organe

Nach der PET/MRT-Messung wurden die unter 3.4.3 beschriebenen Mäuse euthanasiert und die Bauchdecke geöffnet. Die Organe der Bauchhöhle wurden entnommen und deren Fluoreszenz *ex vivo* im Bildgebungsgerät analysiert (Abbildung 45).

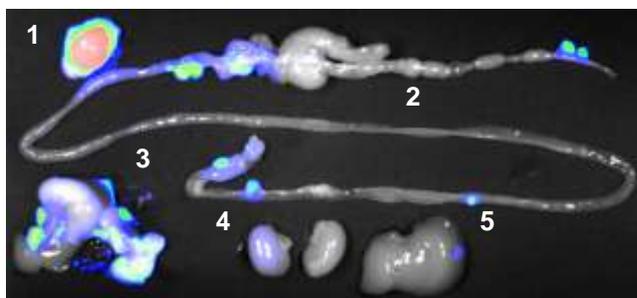


Abbildung 45: Detektion der Fluoreszenz der RMS-Tumoren *ex vivo*. 36 Tage nach Xenotransplantation wurden die Mäuse euthanasiert und die Fluoreszenz der aus der Bauchhöhle entnommenen Organe gemessen. Neben einer Hellfeld-Aufnahme wurde die rote Fluoreszenz (mCherry, 20 sec) der Tumoren aufgezeichnet und beides überlagert. Dargestellt ist beispielhaft die überlagerte Aufnahme von Rh30 II: Subkutaner Tumor (1), Darm mit Blinddarm (2), Magen (3), Nieren (4) und Leber (5).

Es zeigte sich erneut eine positive Korrelation der Fluoreszenzintensität mit der Fläche der einzelnen Tumoren (Abbildung 46). Ein exponentieller Zusammenhang zwischen der Summe der gemessenen Fluoreszenz-Intensitäten aller Tumore je

Maus zur ermittelten GLuc-Biolumineszenz im Plasma wurde erneut beobachtet (Abbildung 47). Allerdings lag das Bestimmtheitsmaß R^2 bei $< 0,9$, so dass die Annäherung durch diese Funktion nur ungenügend beschrieben wird.

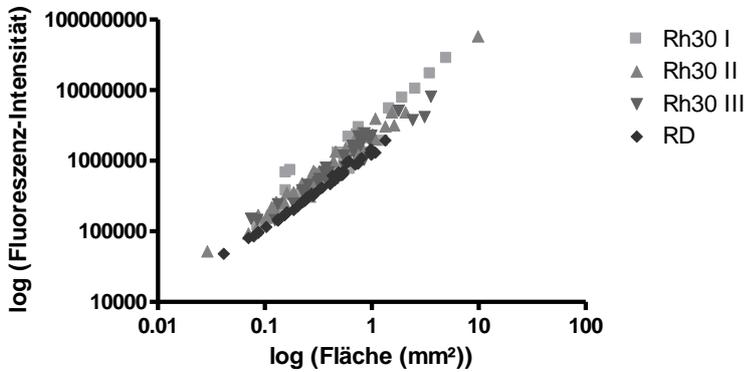


Abbildung 46: Korrelation der Fluoreszenz-Intensität mit der Tumorfläche *ex vivo*. Mittels Bildanalyse wurden die Flächen und Fluoreszenz-Intensitäten der Tumoren ermittelt, die im Bildgebungsgerät auf den einzelnen Organen detektiert worden waren. Jeder Datenpunkt steht für einen Tumor auf einem Organ einer bestimmten Maus. Zur besseren Übersichtlichkeit wurde eine doppellogarithmische Darstellung gewählt.

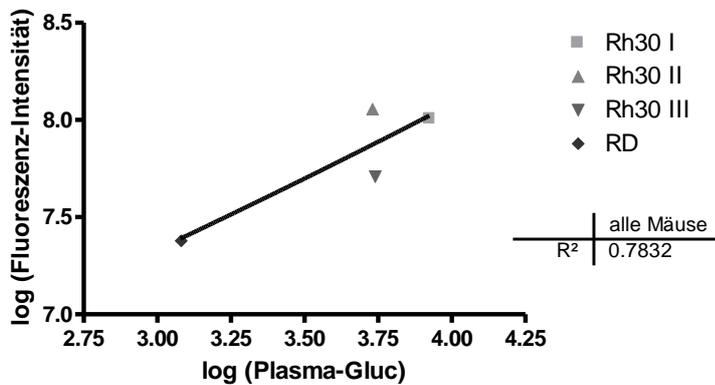


Abbildung 47: Exponentieller Zusammenhang der Fluoreszenz-Intensitäten *ex vivo* mit dem Plasma-GLuc-Level. Die Fluoreszenz-Intensitäten der einzelnen Tumoren je Tier wurden aufsummiert und den entsprechenden Plasma-GLuc-Werten ($\log(\text{RLU})$, vgl. 3.4.1) in einer doppellogarithmischen Darstellung gegenübergestellt. Es zeigte sich bei allen Mäusen eine ungenügende Annäherung ($R^2 < 0,9$) an einen exponentiellen Kurvenverlauf ($y = 5,48 * e^{0,1x}$).

Die Summe der gemessenen Tumorflächen wurde direkt der gemessenen Plasma-GLuc-Konzentration gegenüber gestellt und es konnte ein exponentieller Zusammenhang beobachtet werden, das Bestimmtheitsmaß R^2 lag bei $> 0,9$ (Abbildung 48).

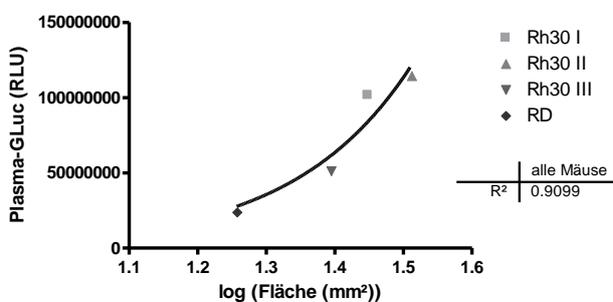


Abbildung 48: Exponentieller Zusammenhang der Plasma-GLuc-Konzentration mit der Tumorfläche *ex vivo*. Es wurde je Maus und Zeitpunkt die Summe der gemessenen Tumorflächen gebildet und den entsprechenden Plasma-GLuc-Werten (vgl. 3.4.1) gegenüber gestellt. Es zeigte sich bei allen Mäusen eine gute Annäherung ($R^2 > 0,9$) an einen exponentiellen Kurvenverlauf ($y = 18996 * e^{5,8x}$).

Eine Messung der Biolumineszenz-Intensitäten durch Auftrag des Substrates Coelenterazin auf die Tumoren *ex vivo* wurde versucht, war jedoch nicht erfolgreich.

Wie beispielsweise für den subkutanen Tumor der Maus Rh30 II dargestellt, wurde eine sehr schwache Lumineszenz-Aktivität im Randbereich des Tumors beobachtet (Abbildung 49A). Nach Injektion des GLuc-Substrates in das Tumorgewebe war eine schwache, heterogene Lumineszenz messbar (Abbildung 49B). Auf eine Quantifizierung wurde verzichtet.

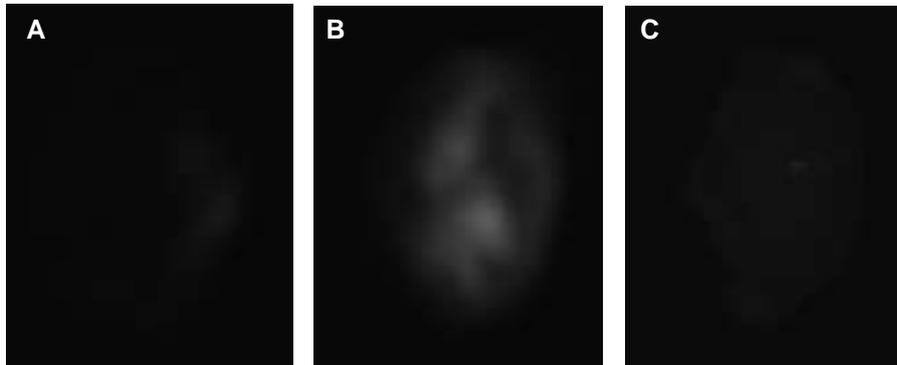


Abbildung 49: Detektion der Biolumineszenz der RMS-Tumoren *ex vivo*. 36 Tage nach Xenotransplantation wurden die Mäuse euthanasiert und die Biolumineszenz der aus der Bauchhöhle entnommenen Organe gemessen. Nach Substratauftrag (A) bzw. Injektion in das Tumorgewebe (B) wurde die Lumineszenz (GLuc, 2 min Substrataufnahme, 60 sec Belichtung) aufgezeichnet. Dargestellt sind beispielhaft die Aufnahmen des subkutanen Tumors von Rh30 II und zum Vergleich die Hellfeldaufnahme (C).

Abschließend wurde im Vergleich mit den *in vivo*-Aufnahmen und den PET/MRT-Untersuchungen ersichtlich, dass deutlich mehr Tumoren *ex vivo* detektiert wurden (Tabelle 6). Unter Annahme kugelförmiger Tumoren wurden anhand der bemessenen Tumorflächen die Volumina errechnet. Auch hier zeigt sich *ex vivo* eine höhere Tumorlast gegenüber der *in vivo*- und MRT-Bildgebung.

Tabelle 6: Vergleich Anzahl und Volumen der beobachteten Tumoren bei der optischen Bildgebung *in vivo*, in der PET/MRT-Messung und *ex vivo*.

	Tumoren (St/mm ³)	Optische Bildgebung <i>in vivo</i>	PET/ MRT	Optische Bildgebung <i>ex vivo</i>
Rh30 I	Anzahl	5	7	34
	Volumen	591	710	891
Rh30 II	Anzahl	2	6	42
	Volumen	660	559	1230
Rh30 III	Anzahl	4	3	33
	Volumen	387	315	690
RD	Anzahl	5	2	45
	Volumen	118	59	328

3.4.6 Histologie der Tumoren

Die histochemische Untersuchung der explantierten Tumoren erlaubte deren Identifikation und Klassifikation als RMS. Beispielhaft dargestellt sind in Abbildung 50 die histomorphologischen Aufnahmen der alveolären Rh30-Tumoren. Deutlich zu erkennen waren die ganz charakteristischen rundlichen Zellen mit relativ großen rundlichen Zellkernen und verhältnismäßig schmalen Zytoplasma. Die Tumorzellen waren in großen soliden Komplexen angeordnet, durchzogen von typischen „Alveolen“-artigen Hohlräumen.

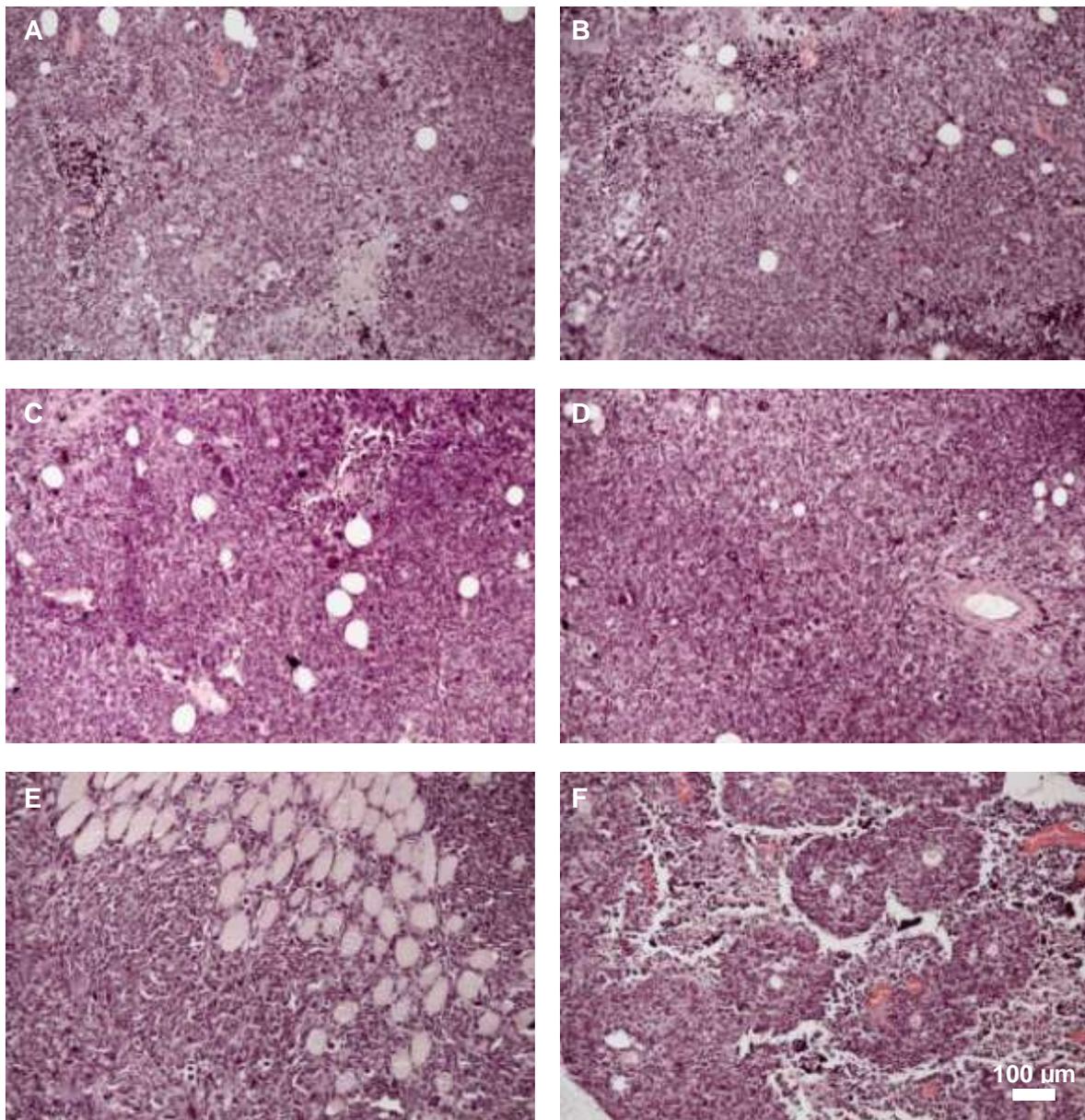


Abbildung 50: Histochemische Identifikation der explantierten RMS-Tumoren. Dargestellt sind HE-gefärbte Schnitte eines am Magen lokalisierten Tumors der Maus Rh30 I (A, B), eines Darmtumors (C, D) sowie des subkutanen Tumors aus Rh30 II (E, F).

Neben der Klassifikation als RMS ermöglichten die HE-gefärbten Schnitte zusätzlich eine Aussage über die Zellvitalität der Tumoren. Nekrose ist gekennzeichnet durch kleine, dichte und dunkelblau angefärbte Zellkerne. Aufgrund des Zellkollapses kommt es teilweise zu einer Aggregation zytoplasmatischer Bestandteile, einer sogenannten Hypereosinophilie. Des Weiteren kann das Zytoplasma blass und schemenhaft erscheinen, bedingt durch den Abbau zytoplasmatischer Proteine. So waren kleinere nekrotische Areale beim dargestellten Magen- und Darmtumor ersichtlich (Abbildung 50A-C). Eine besonders starke Nekrose wurde beim subkutanen Tumor beobachtet (Abbildung 50F).

4. Diskussion

4.1 Evaluierung von Cetuximab bei RMS

Neue immuntherapeutische Behandlungsansätze bei Krebs werden derzeit intensiv erforscht. Bislang sind bei RMS keine spezifischen Zielstrukturen für monoklonale Antikörper bekannt. EGFR ist auf der Zellmembran lokalisiert, wurde im Vergleich zu ARMS vorwiegend in ERMS detektiert (96) und könnte als geeignetes Zielgen einer Antikörpertherapie fungieren. Durch Mikroarray-Genexpressionsanalysen sowie Immunhistochemie wurden weitere mögliche Zielgene für neue Therapiekonzepte entschlüsselt. Beispielsweise wurde in ERMS, ARMS und in den entsprechenden Zelllinien eine konstante Überexpression des Rezeptors für die insulinähnlichen Wachstumsfaktoren beschrieben (97). Andere an der Zelloberfläche befindliche Moleküle, wie Glypican-5 und Midkine, ein an Cystein und basischen Aminosäuren reicher heparinbindender Wachstumsfaktor, wurden häufig in menschlichen Weichteilsarkomen und insbesondere bei RMS detektiert (98-99). Des Weiteren wurde eine hohe Expression der Gene MAP2K4 und MCL1 in RMS-Proben nachgewiesen, die als Bindungsstelle für Antikörper genutzt werden könnten (100). Für beide Proteine gibt es jedoch weder therapeutische Antikörper noch ist ihre subzelluläre Lokalisation im Zytoplasma bzw. in der mitochondrialen Membran für eine Immuntherapie geeignet. Niedermolekulare Inhibitoren oder Aktivatoren sind für alle genannten Zielstrukturen verfügbar, im Vergleich zu monoklonalen Antikörpern sind diese jedoch eher unspezifisch und binden eine Vielzahl verwandter Enzyme.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von EGFR in RMS-Zellen und Tumorproben untersucht. Darauf aufbauend wurde der humanisierte monoklonale Antikörper gegen EGFR, Cetuximab, *in vitro* evaluiert. Mittels Genexpressionsanalyse konnte eine hohe Expression von EGFR auf mRNA-Ebene in RMS-Geweben nachgewiesen werden. Hierbei wurde eine mehr als zweifach erhöhte Expression in ERMS verglichen mit ARMS Gewebeproben festgestellt. Wie bereits publiziert, wurde anhand eines diagnostischen Antikörpers in 76 % der ERMS und in 16 % der getesteten ARMS Gewebeproben die Expression von EGFR bestätigt (101). Folglich wurden EGFR-exprimierende RMS-Zellen mit spezifischen, mit Zellgiften beladenen Antikörpern inkubiert und eine signifikante Inhibierung des

Zellwachstums und der Proteinsynthese sowie eine starke Zunahme der Apoptose konnte beobachtet werden (102). Dies bestätigt das therapeutische Potential von EGFR als neue Zielstruktur für Immuntoxine bei RMS.

Cetuximab, ein bereits zugelassener therapeutischer Antikörper gegen EGFR, wurde für die vorliegenden Forschungsergebnisse ausgewählt. Außerdem von ERMS (RD) und ARMS (Rh30) abstammende Zelllinien mit einer hohen Expression von EGFR, welche durchflusszytometrisch mit Cetuximab bestätigt werden konnte. Die Rh30-Zelllinie könnte vom seltenen, EGFR-positiven ARMS-Gewebe herrühren, dies würde die unerwartete Expression von EGFR erklären. Obwohl über 76 % der ERMS EGFR exprimieren, konnte keine Bindung von Cetuximab an die embryonale Zelllinie A-204 nachgewiesen werden. Die fehlende Expression von EGFR bei A-204 wurde bereits in anderen Studien beobachtet (103). Unabhängig von der EGFR-Expression wurde die Proliferation der RMS-Zelllinien in serumfreiem Medium weder durch EGF noch durch Cetuximab beeinflusst. Kürzlich wurden Fortschritte im Verständnis des EGFR-Signalweges gemacht, insbesondere in Bezug auf die Rolle der Ras-Proteine. Für Dickdarmkrebs wurde berichtet, dass Mutationen im K-Ras-Gen für die Resistenz der Tumorzellen gegenüber Cetuximab verantwortlich sind (104). Dies muss vor einer Behandlung mit dem monoklonalen Antikörper überprüft werden. Allerdings wurden in nur 2 von 38 untersuchten ERMS und in keinem der 12 untersuchten ARMS-Geweben eine K-Ras-Mutation festgestellt (105). Dementsprechend kann bei der Mehrheit der RMS-Tumoren eine Antwort auf blockierende Antikörper wie Cetuximab erwartet werden. In Bezug auf die Zelllinien wurde weder bei Rh30 noch bei A-204 eine Mutation innerhalb der Ras-Genfamilie beschrieben. Die ERMS-Zelllinie RD hingegen enthält nur eine N-Ras-Mutation (106). Die Tatsache, dass EGF das fehlende Serum nicht kompensieren konnte, lässt vermuten, dass andere Wachstumsfaktoren des Rinderserums für die Proliferation der RMS-Zellen von Bedeutung sind. Die beobachtete ausbleibende Antwort auf EGF könnte innerhalb des Signaltransduktionsweges - bedingt durch die Langzeitkultivierung der Zellen - entstanden sein. Darüber hinaus wurde eine Wechselwirkung zwischen zahlreichen Kinasen (z.B. EGFR, MET, TGF β R2) in RMS-Zelllinien beobachtet. Es könnte also erforderlich sein, mehrere Kinase-Signalwege gleichzeitig zu beeinflussen, um das Wachstum der RMS-Zellen ausreichend zu inhibieren. Eine synergistische Hemmung des Wachstums mancher RMS-Zellen wurde beobachtet, nachdem EGFR mit

Kinaseinhibitoren wie Gefitinib und in Kombination mit Inhibitoren des Rezeptors für insulinähnliche Wachstumsfaktoren ausgeschaltet wurde (107).

