

**Untersuchungen zur Expression und Funktion
Ewing-Sarkom-assoziiierter Gene**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Manuela Hesse
geboren am 05.10.1977 in Wolmirstedt (Landkreis Börde)

Gutachter:

1. PD Dr. R. Golbik
2. PD Dr. M.S. Staeger
3. Prof. Dr. med. M. Paulussen
4. Prof. Dr. E. Wahle

Halle (Saale), 03.12.2014

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	7
1.1	Die Familie der Ewing-Sarkome	7
1.1.1	Definition	7
1.1.2	Genetik der Familie der Ewing-Sarkome	7
1.1.3	Epidemiologie	8
1.2	Klinisches Erscheinungsbild und Diagnostik	9
1.2.1	Symptomatik	9
1.2.2	Primärtumor und Metastasierung	9
1.2.3	Labordiagnostik	10
1.2.4	Bildgebende Diagnostik	10
1.2.5	Biopsie	11
1.2.6	Knochenmarksbeteiligung	11
1.3	Histopathologie und Differenzialdiagnose	11
1.4	Molekularbiologie	12
1.5	Therapie	13
1.5.1	Chemotherapie	14
1.5.2	Lokaltherapie	14
1.6	Metastasierung und Prognose	14
2.	ZIEL DIESER ARBEIT	16
3.	MATERIAL UND METHODEN	17
3.1	Material	17
3.1.1	Chemikalien und Reagenzien	17
3.1.2	Zusammensetzung häufig verwendeter Puffer und Lösungen	19
3.1.3	Verwendete Zelllinien, Gewebe und Medien für eukaryontische Zellkulturen	21
3.1.4	Sequenzen verwendeter siRNA- und miRNA-Oligonukleotide sowie RT-PCR-Primer	28
3.1.5	Antikörper für die Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	34
3.1.6	Mikroarray-Datensätze	34
3.1.7	Datenbanken und Programme	34
3.2	Molekularbiologische Methoden	35
3.2.1	Agarosegelelektrophorese	35
3.2.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	36
3.2.3	Konzentrationsbestimmung von RNA- und DNA-Nukleinsäuren	36
3.2.4	Affymetrix DNA-Microarrays als Werkzeug der Genexpressions-Analyse	36
3.2.4.1	<i>Isolation der Gesamt-RNA</i>	36
3.2.4.2	<i>Aufreinigung der präparierten Gesamt-RNA</i>	37
3.2.4.3	<i>Erst-Strang cDNA-Synthese</i>	37
3.2.4.4	<i>Zweit-Strang-Synthese</i>	38
3.2.4.5	<i>Phenol-Chloroform-Extraktion der cDNA</i>	38

3.2.4.6	<i>In vitro</i> Transkription (IVT)	39
3.2.4.7	IVT-Aufreinigung	39
3.2.4.8	Fragmentierung der cRNA	40
3.2.4.9	Hybridisierung	40
3.2.4.10	Waschen und Färben des Microarrays	41
3.2.4.11	Scan-Vorgang der Microarrays	41
3.2.4.12	Waschen und Zweitfärbung mit Antikörperverstärkung	41
3.2.4.13	Scanvorgang der Microarrays nach Antikörperverstärkung	42
3.2.5	Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	42
3.2.5.1	Isolation und Aufreinigung der präparierten Gesamt-RNA	42
3.2.5.2	Reverse Transkription von mRNA	42
3.2.5.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	43
3.2.5.4	Quantitative RT-PCR-Amplifikation	44
3.2.5.5	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ –Methode	45
3.2.5.6	Sequenzier-PCR	46
3.2.6	Klonierung	47
3.2.6.1	Verwendete Plasmide	47
3.2.6.2	Restriktionsendonuklease-Verdau	48
3.2.6.3	XL10-Gold - Kompetente Zellen für Hitzeschock-Transformation	49
3.2.6.4	Ligation	49
3.2.6.5	Transformation	50
3.2.6.6	Minipräparation	50
3.2.6.7	Maxipräparation	51
3.3	Zellbiologische Methoden	51
3.3.1	Kultivierung und Passagieren eukaryotischer Zellen	51
3.3.2	Kryokonservierung eukaryotischer Zellen	52
3.3.3	Transfektion	52
3.3.3.1	Transfektion mit kationischen Polymeren	52
3.3.3.2	Transfektion mit AMAXA Nucleofection-Technologie	53
3.3.4	Durchflusszytometrische Analyse von Zellen	53
3.3.4.1	Das Prinzip der Durchflusszytometrie	53
3.3.4.2	Analyse transfizierter eukaryotischer Zellen	54
3.3.4.3	Analyse fluoreszenzmarkierter Oberflächenantigene	54
3.3.4.4	Analyse von Zellkulturüberständen eukaryotischer Zellen	54
3.3.5	Fluoreszenzmikroskopie von Zellen	55
3.3.6	Untersuchungen zur Zellviabilität	55
3.3.6.1	LDH-Test	55
3.3.7	RNA-Interferenz	57
3.3.7.1	Prinzip der RNA-Interferenz	57
3.3.7.2	RNA-Interferenz mittels miRNA	58
3.4	Phylogenetische Methoden	61
3.4.1	Berechnung Homologie Score für LIPI	61
4.	ERGEBNISSE	62
4.1	LIPI – ein Ewing-Sarkom-assoziiertes <i>Cancer/Testis</i> -Antigen (CTA)	62
4.1.1	Expression von LIPI in Normalgeweben	62
4.1.2	Expression von EFT-assoziierten Genen im Hoden und der Schilddrüse	64