Cetuximab aktiviert ein breiteres Spektrum an Effektormechanismen verglichen mit niedermolekularen Tyrosinkinase-Inhibitoren. Diese zielen auf die intrazelluläre Tyrosinkinase-Region des EGF-Rezeptors (108). Cetuximab zählt zur Subklasse der IgG1-Antikörper und kann immunologische Antworten wie die ADCC induzieren (109-112). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die wirksame ADCC-Aktivität von Cetuximab und die effektive Lyse der RMS-Zellen spezifisch für EGFR-exprimierende Zellen waren. Weder ADCC noch die Bindung von Cetuximab konnten bei der Zelllinie A-204 beobachtet werden. Des Weiteren konnte eine Dosis-Abhängigkeit der ADCC-Aktivität nachgewiesen werden. Bei hohen Antikörper-Konzentrationen (0,5 mg/ml) war die ADCC-Aktivität gesättigt. Dies entspricht den Literaturangaben, die maximale Cetuximab-vermittelte ADCC-Aktivität wurde für Lungenkrebszellen bei einer Konzentration von 0,25 mg/ml beschrieben (111). Dennoch war die Cetuximab-stimulierte Lyse auch bei geringen Konzentrationen wie 0,05 mg/ml detektierbar. Da die ADCC in einem allogenen Setting mit dementsprechend inkompatibler HLA-Expression auf den Effektorzellen durchgeführt worden war, ergab sich die beobachtete Abhängigkeit der Stärke der zytotoxischen Effekte vom Spender. Des Weiteren könnte die variierende Lyse-Aktivität das Ergebnis des F_cγR-Polymorphismus sein. Dieser spielt eine wichtige Rolle bei der Lyse von Tumorzellen durch therapeutische Antikörper, darunter Cetuximab. Die Wirksamkeit der ADCC in einem autologen Setting, wie es bei Patienten vorgefunden werden kann, bleibt unklar. Ein weiterer Effektormechanismus des angeborenen Immunsystems ist die CDC. Für Tumorzellen des Epidermoidkarzinoms und des Glioblastoms wurde bereits beschrieben, dass spezifische Kombinationen von Antikörpern gegen EGFR eine effektive CDC auslösen konnten (113). Mit Cetuximab wurde jedoch keine bedeutende CDC gegenüber den RMS-Zellen beobachtet. Andere gegen EGFR gerichtete Antikörper wie Panitumumab, Matuzumab und Nimotuzumab könnten hierbei effektiver wirken, da sie vollständig humanisiert sind (114).

Die vielversprechende Wirksamkeit therapeutischer Antikörper gegen EGFR auf RMS-Zellen *in vitro* muss *in vivo* überprüft werden, zum Beispiel in einem RMS-Tiermodell mit adaptivem humanem Immunsystem (siehe 4.4). Der chimäre Antikörper

Cetuximab kann als alternativer Behandlungsansatz bei Hochrisiko-ERMS mit hoher EGFR-Expression in Erwägung gezogen werden. Aus der gewonnenen Expressionsdatenbank sollten noch weitere Zielstrukturen für das neue Feld der therapeutischen Antikörper evaluiert werden. Gegen vielversprechende Zielstrukturen könnte ein Set monoklonaler Antikörper hergestellt werden, die gegen extrazelluläre Epitope gerichtet sind und eine weiterführende Eignungsanalyse der Targets ermöglichen. Hierzu gehört die Überprüfung der spezifischen Wirkung gegen das Tumorwachstum, die Untersuchung des Wirkmechanismus sowie die Beurteilung von Nebenwirkungen und Effektivität der Antikörper. Auf diese Weise könnten Antikörper gegen RMS für präklinische und klinische Studien entwickelt werden, die unabhängig von der histologischen Klassifikation wirksam sind.

4.2 Etablierung eines monoklonalen Antikörpers

Ein anderer Ansatz der Entwicklung einer Antikörpertherapie gegen das RMS ist es, Antikörper mit einer hohen Affinität zu beiden histologischen Subtypen durch Screening einer Antikörperbank näher zu charakterisieren, deren Antigene sowie ihre therapeutische Wirksamkeit zu evaluieren. Von Herrn Dr. Bühring wurde mittels Hybridoma-Technologie eine Antikörperbank durch Immunisierung von Mäusen mit Gewebeproben aus kindlichen Tumoren hergestellt. Diese Hybridomüberstände wurden gezielt auf ihre Bindung an drei RMS-Zelllinien durchflusszytometrisch gescreent. Der Antikörper 58B1A2 zeigte eine starke Bindung sowohl an die getesteten ARMS-, als auch an die ERMS-Zellen. Darüber hinaus hat der Antikörper an malignem RMS-Gewebe gebunden, jedoch nicht an gesundem Lebergewebe.

Die hohe Expression des Antigens konnte jedoch nicht genutzt werden, um eine ADCC-Aktivität des neuen Antikörpers zu beobachten. Allerdings wurde durch 58B1A2 die Proliferation von RMS-Zellen geringfügig gehemmt. Die negativen ADCC-Ergebnisse könnten auf den Isotyp des unbekanntes Antikörpers zurückzuführen sein, weshalb im Folgenden die Charakterisierung des unbekanntes Antigens angestrebt wurde. Darauf aufbauend kann das immuntherapeutische Potential eines kommerziellen Antikörpers gegen dasselbe Antigen evaluiert werden.

Eine Detektion des gebundenen Proteins in Western Blots war nicht möglich. Die durchgeführten Immunpräzipitationen und LC/MS-Analysen lieferten - trotz chemischer Vernetzung von Antigen und Antikörper - intrazelluläre Proteine. Diese können jedoch die durchflusszytometrisch beobachtete hohe Affinität des 58B1A2-Antikörpers zu der RMS-Zelloberfläche nicht erklären. Die Vermutung lag nahe, dass es sich bei dem gesuchten Antigen eventuell um ein Kohlenhydrat-Antigen handeln könnte. Dies wurde jedoch durch Oxidation der Zuckerketten mit Periodat-Lösung und anschließende Immunzytochemie ausgeschlossen.

Die Durchmusterung einer Antikörperbank mittels Durchflusszytometrie unfixierter Zellen erlaubt die Selektion geeigneter Antikörper basierend auf einer direkten Antigen-Antikörper-Interaktion. Allerdings ist eine Charakterisierung und Optimierung des Antikörpers - wie im vorliegenden Fall - nicht immer garantiert. Aus diesem Grund sollte die Antikörperauswahl durch gleichzeitige Anwendung mehrerer Methoden sensitiviert werden. Hierzu gehören Untersuchungen der

Hybridomzellüberstände in Western Blots, immunhistochemische Analysen mittels Gewebearrays sowie der Einsatz von Protein-Chips, die eine Erkennung nativer und nicht-nativer Antigene ermöglichen. Da es nicht gelang, das Antigen des eventuell „idealen“ therapeutischen Antikörpers gegen beide Subtypen des RMS zu charakterisieren, wurde im Folgenden ein breiteres Ansprechen des Immunsystems durch kommerziell erhältliche Antikörper und Modulatoren mit dem Ziel einer verbesserten Immuntherapie des RMS untersucht.

4.3 Phagozytose bei RMS

Für verschiedene Tumoren, darunter die akute myeloische Leukämie (115), Blasenkrebs (116) und das Non-Hodgkin-Lymphom (117) konnte gezeigt werden, dass Immunzellen nach Blockade des CD47-Proteins durch einen Antikörper die Krebszellen erfolgreich eliminieren. Hierbei wird der therapeutische Effekt vorwiegend über die Phagozytose durch Makrophagen vermittelt (118). Dies konnte bei akuter lymphatischer Leukämie einerseits *in vitro* belegt werden, andererseits wurde auch *in vivo* das Anwachsen transplantierte Tumorzellen durch einen Antikörper gegen CD47 verhindert (119). Früher wurde vermutet, dass die Blockade von CD47 mit Antikörpern die Apoptose der Tumorzellen auslöst (120-123). Mittlerweile wird die Idee vertreten, dass die Antikörperbindung an CD47 die Interaktion von CD47 mit SIRP α stört und auf diese Weise ein phagozytoseinhibierendes Signal unterbunden wird (115). CD47 wird jedoch nicht nur auf Tumorzellen stark exprimiert, sondern auch auf Normalgewebe (50). Allerdings konnten mögliche toxische Effekte einer CD47-Antikörpertherapie ausgeschlossen werden (119). Für den gezielten Angriff der Tumorzellen ist neben einer Blockade des negativen Signals durch CD47-Antikörper eine gleichzeitig hohe Oberflächenexpression des aktivierenden Signals Calreticulin verantwortlich. Calreticulin wird zwar in allen Zellen exprimiert, allerdings wird bei gesunden Zellen höchstens eine sehr schwache Präsentation an der Zelloberfläche beobachtet. Für zahlreiche Krebszellen hingegen wurde eine starke extrazelluläre Präsentation nachgewiesen (49).

Aufgrund dieser Datenlage bestand die Annahme, dass die Blockade von CD47 einen vielversprechenden Ansatz gegen eine Vielzahl von Krebserkrankungen, darunter auch RMS, darstellt. Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten belegen eine hohe Expression von CD47 auf RMS-Geweben und -Zellen, was bei der Immunevasion von RMS eine Rolle spielen könnte. Darüber hinaus wurde in der Genexpressionanalyse eine signifikante Assoziation zwischen einer höheren CD47-Expression und dem aggressiveren ARMS-Subtyp festgestellt. Eine messbare Phagozytoserate wurde nach mehr als vier Tagen Kokultur von GM-CSF aktivierten Makrophagen mit RMS-Zellen beobachtet. Eine stärkere Phagozytose wurde nur durch eine Erhöhung des Makrophagenanteils erzielt. Derartige Kokulturen mit Stammzellen akuter myeloischer Leukämie und stimulierten Makrophagen belegten

hingegen eine schnelle Phagozytose der Tumorzellen innerhalb von zwei Stunden (115). Aus diesem Grund scheinen die RMS-Zellen vergleichsweise unempfindlicher gegenüber der makrophagenvermittelten Phagozytose zu sein. Der Einsatz eines nachweislich CD47-blockierenden monoklonalen Antikörpers sollte durch Unterbrechung der CD47-SIRP α -Interaktion die Phagozytoserate steigern (124). In einem Testansatz von 24 Stunden wurde keine Verstärkung der Phagozytose beobachtet. Dies könnte durch zu wenig makrophagenaktivierende Signale auf den RMS-Zellen bedingt sein.

Neben GM-CSF und Phosphatidylserin, welche mit zahlreichen Makrophagenrezeptoren interagieren, fungiert Calreticulin auf der Oberfläche von Tumorzellen als Ligand des aktivierenden Makrophagenrezeptors LRP/CD91 (48, 125-126). Des Weiteren wird Annexin-1 intensiv erforscht (127). Unter physiologischen Stressbedingungen, darunter Apoptose, wird die Expression vieler Stressproteine angeregt, hierzu gehört auch Calreticulin (128). Dies führt zu einer erhöhten Menge von Calreticulin auf der Zelloberfläche (129). Allerdings ist der genaue Mechanismus, wie Calreticulin an die Zelloberfläche transportiert wird, noch unklar. Stressbedingungen wurden durch geringe Dosen des Zytostatikums Vincristin ausgelöst. Vincristin wiederum spielt eine bedeutende Rolle bei der Chemotherapie von RMS und induziert die Apoptose von Tumorzellen (130). Eine verstärkte Zellschädigung - bedingt durch Vincristin - führte nicht zu einer gesteigerten Phagozytose von RMS-Zellen mittels Makrophagen. Die Ursache ist vermutlich eine zu schwache Expression des aktivierenden Faktors Calreticulin auf der Tumorzelloberfläche. Sowohl nach Inkubation mit Vincristin als auch mit SAHA blieb Calreticulin innerhalb der RMS-Zellen und konnte mit den getesteten Reagenzien nicht an die Zelloberfläche gebracht werden. SAHA führt zu einer veränderten Genexpression und beeinflusst so Apoptose, Zellteilung und angeborene Immunantwort (131-132). Auf diese Weise kann auch die Expression verschiedener Rezeptoren auf der Zelloberfläche moduliert werden, wie es im Falle der Induktion von immunmodulatorischen Molekülen bei NK-Zellen gezeigt wurde (46-47, 133). Eine erhöhte Empfindlichkeit der RMS-Zellen gegenüber den Makrophagen nach Inkubation mit SAHA wurde nicht beobachtet. Allerdings sind Anthracycline in der Lage, den Transport von Calreticulin an die Zelloberfläche zu induzieren. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine Dosis-Abhängigkeit der Calreticulin-Präsentation nach Doxorubicin-Behandlung. Bei Kolonkarzinomzellen wurde bei

gleicher Inkubationsdauer eine Konzentration von 25 μM Doxorubicin beschrieben, umgerechnet 14,5 $\mu\text{g/ml}$ (134). Bei den RMS-Zellen konnten bereits durch 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Doxorubicin neben einer durchflusszytometrisch messbaren Calreticulin-Expression eine deutlich gesteigerte Phagozytoserate nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte ein unterschiedliches Ansprechen der ERMS- im Vergleich zu den ARMS-Zellen beobachtet werden. Bei gleicher Doxorubicin-Konzentration zeigten die ERMS-Zellen eine höhere extrazelluläre Calreticulin-Präsentation und dementsprechend eine effizientere Phagozytoserate, wobei sie durch alleinige Zugabe des Zytostatikums nicht stärker beeinträchtigt wurden als die ARMS.

Es konnte klar gezeigt werden, dass Makrophagen in der Lage sind, allogene RMS-Zellen unter Zell-zu-Zell-Kontakt-Bedingungen zu phagozytieren. Nach GM-CSF-Aktivierung der Makrophagen und Kokultur mit RMS-Zellen sank die Vitalität der Tumorzellen ohne weitere Zusätze auf 50-60 %. Nach Aktivierung von Calreticulin konnte die effiziente Phagozytose der ERMS-Zellen auf 90 % gesteigert werden. Diese vielversprechende Wirksamkeit *in vitro* muss *in vivo* überprüft werden. Doxorubicin kann die Effizienz adoptiver Immun- und Chemotherapieprotokolle erhöhen. Bislang wird Doxorubicin in einer Kombination mit Ifosfamid und Vincristin erst spät im Therapieprotokoll eingesetzt. Durch eine Aufnahme von Doxorubicin in die Therapieempfehlung in den ersten Zyklen der Chemotherapie kann dessen immunologische Aktivität den Therapieerfolg verbessern.

4.4 *In vivo* Modell zur Evaluierung immuntherapeutischer Ansätze

Neue experimentelle immuntherapeutische Ansätze bei RMS im fortgeschrittenen Stadium können eine Möglichkeit darstellen, den Behandlungserfolg betroffener Patienten zu verbessern. Bevor jedoch klinische Studien durchgeführt werden können, werden Modellorganismen untersucht. Diese werden mit einfachen Methoden gezüchtet und zeichnen sich durch eine kurze Generationsdauer sowie eine kostengünstige und unkomplizierte Haltung aus. Da sich das Immunsystem erst in den Wirbeltieren entwickelt hat, werden Mausmodelle für immunologische Studien geschätzt. Zwar kann der Zustand des Tieres anhand seiner Körpersprache analysiert werden, das gezielte Monitoring von Tumorwachstum und Behandlungserfolg *in vivo* stellt hingegen eine Schwierigkeit dar. Im Bereich der molekularen Bildgebung wurden für das RMS bereits erste Arbeiten zur Transfektion der Tumorzellen mit fluoreszierenden Proteinen durchgeführt (135). Hierbei zeigte sich, dass die Tumorzellen aufgrund ihrer Fluoreszenzeigenschaften sowohl *in vitro* als auch *in vivo* visualisierbar waren und erstmals eine Beobachtung der xenotransplantierten Tumorzellen im Tiermodell erlaubten. Darüber hinaus konnte auf Einzelzellebene im Kapillarsystem der Mäuse die Metastasierung von RMS-Zellen, bestehend aus Akkumulation und anschließender Extravasation, beobachtet werden (136). Dabei zeigte sich auch bei einer intraperitonealen Applikation der RMS-Zellen ein metastatisches Tumorwachstum.

Dieses Tiermodell wurde in der vorliegenden Arbeit derart weiterentwickelt, dass die RMS-Zellen stabil mit dem rot-fluoreszierenden mCherry-Protein transduziert wurden. Dies ermöglicht ein kontinuierliches Monitoring des Tumorwachstums bzw. Therapieansprechens *in vivo*. Außerdem wurden die RMS-Zellen stabil mit dem Enzym Gaussia Luciferase transfiziert, welches ins Plasma sekretiert wird. Auf diese Weise kann zum einen - bedingt durch die Biolumineszenz - als auch andererseits durch die Entnahme geringer Blutproben und Bestimmung der Enzymaktivität im Plasma ebenfalls das Tumorwachstum verfolgt werden. Mit dieser Methode wurde ein exponentieller Anstieg der Luciferase-Aktivität im Plasma und damit des Tumolvolumens in den fünf wöchentlich beobachteten Tieren verzeichnet. Das Wachstum der RD-Xenotransplantate fiel - verglichen mit Rh30 - deutlich geringer aus, obwohl die RD-Zellen *in vitro* eine geringfügig höhere Biolumineszenz-Aktivität

aufwiesen. Anhand der Fluoreszenz-Bildgebung *in vivo* wurden bei der RD-Maus zwar überraschend mehr Tumoren als bei den Rh30-Mäusen detektiert, jedoch mit insgesamt deutlich geringerem Tumolvolumen. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass sich die alveolären Rh30-Zellen biologisch aggressiver verhalten als die embryonalen RD-Zellen (137). Sie zeigen ein schnelleres Wachstum *in vitro*, welches auch *in vivo* bei vergleichbarer Tumorinzidenz die Formierung verhältnismäßig größerer Xenotransplantate begünstigt.

Das Plasma-Monitoring hat sich im Vergleich zur Fluoreszenz-Bildgebung *in vivo* als sensitiver erwiesen, da schon bevor die Tumoren mittels Fluoreszenzmessung nachweisbar waren, eine erhöhte GLuc-Aktivität gemessen werden konnte. Die Detektion der Fluoreszenz *in vivo* erforderte wiederum eine höhere Zellzahl, konnte jedoch durch helle, deutliche Signale überzeugen. Allerdings war - bedingt durch die Autofluoreszenz endogener Fluorophore - das Signal-Rausch-Verhältnis schlechter als bei der Biolumineszenz-Messung. Hierfür war zwar keine Anregung erforderlich, jedoch die Zugabe des Substrates Coelenterazin. Es wurden sehr schwache und heterogene Signale beobachtet, welche keine Bestimmung der Tumorphäche und damit keinen Vergleich mit der GLuc-Aktivität im Plasma der Tiere ermöglichten. Darüber hinaus zeigten die mittels Fluoreszenz sehr deutlich detektierten subkutan lokalisierten Tumoren kein Lumineszenzsignal. Eventuelle Ursache könnte sein, dass Coelenterazin in wässriger Lösung schlecht löslich ist und nicht bis ins Tumorkompartiment vordringt. Bei gleichem Protokoll wurde dies hingegen bei intravenöser Injektion nicht als störend empfunden (138). Allerdings könnte auch eine mögliche Hypoxie in der verkapselten Struktur der Hauttumoren die Umsetzung des Substrates verhindern. Erste Anzeichen hierfür sind die anhand der histologischen Untersuchung detektierten Nekrosen in den entsprechenden Tumoren. Außerdem war auch nach direkter Injektion des Substrates in die Hauttumoren kein Lumineszenzsignal detektierbar. Durch weitere PET-Messungen mit dem hypoxiesensitiven Tracer [¹⁸F]FMISO könnte diese Fragestellung näher untersucht werden (139). Grundsätzlich befürworten die vorliegenden Daten mit dem dualen Reportersystem zwar einerseits die Bestimmung der Lumineszenzaktivität im Plasma als sensitiven Parameter, im Falle der *in vivo*-Bildgebung konnte hingegen die Messung der Fluoreszenz überzeugen. Durch die Entwicklung neuer technischer Verfahren zur Reduzierung der Autofluoreszenz könnte dieses Nachweisverfahren noch optimiert werden.

Neben Fluoreszenz und Biolumineszenz wurde die Kombination von PET und MRT in dieser Arbeit beim RMS-Mausmodell eingesetzt und evaluiert. Die derzeit in der Klinik am häufigsten benutzte Bildgebung mittels MRT ist oft nicht ausreichend, um zwischen vitalem Tumor und umgebenden Gewebe zu unterscheiden. Eine Kombination mit der Computertomographie (CT) würde zwar eine Differenzierung erlauben, ist jedoch aufgrund der hohen Strahlenbelastung bei pädiatrischen Patienten nicht vertretbar. Eine Darstellung im PET bietet eine hohe Sensitivität und Spezifität im Vergleich zu CT, MRT und Knochenszintigraphie. Bei einzelnen PET-Untersuchungen bei RMS-Patienten wurden 10 von 96 Tumoren übersehen (140). Eine Kombination aus PET und MRT könnte die Sensitivität erhöhen (141). Bei Mäusen mit syngemem RMS konnte mittels einer Kombination aus PET und MRT die Effektivität einer Strahlentherapie verfolgt werden (142). Es zeigte sich, dass eine Bildgebung mittels PET/MRT bei murinen Tumoren, die an den Extremitäten lokalisiert sind, technisch möglich ist. Die vorliegenden Ergebnisse mit den Tracern [^{18}F]FDG, [^{11}C]Cholin und [^{18}F]FLT belegen, dass eine Bildgebung auch bei intraabdominellen, humanen Tumoren durchführbar ist. Bezüglich Kontrast und Lokalisation scheint der [^{18}F]FLT-Tracer für die humanen RMS-Tumoren in der Maus am geeignetsten zu sein, da dieser die wenigsten Hintergrundsignale verursacht.

Um die Ergebnisse der optischen Bildgebung und der PET/MRT-Messung zu validieren, wurden am Versuchsende die exponierten Organe der Mäuse untersucht. Eine exponentielle Korrelation der Luciferase-Aktivität im Plasma mit den *ex vivo* durch Fluoreszenzmessung ermittelten Tumorflächen konnte erneut beobachtet werden. Vergleicht man die detektierte Anzahl der Tumoren und ihre Volumina durch optische Bildgebung *in vivo*, PET/MRT *in vivo* und Fluoreszenzmessung *ex vivo*, so wurde bei allen Tieren die höchste Tumorklast *ex vivo* ermittelt. Deutlich darunter liegen die Ergebnisse der beiden *in vivo*-Methoden, allerdings wiederum in einem ähnlichen Größenbereich. Die Sensitivität beider Verfahren wird durch die Haut der Tiere und diverse Hintergrundsignale, bedingt durch das weiße Tierfell bzw. unspezifische Tracer-Anreicherungen, stark herabgesetzt. Hierbei spielt auch die Lokalisation der Tumoren im Tier eine Rolle, so werden bei der optischen Bildgebung des Bauchraumes Tumoren unter der Leber oder dem Darm verdeckt. Dies kann durch eine dreidimensionale Bildgebung wie beim PET/MRT vermieden werden. Allerdings werden RMS-Tumoren oft im Bereich der Blase beobachtet und sind in der PET-Analyse mit FDG oder FLT nicht vom starken unspezifischen Signal der Blase

abzugrenzen. Dies kann hingegen durch den Einsatz des [^{11}C]Cholin-Tracers umgangen werden, dieser reichert sich nicht in der Blase an. Jedoch muss dessen Handhabung aufgrund der sehr kurzen Halbwertszeit von 20 Minuten noch weiter optimiert werden, um das in dieser Arbeit detektierte starke Hintergrundsignal zu verhindern.

Zusammenfassend hat das PET/MRT-Verfahren mit dem radioaktiven Tracer [^{18}F]FLT zwar das Potenzial, zukünftig das Monitoring experimenteller immuntherapeutischer Ansätze beim RMS-Mausmodell *in vivo* zu gewährleisten. Zur Validierung einer immunologischen Wirkung könnte sogar zusätzlich die Migration der Immunzellen in den Tumor durch eine Markierung mit [^{64}Cu]PTSM (143) oder nach radioaktiver [^{64}Cu]-Markierung des Antikörpers dessen Bindung im Tumorgewebe beobachtet werden (144). Allerdings erfordert dieses Verfahren teure Spezialgeräte, eine umfassende Expertise, sowie - bedingt durch den raschen Zerfall der Isotope - ein Zyklotron vor Ort. Ferner gestalten hohe Betriebskosten sowie lange Aufnahmezeiten ein intensives Therapiemonitoring bei der Maus impraktikabel. Die Bestimmung der GLuc-Biolumineszenz hingegen ist schnell durchführbar, Probleme bereitet jedoch die erhebliche Absorption des emittierten blauen Lichts im Gewebe ($\lambda_{\text{max}} = 480 \text{ nm}$). Außerdem verursacht das Substrat Coelenterazin nach intraperitonealer Gabe eine starke Autolumineszenz. Beides kann bei der *ex vivo*-Bestimmung der Enzymaktivität im Plasma umgangen werden. Die Aufnahme der Fluoreszenz *ex vivo* ist wiederum unabhängig von einer Substratapplikation und ebenfalls ohne großen technischen Aufwand schnell und kostengünstig durchführbar. Zwar müssen sowohl das zur Anregung des Reporters verwendete Licht einer externen Lichtquelle als auch das emittierte Licht das Gewebe penetrieren und können dadurch in ihrer Intensität abgeschwächt werden. Dem Nachteil einer erschwerten Quantifizierung steht jedoch auch der Vorteil gegenüber, dass eine zusätzliche Detektion und Validierung der Versuchsergebnisse mittels Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie möglich ist. Mit der Fluoreszenzmessung *ex vivo* in Kombination mit der Bestimmung der GLuc-Aktivität im Plasma *ex vivo* stehen zwei ideale Parameter für das Monitoring des Tumorwachstums beim RMS-Metastasemodell zur Verfügung.

5. Zusammenfassung

Neue immuntherapeutische Behandlungsansätze bei Krebs werden derzeit intensiv erforscht. Die Entwicklung einer Antikörpertherapie setzt neben der Auswahl geeigneter Antigene auch die Identifikation therapeutisch wirksamer Antikörper sowie ein Mausmodell zur Überprüfung effizienter Therapiestrategien *in vivo* voraus. Bislang sind beim RMS keine spezifischen Zielstrukturen oder therapeutische Antikörper zur Optimierung vorhandener Therapieverfahren erprobt.

Nach einer Genexpressionsanalyse von RMS-Geweben wurde EGFR als therapeutisches Target ausgewählt und dessen Expression auch auf RMS-Zelllinien nachgewiesen. Mit dem EGFR-bindenden therapeutischen Antikörper Cetuximab wurde eine wirksame ADCC-Aktivität und eine effektive Lyse der RMS-Zellen *in vitro* aufgezeigt. Monoklonale Antikörper, hergestellt durch Immunisierung von Mäusen mit Gewebeproben aus kindlichen Tumoren, wurden auf ihre Bindungsspezifität an RMS-Zellen und -Gewebe charakterisiert. Der Antikörper 58B1A2 zeichnet sich durch eine hohe Affinität zu malignen RMS-Tumoren aus. Sein unbekanntes Antigen konnte weder durch Western-Blots noch durch Immunpräzipitationen und anschließende LC/MS-Analysen identifiziert werden. Um ein breiteres Ansprechen des Immunsystems durch die Aktivierung von Phagozytose zu erlangen, wurden CD47 und Calreticulin moduliert. Für beide Zielstrukturen wurde eine hohe intrazelluläre Expression in RMS-Zellen und -Geweben beobachtet. Eine bioregulatorische Bedeutung des CD47-Antikörpers in Form einer verhinderten Inhibition der Phagozytose konnte beim RMS nicht bestätigt werden. Allerdings wurde durch das Zytostatikum Doxorubicin ein Transport des Makrophagen-Aktivators Calreticulin an die Oberfläche der RMS-Zellen mit einer damit verbundenen effizienten Phagozytose *in vitro* dokumentiert. Darüber hinaus wurden verschiedene *in vivo* Monitoring-Methoden für das Mausmodell des metastasierenden RMS etabliert und validiert. Als qualitativer Parameter des Tumorwachstums hat sich die Bestimmung der GLuc-Aktivität im Plasma der Tiere bewährt. Im Falle der Tumorlokalisierung wurden bei der optischen Bildgebung mittels Fluoreszenz und Biolumineszenz Defizite wahrgenommen. Diese konnten jedoch in einer PET/MRT-Messung mit dem radioaktiven Tracer [¹⁸F]FLT ausgeräumt werden.

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit erzielten Erkenntnisse über eine Immuntherapie mit Antikörpern beim RMS scheinen vielversprechend. Überdies unterstützen die Vorarbeiten zum Mausmodell die weitere Entwicklung neuer Behandlungsstrategien.

6. Referenzen

- (1) McDowell HP. Update on childhood rhabdomyosarcoma. *ArchDisChild* 2003; 88:354-357.
- (2) Pappo AS, Shapiro DN, Crist WM, Maurer HM. Biology and therapy of pediatric rhabdomyosarcoma. *JClinOncol* 1995; 13:2123-2139.
- (3) Leuschner I, Harms D. [Pathology of childhood and adolescent rhabdomyosarcoma]. *Pathologe* 1999; 20:87-97.
- (4) Merlino G, Helman LJ. Rhabdomyosarcoma--working out the pathways. *Oncogene* 1999; 18:5340-5348.
- (5) Ferrari A, Bisogno G, Macaluso A, et al. Soft-tissue sarcomas in children and adolescents with neurofibromatosis type 1. *Cancer* 2007; 109:1406-1412.
- (6) DeBaun MR, Tucker MA. Risk of cancer during the first four years of life in children from The Beckwith-Wiedemann Syndrome Registry. *JPediatr* 1998; 132:398-400.
- (7) Miller RW, Rubinstein JH. Tumors in Rubinstein-Taybi syndrome. *AmJMedGenet* 1995; 56:112-115.
- (8) Wenger SL, Blatt J, Steele MW, et al. Rhabdomyosarcoma in Roberts syndrome. *Cancer GenetCytogenet* 1988; 31:285-289.
- (9) Trahair T, Andrews L, Cohn RJ. Recognition of Li Fraumeni syndrome at diagnosis of a locally advanced extremity rhabdomyosarcoma. *PediatrBlood Cancer* 2007; 48:345-348.
- (10) Wolden SL, Anderson JR, Crist WM, et al. Indications for radiotherapy and chemotherapy after complete resection in rhabdomyosarcoma: A report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Studies I to III. *JClinOncol* 1999; 17:3468-3475.
- (11) Koscielniak E, Morgan M, Treuner J. Soft tissue sarcoma in children: prognosis and management. *PaediatrDrugs* 2002; 4:21-28.
- (12) Ma WW, Adjei AA. Novel agents on the horizon for cancer therapy. *CA Cancer JClin* 2009; 59:111-137.
- (13) Harms D. Soft tissue sarcomas in the Kiel Pediatric Tumor Registry. *CurrTopPathol* 1995; 89:31-45.
- (14) Newton WA, Jr., Soule EH, Hamoudi AB, et al. Histopathology of childhood sarcomas, Intergroup Rhabdomyosarcoma Studies I and II: clinicopathologic correlation. *JClinOncol* 1988; 6:67-75.
- (15) Scrabble H, Witte D, Shimada H, et al. Molecular differential pathology of rhabdomyosarcoma. *Genes ChromosomesCancer* 1989; 1:23-35.
- (16) Enzinger FM, Weiss SH. *Soft tissue tumors* (3 ed). Mosby, StLouis 1995.
- (17) Study protocol of the German Cooperative Soft Tissue Sarcoma Study CWS-96. Stuttgart 1997.
- (18) Seidal T, Mark J, Hagmar B, Angervall L. Alveolar rhabdomyosarcoma: a cytogenetic and correlated cytological and histological study. *Acta PatholMicrobiolImmunolScandA* 1982; 90:345-354.
- (19) Weber-Hall S, McManus A, Anderson J, et al. Novel formation and amplification of the PAX7-FKHR fusion gene in a case of alveolar rhabdomyosarcoma. *Genes ChromosomesCancer* 1996; 17:7-13.
- (20) Harms D. Alveolar rhabdomyosarcoma: a prognostically unfavorable rhabdomyosarcoma type and its necessary distinction from embryonal rhabdomyosarcoma. *CurrTopPathol* 1995; 89:273-296.
- (21) Kelly KM, Womer RB, Sorensen PH, Xiong QB, Barr FG. Common and variant gene fusions predict distinct clinical phenotypes in rhabdomyosarcoma. *JClinOncol* 1997; 15:1831-1836.
- (22) Borys D. Malignant Soft Tissue Tumors. Department of Pathology and Laboratory Medicine, US Davis Medical Center. <http://www.pedorthpath.com>, 22 Jan 2012.
- (23) Sprent J, Surh CD. T cell memory. *AnnuRevImmunol* 2002; 20:551-579.

- (24) Greten TF, Jaffee EM. Cancer vaccines. *CurrProtocHumGenet* 2001; Chapter 13:Unit.
- (25) Carter P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer* 2001; 1:118-129.
- (26) Senter PD. Activation of prodrugs by antibody-enzyme conjugates: a new approach to cancer therapy. *FASEB J* 1990; 4:188-193.
- (27) Bagshawe KD. Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT). *AdvPharmacol* 1993; 24:99-121.
- (28) National Human Genome Research Institute. Talking Glossary of Genetic Terms. <http://www.genome.gov/glossary/?id=7> Juni 2011.
- (29) Urbain J, Wikler M, Franssen JD, Collignon C. Idiotypic regulation of the immune system by the induction of antibodies against anti-idiotypic antibodies. *ProcNatlAcadSciUSA* 1977; 74:5126-5130.
- (30) Tao MH, Levy R. Idiotype/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor fusion protein as a vaccine for B-cell lymphoma. *Nature* 1993; 362:755-758.
- (31) Liu C, Lee A. ADCC enhancement technologies for next generation therapeutic antibody. *Trends in Bio/Pharmaceutical Industry* 2009; 5:13-17.
- (32) Rosenberg SA. A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity* 1999; 10:281-287.
- (33) Brichard V, Van Pel A, Wolfel T, et al. The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* 1993; 178:489-495.
- (34) Brumm C, Schulze C, Charels K, Morohoshi T, Kloppel G. The significance of alpha-fetoprotein and other tumour markers in differential immunocytochemistry of primary liver tumours. *Histopathology* 1989; 14:503-513.
- (35) Seppala M, Pihko H, Ruoslahti E. Carcinoembryonic antigen and alpha fetoprotein in malignant tumors of the female genital tract. *Cancer* 1975; 35:1377-1381.
- (36) Mitsudomi T, Steinberg SM, Nau MM, et al. p53 gene mutations in non-small-cell lung cancer cell lines and their correlation with the presence of ras mutations and clinical features. *Oncogene* 1992; 7:171-180.
- (37) Kessler JH, Bres-Vloemans SA, van Veelen PA, et al. BCR-ABL fusion regions as a source of multiple leukemia-specific CD8+ T-cell epitopes. *Leukemia* 2006; 20:1738-1750.
- (38) Lipford GB, Bauer S, Wagner H, Heeg K. Peptide engineering allows cytotoxic T-cell vaccination against human papilloma virus tumour antigen, E6. *Immunology* 1995; 84:298-303.
- (39) Morris EC, Bendle GM, Stauss HJ. Prospects for immunotherapy of malignant disease. *ClinExpImmuno* 2003; 131:1-7.
- (40) Lanier LL. Natural killer cell receptor signaling. *Curr Opin Immunol* 2003; 15:308-314.
- (41) Moretta L, Moretta A. Killer immunoglobulin-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2004; 16:626-633.
- (42) Lopez-Botet M, Llano M, Navarro F, Bellon T. NK cell recognition of non-classical HLA class I molecules. *Semin Immunol* 2000; 12:109-119.
- (43) Long EO. Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:875-904.
- (44) Bottino C, Castriconi R, Moretta L, Moretta A. Cellular ligands of activating NK receptors. *Trends Immunol* 2005; 26:221-226.
- (45) Armeanu S, Bitzer M, Lauer UM, et al. Natural killer cell-mediated lysis of hepatoma cells via specific induction of NKG2D ligands by the histone deacetylase inhibitor sodium valproate. *Cancer Res* 2005; 65:6321-6329.
- (46) Kato N, Tanaka J, Sugita J, et al. Regulation of the expression of MHC class I-related chain A, B (MICA, MICB) via chromatin remodeling and its impact on the susceptibility of leukemic cells to the cytotoxicity of NKG2D-expressing cells. *Leukemia* 2007; 21:2103-2108.
- (47) Skov S, Pedersen MT, Andresen L, Straten PT, Woetmann A, Odum N. Cancer cells become susceptible to natural killer cell killing after exposure to histone deacetylase

- inhibitors due to glycogen synthase kinase-3-dependent expression of MHC class I-related chain A and B. *Cancer Res* 2005; 65:11136-11145.
- (48) Gardai SJ, Bratton DL, Ogden CA, Henson PM. Recognition ligands on apoptotic cells: a perspective. *JLeukocBiol* 2006; 79:896-903.
- (49) Chao MP, Jaiswal S, Weissman-Tsakamoto R, et al. Calreticulin Is the Dominant Pro-Phagocytic Signal on Multiple Human Cancers and Is Counterbalanced by CD47. *SciTranslMed* 2010; 2:63ra94.
- (50) Reinhold MI, Lindberg FP, Plas D, Reynolds S, Peters MG, Brown EJ. In vivo expression of alternatively spliced forms of integrin-associated protein (CD47). *JCell Sci* 1995; 108 (Pt 11):3419-3425.
- (51) Mantovani A, Schioppa T, Porta C, Allavena P, Sica A. Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25:315-322.
- (52) Gregory CD, Brown SB. Apoptosis: eating sensibly. *Nat Cell Biol* 2005; 7:1161-1163.
- (53) Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002; 3:991-998.
- (54) Cabrera CM, Jimenez P, Cabrera T, Esparza C, Ruiz-Cabello F, Garrido F. Total loss of MHC class I in colorectal tumors can be explained by two molecular pathways: beta2-microglobulin inactivation in MSI-positive tumors and LMP7/TAP2 downregulation in MSI-negative tumors. *Tissue Antigens* 2003; 61:211-219.
- (55) Jager E, Ringhoffer M, Altmannsberger M, et al. Immunoselection in vivo: independent loss of MHC class I and melanocyte differentiation antigen expression in metastatic melanoma. *Int J Cancer* 1997; 71:142-147.
- (56) Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC. The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. *Nat Immunol* 2001; 2:203-209.
- (57) Elias EG, Hasskamp JH, Sharma BK. Cytokines and growth factors expressed by human cutaneous melanoma. *Cancers* 2010:794-808.
- (58) Klein G. Cancer, apoptosis, and nonimmune surveillance. *Cell Death Differ* 2004; 11:13-17.
- (59) Hallermalm K, De Geer A, Kiessling R, Levitsky V, Levitskaya J. Autocrine secretion of Fas ligand shields tumor cells from Fas-mediated killing by cytotoxic lymphocytes. *Cancer Res* 2004; 64:6775-6782.
- (60) Ibrahim SM, Ringel J, Schmidt C, et al. Pancreatic adenocarcinoma cell lines show variable susceptibility to TRAIL-mediated cell death. *Pancreas* 2001; 23:72-79.
- (61) Morales A, Eidinger D, Bruce AW. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol* 1976; 116:180-183.
- (62) Dutcher J. Current status of interleukin-2 therapy for metastatic renal cell carcinoma and metastatic melanoma. *Oncology (Williston Park)* 2002; 16:4-10.
- (63) Belardelli F, Ferrantini M, Proietti E, Kirkwood JM. Interferon-alpha in tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13:119-134.
- (64) Bordignon C, Carlo-Stella C, Colombo MP, et al. Cell therapy: achievements and perspectives. *Haematologica* 1999; 84:1110-1149.
- (65) Renner C, Kubuschok B, Trumper L, Pfreundschuh M. Clinical approaches to vaccination in oncology. *Ann Hematol* 2001; 80:255-266.
- (66) Attia P, Phan GQ, Maker AV, et al. Autoimmunity correlates with tumor regression in patients with metastatic melanoma treated with anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4. *J Clin Oncol* 2005; 23:6043-6053.
- (67) Rammensee HG, Weinschenk T, Gouttefangeas C, Stevanovic S. Towards patient-specific tumor antigen selection for vaccination. *Immunol Rev* 2002; 188:164-176.
- (68) Mitchison NA. Immunologic approach to cancer. *Transplant Proc* 1970; 2:92-103.
- (69) Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, et al. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N Engl J Med* 1988; 319:1676-1680.
- (70) Giralt SA, Kolb HJ. Donor lymphocyte infusions. *Curr Opin Oncol* 1996; 8:96-102.