4.1.3	Expression von LIPI in Tumor-Zelllinien und Primärtumoren	65
4.1.4	Evaluierung von LIPI als Marker bei der Diagnosestellung von EFT	67
4.1.5	Phylogenetische Aspekte von Lipase I und der verwandten Lipase H	68
4.1.5.1	<i>Expressionsprofil von Lipase H in humanen Zelllinien</i>	68
4.1.5.2	<i>Datenbankrecherche und bioinformatische Analysen zur Identifizierung homologer Lipasen der LIPI/LIPH-Familie</i>	69
4.1.5.3	<i>Genomischer Kontext von LIPI und LIPH</i>	72
4.1.5.4	<i>Multiples Sequenzalignment von LIPI und LIPH</i>	72
4.1.5.5	<i>LIPI - ein CTA in Mammalia</i>	75
4.2	RBM11 – seine Bedeutung für das Ewing-Sarkom	76
4.2.1	Korrelation der LIPI- und RBM11-Expression	76
4.2.2	Expressionsprofil in humanen Tumor-Zelllinien	77
4.2.3	Phylogenetische Analyse von RBM7 und RBM11	77
4.2.4	Expressionsprofil von RBM11 in Normalgeweben verschiedener Spezies	79
4.2.5	RNA-Interferenz mittels siRNA	80
4.2.6	DNA-Mikroarray-Analyse zur Bestimmung des Expressionsprofils der Ewing-Sarkom-Zelllinie SK-N-MC nach RNA-Interferenz	81
4.2.7	Validation der DNA-Mikroarray-Analyse	83
4.3	Einfluss von CXCL14 auf Ewing-Sarkom-Zellen	86
4.3.1	Korrelation von CXCL14 und RBM11	86
4.3.2	Expressionsprofil von CXCL14 in humanen Normalgeweben	86
4.3.3	Expressionsprofil von CXCL14 in humanen Tumor-Zelllinien	87
4.3.4	Expressionsprofil von CXCL14 in humanen Primärtumoren	88
4.3.5	Tumorzell-Viabilität nach <i>in vitro</i> CXCL14-Behandlung	88
4.3.6	Analyse von PBMC nach <i>in vitro</i> CXCL14-Behandlung	91
4.3.7	CBA-Assay	92
4.3.8	Zytotoxizitätstest	94
4.3.9	Stabil verminderte Transkriptionseffizienz der Gene RBM11, LIPI und LIPH in SK-N-MC-Zellen über miRNAs	95
5.	DISKUSSION	97
5.1	Charakterisierung des Expressionsmusters der Lipase I und Ewing-Sarkom-assoziiierter Gene	98
5.2	Lipase I als diagnostischer Marker	101
5.3	Phylogenetische Analyse von Lipase I und Lipase verwandter Familienmitglieder	102
5.4	RBM11 – seine Bedeutung für das Ewing-Sarkom	104
5.5	Der Einfluss von CXCL14 auf Ewing-Sarkom-Zellen	105
6.	ZUSAMMENFASSUNG	112
7.	LITERATURVERZEICHNIS	114
8.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	128