- (71) Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002; 295:2097-2100.
- (72) Handgretinger R, Klingebiel T, Lang P, Gordon P, Niethammer D. Megadose transplantation of highly purified haploidentical stem cells: current results and future prospects. *Pediatr Transplant* 2003; 7 Suppl 3:51-55.
- (73) Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256:495-497.
- (74) Gussow D, Seemann G. Humanization of monoclonal antibodies. *Methods Enzymol* 1991; 203:99-121.
- (75) Handgretinger R, Anderson K, Lang P, et al. A phase I study of human/mouse chimeric antiganglioside GD2 antibody ch14.18 in patients with neuroblastoma. *Eur J Cancer* 1995; 31A:261-267.
- (76) Hank JA, Surfus J, Gan J, et al. Treatment of neuroblastoma patients with antiganglioside GD2 antibody plus interleukin-2 induces antibody-dependent cellular cytotoxicity against neuroblastoma detected in vitro. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 1994; 15:29-37.
- (77) Kushner BH, Kramer K, Cheung NK. Phase II trial of the anti-G(D2) monoclonal antibody 3F8 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2001; 19:4189-4194.
- (78) Foon KA, Lutzky J, Baral RN, et al. Clinical and immune responses in advanced melanoma patients immunized with an anti-idiotypic antibody mimicking disialoganglioside GD2. *J Clin Oncol* 2000; 18:376-384.
- (79) Glennie MJ, Johnson PW. Clinical trials of antibody therapy. *Immunol Today* 2000; 21:403-410.
- (80) Liu B, Fang M, Lu Y, Mendelsohn J, Fan Z. Fibroblast growth factor and insulin-like growth factor differentially modulate the apoptosis and G1 arrest induced by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody. *Oncogene* 2001; 20:1913-1922.
- (81) Wu X, Fan Z, Masui H, Rosen N, Mendelsohn J. Apoptosis induced by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in a human colorectal carcinoma cell line and its delay by insulin. *J Clin Invest* 1995; 95:1897-1905.
- (82) Shan D, Ledbetter JA, Press OW. Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies. *Blood* 1998; 91:1644-1652.
- (83) Dechant M, Bruenke J, Valerius T. HLA class II antibodies in the treatment of hematologic malignancies. *Semin Oncol* 2003; 30:465-475.
- (84) Meng R, Smallshaw JE, Pop LM, et al. The evaluation of recombinant, chimeric, tetravalent antihuman CD22 antibodies. *Clin Cancer Res* 2004; 10:1274-1281.
- (85) Vitale C, Romagnani C, Falco M, et al. Engagement of p75/AIRM1 or CD33 inhibits the proliferation of normal or leukemic myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:15091-15096.
- (86) Peng D, Fan Z, Lu Y, DeBlasio T, Scher H, Mendelsohn J. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 up-regulates p27KIP1 and induces G1 arrest in prostatic cancer cell line DU145. *Cancer Res* 1996; 56:3666-3669.
- (87) Perrotte P, Matsumoto T, Inoue K, et al. Anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits angiogenesis in human transitional cell carcinoma growing orthotopically in nude mice. *Clin Cancer Res* 1999; 5:257-265.
- (88) Harries M, Smith I. The development and clinical use of trastuzumab (Herceptin). *Endocr Relat Cancer* 2002; 9:75-85.
- (89) Mellstedt H. Monoclonal antibodies in human cancer. *Drugs Today (Barc)* 2003; 39 Suppl C:1-16.
- (90) Brekke OH, Sandlie I. Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2:52-62.
- (91) Dong X, Stothard P, Forsythe IJ, Wishart DS. PlasMapper: a web server for drawing and auto-annotating plasmid maps. *Nucleic Acids Res* 2004; 32:W660-W664.

- (92) Schroeder A, Mueller O, Stocker S, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 2006; 7:3.
- (93) Peiper M, Sato T, Zurakowski D, et al. CD44s expression is associated with improved survival in soft tissue sarcoma. *Anticancer Res* 2004; 24:1053-1056.
- (94) Humphrey G, Hazel DL, MacLennan K, Lewis I. Expression of CD44 by rhabdomyosarcoma: a new prognostic marker? *Br J Cancer* 1999; 80:918-921.
- (95) Keshelava N, Houghton PJ, Morton CL, et al. Initial testing (stage 1) of vorinostat (SAHA) by the pediatric preclinical testing program. *PediatrBlood Cancer* 2009; 53:505-508.
- (96) Davicioni E, Anderson MJ, Finckenstein FG, et al. Molecular classification of rhabdomyosarcoma--genotypic and phenotypic determinants of diagnosis: a report from the Children's Oncology Group. *AmJPathol* 2009; 174:550-564.
- (97) el-Badry OM, Minniti C, Kohn EC, Houghton PJ, Daughaday WH, Helman LJ. Insulin-like growth factor II acts as an autocrine growth and motility factor in human rhabdomyosarcoma tumors. *Cell Growth Differ* 1990; 1:325-331.
- (98) Jin Z, Lahat G, Korchin B, et al. Midkine enhances soft-tissue sarcoma growth: a possible novel therapeutic target. *ClinCancer Res* 2008; 14:5033-5042.
- (99) Williamson D, Selfe J, Gordon T, et al. Role for amplification and expression of glypican-5 in rhabdomyosarcoma. *Cancer Res* 2007; 67:57-65.
- (100) Pazzaglia L, Chiechi A, Conti A, et al. Genetic and molecular alterations in rhabdomyosarcoma: mRNA overexpression of MCL1 and MAP2K4 genes. *HistolHistopathol* 2009; 24:61-67.
- (101) Ganti R, Skapek SX, Zhang J, et al. Expression and genomic status of EGFR and ErbB-2 in alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma. *ModPathol* 2006; 19:1213-1220.
- (102) Ricci C, Polito L, Nanni P, et al. HER/erbB receptors as therapeutic targets of immunotoxins in human rhabdomyosarcoma cells. *JImmunother* 2002; 25:314-323.
- (103) Ren W, Korchin B, Zhu QS, et al. Epidermal growth factor receptor blockade in combination with conventional chemotherapy inhibits soft tissue sarcoma cell growth in vitro and in vivo. *ClinCancer Res* 2008; 14:2785-2795.
- (104) Lievre A, Bachet JB, Le CD, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 2006; 66:3992-3995.
- (105) Forbes SA, Bhamra G, Bamford S, et al. The Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC). *CurrProtocHumGenet* 2008; Chapter 10:Unit.
- (106) Chen Y, Takita J, Hiwatari M, et al. Mutations of the PTPN11 and RAS genes in rhabdomyosarcoma and pediatric hematological malignancies. *Genes ChromosomesCancer* 2006; 45:583-591.
- (107) Huang F, Greer A, Hurlburt W, et al. The mechanisms of differential sensitivity to an insulin-like growth factor-1 receptor inhibitor (BMS-536924) and rationale for combining with EGFR/HER2 inhibitors. *Cancer Res* 2009; 69:161-170.
- (108) Woof JM. Immunology. Tipping the scales toward more effective antibodies. *Science* 2005; 310:1442-1443.
- (109) Kawaguchi Y, Kono K, Mimura K, Sugai H, Akaike H, Fujii H. Cetuximab induce antibody-dependent cellular cytotoxicity against EGFR-expressing esophageal squamous cell carcinoma. *IntJCancer* 2007; 120:781-787.
- (110) Kimura H, Sakai K, Arao T, Shimoyama T, Tamura T, Nishio K. Antibody-dependent cellular cytotoxicity of cetuximab against tumor cells with wild-type or mutant epidermal growth factor receptor. *Cancer Sci* 2007; 98:1275-1280.
- (111) Kurai J, Chikumi H, Hashimoto K, et al. Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by cetuximab against lung cancer cell lines. *ClinCancer Res* 2007; 13:1552-1561.
- (112) Naramura M, Gillies SD, Mendelsohn J, Reisfeld RA, Mueller BM. Therapeutic potential of chimeric and murine anti-(epidermal growth factor receptor) antibodies in a metastasis model for human melanoma. *Cancer ImmunolImmunother* 1993; 37:343-349.

- (113) Dechant M, Weisner W, Berger S, et al. Complement-dependent tumor cell lysis triggered by combinations of epidermal growth factor receptor antibodies. *Cancer Res* 2008; 68:4998-5003.
- (114) Capdevila J, Elez E, Macarulla T, Ramos FJ, Ruiz-Echarri M, Tabernero J. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer treatment. *Cancer Treat Rev* 2009.
- (115) Majeti R, Chao MP, Alizadeh AA, et al. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell* 2009; 138:286-299.
- (116) Chan KS, Espinosa I, Chao M, et al. Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106:14016-14021.
- (117) Chao MP, Alizadeh AA, Tang C, et al. Anti-CD47 antibody synergizes with rituximab to promote phagocytosis and eradicate non-Hodgkin lymphoma. *Cell* 2010; 142:699-713.
- (118) Nimmerjahn F, Ravetch JV. Antibodies, Fc receptors and cancer. *Curr Opin Immunol* 2007; 19:239-245.
- (119) Chao MP, Alizadeh AA, Tang C, et al. Therapeutic antibody targeting of CD47 eliminates human acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 2010.
- (120) Kikuchi Y, Uno S, Yoshimura Y, et al. A bivalent single-chain Fv fragment against CD47 induces apoptosis for leukemic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 315:912-918.
- (121) Kikuchi Y, Uno S, Kinoshita Y, et al. Apoptosis inducing bivalent single-chain antibody fragments against CD47 showed antitumor potency for multiple myeloma. *Leuk Res* 2005; 29:445-450.
- (122) Mateo V, Lagneaux L, Bron D, et al. CD47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med* 1999; 5:1277-1284.
- (123) Uno S, Kinoshita Y, Azuma Y, et al. Antitumor activity of a monoclonal antibody against CD47 in xenograft models of human leukemia. *Oncol Rep* 2007; 17:1189-1194.
- (124) Subramanian S, Parthasarathy R, Sen S, Boder ET, Discher DE. Species- and cell type-specific interactions between CD47 and human SIRPalpha. *Blood* 2006; 107:2548-2556.
- (125) Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992; 148:2207-2216.
- (126) Heidenreich S, Gong JH, Schmidt A, Nain M, Gemsa D. Macrophage activation by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. Priming for enhanced release of tumor necrosis factor-alpha and prostaglandin E2. *J Immunol* 1989; 143:1198-1205.
- (127) Scannell M, Flanagan MB, deStefani A, et al. Annexin-1 and peptide derivatives are released by apoptotic cells and stimulate phagocytosis of apoptotic neutrophils by macrophages. *J Immunol* 2007; 178:4595-4605.
- (128) Heal R, McGivan J. Induction of calreticulin expression in response to amino acid deprivation in Chinese hamster ovary cells. *Biochem J* 1998; 329 (Pt 2):389-394.
- (129) Jethmalani SM, Henle KJ, Gazitt Y, Walker PD, Wang SY. Intracellular distribution of heat-induced stress glycoproteins. *J Cell Biochem* 1997; 66:98-111.
- (130) Groth-Pedersen L, Ostefeld MS, Hoyer-Hansen M, Nylandsted J, Jaattela M. Vincristine induces dramatic lysosomal changes and sensitizes cancer cells to lysosome-destabilizing siramesine. *Cancer Res* 2007; 67:2217-2225.
- (131) Lobjois V, Frongia C, Jozan S, Truchet I, Valette A. Cell cycle and apoptotic effects of SAHA are regulated by the cellular microenvironment in HCT116 multicellular tumour spheroids. *Eur J Cancer* 2009; 45:2402-2411.
- (132) Luong QT, O'Kelly J, Braunstein GD, Hershman JM, Koeffler HP. Antitumor activity of suberoylanilide hydroxamic acid against thyroid cancer cell lines in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 2006; 12:5570-5577.

-
- (133) Armeanu-Ebinger S, Bonin M, Habig K, et al. Differential expression of invasion promoting genes in childhood rhabdomyosarcoma. *IntJOncol* 2011.
- (134) Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 2007; 13:54-61.
- (135) Seitz G, Warmann SW, Fuchs J, et al. Visualization of xenotransplanted human rhabdomyosarcoma after transfection with red fluorescent protein. *J Pediatr Surg* 2006; 41:1369-1376.
- (136) Seitz G, Warmann SW, Fuchs J, et al. Imaging of cell trafficking and metastases of paediatric rhabdomyosarcoma. *Cell Prolif* 2008; 41:365-374.
- (137) Seitz G, Warmann SW, Vokuhl CO, et al. Effects of standard chemotherapy on tumor growth and regulation of multidrug resistance genes and proteins in childhood rhabdomyosarcoma. *Pediatr Surg Int* 2007; 23:431-439.
- (138) Bakhos T, Christian B, Thomas W. Gaussia luciferase blood level as an index of cell growth and proliferation. 2008.
- (139) Rajendran JG, Wilson DC, Conrad EU, et al. [(18)F]FMISO and [(18)F]FDG PET imaging in soft tissue sarcomas: correlation of hypoxia, metabolism and VEGF expression. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003; 30:695-704.
- (140) Klem ML, Grewal RK, Wexler LH, Schoder H, Meyers PA, Wolden SL. PET for staging in rhabdomyosarcoma: an evaluation of PET as an adjunct to current staging tools. *J Pediatr Hematol Oncol* 2007; 29:9-14.
- (141) Kumar R, Shandal V, Shamim SA, Halanaik D, Malhotra A. Clinical applications of PET and PET/CT in pediatric malignancies. *Expert Rev Anticancer Ther* 2010; 10:755-768.
- (142) Rommel D, Abarca-Quinones J, Bol A, et al. Early monitoring of external radiation therapy by [18F]-fluoromethylcholine positron emission tomography and 3-T proton magnetic resonance spectroscopy: an experimental study in a rodent rhabdomyosarcoma model. *Nucl Med Biol* 2010; 37:645-653.
- (143) Adonai N, Nguyen KN, Walsh J, et al. Ex vivo cell labeling with ⁶⁴Cu-pyruvaldehyde-bis(N4-methylthiosemicarbazone) for imaging cell trafficking in mice with positron-emission tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:3030-3035.
- (144) Elsasser-Beile U, Reischl G, Wiehr S, et al. PET imaging of prostate cancer xenografts with a highly specific antibody against the prostate-specific membrane antigen. *J Nucl Med* 2009; 50:606-611.

7. Anhang

7.1 Differenziell regulierte Transkripte - ARMS vs. ERMS

7.1.1 Hochregulierte Gene (211)

Probenset ID	Gensymbol	mean signal		fold change	p-value	Genname
		ARMS	ERMS			
213436_at	CNR1	8,3	2,7	48,8	2,3E-05	cannabinoid receptor 1 (brain)
214451_at	TFAP2B	7,7	2,4	40,9	5,1E-04	transcription factor AP-2 beta (activating enhancer binding protein 2 beta)
1556606_at	NAV2	7,4	2,3	35,3	6,8E-05	neuron navigator 2
239132_at	NOS1	7,6	2,5	33,3	2,3E-04	Neuronal nitric-oxide synthase isoform mu, partial
228170_at	OLIG1 /// LOC728598 /// LOC732056	7,4	2,4	32,2	8,6E-05	oligodendrocyte transcription factor 1
205935_at	FOXF1	9,3	4,3	31,8	2,5E-04	forkhead box F1
221605_s_at	PIPOX	9,7	4,9	27,8	1,8E-04	pipecolic acid oxidase
231580_at	LOC729464	7,5	3,0	23,5	3,9E-08	---
204939_s_at	PLN	9,2	4,7	22,8	4,6E-03	phospholamban
1553890_s_at	LOC126147	6,9	2,5	21,1	3,0E-04	netrin 5
1556378_a_at	LOC440896	7,7	3,5	19,0	1,9E-03	hypothetical gene LOC440896
235372_at	FCRLA	6,4	2,3	16,5	2,8E-05	Fc receptor-like A
244297_at	FLJ35740	6,6	2,6	16,5	2,8E-04	ankyrin repeat domain 18A
231916_at	EXOSC6	6,1	2,1	15,8	1,1E-04	exosome component 6
236783_at	KCNIP4	7,4	3,5	15,2	6,9E-05	Kv channel interacting protein 4
244409_at	LOC645811	6,2	2,4	13,9	3,4E-04	CDNA clone IMAGE:4111037
211341_at	POU4F1	7,4	3,7	13,4	6,5E-03	similar to hCG1781072 /// POU class 4 homeobox 1
205713_s_at	COMP	7,1	3,3	13,3	7,8E-03	cartilage oligomeric matrix protein
224646_x_at	H19	11,9	8,2	13,3	6,7E-03	H19, imprinted maternally expressed transcript (non-protein coding)
221854_at	PKP1	6,2	2,5	13,1	6,2E-04	plakophilin 1 (ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome)
218934_s_at	HSPB7	7,9	4,2	12,7	1,8E-03	heat shock 27kDa protein family, member 7 (cardiovascular)
223835_x_at	OTP	6,6	2,9	12,6	5,1E-03	orthopedia homeobox
229651_at	SEZ6	6,0	2,4	12,1	2,9E-03	seizure related 6 homolog (mouse)
209074_s_at	FAM107A	7,6	4,1	11,6	4,6E-04	family with sequence similarity 107, member A
204051_s_at	SFRP4	9,2	5,8	10,8	6,8E-03	secreted frizzled-related protein 4
213825_at	OLIG2	6,1	2,8	10,4	8,3E-05	oligodendrocyte lineage transcription factor 2
205422_s_at	ITGBL1	8,6	5,3	10,2	7,8E-04	integrin, beta-like 1 (with EGF-like repeat domains)
206446_s_at	ELA2A	6,0	2,7	10,1	2,6E-04	elastase 2A /// elastase 2B
228658_at	C22orf35	6,0	2,7	10,1	9,7E-04	myocardial infarction associated transcript (non-protein coding)
209869_at	ADRA2A	7,0	3,7	9,8	4,7E-04	adrenergic, alpha-2A-, receptor
206089_at	NELL1	7,6	4,3	9,7	7,1E-03	NEL-like 1 (chicken)
203700_s_at	DIO2	6,1	2,9	9,3	1,2E-03	deiodinase, iodothyronine, type II
203680_at	PRKAR2B	7,6	4,5	8,7	7,4E-03	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, beta
203638_s_at	FGFR2	8,9	5,8	8,7	9,5E-03	fibroblast growth factor receptor 2
226303_at	PGM5	9,6	6,5	8,7	4,3E-03	phosphoglucomutase 5
202748_at	GBP2	9,1	6,0	8,5	6,3E-04	guanylate binding protein 2, interferon-inducible
207859_s_at	CHRNB3	5,2	2,1	8,4	1,2E-03	cholinergic receptor, nicotinic, beta 3
227154_at	IGSF21	6,6	3,6	7,9	4,5E-04	immunoglobulin superfamily, member 21
208212_s_at	ALK	6,1	3,2	7,6	4,0E-03	anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase

Probenset ID	Gensymbol	mean signal		fold change	p-value	Genname
		ARMS	ERMS			
205902_at	KCNN3	8,3	5,4	7,3	3,4E-04	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 3 /// similar to small conductance calcium-activated potassium channel protein 3
213909_at	LRR15	5,7	2,9	7,0	5,1E-03	leucine rich repeat containing 15
1552735_at	PCDHGA4	7,5	4,7	7,0	2,5E-03	protocadherin gamma subfamily A, 4
212992_at	C14orf78	7,3	4,6	6,6	3,7E-03	AHNAK nucleoprotein 2
230406_at	ASS1	5,9	3,2	6,5	3,3E-03	---
1553204_at	FLJ30313	7,5	4,9	6,5	1,6E-03	chromosome 20 open reading frame 200
226576_at	ARHGAP26	7,7	5,0	6,4	1,5E-03	Rho GTPase activating protein 26
229479_at	LOC646324	5,6	2,9	6,3	2,5E-03	---
223796_at	CNTNAP3 /// CNT- NAP3B /// LOC728577	7,0	4,3	6,2	8,7E-04	contactin associated protein-like 3 /// contactin associated protein-like 3B /// similar to cell recognition molecule CASPR3 /// hypothetical LOC653355 /// similar to cell recognition molecule CASPR3
206306_at	RYR3	7,0	4,3	6,2	3,8E-03	ryanodine receptor 3
229290_at	LOC92196	5,3	2,7	6,2	3,8E-03	death associated protein-like 1
230973_at	SH2D5	4,8	2,2	6,1	3,7E-03	SH2 domain containing 5
202458_at	PRSS23	10,2	7,6	6,1	2,6E-03	protease, serine, 23
237828_at	KIAA1853	4,9	2,3	6,0	6,5E-03	KIAA1853
228194_s_at	SORCS1	5,7	3,1	6,0	5,5E-04	sortilin-related VPS10 domain containing receptor 1
204570_at	COX7A1	10,9	8,3	6,0	7,9E-03	cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 1 (muscle)
236824_at	TMEM132B	6,2	3,6	6,0	3,0E-03	transmembrane protein 132B
205818_at	DBC1	5,0	2,4	5,9	1,2E-04	deleted in bladder cancer 1
204623_at	TFF3	6,0	3,4	5,8	1,2E-03	trefoil factor 3 (intestinal)
205948_at	PTPRT	5,0	2,4	5,8	3,7E-04	protein tyrosine phosphatase, receptor type, T
226523_at	TAGLN	7,1	4,6	5,8	8,8E-03	SM22 alpha
242447_at	LOC285382	9,5	7,0	5,6	3,8E-04	chromosome 3 open reading frame 70
226281_at	DNER	5,4	3,0	5,6	3,8E-03	delta/notch-like EGF repeat containing
235721_at	DTX3	9,2	6,8	5,6	8,2E-04	deltex 3 homolog (Drosophila)
230560_at	STXBP6	7,6	5,1	5,5	2,8E-03	syntaxin binding protein 6 (amisyn)
1552698_at	MGC16703	5,9	3,4	5,4	6,2E-03	tubulin, alpha pseudogene
229585_at	C9orf94	6,8	4,3	5,4	4,7E-05	ADAMTS-like 1
213791_at	PENK	6,9	4,5	5,3	9,0E-03	proenkephalin
212686_at	PPM1H	6,5	4,1	5,2	3,2E-03	protein phosphatase 1H (PP2C domain containing)
204584_at	L1CAM	6,8	4,4	5,1	7,0E-03	L1 cell adhesion molecule
230498_at	MCHR1	5,8	3,4	5,1	2,7E-03	melanin-concentrating hormone receptor 1
205431_s_at	BMP5	6,3	4,0	5,0	4,4E-03	bone morphogenetic protein 5
212314_at	KIAA0746	9,5	7,2	5,0	2,3E-03	KIAA0746 protein /// serine incorporator 2
230158_at	DPY19L2	6,7	4,4	5,0	1,2E-04	dpy-19-like 2 (C. elegans)
242332_at	LOC283904	6,2	3,9	5,0	7,8E-03	hypothetical protein LOC283904
213010_at	PRKCDBP	8,5	6,2	4,9	7,5E-03	protein kinase C, delta binding protein
215767_at	ZNF804A	5,5	3,2	4,8	3,9E-03	zinc finger protein 804A
201313_at	ENO2	7,3	5,0	4,8	2,0E-03	enolase 2 (gamma, neuronal)
221185_s_at	IQCG	5,6	3,4	4,7	6,4E-04	IQ motif containing G
205109_s_at	ARHGEF4	5,4	3,1	4,7	8,0E-03	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 4
218918_at	MAN1C1	7,4	5,2	4,7	8,8E-04	mannosidase, alpha, class 1C, member 1
205946_at	VIPR2	4,8	2,6	4,7	1,7E-03	vasoactive intestinal peptide receptor 2
219521_at	B3GAT1	4,6	2,3	4,7	2,6E-03	beta-1,3-glucuronyltransferase 1 (glucuronosyltransferase P)
228448_at	MAP6	6,3	4,1	4,6	7,9E-03	microtubule-associated protein 6
41577_at	PPP1R16B	6,1	3,9	4,6	5,5E-04	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 16B
242045_at	ANKRD18A	5,1	2,9	4,6	2,7E-03	KIAA2015 protein

Probenset ID	Gensymbol	mean signal		fold change	p-value	Genname
		ARMS	ERMS			
205889_s_at	JAKMIP2	5,4	3,2	4,5	8,0E-03	janus kinase and microtubule interacting protein 2
204671_s_at	ANKRD6	8,1	5,9	4,4	3,6E-04	ankyrin repeat domain 6
210715_s_at	SPINT2	7,2	5,0	4,4	3,9E-03	serine peptidase inhibitor, Kunitz type, 2
1558738_at	NOL3	7,9	5,8	4,1	3,3E-03	CDNA FLJ58768 complete cds, highly similar to Homo sapiens nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain) (NOL3), mRNA
227168_at	FLJ25967	6,8	4,7	4,1	2,1E-03	myocardial infarction associated transcript (non-protein coding)
244065_at	FLJ37512	5,5	3,5	4,0	6,5E-04	similar to cell recognition molecule CASPR3
201578_at	PODXL	10,1	8,2	3,9	1,3E-03	podocalyxin-like
226586_at	ANKS6	6,2	4,2	3,9	3,7E-03	ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing 6
201037_at	PFKP	9,3	7,4	3,8	9,0E-03	phosphofructokinase, platelet
205081_at	CRIP1 /// GALK2	8,5	6,6	3,8	5,7E-03	cysteine-rich protein 1 (intestinal)
213488_at	SNED1	6,7	4,8	3,8	8,5E-04	sushi, nidogen and EGF-like domains 1
219632_s_at	TRPV1	5,6	3,7	3,8	5,1E-03	transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1
226016_at	CD47	10,1	8,2	3,7	8,3E-04	CD47 molecule
237471_at	LOC154822	4,5	2,6	3,7	7,8E-03	hypothetical LOC154822
203929_s_at	MAPT	7,3	5,4	3,7	1,0E-03	microtubule-associated protein tau
228546_at	DPP6	5,1	3,2	3,7	9,6E-03	dipeptidyl-peptidase 6
214724_at	DIXDC1	9,0	7,1	3,7	6,3E-03	DIX domain containing 1
204567_s_at	ABCG1	8,1	6,2	3,7	3,1E-03	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1
209651_at	TGFB11	10,0	8,1	3,7	1,5E-03	transforming growth factor beta 1 induced transcript 1
1562659_at	LOC400548	4,2	2,3	3,6	6,0E-03	hypothetical gene supported by BC040918
217520_x_at	LOC646278	4,9	3,0	3,6	6,5E-03	PREDICTED: Homo sapiens similar to programmed cell death 6 interacting protein (LOC731884), mRNA
222912_at	ARRB1	6,6	4,8	3,6	1,4E-03	arrestin, beta 1
206645_s_at	NR0B1	4,2	2,4	3,6	5,8E-03	nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1
206128_at	ADRA2C	6,3	4,4	3,6	2,0E-03	adrenergic, alpha-2C-, receptor
1554628_at	ZNF57	6,9	5,0	3,6	4,3E-03	zinc finger protein 57
225814_at	XRN1	10,6	8,8	3,6	3,8E-04	5'-3' exoribonuclease 1
225306_s_at	SLC25A29	7,6	5,8	3,5	5,0E-03	solute carrier family 25, member 29
240744_at	CPA5	4,9	3,1	3,5	2,8E-03	carboxypeptidase A5
206528_at	TRPC6	4,7	2,9	3,5	4,9E-03	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 6
1564207_at	FLJ35390	6,6	4,8	3,5	1,2E-03	hypothetical LOC255031
206228_at	PAX2	4,5	2,7	3,5	6,5E-03	paired box 2
222095_s_at	C1orf76	4,2	2,4	3,5	7,1E-03	family with sequence similarity 163, member A
231859_at	C14orf132	6,5	4,7	3,5	8,2E-03	chromosome 14 open reading frame 132 /// hypothetical protein LOC100132684
227440_at	ANKS1B	4,1	2,4	3,5	2,0E-05	ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing 1B
238452_at	FCRLB	4,3	2,6	3,4	2,8E-03	Fc receptor-like B
204838_s_at	MLH3	6,3	4,6	3,4	2,5E-03	mutL homolog 3 (E. coli)
227657_at	RNF150	8,8	7,0	3,3	2,5E-03	ring finger protein 150
225474_at	MAG1	8,9	7,1	3,3	9,6E-04	membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 1
229130_at	LOC285535	7,2	5,5	3,3	1,8E-04	hypothetical protein LOC285535
217109_at	MUC4	4,9	3,2	3,2	7,2E-03	mucin 4, cell surface associated
223629_at	PCDHB5	5,0	3,3	3,2	1,5E-03	protocadherin beta 5
57588_at	SLC24A3	8,8	7,1	3,2	1,4E-04	solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 3
228184_at	DISP1	7,1	5,4	3,1	1,8E-03	dispatched homolog 1 (Drosophila)
213388_at	LOC727942	6,9	5,3	3,1	5,6E-03	phosphodiesterase 4D interacting protein

Probenset ID	Gensymbol	mean signal		fold change	p-value	Genname
		ARMS	ERMS			
228538_at	ZNF662	5,2	3,6	3,1	8,8E-03	zinc finger protein 662
200872_at	S100A10	12,1	10,5	3,1	2,6E-03	S100 calcium binding protein A10
209286_at	CDC42EP3	9,9	8,3	3,1	9,8E-03	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 3
229156_s_at	ALCAM /// WDFY3	5,7	4,1	3,1	5,9E-03	---
226607_at	C20orf194	9,0	7,4	3,0	2,3E-03	chromosome 20 open reading frame 194
45714_at	HCFC1R1	8,4	6,8	3,0	9,6E-05	host cell factor C1 regulator 1 (XPO1 dependent)
207077_at	ELA2B	4,0	2,4	3,0	1,2E-03	elastase 2B
229685_at	TBC1D14	5,4	3,9	3,0	7,5E-04	hypothetical LOC100134937
207522_s_at	ATP2A3	5,2	3,7	2,9	1,7E-03	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, ubiquitous
226895_at	NFIC	10,7	9,1	2,9	1,2E-03	CAAT-box binding transcription factor CTF-1 (syn. CTF/NFI or CTF or NF-I or NF-1)
209365_s_at	ECM1	7,1	5,6	2,9	6,8E-03	extracellular matrix protein 1
204763_s_at	GNAO1	4,8	3,2	2,9	1,8E-03	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha activating activity polypeptide O
229014_at	FLJ42709	6,1	4,6	2,9	5,2E-03	hypothetical gene supported by AK124699
212736_at	C16orf45	9,0	7,4	2,9	3,7E-03	chromosome 16 open reading frame 45
223974_at	MGC11082	5,1	3,6	2,9	6,4E-03	hypothetical LOC84777
210740_s_at	ITPK1	8,6	7,1	2,8	2,0E-03	inositol 1,3,4-triphosphate 5/6 kinase
202310_s_at	COL1A1	14,0	12,5	2,8	6,2E-03	collagen, type I, alpha 1
230228_at	FLJ35258	7,3	5,8	2,8	6,5E-05	hypothetical LOC284297
241355_at	HR	5,5	4,0	2,8	9,8E-03	hairless homolog (mouse)
212747_at	ANKS1A	10,2	8,8	2,7	1,3E-03	ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing 1A
230167_at	ADAMTS14	6,1	4,7	2,7	4,8E-03	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 14
203072_at	MYO1E /// LOC390588	5,6	4,2	2,7	1,5E-03	myosin IE
201655_s_at	HSPG2	11,2	9,8	2,7	8,4E-04	heparan sulfate proteoglycan 2
203151_at	MAP1A	8,6	7,2	2,6	3,3E-03	microtubule-associated protein 1A
215785_s_at	CYFIP2	9,1	7,7	2,6	1,8E-03	cytoplasmic FMR1 interacting protein 2
227611_at	TARSL2	8,5	7,1	2,6	9,4E-03	threonyl-tRNA synthetase-like 2
227761_at	MYO5A	7,3	5,9	2,6	4,3E-03	myosin VA (heavy chain 12, myosin)
211704_s_at	SPIN2A /// SPIN2B	6,7	5,4	2,6	1,6E-04	spindlin family, member 2A /// spindlin family, member 2B
206981_at	SCN4A	4,1	2,7	2,6	5,7E-03	sodium channel, voltage-gated, type IV, alpha subunit
235932_x_at	HMCN2 /// LOC727754	4,5	3,1	2,6	5,9E-03	hemicentin 2
243976_at	LOC541472	5,9	4,5	2,6	1,8E-03	---
226198_at	TOM1L2	6,6	5,2	2,6	3,0E-05	target of myb1-like 2 (chicken)
1555420_a_at	KLF7	6,6	5,3	2,6	9,8E-03	Kruppel-like factor 7 (ubiquitous)
219655_at	C7orf10	5,6	4,2	2,6	8,5E-03	chromosome 7 open reading frame 10
227427_at	GEFT	6,9	5,5	2,6	5,3E-03	RhoA/RAC/CDC42 exchange factor /// solute carrier family 26, member 10
226111_s_at	ZNF385	5,7	4,3	2,6	3,6E-03	zinc finger protein 385A
219310_at	C20orf39	5,4	4,1	2,5	4,9E-04	chromosome 20 open reading frame 39
218610_s_at	FLJ11151	5,9	4,5	2,5	3,4E-03	hypothetical protein FLJ11151
212339_at	EPB41L1	4,1	2,7	2,5	7,4E-04	erythrocyte membrane protein band 4.1-like 1
224686_x_at	LOC728871 /// LRRC37A2	9,3	8,0	2,5	9,4E-04	CDNA FLJ34414 fis, clone HEART2003168, highly similar to Homo sapiens c114 SLIT-like testicular protein (LOC474170), mRNA
204094_s_at	TSC22D2	10,8	9,5	2,4	9,8E-03	TSC22 domain family, member 2
228703_at	P4HA3	4,8	3,6	2,4	6,4E-03	prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide III
228098_s_at	MYLIP	10,0	8,7	2,4	4,3E-03	myosin regulatory light chain interacting protein
202245_at	LSS	8,6	7,4	2,4	2,8E-03	lanosterol synthase (2,3-oxidosqualene-lanosterol cyclase)

Probenset ID	Gensymbol	mean signal		fold change	p-value	Genname
		ARMS	ERMS	ARMS vs ERMS		
214454_at	ADAMTS2	5,8	4,5	2,4	5,3E-03	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 2
225157_at	MLXIP	8,9	7,6	2,4	9,2E-04	MLX interacting protein, mRNA (cDNA clone IMAGE:4995872)
230353_at	LOC284112	4,6	3,4	2,4	4,3E-03	hypothetical protein LOC284112
216442_x_at	FN1	13,6	12,3	2,4	6,8E-03	fibronectin 1
204075_s_at	KIAA0562	7,6	6,4	2,4	2,0E-03	KIAA0562
209205_s_at	LMO4	9,3	8,0	2,4	1,1E-03	LIM domain only 4
215231_at	PRKAG2	4,7	3,5	2,4	7,6E-03	Protein kinase, AMP-activated, gamma 2 non-catalytic subunit, mRNA (cDNA clone IMAGE:4413055)
225390_s_at	KLF13	8,9	7,6	2,4	3,7E-03	Kruppel-like factor 13
227679_at	HDAC11	5,6	4,3	2,3	5,6E-03	---
223715_at	BRSK2	3,4	2,2	2,3	6,1E-03	BR serine/threonine kinase 2
208626_s_at	VAT1	8,8	7,5	2,3	4,6E-03	vesicle amine transport protein 1 homolog (T. californica)
224814_at	DPP7	7,1	5,9	2,3	3,9E-03	dipeptidyl-peptidase 7
215016_x_at	DST	10,7	9,5	2,3	5,1E-03	dystonin
219680_at	NLRX1	6,4	5,2	2,3	3,0E-03	NLR family member X1
203523_at	LSP1	6,9	5,7	2,3	2,5E-03	lymphocyte-specific protein 1
202098_s_at	PRMT2	8,4	7,2	2,3	7,5E-03	protein arginine methyltransferase 2
200629_at	WARS	9,2	8,1	2,2	9,2E-03	tryptophanyl-tRNA synthetase
208404_x_at	KCNJ5	3,7	2,6	2,2	3,1E-03	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 5
204199_at	RALGPS1	4,5	3,4	2,2	8,1E-03	Ral GEF with PH domain and SH3 binding motif 1
1558801_at	LOC730846	7,8	6,7	2,2	9,0E-04	---
231950_at	ZNF658	4,7	3,6	2,2	9,3E-03	zinc finger protein 658
227199_at	DIP2A	8,2	7,0	2,2	6,5E-03	DIP2 disco-interacting protein 2 homolog A (Drosophila)
213455_at	FAM114A1	9,8	8,7	2,2	7,7E-03	family with sequence similarity 114, member A1
1554565_x_at	UNQ1887	5,0	3,9	2,2	8,7E-03	signal peptide peptidase 3
210946_at	PPAP2A	10,5	9,4	2,1	5,2E-03	phosphatidic acid phosphatase type 2A
225624_at	LOC92017	6,4	5,3	2,1	7,5E-04	sorting nexin 29
241650_x_at	HMCN2	5,9	4,9	2,1	6,1E-05	hemicentin 2
213630_at	KIAA0363	4,0	2,9	2,1	1,1E-03	NAC alpha domain containing
232768_at	CCNB2	4,2	3,1	2,1	7,2E-03	Cyclin B2, mRNA (cDNA clone MGC:132772 IMAGE:8144115)
212350_at	SMAD5 /// TBC1D1	8,7	7,6	2,1	7,0E-03	TBC1 (tre-2/USP6, BUB2, cdc16) domain family, member 1
205968_at	KCNS3	7,5	6,5	2,1	8,4E-03	potassium voltage-gated channel, delayed-rectifier, subfamily S, member 3
204578_at	HISPPD2A	4,9	3,9	2,1	4,7E-03	histidine acid phosphatase domain containing 2A
224991_at	CMIP	7,3	6,2	2,0	9,1E-03	c-Maf-inducing protein
203402_at	KCNAB2	5,6	4,5	2,0	3,7E-03	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 2
1562059_at	SVIL	5,5	4,5	2,0	1,7E-03	---
204020_at	PURA	9,9	8,9	2,0	6,2E-03	purine-rich element binding protein A
212742_at	ZNF364	8,1	7,1	2,0	5,6E-03	ring finger protein 115
227409_at	PPP1R3E	4,9	3,9	2,0	6,5E-03	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3E

7.1.2 Herunterregulierte Gene (323)

Probenset ID	Gensymbol	mean signal		fold change	p-value	Genname
		ARMS	ERMS			
205848_at	GAS2	4,5	9,6	-34,5	4,4E-06	growth arrest-specific 2
203184_at	FBN2	4,3	8,5	-18,3	4,8E-03	fibrillin 2
204086_at	PRAME	4,5	8,6	-17,8	5,5E-03	preferentially expressed antigen in melanoma
213479_at	NPTX2	4,5	7,9	-10,5	8,9E-03	neuronal pentraxin II
204014_at	DUSP4	4,2	7,4	-8,9	8,0E-04	dual specificity phosphatase 4
218847_at	IGF2BP2	5,2	8,2	-7,8	9,8E-04	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 2
1552658_a_at	NAV3	3,5	6,4	-7,5	2,6E-03	neuron navigator 3
204285_s_at	PMAIP1	5,6	8,5	-7,5	1,7E-04	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
227377_at	IGF2BP1	3,1	6,0	-7,5	5,4E-03	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 1
218959_at	HOXC10	3,8	6,7	-7,4	6,1E-03	homeobox C10
227242_s_at	EBF3	2,8	5,7	-7,4	2,8E-03	early B-cell factor 3
227550_at	LOC143381	4,1	7,0	-7,4	1,7E-04	hypothetical protein LOC143381
207145_at	GDF8	4,3	7,2	-7,1	7,6E-03	myostatin
227911_at	ARHGAP28	4,4	7,2	-6,9	5,4E-03	Rho GTPase activating protein 28
220462_at	TAIP-2	3,1	5,9	-6,9	2,5E-04	cysteine-serine-rich nuclear protein 3
1552766_at	HS6ST2	4,0	6,8	-6,8	2,6E-03	heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 2
219511_s_at	SNCAIP	4,3	7,0	-6,7	3,5E-03	synuclein, alpha interacting protein
239153_at	FLJ41747	4,1	6,8	-6,5	4,4E-03	hox transcript antisense RNA (non-protein coding)
217997_at	PHLDA1	5,2	7,9	-6,4	1,6E-04	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1
227506_at	SLC16A9	4,1	6,8	-6,4	1,3E-03	solute carrier family 16, member 9 (monocarboxylic acid transporter 9)
206070_s_at	EPHA3	6,8	9,5	-6,4	1,5E-03	EPH receptor A3
207144_s_at	CITED1	4,5	7,1	-6,1	3,5E-03	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 1
226809_at	FLJ30428 /// LOC730024	2,7	5,2	-5,8	9,3E-03	hypothetical LOC100216479
220892_s_at	PSAT1	5,1	7,6	-5,8	1,1E-03	phosphoserine aminotransferase 1
219894_at	MAGEL2	4,7	7,2	-5,7	5,4E-03	MAGE-like 2
205372_at	PLAG1	3,7	6,2	-5,6	1,8E-03	pleiomorphic adenoma gene 1
226814_at	ADAMTS9	5,4	7,9	-5,6	3,8E-03	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 9
224851_at	CDK6	7,6	10,1	-5,5	3,6E-03	cyclin-dependent kinase 6
44783_s_at	HEY1	8,5	10,9	-5,3	5,2E-03	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1
208893_s_at	DUSP6	6,1	8,5	-5,3	4,6E-03	dual specificity phosphatase 6
215008_at	TLL2	2,8	5,1	-5,2	3,0E-03	tolloid-like 2
204304_s_at	PROM1	7,3	9,6	-5,2	2,4E-03	prominin 1
214930_at	SLITRK5	4,0	6,4	-5,1	5,5E-03	SLIT and NTRK-like family, member 5
228904_at	HOXB3	5,7	8,1	-5,1	1,8E-03	homeobox B3
242260_at	MATR3	3,8	6,2	-5,0	1,6E-03	Major nuclear matrix protein mRNA
225975_at	PCDH18	7,3	9,6	-5,0	6,8E-03	protocadherin 18
205522_at	HOXD4	3,5	5,8	-4,9	3,1E-03	homeobox D4
228307_at	EMILIN3	5,6	7,9	-4,9	2,3E-03	elastin microfibril interfacer 3
218816_at	LRRC1	4,9	7,2	-4,9	2,4E-05	leucine rich repeat containing 1
204301_at	KBTBD11	4,2	6,5	-4,9	3,0E-04	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 11
219682_s_at	TBX3	4,8	7,1	-4,8	1,2E-03	T-box 3
231936_at	HOXC9	3,3	5,6	-4,8	1,0E-02	homeobox C9
228233_at	FREM1	3,7	5,9	-4,8	1,3E-03	FRAS1 related extracellular matrix 1
235891_at	DNM3	4,4	6,7	-4,8	3,6E-03	---
205990_s_at	WNT5A	5,7	7,9	-4,7	7,3E-04	wingless-type MMTV integration site family, member 5A
205542_at	STEAP1	5,2	7,4	-4,6	5,7E-03	six transmembrane epithelial antigen of the prostate 1