8.1	Allgemeine Abkürzungen, Chemikalien und Maßeinheiten	128
8.2	Abkürzungen der Aminosäuren	131
9.	ANHANG	133
9.1	Eidesstattliche Erklärung	135
10.	DANKSAGUNG	136
11.	LEBENS LAUF	137
3.1	Zur Person	137
3.2	Schulbildung	137
3.3	Hochschulstudium	137
3.4	Berufstätigkeit	138
12.	PUBLIKATIONEN	139

1. Einleitung

1.1 Die Familie der Ewing-Sarkome

1.1.1 Definition

Zur Familie der Ewing-Sarkome (auch bezeichnet als Tumore der Ewing-Familie, EFT) gehören das klassische und atypische Ewing-Sarkom, die peripheren malignen primitiven neuroektodermalen Tumoren (pPNET), sowie die Askin-Tumoren der Thoraxwand. Ewing-Sarkome sind gewöhnlich knöchernen, gelegentlich weichteiligen Ursprungs und gehören zur Gruppe der malignen klein-rund-blauzelligen Tumore. Als Erstbeschreiber gelten Lücke und Hildebrandt (Sevier et al. 1930). Die ersten Fallserien publizierte James Ewing als „diffuses Endotheliom“ und „endotheliales Myelom“ 1921 (Ewing 1921; Ewing 1924; Ewing 1939) (Abbildung 1-1).

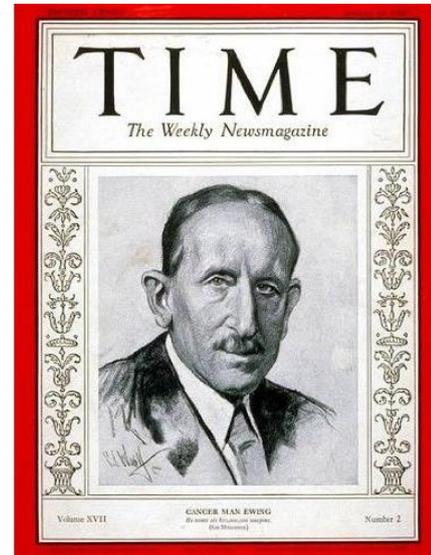


Abbildung 1-1: James Ewing auf dem Titelblatt des *Time Magazine* im Jahre 1931 (Quelle: http://www.pedsoncologyeducation.com/ewing_epidemiology.asp).

1.1.2 Genetik der Familie der Ewing-Sarkome

Der histogenetische Ursprung der EFT ist bis heute ungeklärt, jedoch deuten Experimente auf eine neuroektodermale Determinierung hin (Thiele 1990; O'Regan et al. 1995). EFT sind molekulargenetisch durch chromosomale Translokationen charakterisiert, die in der Mehrzahl der Fälle zu einer Fusion des auf Chromosom 22q12 gelegenen EWS-Gens mit Mitgliedern der ETS-Transkriptionsfaktor-Familie führen (Delattre O et al. 1994; Sorensen et al. 1994).

1.1.3 Epidemiologie

Ewing-Sarkome sind die zweithäufigsten malignen Knochentumore im Kindes- und Jugendalter und mit einer Langzeit-Überlebenswahrscheinlichkeit von etwa 70 % nach Erstdiagnose deutlich schlechter zu heilen, als viele andere Krebserkrankungen im Kindesalter. Die jährliche Inzidenz liegt bei 3 Neuerkrankungen pro 1 Mio. Kinder unter 15 Jahren und 2,4 pro 1 Mio. Heranwachsende zwischen 15 und 25 Jahren. Nach den Ergebnissen der Studien CESS 81, CESS 86 und EICES 92 erkrankten mehr als die Hälfte aller Patienten im Alter zwischen 10 und 19 Jahren (Schorlemer 2006). Das mediane Alter bei Erstdiagnose liegt bei 11 Jahren (Deutsches Krebsregister; Stand 09/2011). Der Anteil der Patienten unter 10 Jahren beträgt circa 20 %. Knapp ein Viertel der Patienten entwickelte erst nach dem 20. Lebensjahr ein Ewing-Sarkom (Cangir 1990). Es besteht eine männliche Prädominanz mit 1,5:1, welche mit steigendem Alter zunimmt (Abbildung 1-2) (Sevier et al. 1930).