Probenset ID	Gensymbol	mean signal		fold change	p-value	Genname
		ARMS	ERMS			
227812_at	TNFRSF19	5,8	8,0	-4,6	2,3E-03	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19
223038_s_at	FAM60A /// LOC65036 9 /// LOC72811 5	5,5	7,7	-4,4	1,5E-03	family with sequence similarity 60, member A
235334_at	ST6GALNA C3	3,8	6,0	-4,4	3,0E-03	ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminy-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 3
209325_s_at	RGS16	5,3	7,4	-4,4	1,7E-03	regulator of G-protein signaling 16
218062_x_at	CDC42EP4	5,2	7,3	-4,3	3,5E-04	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 4
203417_at	MFAP2	7,2	9,3	-4,3	7,1E-03	microfibrillar-associated protein 2
209866_s_at	LPHN3	3,9	6,0	-4,2	2,4E-03	latrophilin 3
227354_at	PAG1	5,0	7,0	-4,1	9,4E-03	phosphoprotein associated with glycosphingolipid microdomains 1
219010_at	C1orf106	4,3	6,3	-4,1	5,0E-03	chromosome 1 open reading frame 106
228790_at	C8orf72	5,8	7,7	-4,0	5,0E-03	family with sequence similarity 110, member B
207622_s_at	ABCF2	6,5	8,4	-4,0	5,5E-03	ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 2
209109_s_at	TSPAN6 /// ZNF444	7,4	9,3	-3,9	2,5E-04	tetraspanin 6
205677_s_at	DLEU1 /// SPANXC	5,8	7,8	-3,9	4,3E-03	deleted in lymphocytic leukemia 1 (non-protein coding)
212850_s_at	LRP4	4,4	6,4	-3,9	9,9E-03	low density lipoprotein receptor-related protein 4
209631_s_at	GPR37	3,1	5,1	-3,9	4,7E-03	G protein-coupled receptor 37 (endothelin receptor type B-like)
226649_at	PANK1	5,5	7,4	-3,8	2,6E-06	pantothenate kinase 1
221194_s_at	LOC51136	3,8	5,7	-3,8	6,9E-04	ring finger protein, transmembrane 1
1438_at	EPHB3	3,4	5,3	-3,8	4,0E-03	EPH receptor B3
221586_s_at	E2F5	4,3	6,2	-3,7	1,9E-03	E2F transcription factor 5, p130-binding
201629_s_at	ACP1	6,7	8,5	-3,7	8,5E-03	acid phosphatase 1, soluble
207327_at	EYA4	4,4	6,3	-3,7	5,7E-03	eyes absent homolog 4 (Drosophila)
204087_s_at	SLC5A6	5,1	6,9	-3,6	9,4E-04	solute carrier family 5 (sodium-dependent vitamin transporter), member 6
210868_s_at	ELOVL6	3,3	5,2	-3,6	3,3E-03	ELOVL family member 6, elongation of long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3-like, yeast)
210416_s_at	CHEK2	3,6	5,4	-3,6	1,1E-03	CHK2 checkpoint homolog (S. pombe)
243000_at	C18orf22	3,4	5,3	-3,6	3,3E-04	cyclin-dependent kinase 6
221004_s_at	ITM2C	7,6	9,4	-3,5	9,3E-03	integral membrane protein 2C
1554452_a_at	HIG2	6,8	8,6	-3,5	7,2E-03	hypoxia-inducible protein 2
203790_s_at	HRSP12	6,6	8,4	-3,5	6,1E-03	heat-responsive protein 12
209162_s_at	PRPF4	5,6	7,4	-3,5	5,8E-03	PRP4 pre-mRNA processing factor 4 homolog (yeast)
226408_at	TEAD2	5,7	7,5	-3,5	7,6E-03	TEA domain family member 2
225627_s_at	CACHD1	6,6	8,3	-3,4	9,2E-04	cache domain containing 1
1555274_a_at	SELI	3,8	5,6	-3,4	6,4E-05	selenoprotein I
219522_at	FJX1	5,6	7,4	-3,4	4,7E-03	four jointed box 1 (Drosophila)
201939_at	PLK2	8,0	9,8	-3,4	1,7E-03	polo-like kinase 2 (Drosophila)
220386_s_at	EML4	5,5	7,3	-3,4	3,5E-03	echinoderm microtubule associated protein like 4
225203_at	PPP1R16A	5,1	6,8	-3,3	1,3E-03	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 16A
223595_at	TMEM133	6,1	7,8	-3,3	5,3E-05	transmembrane protein 133
209921_at	SLC7A11	3,0	4,7	-3,3	9,9E-03	solute carrier family 7, (cationic amino acid transporter, y+ system) member 11
209108_at	TSPAN6	7,2	8,9	-3,3	2,7E-04	tetraspanin 6
225702_at	C8orf76	6,6	8,3	-3,2	2,6E-04	chromosome 8 open reading frame 76
212445_s_at	NEDD4L	4,9	6,5	-3,2	4,6E-03	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like
230047_at	FLJ32810	4,0	5,7	-3,2	5,1E-05	hypothetical protein FLJ32810
202972_s_at	FAM13A1	4,5	6,1	-3,2	6,9E-03	family with sequence similarity 13, member A1

Probenset ID	Gensym- bol	mean signal		fold change	p-value	Genname
		ARMS	ERMS			
205188_s_at	SMAD5	4,5	6,2	-3,2	2,4E-03	SMAD family member 5
222240_s_at	ISYNA1	6,9	8,6	-3,2	5,1E-03	inositol-3-phosphate synthase 1
219763_at	DENND1A	2,4	4,1	-3,2	5,6E-03	DENN/MADD domain containing 1A
225835_at	SLC12A2	7,6	9,3	-3,2	4,0E-04	solute carrier family 12 (sodium/potassium/chloride transporters), member 2
1553500_at	FBXL21	2,6	4,3	-3,1	8,4E-03	F-box and leucine-rich repeat protein 21
211450_s_at	MSH6	6,5	8,2	-3,1	7,6E-03	mutS homolog 6 (E. coli)
225439_at	NUDCD1	7,3	8,9	-3,1	3,3E-06	NudC domain containing 1
224839_s_at	GPT2	4,3	6,0	-3,1	8,2E-03	glutamic pyruvate transaminase (alanine aminotransferase) 2
208546_x_at	HIST1H2BH	3,1	4,7	-3,1	7,0E-03	histone cluster 1, H2bh
227100_at	B3GALTL	4,2	5,8	-3,1	7,8E-03	beta 1,3-galactosyltransferase-like
208459_s_at	XPO7	4,8	6,4	-3,1	5,2E-03	exportin 7
223568_s_at	PPAPDC1B	5,6	7,3	-3,1	2,9E-03	phosphatidic acid phosphatase type 2 domain containing 1B
228653_at	RP5-875H10.1	4,0	5,6	-3,0	9,9E-03	sterile alpha motif domain containing 5
210762_s_at	DLC1	8,6	10,1	-3,0	1,7E-03	deleted in liver cancer 1
221039_s_at	DDEF1	6,5	8,1	-3,0	8,3E-03	ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 1
225293_at	COL27A1	6,4	8,0	-3,0	2,2E-03	collagen, type XXVII, alpha 1
226342_at	SPTBN1	7,4	9,0	-3,0	3,6E-03	spectrin, beta, non-erythrocytic 1
223879_s_at	OXR1	4,6	6,2	-3,0	1,1E-03	oxidation resistance 1
204011_at	SPRY2	8,4	10,0	-3,0	6,7E-03	sprouty homolog 2 (Drosophila)
228092_at	CREM	3,5	5,0	-2,9	9,3E-03	cAMP responsive element modulator
231863_at	ING3	4,7	6,2	-2,9	5,8E-03	inhibitor of growth family, member 3
203395_s_at	HES1	6,5	8,0	-2,9	4,8E-03	hairy and enhancer of split 1, (Drosophila)
1555751_a_at	GEMIN7	4,7	6,2	-2,9	1,9E-03	gem (nuclear organelle) associated protein 7
212731_at	ANKRD46	8,0	9,6	-2,9	2,8E-04	ankyrin repeat domain 46
212385_at	TCF4	7,7	9,2	-2,9	9,5E-03	transcription factor 4
241801_at	PGAP1	5,3	6,8	-2,9	4,3E-03	post-GPI attachment to proteins 1
226421_at	AMMECR1	4,7	6,3	-2,9	6,8E-04	Alport syndrome, mental retardation, midface hypoplasia and elliptocytosis chromosomal region gene 1
202670_at	MAP2K1	7,6	9,1	-2,8	6,3E-03	mitogen-activated protein kinase kinase 1
217998_at	PHLDA1 /// LOC652993	3,3	4,8	-2,8	8,8E-03	hypothetical LOC652993 /// pleckstrin homology-like domain, family A, member 1
213449_at	POP1	2,9	4,4	-2,8	7,8E-03	processing of precursor 1, ribonuclease P/MRP subunit (S. cerevisiae)
1552921_a_at	FIGNL1	3,8	5,3	-2,8	4,1E-03	fidgetin-like 1
222703_s_at	YRDC	4,5	6,0	-2,8	7,9E-05	yrnC domain containing (E. coli)
208675_s_at	DDOST	9,4	10,9	-2,8	7,1E-03	dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase
223266_at	ALS2CR2	6,7	8,2	-2,8	7,9E-03	STE20-related kinase adaptor beta
205047_s_at	ASNS	7,4	8,9	-2,8	1,6E-03	asparagine synthetase
218629_at	SMO	4,3	5,8	-2,8	1,1E-03	smoothened homolog (Drosophila)
208361_s_at	POLR3D	5,1	6,6	-2,8	2,2E-03	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide D, 44kDa
239265_at	TMEM20	3,2	4,6	-2,8	5,2E-03	transmembrane protein 20
203616_at	POLB	8,0	9,4	-2,8	9,7E-04	polymerase (DNA directed), beta
223296_at	SLC25A33	6,4	7,9	-2,7	1,7E-03	solute carrier family 25, member 33
229068_at	CCT5	4,5	5,9	-2,7	5,0E-03	chaperonin containing TCP1, subunit 5 (epsilon)
202743_at	PIK3R3	7,0	8,5	-2,7	4,5E-04	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 3 (gamma)
202955_s_at	ARFGEF1	4,7	6,1	-2,7	5,9E-03	ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factor 1(brefeldin A-inhibited)
1554450_s_at	MIER3	5,1	6,6	-2,7	5,6E-03	mesoderm induction early response 1, family member 3
222199_s_at	BIN3	6,1	7,5	-2,7	9,2E-06	bridging integrator 3
222752_s_at	C1orf75	5,8	7,2	-2,7	8,0E-03	transmembrane protein 206

Probenset ID	Gensymbol	mean signal		fold change	p-value	Genname
		ARMS	ERMS			
235192_at	TP53RK	3,7	5,2	-2,7	9,5E-05	<i>TP53 regulating kinase</i>
233899_x_at	ZBTB10	5,4	6,9	-2,7	6,7E-03	<i>zinc finger and BTB domain containing 10</i>
218695_at	EXOSC4	6,5	8,0	-2,7	8,0E-04	<i>exosome component 4</i>
203816_at	DGUOK	6,3	7,7	-2,7	2,6E-03	<i>deoxyguanosine kinase</i>
204875_s_at	GMDS	5,0	6,5	-2,7	6,1E-03	<i>GDP-mannose 4,6-dehydratase</i>
203622_s_at	PNO1	8,0	9,4	-2,7	2,9E-03	<i>partner of NOB1 homolog (S. cerevisiae)</i>
212724_at	RND3	9,0	10,5	-2,7	3,4E-03	<i>Rho family GTPase 3</i>
209468_at	LRP5	5,6	7,0	-2,7	2,7E-03	<i>low density lipoprotein receptor-related protein 5</i>
225420_at	GPAM	5,2	6,6	-2,7	7,8E-03	<i>glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial</i>
204639_at	ADA	5,8	7,2	-2,7	3,8E-03	<i>adenosine deaminase</i>
240331_at	BMPR1B	2,9	4,3	-2,7	5,5E-03	---
204175_at	ZNF593	6,1	7,6	-2,7	1,6E-04	<i>zinc finger protein 593</i>
201976_s_at	MYO10	7,7	9,1	-2,6	6,0E-03	<i>myosin X</i>
203870_at	USP46	6,6	8,0	-2,6	6,4E-03	<i>ubiquitin specific peptidase 46</i>
203119_at	CCDC86	6,0	7,4	-2,6	3,7E-03	<i>coiled-coil domain containing 86</i>
225676_s_at	WDSOF1	9,2	10,6	-2,6	8,9E-04	<i>WD repeats and SOF1 domain containing</i>
203941_at	RC74	6,0	7,3	-2,6	5,9E-03	<i>integrator complex subunit 9</i>
226868_at	GLT8D3	6,9	8,3	-2,6	7,2E-04	<i>glycosyltransferase 8 domain containing 3</i>
206238_s_at	YAF2	3,9	5,3	-2,6	1,1E-03	<i>YY1 associated factor 2</i>
228660_x_at	SEMA4F	3,8	5,2	-2,6	9,5E-03	<i>sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4F</i>
216640_s_at	PDIA6	8,9	10,3	-2,6	2,2E-03	<i>protein disulfide isomerase family A, member 6</i>
210092_at	MAGOH	7,0	8,3	-2,6	6,0E-03	<i>mago-nashi homolog, proliferation-associated (Drosophila)</i>
217716_s_at	SEC61A1	7,8	9,2	-2,6	1,6E-03	<i>Sec61 alpha 1 subunit (S. cerevisiae)</i>
220254_at	LRP12	4,3	5,7	-2,6	7,6E-03	<i>low density lipoprotein-related protein 12</i>
231798_at	NOG	2,7	4,0	-2,6	2,6E-03	<i>noggin</i>
215695_s_at	GYG2	3,9	5,3	-2,6	6,7E-03	<i>glycogenin 2</i>
206173_x_at	GABPB2	3,7	5,1	-2,6	2,1E-03	<i>GA binding protein transcription factor, beta subunit 1</i>
242857_at	FARP2	3,8	5,2	-2,6	5,4E-03	---
220968_s_at	TSPAN9	7,6	9,0	-2,6	1,4E-03	<i>tetraspanin 9</i>
1554239_s_at	ZADH2	4,8	6,2	-2,6	6,1E-03	<i>zinc binding alcohol dehydrogenase domain containing 2</i>
217419_x_at	AGRIN	4,7	6,1	-2,6	9,0E-03	<i>agrin</i>
208309_s_at	MALT1	4,8	6,2	-2,5	6,3E-03	<i>mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1</i>
233196_at	PEG10	2,2	3,6	-2,5	8,3E-03	---
220028_at	ACVR2B	4,5	5,8	-2,5	8,2E-03	<i>activin A receptor, type IIB</i>
221810_at	RAB15	3,9	5,2	-2,5	7,3E-03	<i>RAB15, member RAS oncogene family</i>
203669_s_at	DGAT1 /// LOC72776 5	5,1	6,5	-2,5	5,5E-03	<i>diacylglycerol O-acyltransferase homolog 1 (mouse) /// similar to diacylglycerol O-acyltransferase homolog 1 (mouse)</i>
207724_s_at	SPAST	4,2	5,6	-2,5	1,2E-03	<i>spastin</i>
209281_s_at	ATP2B1	7,5	8,9	-2,5	6,3E-03	<i>ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 1</i>
201399_s_at	TRAM1	7,9	9,2	-2,5	4,5E-03	<i>translocation associated membrane protein 1</i>
241122_s_at	MUSK	3,2	4,5	-2,5	6,2E-03	<i>muscle, skeletal, receptor tyrosine kinase</i>
225348_at	LOC72792 2	6,1	7,4	-2,5	7,5E-03	<i>FUS interacting protein (serine/arginine-rich) 1</i>
214545_s_at	PROSC	5,7	7,0	-2,5	9,4E-03	<i>proline synthetase co-transcribed homolog (bacterial)</i>
225903_at	PIGU	5,7	7,0	-2,5	3,8E-03	<i>phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class U</i>
214711_at	15E1.2	5,7	7,0	-2,5	9,2E-03	<i>glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase, subunit C homolog (bacterial)</i>