Die Ätiologie von Ewing-Sarkomen ist nach wie vor unbekannt. Extrem selten kommen sie in der afrikanischen oder chinesischen Bevölkerung vor (Enneking 1987). Bislang gibt es keinen Nachweis für eine genetische Prädisposition.

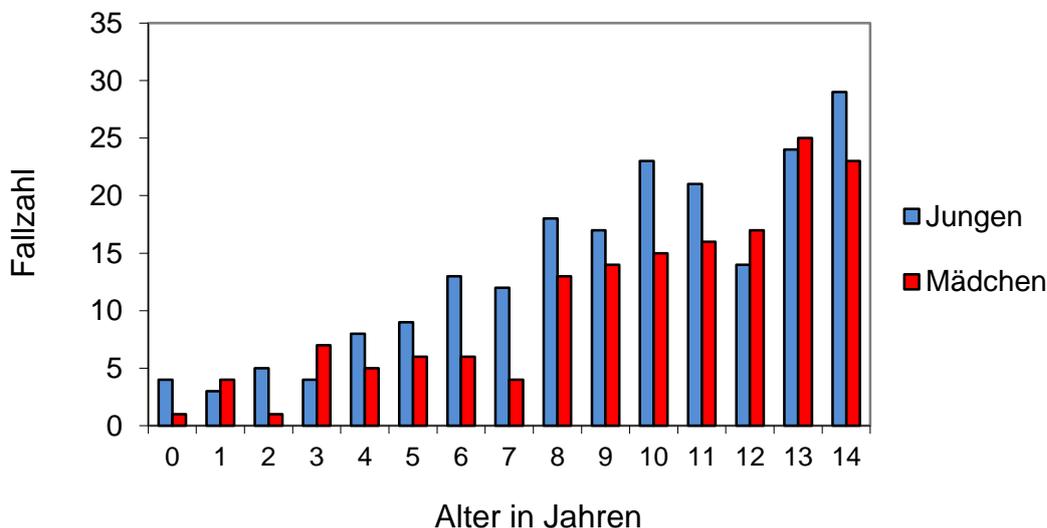


Abbildung 1-2: Alters- und geschlechtsspezifische Fallzahlen von Ewing-Sarkomen und verwandten Knochen-Sarkomen der Region Deutschland im Zeitraum 2001-2010. Inzidenzen bezogen auf 1.000.000 Kinder unter 15 Jahren. Der Altersmedian beträgt 10 Jahre 9 Monate. Quelle: Deutsches Kinderkrebsregister; Stand 09/2011.

1.2 Klinisches Erscheinungsbild und Diagnostik

1.2.1 Symptomatik

Erstsymptome sind gewöhnlich Schmerzen, die aktivitätsbezogen zunehmen und auch nachts bestehen bleiben. Dem stärker werdenden, durch Dehnung des Periosts verursachten Schmerz folgt gewöhnlich ein Anschwellen der betroffenen Region. Sind die Wirbelsäule oder periphere Nerven einbezogen, können Ausfallserscheinungen auftreten. Bei einem Drittel der Patienten treten Fieber, Anämie, Leukozytose oder eine unspezifische Erhöhung der Serumlaktatdehydrogenase (LDH), die einen erhöhten Zellumsatz indiziert, auf. Das Vorliegen dieser Faktoren ist als prognostisch ungünstig zu werten (Bacci et al. 1999, Venkateswaran et al. 2001).

Ewing-Sarkome sind oft im Bereich des Beckens, der langen Röhrenknochen der Extremitäten oder der Rippen lokalisiert. Aufgrund der damit verbundenen Nähe zu Körperhöhlen und/oder größeren Muskelgruppen kann ein Tumorwachstum längere Zeit unentdeckt bleiben. Bei Diagnosestellung haben diese Tumoren oft bereits ein Volumen von über 100 ml erreicht. Ein größeres Tumolvolumen wird erwartungsgemäß mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Mendenhall 1983, Cotterill et al. 2000).

1.2.2 Primärtumor und Metastasierung

Primärtumoren treten mit einer Häufigkeit von 26 % im Bereich des knöchernen Beckens, 6-20 % in den langen Röhrenknochen der Extremitäten, 10 % in den Rippen, 4 % in der Scapula und 6 % in der Wirbelsäule auf. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose besteht bei 74 % der Patienten keine Metastasierung. Primärmetastasen finden sich mit jeweils 10 % in der Lunge oder der Knochen bzw. dem Knochenmark. Bei 6 % der Betroffenen finden sich Primärmetastasen bei Erstdiagnose in mehreren Organen bzw. außerhalb des Bereiches der Lunge oder Knochen/des Knochenmarks (Paulussen et al. 2001) (Abbildung 1-3). Eine einheitliche Definition von TNM-Stadien (T = Primärtumor, N = Lymphknotenbefall, M = Vorhandensein von Fernmetastasen) für Ewing-Sarkome existiert nicht.

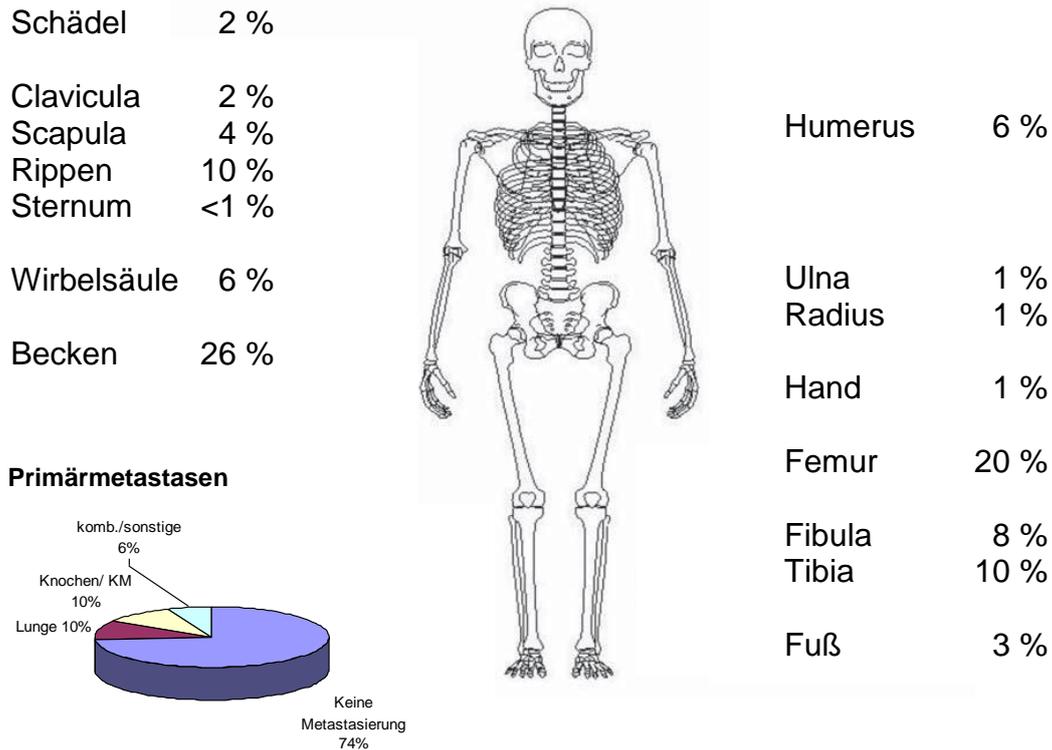


Abbildung 1-3: Skelettverteilung der Ewing-Sarkome und prozentuale Verteilung der Primärmetastasen. Datenbasis von 1426 Patienten der (EI)CESS-Studien (Bernstein et al. 2006).

1.2.3 Labordiagnostik

Spezifische Laborparameter zum Nachweis eines Ewing-Sarkoms sind nicht bekannt. Charakteristische Anzeichen sind eine milde Anämie und eine Leukozytose in Abhängigkeit von der Tumorlast. Als prognostischer Faktor dient die Laktatdehydrogenase im Serum. Sie korreliert mit der Tumorlast. Katecholamine im Serum und Urin sind normwertig (Bernstein et al. 2006).