Probenset ID	Gensymbol	mean signal		fold change	p-value	Genname
		ARMS	ERMS			
224799_at	NDFIP2	5,6	6,9	-2,5	4,1E-03	<i>Nedd4 family interacting protein 2</i>
222657_s_at	UBE2W	6,6	7,9	-2,5	4,7E-04	<i>ubiquitin-conjugating enzyme E2W (putative)</i>
218119_at	TIMM23 /// LOC653252	6,1	7,4	-2,5	6,2E-03	<i>translocase of inner mitochondrial membrane 23 homolog (yeast) /// translocase of inner mitochondrial membrane 23 homolog B (yeast)</i>
213497_at	ABTB2	3,2	4,5	-2,5	9,1E-03	<i>ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing 2</i>
212365_at	MYO1B	7,1	8,5	-2,5	6,4E-03	<i>myosin IB</i>
226360_at	ZNRF3	5,9	7,2	-2,5	6,2E-03	<i>zinc and ring finger 3</i>
235177_at	FAM119A	5,5	6,8	-2,5	6,2E-03	<i>family with sequence similarity 119, member A</i>
218284_at	SMAD3	6,7	8,0	-2,5	6,3E-03	<i>SMAD family member 3</i>
232149_s_at	NSMAF	6,0	7,3	-2,5	8,6E-03	<i>neutral sphingomyelinase (N-SMase) activation associated factor</i>
234140_s_at	STIM2	5,6	6,9	-2,5	7,7E-03	<i>stromal interaction molecule 2</i>
201700_at	CCND3	8,1	9,4	-2,5	5,0E-03	<i>cyclin D3</i>
207030_s_at	CSRP2	10,2	11,5	-2,5	9,4E-03	<i>cysteine and glycine-rich protein 2</i>
218689_at	FANCF	5,4	6,7	-2,5	8,8E-03	<i>Fanconi anemia, complementation group F</i>
208447_s_at	PRPS1	4,9	6,1	-2,5	7,2E-03	<i>phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1</i>
205078_at	PIGF	5,9	7,2	-2,4	1,0E-03	<i>phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class F</i>
203359_s_at	MYCBP	6,2	7,5	-2,4	8,4E-03	<i>c-myc binding protein</i>
220367_s_at	SAP130	6,0	7,3	-2,4	8,3E-04	<i>Sin3A-associated protein, 130kDa</i>
225308_s_at	TANC1	8,7	10,0	-2,4	7,7E-04	<i>tetratricopeptide repeat, ankyrin repeat and coiled-coil containing 1</i>
202843_at	RALBP1	5,9	7,2	-2,4	8,3E-03	<i>DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9</i>
222561_at	LANCL2	6,6	7,9	-2,4	4,4E-03	<i>LanC lantibiotic synthetase component C-like 2 (bacterial)</i>
201316_at	PSMA2	6,7	8,0	-2,4	9,6E-04	<i>proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 2</i>
204108_at	NFYA	5,4	6,7	-2,4	1,3E-03	<i>nuclear transcription factor Y, alpha</i>
214908_s_at	TRRAP	3,8	5,1	-2,4	3,8E-03	<i>transformation/transcription domain-associated protein</i>
242923_at	ZNF678	4,2	5,5	-2,4	8,6E-04	<i>Primary neuroblastoma cDNA, clone:Nbla10712, full insert sequence chromosome 19 open reading frame 61</i>
221335_x_at	FLJ12886	3,6	4,8	-2,4	1,9E-04	<i>chromosome 10 open reading frame 2</i>
218590_at	PEO1	4,5	5,7	-2,4	5,2E-03	<i>chromosome 10 open reading frame 2</i>
223283_s_at	TSHZ1	6,9	8,2	-2,4	1,3E-03	<i>teashirt zinc finger homeobox 1</i>
235509_at	C8orf38	6,5	7,8	-2,4	5,9E-04	<i>chromosome 8 open reading frame 38</i>
218465_at	TMEM33	5,8	7,1	-2,4	3,3E-03	<i>transmembrane protein 33</i>
228899_at	CUL1	3,7	4,9	-2,4	7,7E-03	<i>hypothetical protein LOC100132884</i>
219031_s_at	NIP7	7,0	8,3	-2,4	7,5E-05	<i>nuclear import 7 homolog (S. cerevisiae)</i>
218245_at	TSKU	6,1	7,4	-2,4	4,8E-03	<i>tsukushin</i>
222532_at	SRPRB	5,4	6,7	-2,4	4,8E-03	<i>signal recognition particle receptor, B subunit</i>
229817_at	ZNF608	4,3	5,6	-2,3	5,6E-03	<i>zinc finger protein 608</i>
202883_s_at	PPP2R1B	5,8	7,0	-2,3	5,3E-03	<i>protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit A, beta isoform</i>
1552641_s_at	ATAD3A /// ATAD3B /// LOC727868 /// LOC732419	3,3	4,5	-2,3	2,9E-03	<i>ATPase family, AAA domain containing 3A /// ATPase family, AAA domain containing 3B /// ATPase family, AAA domain containing 3C /// similar to AAA-ATPase TOB3</i>
200078_s_at	ATP6V0B	7,9	9,1	-2,3	2,5E-03	<i>ATPase, H+ transporting, lysosomal 21kDa, V0 subunit b</i>
226650_at	ZFAND2A	6,9	8,1	-2,3	1,6E-04	<i>zinc finger, AN1-type domain 2A</i>
238562_at	C8orf53	4,3	5,5	-2,3	4,4E-03	---
203588_s_at	TFDP2	5,5	6,7	-2,3	8,8E-03	<i>transcription factor Dp-2 (E2F dimerization partner 2)</i>
213793_s_at	HOMER1	8,4	9,7	-2,3	3,9E-03	<i>homer homolog 1 (Drosophila)</i>
222636_at	MED28	4,3	5,5	-2,3	3,8E-03	<i>mediator complex subunit 28</i>
222262_s_at	ETNK1	4,1	5,3	-2,3	2,4E-03	<i>ethanolamine kinase 1</i>

Probenset ID	Gensymbol	mean signal		fold change	p-value	Genname
		ARMS	ERMS			
233341_s_at	POLR1B	5,0	6,2	-2,3	1,4E-03	<i>polymerase (RNA) I polypeptide B, 128kDa</i>
217829_s_at	USP39	6,1	7,3	-2,3	3,8E-03	<i>ubiquitin specific peptidase 39</i>
203612_at	BYSL	6,9	8,1	-2,3	4,5E-04	<i>bystin-like</i>
223017_at	TXNDC12	8,4	9,6	-2,3	3,1E-04	<i>thioredoxin domain containing 12 (endoplasmic reticulum)</i>
205280_at	GLRB	3,6	4,8	-2,3	4,1E-03	<i>glycine receptor, beta</i>
216305_s_at	C2orf3	5,7	6,9	-2,3	6,6E-03	<i>chromosome 2 open reading frame 3</i>
206953_s_at	LPHN2	8,1	9,3	-2,3	5,2E-03	<i>latrophilin 2</i>
218172_s_at	DERL1	7,7	8,9	-2,3	1,3E-03	<i>Der1-like domain family, member 1</i>
203265_s_at	MAP2K4	4,8	5,9	-2,3	6,3E-03	<i>mitogen-activated protein kinase kinase 4</i>
1555600_s_at	APOL4	3,0	4,1	-2,3	7,4E-03	<i>apolipoprotein L, 4</i>
208884_s_at	EDD1 /// LOC730429	7,8	9,0	-2,3	6,3E-03	<i>ubiquitin protein ligase E3 component n-recogin 5</i>
202539_s_at	HMGCR	6,8	7,9	-2,3	5,9E-03	<i>3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase</i>
222658_s_at	APTX	4,4	5,5	-2,3	9,5E-03	<i>aprataxin</i>
212540_at	CDC34	7,1	8,3	-2,2	5,6E-03	<i>cell division cycle 34 homolog (S. cerevisiae)</i>
226775_at	ENY2	6,0	7,1	-2,2	8,5E-03	<i>enhancer of yellow 2 homolog (Drosophila)</i>
223219_s_at	CNOT10	5,5	6,7	-2,2	8,6E-04	<i>CCR4-NOT transcription complex, subunit 10</i>
223440_at	C16orf70	5,0	6,1	-2,2	4,0E-03	<i>chromosome 16 open reading frame 70</i>
235103_at	MAN2A1	6,2	7,3	-2,2	4,6E-03	<i>mannosidase, alpha, class 2A, member 1</i>
225265_at	RBMS1	7,3	8,5	-2,2	5,5E-03	<i>RNA binding motif, single stranded interacting protein 1</i>
219819_s_at	MRPS28	8,4	9,6	-2,2	7,1E-04	<i>mitochondrial ribosomal protein S28</i>
200598_s_at	HSP90B1	9,3	10,5	-2,2	4,9E-03	<i>heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1</i>
225375_at	C17orf32	4,4	5,5	-2,2	2,0E-03	<i>transmembrane protein 199</i>
221925_s_at	CSPP1	4,9	6,0	-2,2	1,2E-04	<i>centrosome and spindle pole associated protein 1</i>
205375_at	MDF1	3,9	5,0	-2,2	8,0E-03	<i>MyoD family inhibitor</i>
219103_at	DDEFL1	4,9	6,0	-2,2	2,8E-03	<i>ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 3</i>
1553106_at	C5orf24	5,2	6,3	-2,2	4,5E-03	<i>chromosome 5 open reading frame 24</i>
201433_s_at	PTDSS1	8,9	10,0	-2,2	4,4E-03	<i>phosphatidylserine synthase 1</i>
203007_x_at	LYPLA1	8,4	9,6	-2,2	2,8E-03	<i>lysophospholipase I</i>
219168_s_at	PRR5	3,8	4,9	-2,2	6,5E-03	<i>proline rich 5 (renal)</i>
213696_s_at	MED8	6,1	7,2	-2,2	3,0E-03	<i>mediator complex subunit 8</i>
200844_s_at	PRDX6	10,7	11,9	-2,2	2,0E-03	<i>peroxiredoxin 6</i>
228013_at	PPP2R2A	5,9	7,0	-2,2	8,8E-03	---
219675_s_at	UXS1	6,8	7,9	-2,2	6,9E-03	<i>UDP-glucuronate decarboxylase 1</i>
202894_at	SIRPA	6,4	7,5	-2,2	6,6E-03	<i>EPH receptor B4</i>
208725_at	EIF2S2	4,8	6,0	-2,2	1,9E-03	<i>eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 2 beta, 38kDa</i>
225292_at	COL27A1	4,9	6,0	-2,2	1,4E-03	<i>collagen, type XXVII, alpha 1</i>
201233_at	PSMD13	7,0	8,1	-2,2	2,5E-03	<i>proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 13</i>
221786_at	C6orf120	7,2	8,3	-2,2	1,2E-03	<i>chromosome 6 open reading frame 120</i>
221781_s_at	DNAJC10	6,1	7,2	-2,2	5,2E-03	<i>DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 10</i>
219420_s_at	C1orf163	5,4	6,5	-2,2	2,1E-03	<i>chromosome 1 open reading frame 163</i>
225699_at	C7orf40	7,1	8,3	-2,2	5,6E-03	<i>chromosome 7 open reading frame 40</i>
242727_at	ARL5B	3,3	4,5	-2,2	1,6E-03	<i>ADP-ribosylation factor-like 5B</i>
223048_at	FLJ20487	6,3	7,4	-2,2	1,2E-03	<i>chromosome 11 open reading frame 79</i>
223212_at	ZDHHC16	6,7	7,8	-2,2	7,4E-04	<i>zinc finger, DHHC-type containing 16</i>
1554470_s_at	ZBTB44	5,0	6,1	-2,1	8,7E-03	<i>zinc finger and BTB domain containing 44</i>
217893_s_at	C1orf108	7,3	8,4	-2,1	4,8E-03	<i>akirin 1</i>
211725_s_at	BID	5,8	6,9	-2,1	6,4E-03	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
52285_f_at	CEP76	6,2	7,2	-2,1	6,0E-04	<i>centrosomal protein 76kDa</i>

Probenset ID	Gensymbol	mean signal		fold change	p-value	Genname
		ARMS	ERMS			
211139_s_at	NAB1	4,6	5,7	-2,1	8,8E-03	NGFI-A binding protein 1 (EGR1 binding protein 1)
226942_at	PHF20L1	6,2	7,3	-2,1	6,2E-03	PHD finger protein 20-like 1
223225_s_at	SEH1L	4,1	5,2	-2,1	5,8E-03	SEH1-like (<i>S. cerevisiae</i>)
1555450_a_at	NARG1L	4,0	5,1	-2,1	4,5E-03	NMDA receptor regulated 1-like
203737_s_at	PPRC1	7,0	8,1	-2,1	9,1E-05	peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator-related 1
209817_at	PPP3CB	6,4	7,4	-2,1	2,5E-03	protein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic subunit, beta isoform
203176_s_at	TFAM	5,5	6,5	-2,1	1,6E-04	transcription factor A, mitochondrial
218421_at	CERK	6,6	7,7	-2,1	1,0E-02	ceramide kinase
212771_at	C10orf38	7,7	8,7	-2,1	6,7E-03	family with sequence similarity 171, member A1
214697_s_at	ROD1	3,5	4,6	-2,1	4,6E-04	ROD1 regulator of differentiation 1 (<i>S. pombe</i>)
210296_s_at	PXMP3	7,8	8,9	-2,1	5,0E-03	peroxisomal membrane protein 3, 35kDa
220967_s_at	ZNF696	4,2	5,2	-2,1	4,9E-03	zinc finger protein 696
205698_s_at	MAP2K6	4,8	5,8	-2,1	4,5E-03	mitogen-activated protein kinase kinase 6
211432_s_at	TYRO3	3,7	4,8	-2,1	9,0E-03	TYRO3 protein tyrosine kinase
203489_at	SIVA1	6,0	7,1	-2,1	3,2E-03	SIVA1, apoptosis-inducing factor
225253_s_at	METTL2B /// METTL2A	7,5	8,5	-2,1	3,9E-03	methyltransferase like 2A /// methyltransferase like 2B
227161_at	NOM1	4,3	5,4	-2,1	4,5E-03	nucleolar protein with MIF4G domain 1
213320_at	PRMT3	6,1	7,1	-2,1	2,1E-03	protein arginine methyltransferase 3
207515_s_at	POLR1C	5,6	6,7	-2,1	1,4E-03	polymerase (RNA) I polypeptide C, 30kDa
209257_s_at	SMC3	7,1	8,2	-2,1	7,9E-03	structural maintenance of chromosomes 3
1554082_a_at	NOL9	5,5	6,6	-2,1	9,2E-03	nucleolar protein 9
36936_at	TSTA3	6,9	7,9	-2,1	5,7E-03	tissue specific transplantation antigen P35B
65884_at	MAN1B1	5,9	7,0	-2,1	8,3E-03	mannosidase, alpha, class 1B, member 1
225737_s_at	FBXO22	5,2	6,3	-2,1	5,3E-03	F-box protein 22
209899_s_at	SIAHBP1	8,8	9,8	-2,1	2,8E-03	poly-U binding splicing factor 60kDa
222412_s_at	SSR3	7,4	8,4	-2,1	7,7E-04	signal sequence receptor, gamma (translocon-associated protein gamma)
225844_at	POLE4	6,3	7,3	-2,0	4,8E-04	polymerase (DNA-directed), epsilon 4 (p12 subunit)
205763_s_at	DDX18	6,8	7,8	-2,0	3,9E-03	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 18
203545_at	ALG8	6,9	7,9	-2,0	3,4E-03	asparagine-linked glycosylation 8, alpha-1,3-glucosyltransferase homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
223374_s_at	B3GALNT1	6,2	7,3	-2,0	2,6E-03	beta-1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase 1 (globoside blood group)
200997_at	RBM4	9,2	10,2	-2,0	2,3E-03	RNA binding motif protein 4
208152_s_at	DDX21	9,6	10,6	-2,0	1,2E-03	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 21
225163_at	FRMD4A	7,1	8,1	-2,0	5,1E-03	FERM domain containing 4A
203957_at	E2F6	6,7	7,7	-2,0	7,6E-03	E2F transcription factor 6
229865_at	FNDC3B	2,5	3,5	-2,0	8,3E-03	fibronectin type III domain containing 3B
218214_at	C12orf44	6,6	7,6	-2,0	5,1E-04	chromosome 12 open reading frame 44
223984_s_at	NUPL1	4,5	5,5	-2,0	4,6E-03	nucleoporin like 1
207829_s_at	BNIP1	5,0	6,0	-2,0	2,4E-04	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 1
204761_at	USP6NL	6,0	7,0	-2,0	6,8E-03	USP6 N-terminal like
211913_s_at	MERTK	3,1	4,1	-2,0	1,5E-03	c-mer proto-oncogene tyrosine kinase
1552286_at	ATP6V1E2	3,3	4,3	-2,0	3,1E-03	ATPase, H+ transporting, lysosomal 31kDa, V1 subunit E2
229845_at	MAPKAP1	3,6	4,6	-2,0	2,2E-03	mitogen-activated protein kinase associated protein 1
222893_s_at	C1orf82	5,0	6,0	-2,0	1,5E-03	RNA polymerase II associated protein 2
234726_s_at	TMEM168	5,2	6,3	-2,0	6,6E-03	transmembrane protein 168

Proben ID	Gensymbol	mean signal		fold change	p-value	Genname
		ARMS	ERMS			
202083_s_at	SEC14L1	5,0	6,0	-2,0	9,3E-03	<i>SEC14-like 1 (S. cerevisiae)</i>
231973_s_at	ANAPC1	6,1	7,1	-2,0	6,5E-03	<i>anaphase promoting complex subunit 1</i>
221543_s_at	SPFH2	7,5	8,5	-2,0	4,8E-03	<i>ER lipid raft associated 2</i>
219363_s_at	MTERFD1	8,8	9,8	-2,0	7,7E-04	<i>MTERF domain containing 1</i>
211686_s_at	RBM13	7,9	8,9	-2,0	1,6E-03	<i>MAK16 homolog (S. cerevisiae)</i>
203086_at	KIF2A	4,4	5,4	-2,0	7,0E-03	<i>kinesin heavy chain member 2A</i>
210022_at	PCGF1	6,2	7,2	-2,0	5,8E-03	<i>polycomb group ring finger 1</i>
228801_at	ORMDL1	4,7	5,7	-2,0	5,8E-03	<i>ORM1-like 1 (S. cerevisiae)</i>
221712_s_at	WDR74	6,0	7,0	-2,0	6,3E-03	<i>WD repeat domain 74</i>

7.2 LC/MS-Analysen

7.2.1 Unbekannte Bande bei 60-70 kDa

7.2.1.1 Rh30

Proteinname	Peptide	Sequezaabdeckung [%]	Mol.-Gew. [kDa]	PEP	Intensität
<i>Vimentin</i>	43	74,5	53,651	3,09E-207	170730000
<i>Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5</i>	18	32,2	69,147	3,84E-82	22663000
--	1	6,1	19,748	4,86E-07	18967000
<i>Lamin-A/C</i>	24	36,4	74,139	2,59E-94	13634000
<i>Lamin-B2</i>	27	41,5	69,948	1,91E-117	10865000
<i>Desmin</i>	20	41,9	53,535	1,28E-107	10001000
<i>Putative uncharacterized protein ENSP00000375030</i>	1	9,4	13,48	1,76E-18	4189100
<i>Pyruvate kinase isozymes M1/M2</i>	7	17,7	57,936	4,37E-46	3203700
<i>60 kDa heat shock protein, mitochondrial</i>	10	31,6	61,054	1,86E-54	2120900
<i>Cystatin-A</i>	4	66,3	11,006	2,02E-13	1772300
<i>DNA FLJ78387</i>	5	16,5	51,596	8,23E-18	1754800
<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>	6	11,5	70,897	1,41E-15	1735100
<i>cDNA FLJ75516, highly similar to Xenopus tropicalis ubiquitin C, mRNA</i>	2	32,8	77,028	1,36E-07	1446800
<i>Alpha-1-antitrypsin;Alpha-1 protease inhibitor</i>	3	12,2	46,736	2,38E-08	1240000
<i>Zinc-alpha-2-glycoprotein</i>	4	14,8	34,258	3,44E-28	1203500
<i>Prolactin-inducible protein</i>	3	19,9	16,572	1,58E-09	1054500
<i>Lipocalin-1</i>	3	16,5	19,25	3,15E-11	950210
<i>V1-17 protein</i>	2	16,1	25,024	1,32E-10	759630
<i>Lysozyme C</i>	3	17,6	16,537	3,04E-10	689220
<i>Protein S100-A7</i>	2	11,9	11,471	5,95E-08	686510
<i>Protein S100-A8</i>	3	31,2	10,834	1,01E-14	632690
<i>Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial</i>	3	5,1	68,996	1,11E-11	571670
<i>Transcriptional adapter 2-beta</i>	1	1,7	48,47	1,58E-05	527430
<i>RNA-binding protein 9</i>	2	5,5	47,343	3,56E-16	478210
<i>J kappa 5</i>	2	11	25,834	2,47E-03	462880
<i>Fatty acid-binding protein, epidermal</i>	2	23,7	15,164	1,63E-06	432270
<i>cDNA FLJ14473 fis, clone MAMMA1001080, highly similar to Homo sapiens SNC73 protein (SNC73) mRNA</i>	3	14,6	53,088	2,06E-14	414760
<i>Desmoglein-1</i>	3	5,1	113,71	2,25E-16	353240
<i>Putative uncharacterized protein</i>	5	13,5	55,849	5,24E-10	300210
<i>Stress-70 protein, mitochondrial</i>	2	3,4	73,68	4,46E-07	233580
<i>Apolipoprotein D</i>	2	13,5	24,158	2,02E-07	217870
<i>Hemoglobin subunit beta</i>	2	45,6	15,998	2,53E-21	187280
<i>Heat shock protein HSP 90-alpha</i>	1	1,6	98,16	2,73E-05	176790
<i>Dermcidin isoform 2</i>	2	20,7	12,414	2,10E-03	166210
<i>Ig gamma-4 chain C region</i>	4	8,8	53,251	1,26E-08	164830
<i>Serine hydroxymethyltransferase</i>	1	2,1	56,379	1,45E-03	155370
<i>Trypsin-3</i>	1	4,3	32,528	4,47E-06	152160
<i>Runt-related transcription factor 2</i>	1	2,5	64,438	3,38E-02	149010
<i>Serpin B3</i>	2	4,6	44,564	7,88E-03	128850
<i>Protein disulfide-isomerase</i>	1	2	57,116	2,87E-02	126820
<i>ATPase family AAA domain-containing protein 3B</i>	1	1,7	72,572	9,48E-03	114210
<i>Annexin A2</i>	1	3,1	40,411	9,62E-06	103570
<i>Elongation factor 1-alpha 1</i>	1	5,2	50,14	1,29E-02	94848
<i>Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1</i>	1	1,9	72,777	4,63E-02	78090
<i>Splicing factor 1</i>	1	1,3	80,62	7,44E-03	52966
<i>SERPIN12 protein</i>	1	1,9	48,445	2,44E-02	47942
<i>Cytoskeleton-associated protein 4</i>	1	1,2	66,022	5,55E-02	10375