1.2.4 Bildgebende Diagnostik

Konventionelle Röntgenaufnahmen sowie Magnetresonanztomographie (MRT) und Computertomographie (CT) gelten als Standardmethoden der Diagnostik von Primärtumoren (Campanacci et al. 1998).

Im Röntgenbild des betroffenen Knochens sind eine zirkuläre Periostabhebung, eine Destruktion der Kortikalis, Codman-Dreiecke und eine Weichteilkomponente erkennbar. Diese Veränderungen können im Magnetresonanztomogramm (MRT)

noch besser und früher nachgewiesen werden. Neben dem MRT erlaubt auch die Computertomographie (CT) eine exakte Größen- und Lagebestimmung des Tumors. Gilt die Diagnose des Ewing-Sarkoms als erwiesen, ist eine Ganzkörper-Technetium-Szintigraphie indiziert (Schorlemer 2006). Für den Ausschluss bzw. Nachweis von Lungen- und Knochenmetastasen bei Ewing-Sarkomen gelten die CT der Thoraxorgane in Ergänzung zum Thoraxröntgenbild sowie die Positronenemissionstomographie mit 18-Fluor-Deoxyglukose (FDG-PET) als sensitiv (Franzius et al. 2000).

1.2.5 Biopsie

Die klinische Verdachtsdiagnose wird durch eine Biopsie gesichert. Zum Zeitpunkt der Diagnose haben circa 25 % eine nachweisbare Metastasierung (Paulussen et al. 1998; Paulussen et al. 2001a). Eine fragliche Metastasierung sollte bioptisch gesichert werden, da der Nachweis für die Therapieplanung und Prognosestellung von Bedeutung ist. Da die Biopsienarbe sowie das angrenzende Gewebe durch Tumorzellen kontaminiert sein kann, sollte diese in die später folgende Lokalthherapie zwingend einbezogen werden.

1.2.6 Knochenmarksbeteiligung

Die molekulargenetische Untersuchung zum Nachweis von EWS-Genfusionstranskripten stellt heute eine Ergänzung zur konventionellen Untersuchung von Knochenmarkaspiraten und Knochenstanzen dar (Dockhorn-Dworniczak et al. 1994b; Pein et al. 1995; Peter et al. 1995).

1.3 Histopathologie und Differenzialdiagnose

Ewing-Sarkome sind makroskopisch von grau-weißlicher Farbe und fester Konsistenz. Für das histologische Bild einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung des Tumors sind Zellen mit kleinen, blauen und runden Zellkernen mit spärlichem Zytoplasmasaum charakteristisch. Mittels Peroidsäure-Schiff-Reagenz (PAS)-Färbung sind die zytoplasmatischen Glykogenablagerungen nachweisbar (Roessner et al. 1993; Roessner et al. 1996).

Über 95 % aller Ewing-Sarkome exprimieren CD99 (Ambros et al. 1991). CD99 ist jedoch nicht Ewing-Sarkom-spezifisch (Zhang et al. 2000). In über 30 % aller Ewing-

Sarkome werden neuronale Marker wie S100, die neuronenspezifische Enolase sowie Synaptophysin nachgewiesen (Schmidt et al. 1991). Die Einteilung der Ewing-Sarkome erfolgt auf der Grundlage der Expression von neuronalen Markern. Als klassische Ewing-Sarkome (EWS) gelten Ewing-Sarkome ohne Nachweis einer neuronalen Differenzierung. Ewing-Sarkome mit dem Nachweis eines neuronalen Markers werden als atypische EWS und Ewing-Sarkome mit dem Nachweis von zwei oder mehr neuronalen Markern als periphere maligne primitive neuroektodermale Tumoren (pPNET; Schmidt et al. 1991) bezeichnet. Die aktuelle Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation fasst alle Tumoren dieser Familie unter dem Begriff Ewing-Sarkom zusammen. Der fehlende Nachweis muskulärer oder hämatopoetischer Marker grenzt das Ewing-Sarkom von Weichteilsarkomen oder Lymphomen ab (Roessner et al. 1984).