7.2.1.2 RD

Proteinname	Peptide	Sequeabdeckung [%]	Mol.-Gew. [kDa]	PEP	Intensität
<i>Vimentin</i>	35	74,5	53,651	3,09E-207	45997000
<i>Lamin-B1</i>	42	56,7	66,408	3,23E-180	24932000
--	1	6,1	19,748	4,86E-07	18245000
<i>60 kDa heat shock protein, mitochondrial</i>	16	31,6	61,054	1,86E-54	4576900
<i>IGL @ protein</i>	3	14,4	27,993	5,54E-12	4194100
<i>Lamin-B2</i>	25	41,5	69,948	1,91E-117	3735300
<i>Lamin-A/C</i>	18	36,4	74,139	2,59E-94	3458800
<i>Putative uncharacterized protein ENSP00000375030</i>	1	9,4	13,48	1,76E-18	3182300
<i>cDNA FLJ78387</i>	7	16,5	51,596	8,23E-18	2267200
<i>Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5</i>	11	32,2	69,147	3,84E-82	1999400
<i>Cystatin-A</i>	4	66,3	11,006	2,02E-13	1163400
<i>Prolactin-inducible protein</i>	3	19,9	16,572	1,58E-09	1152300
<i>Alpha-1-antitrypsin</i>	5	12,2	46,736	2,38E-08	1127400
<i>Lipocalin-1</i>	3	16,5	19,25	3,15E-11	1109700
<i>V1-17 protein</i>	3	16,1	25,024	1,32E-10	1092300
<i>cDNA FLJ75516, highly similar to Xenopus tropicalis ubiquitin C, mRNA</i>	2	32,8	77,028	1,36E-07	1053000
<i>Lysozyme C</i>	3	17,6	16,537	3,04E-10	893300
<i>Hemoglobin subunit beta</i>	5	45,6	15,998	2,53E-21	847450
<i>Protein S100-A8</i>	3	31,2	10,834	1,01E-14	756340
<i>Fatty acid-binding protein, epidermal cDNA FLJ14473 fis, clone MAMMA1001080, highly similar to Homo sapiens SNC73 protein (SNC73) mRNA</i>	3	23,7	15,164	1,63E-06	739080
<i>RNA-binding protein 9</i>	7	14,6	53,088	2,06E-14	721180
<i>Zinc-alpha-2-glycoprotein</i>	2	5,5	47,343	3,56E-16	661640
<i>Protein S100-A7</i>	3	14,8	34,258	3,44E-28	561820
<i>Lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex, mitochondrial</i>	2	11,9	11,471	5,95E-08	527220
<i>Putative uncharacterized protein</i>	4	9,1	53,486	4,92E-06	496290
<i>Desmoglein-1</i>	6	13,5	55,849	5,24E-10	483920
<i>J kappa 5</i>	4	5,1	113,71	2,25E-16	433750
<i>Transcriptional adapter 2-beta</i>	2	11	25,834	2,47E-03	427280
<i>Apolipoprotein A-I</i>	1	1,7	48,47	1,58E-05	360090
<i>Pyruvate kinase isozymes M1/M2</i>	1	5,2	30,777	4,93E-03	315170
<i>Apolipoprotein D</i>	2	17,7	57,936	4,37E-46	309370
<i>Dermcidin isoform 2</i>	3	13,5	24,158	2,02E-07	242000
<i>Ig gamma-4 chain C region</i>	2	20,7	12,414	2,10E-03	230830
<i>T-complex protein 1 subunit gamma</i>	4	8,8	53,251	1,26E-08	145800
<i>Desmin</i>	1	2	60,533	1,33E-04	134360
<i>Caspase-14</i>	8	41,9	53,535	1,28E-107	119230
<i>Elongation factor 1-alpha 1</i>	2	8,7	27,679	3,67E-04	102320
<i>Gamma-glutamylcyclotransferase</i>	1	5,2	50,14	1,29E-02	92906
<i>Serpin B3</i>	1	6,9	21,007	5,17E-05	66785
<i>60S ribosomal protein L13</i>	1	4,6	44,564	7,88E-03	52000
<i>Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial</i>	1	4,3	24,261	3,81E-02	37773
<i>Hemoglobin subunit alpha</i>	1	2,2	61,397	4,48E-04	36657
<i>Splicing factor 1</i>	3	25,4	15,257	1,15E-05	14472
	1	1,3	80,62	7,44E-03	10645

7.2.2 Unbekannte Bande bei 250 kDa

Proteinname	Peptide	Sequeabdeckung [%]	Mol.-Gew. [kDa]	PEP	Intensität
<i>Myosin-9</i>	92	44,1	226,53	0,00E+00	122090000
<i>CD276 antigen</i>	8	27,2	57,235	1,63E-58	20960000
<i>Myosin-10</i>	61	31,6	231,37	4,04E-199	18204000
<i>Nestin</i>	34	24,3	177,44	1,79E-180	16924000
--	1	6,1	19,748	4,73E-09	9131700
<i>Protein S100-A8</i>	5	47,3	10,834	4,77E-28	4728900
<i>Protein S100-A9</i>	4	37,7	13,242	1,26E-36	4708900
--	1	9,4	13,48	5,95E-09	2461700
<i>Histone H4</i>	5	50,5	11,367	4,64E-29	2154200
<i>cDNA FLJ75516, highly similar to Xenopus tropicalis ubiquitin C, mRNA</i>	2	32,8	77,028	8,71E-17	1308400

Proteinname	Peptide	Sequenzabdeckung [%]	Mol.-Gew. [kDa]	PEP	Intensität
<i>cDNA, FLJ93047, highly similar to Homo sapiens matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted) (MMP14), mRNA</i>	6	8,8	65,893	9,94E-09	1006200
<i>Heat shock protein HSP 90-beta</i>	6	10,2	83,263	1,27E-24	995480
<i>Galectin-1</i>	4	35,6	14,716	9,63E-08	916820
<i>Inhibitor of kappaB kinase gamma</i>	1	3,3	55,786	6,42E-14	818670
<i>Actin, cytoplasmic 2</i>	7	48,5	41,792	1,01E-130	803640
<i>Ig kappa chain V-II region RPMI 6410</i>	2	11,3	26,234	1,09E-07	720120
<i>Lactotransferrin</i>	1	2,8	78,367	5,14E-20	602380
<i>Profilin-1</i>	1	10	15,054	9,61E-20	594720
<i>NES protein</i>	18	35	65,809	2,43E-112	538900
<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U</i>	4	5,3	90,583	1,39E-11	530350
<i>Zymogen granule protein 16 homolog B</i>	3	22,1	22,739	2,11E-13	517590
<i>Dedicator of cytokinesis protein 7</i>	7	3,1	242,56	5,26E-09	503380
<i>60S ribosomal protein L13</i>	4	29,4	24,261	1,06E-12	483390
<i>cDNA FLJ55335, highly similar to Tyrosine-protein kinase-like 7</i>	6	5,7	119,2	1,58E-11	481270
<i>Glycogen phosphorylase, muscle form</i>	2	2,3	97,091	1,76E-04	476680
<i>Cystatin-SN</i>	1	12,1	16,387	7,41E-04	468170
<i>Histone H2A.J</i>	2	8,8	18,414	9,37E-08	437120
<i>Transcriptional adapter 2-beta</i>	1	1,7	48,47	3,85E-05	353410
<i>Ephrin type-A receptor 6</i>	2	1,7	126,56	2,54E-03	315260
<i>Neural cell adhesion molecule 1</i>	3	4,1	94,573	1,14E-04	254310
<i>Laminin subunit gamma-1</i>	5	3,9	177,6	8,00E-13	246670
<i>Dermcidin isoform 2</i>	2	11,6	12,414	9,76E-08	228870
<i>Vimentin</i>	5	10,7	53,651	3,74E-11	228200
<i>T-complex protein 1 subunit gamma</i>	1	1,5	60,533	3,10E-02	185730
<i>Amyloid beta A4 protein</i>	3	4,3	86,942	9,99E-07	180030
<i>U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase</i>	3	1,5	244,5	1,06E-04	168290
<i>60S ribosomal protein L10</i>	1	14	24,577	4,25E-06	163650
<i>Putative uncharacterized protein DKFZp686G11190</i>	2	6,7	52,042	1,19E-10	162960
<i>Trypsin-3</i>	1	4,3	32,528	2,45E-13	159930
<i>CAD protein</i>	3	1,3	242,98	8,50E-04	145370
<i>Lysozyme C</i>	1	8,1	16,537	2,25E-07	143350
--	1	26,1	14,017	2,24E-01	140820
<i>Cystatin-S</i>	1	12,1	16,214	5,38E-06	132190
<i>Neural cell adhesion molecule L1</i>	3	2,5	140	1,84E-08	130450
<i>Junction plakoglobin</i>	2	2,6	81,744	1,10E-03	127710
<i>Melanocyte-stimulating hormone receptor</i>	2	3,1	88,381	4,73E-02	125110
<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 16</i>	2	6,3	45,183	1,59E-04	121260
<i>Myeloblastin</i>	1	3,5	27,807	3,93E-04	115590
<i>Desmocollin-1</i>	1	3,1	99,986	1,34E-05	105150
<i>Desmoplakin</i>	2	0,8	331,77	2,32E-03	90440
<i>Pre-mRNA-processing-splicing factor 8</i>	2	0,9	273,6	5,60E-02	87852
<i>Similar to Ubiquinol-cytochrome C reductase iron-sulfur subunit, mitochondrial (Rieske iron-sulfur protein) (RISP)</i>	1	6,7	30,48	6,30E-02	85744
<i>52 kDa Ro protein</i>	1	4	54,169	7,12E-03	84956
<i>Annexin A2</i>	2	9	40,411	3,75E-06	76220
<i>Decay-accelerating factor splicing variant 5</i>	2	3,4	59,037	1,90E-02	70557
<i>60S ribosomal protein L17</i>	1	5,4	21,397	3,70E-02	62501
<i>Calmodulin-like protein 5</i>	1	21,2	15,892	2,30E-08	61689
<i>Filaggrin</i>	2	2	435,16	4,23E-04	59476
<i>Fatty acid synthase</i>	2	0,7	273,42	1,34E-02	58648
<i>Ig alpha-1 chain C region</i>	1	3,7	53,224	1,96E-05	57430
<i>40S ribosomal protein S2</i>	1	6,5	31,324	5,75E-03	55636
<i>Heat shock protein HSP 90-alpha</i>	3	4	98,16	2,07E-11	51071
<i>Actinin alpha 1 isoform 3</i>	1	1,3	107,14	1,03E-02	45749
<i>Peroxiredoxin-1</i>	1	23,6	22,11	7,00E-08	29147
<i>Zinc-alpha-2-glycoprotein</i>	1	17,1	34,258	3,01E-28	26630
<i>Transferrin receptor protein 1</i>	1	1,8	84,87	4,20E-02	21600
<i>Serpin B4</i>	1	3,8	44,853	7,42E-03	17984

7.2.3 Unbekannte Bande bei 45 kDa

Proteinname	Peptide	Sequenzabdeckung [%]	Mol.-Gew. [kDa]	PEP	Intensität
<i>Actin, cytoplasmic 2</i>	16	48,5	41,792	1,01E-130	393610000
<i>Protein S100-A9</i>	4	37,7	13,242	1,26E-36	23101000
<i>Actin, alpha skeletal muscle</i>	14	39,8	42,051	1,82E-70	16135000
<i>Protein S100-A8</i>	5	47,3	10,834	4,77E-28	6181900
<i>Haptoglobin</i>	5	12,1	46,723	1,89E-54	5317500
<i>V1-17 protein</i>	1	3,4	25,024	4,84E-03	3849900
<i>Putative uncharacterized protein DKFZp686G11190</i>	3	6,7	52,042	1,19E-10	3677700
<i>Fructose-bisphosphate aldolase A</i>	5	13,2	45,26	1,66E-31	3034300
<i>60S ribosomal protein L13</i>	6	29,4	24,261	1,06E-12	1859100
<i>Poly(RC)-binding protein 2 isoform b variant</i>	6	22,7	38,651	3,94E-26	1769900
<i>Histone H4</i>	4	50,5	11,367	4,64E-29	1694900
<i>Zinc-alpha-2-glycoprotein</i>	4	17,1	34,258	3,01E-28	1110800
<i>Peroxiredoxin-1</i>	5	23,6	22,11	7,00E-08	946160
<i>Ig kappa chain V-III region NG9</i>	1	9	10,729	1,36E-03	879560
<i>Lactotransferrin</i>	1	2,8	78,367	5,14E-20	809830
<i>Inhibitor of kappaB kinase gamma</i>	1	3,3	55,786	6,42E-14	727050
<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2</i>	4	8,8	33,67	2,03E-07	663240
<i>60S ribosomal protein L10</i>	3	14	24,577	4,25E-06	575900
<i>cDNA FLJ51656, highly similar to Actin-like protein 2</i>	2	6,5	45,376	1,01E-05	570180
<i>Dystroglycan</i>	2	2,6	97,44	1,37E-05	551810
<i>Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1</i>	2	5,9	43,439	1,75E-04	515500
<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G</i>	3	8,7	42,331	3,20E-16	504540
<i>40S ribosomal protein S3</i>	4	18,1	26,688	1,17E-09	501670
<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3</i>	2	5,6	39,594	9,29E-06	481970
<i>Zymogen granule protein 16 homolog B</i>	3	22,1	22,739	2,11E-13	480750
<i>Poly(rC)-binding protein 1</i>	4	15,7	37,497	5,88E-18	464830
<i>Calmodulin-like protein 5</i>	2	21,2	15,892	2,30E-08	454740
<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0</i>	1	3,9	38,434	1,24E-11	365700
<i>Tropomodulin-3</i>	2	5,4	39,594	1,23E-04	361040
<i>40S ribosomal protein S2</i>	2	6,5	31,324	5,75E-03	355600
<i>Nuclear migration protein nudC</i>	3	8,2	38,242	6,64E-05	344910
<i>Desmocollin-1</i>	2	3,1	99,986	1,34E-05	338820
<i>Serpin B4</i>	2	3,8	44,853	7,42E-03	312690
<i>52 kDa Ro protein</i>	2	4	54,169	7,12E-03	292600
<i>Ig kappa chain V-III region VG</i>	1	7,1	13,798	8,90E-03	281170
<i>CD276 antigen</i>	1	27,2	57,235	1,63E-58	276720
<i>Septin-2</i>	2	6,6	45,46	2,96E-05	273160
<i>cDNA FLJ75459</i>	1	2,8	43,448	8,28E-05	270110
<i>cDNA FLJ37456 fis, clone BRAWH2011096, highly similar to 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13</i>	3	6,9	42,942	1,69E-05	256720
<i>Profilin-1</i>	1	10	15,054	9,61E-20	248450
<i>Histone H2A.J</i>	2	8,8	18,414	9,37E-08	246480
<i>Fibrinogen beta chain</i>	2	5,7	55,928	2,52E-10	243510
<i>60S ribosomal protein L17</i>	1	5,4	21,397	3,70E-02	239980
<i>Trypsin-3</i>	1	4,3	32,528	2,45E-13	237120
<i>Ig heavy chain V-III region HIL</i>	1	9,1	13,437	8,04E-07	229990
<i>Phosphoglycerate kinase 1</i>	2	6,2	44,614	3,95E-16	222990
<i>Interleukin enhancer-binding factor 2</i>	1	3,1	43,062	3,96E-03	211260
<i>Galectin-1</i>	2	35,6	14,716	9,63E-08	209640
<i>Single-stranded DNA-binding protein 3</i>	2	7	40,421	3,14E-11	208130
<i>Ig alpha-1 chain C region</i>	1	3,7	53,224	1,96E-05	208000
<i>Reticulocalbin-1</i>	2	6,9	38,89	1,22E-02	201430
<i>Ig kappa chain V-II region RPMI 6410</i>	1	11,3	26,234	1,09E-07	195000
<i>Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G</i>	1	4,1	35,611	2,41E-05	193500
<i>Alpha-1-acid glycoprotein 2</i>	1	4	23,602	1,93E-07	191300
<i>40S ribosomal protein S11</i>	2	13,3	18,431	2,42E-04	189740
<i>cDNA FLJ75516, highly similar to Xenopus tropicalis ubiquitin C, mRNA</i>	1	32,8	77,028	8,71E-17	187240
<i>RNA-binding protein 4</i>	1	2,5	40,313	1,36E-03	182010
<i>Myeloblastin</i>	1	3,5	27,807	3,93E-04	180650
<i>Protein S100-A7</i>	1	10,9	11,471	6,29E-03	180420
--	1	6,1	19,748	4,73E-09	180370
<i>Cystatin-S</i>	1	12,1	16,214	5,38E-06	176120
<i>Major histocompatibility complex class I F</i>	1	2,9	50,427	2,35E-03	172840

Proteinname	Peptide	Sequeza- bedeckung [%]	Mol.-Gew. [kDa]	PEP	Intensität
<i>Calumenin, isoform CRA_c</i>	2	6,5	38,05	2,67E-03	170390
<i>DnaJ homolog subfamily B member 6</i>	1	3,1	36,087	3,70E-02	165710
<i>Lysozyme C</i>	1	8,1	16,537	2,25E-07	162250
<i>POTE ankyrin domain family member E</i>	8	7,9	121,36	4,05E-43	162130
<i>Rheumatoid factor D5 heavy chain</i>	1	9,2	12,986	5,95E-09	151930
<i>Creatine kinase B-type</i>	1	2,9	42,644	1,61E-02	144600
<i>Desmoplakin</i>	2	0,8	331,77	2,32E-03	140600
<i>cDNA FLJ59739, highly similar to Protein transport protein Sec61 subunit alpha isoform 1</i>	1	1,9	52,949	2,94E-02	130620
<i>cDNA FLJ55165, highly similar to Particularly interesting new Cys-His protein</i>	1	3,1	44,39	3,96E-03	130090
<i>DnaJ homolog subfamily B member 11</i>	1	3,1	40,513	8,04E-07	129340
<i>Annexin A2</i>	1	9	40,411	3,75E-06	127310
<i>Adenosylhomocysteinase</i>	1	2,8	47,716	1,32E-09	127150
<i>Filaggrin</i>	1	2	435,16	4,23E-04	110500
<i>cDNA, FLJ96656, highly similar to Homo sapiens SPFH domain family, member 1 (SPFH1), mRNA</i>	1	3,4	39,171	2,78E-02	106170
<i>Galectin-7</i>	1	8,1	15,075	8,28E-05	100300
<i>40S ribosomal protein S9</i>	1	4,6	22,591	2,94E-02	100080
<i>60S ribosomal protein L19</i>	1	4,6	23,466	2,86E-07	86591
<i>Cystatin-SN</i>	1	12,1	16,387	7,41E-04	83348
<i>26S protease regulatory subunit S10B</i>	1	2,7	45,796	8,28E-05	81028
<i>Activator of 90 kDa heat shock protein</i>					
<i>ATPase homolog 1</i>	1	3	38,274	1,50E-02	73263
--	1	9,4	13,48	5,95E-09	49936
<i>Obg-like ATPase 1</i>	1	1,7	46,937	4,45E-02	30332
<i>E3 ubiquitin-protein ligase KCMF1</i>	1	2,4	41,947	8,90E-03	29113

7.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Jörg Fuchs danke ich für die Möglichkeit, meine Promotion in seiner Abteilung durchzuführen.

Bei Herrn Prof. Dr. Olaf Rieß möchte ich mich für die Vertretung der Arbeit an der biologischen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen bedanken.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Sorin Armeanu-Ebinger für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die kompetente Betreuung und die zahlreichen wissenschaftlichen Denkanstöße.

Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Guido Seitz, der meine Begeisterung für das Rhabdomyosarkom geweckt und meine Manuskripte stets kritisch unter die Lupe genommen hat.

Für die sehr angenehme Arbeitsumgebung bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Forschungslabors Kinderchirurgie. Besonders bei Bettina Kirchner und Julia Wenz für ihre spontane Hilfsbereitschaft bei allen möglichen Fragen. Alexander Dewerth danke ich für die informativen Diskussionen und das ausdauernde Korrekturlesen. Jennifer Rottenberger und Heike Dettmann haben mir mit netten Gesprächen manche Inkubationszeit verkürzt.

Nicht genug danken kann ich meinen Eltern und Großeltern, die viel Ausdauer und Geduld während meiner langjährigen Ausbildung bewiesen und mich in jeder Hinsicht unterstützt haben.

Zum Schluss möchte ich noch einen ganz besonderen Dank an Tobias Rinas aussprechen, der an meiner Seite alle Höhen und Tiefen der Promotion miterlebt hat und immer für mich da war.

7.4 Lebenslauf