1.4 Molekularbiologie

Ewing-Sarkome sind durch den Nachweis einer tumorspezifischen Translokation charakterisiert. In ca. 85 % aller Ewing-Sarkome ist eine Translokation $t(11:22)(q24;q12)$ und auf molekularer Ebene eine EWS-FLI1-Genfusion nachweisbar (Delattre et al. 1992; Delattre et al. 1994). In fast allen weiteren Fällen können Fusionsprodukte des EWS-Gens identifiziert werden (de Alava und Gerald, 1998; Jeon et al. 1995; Sorensen et al. 1994; Peter et al. 1997; Zucman et al. 1993). Das EWS-Gen kodiert ein ubiquitär exprimiertes RNA-Bindungsprotein, das in Transkriptionsprozesse und die RNA-Prozessierung involviert ist. Das FLI1-Gen (*Friend leukemia virus integration site 1*) kodiert ein Protein mit carboxyterminaler DNA-Bindungsdomäne, die charakteristisch ist für die Mitglieder der ETS-Familie (*Twenty-six erythroblastosis virus transforming sequence*) von Transkriptionsfaktoren. Aufgrund der Genfusion wird die EWS-RNA-Bindungsdomäne durch die FLI1-DNA-Bindungsdomäne ersetzt. Dies führt zu der Entstehung eines Transkriptionsfaktors mit starkem *in vitro* Transkriptionspotenzial. Alternative EWS-Fusionsprodukte mit Mitgliedern der ETS-Genfamilie, meist ERG (*ETS related gene*), können in 10-15 % aller Ewing-Sarkome beobachtet werden. Die Fusion von EWS mit Mitgliedern der ETS-Genfamilie ist Ewing-Sarkom-spezifisch. Die häufigsten Ewing-Sarkom-Genfusionen resultieren in einer Typ 1-Fusion von EWS-Exon 7 mit FLI1-Exon 6 in über 50 % der Fälle, oder Typ 2-Fusion von EWS-Exon 7 mit FLI1-Exon 5 in 27 % der Fälle. Die EWS-ETS-Genfusion wird als essenziell für die Ewing-

Sarkompathogenese angesehen, wenngleich die Rolle der entsprechenden Onkofusionsproteine nicht vollständig aufgeklärt ist. Weiterhin bedarf es der Aufklärung, warum die *in vitro* Transduktion von EWS-FLI1 für die meisten Zelltypen, jedoch nicht für die Ursprungszelle von Ewing-Sarkomen ein letales Ereignis darstellt (Kovar 1998; Kovar 1999; Kovar 2003).

Aufgrund der hohen Ewing-Sarkom-Spezifität und Involvierung in die onkogene Pathogenese von EFT erscheint EWS-FLI1 dennoch als ideale Zielstruktur. Bislang konnte gezeigt werden, dass EWS-FLI1-spezifische Oligonukleotide das EFT-Zellwachstum effizient inhibieren (Ouchida et al. 1995; Lambert et al. 2000; Matsumoto et al. 2001; Toub et al. 2006; Mateo-Lozano et al. 2006; Elhames et al. 2009). Dieser Therapieansatz wird jedoch durch die Vielzahl an Fusionstypen in EFT limitiert (Staege und Max 2009). Unvorhergesehen kam es auch zum Auftreten einer kontraproduktiven Stimulation des Tumorwachstums mittels freier Oligonukleotide (Elhames et al. 2009). Der Einsatz von chimären Fusionsproteinen in der Immuntherapie war in einer Pilotstudie bei kindlichen Sarkomen erfolglos, da eine hohe Affinität zu den häufigsten HLA-Molekülen nicht gegeben war (Pfeifle et al. 2009).

Neue therapeutische Ansätze könnten die Entwicklung von EFT-spezifischen Ribozymen (Hühn et al. 2009) oder Inhibitoren der onkogenen Transaktivierung von EFT (Todorova 2009) darstellen.

1.5 Therapie

Ewing-Sarkome wurden trotz Radiosensibilität erst durch Kombinationschemotherapie und Lokalthherapie mittels Operation und / oder Bestrahlung heilbar. Mit einer Überlebenschance von ca. 70 % ist das Ewing-Sarkom einer der am schlechtesten heilbaren Tumore im Kindes- und Jugendalter. Ewing-Sarkome müssen auch bei fehlendem Nachweis einer Metastasierung in die Lungen oder das Skelettsystem als eine systemische Erkrankung angesehen werden und bedürfen einer systemischen Kombinationschemotherapie sowie Lokalthherapie (Paulussen et al. 2009, Ladenstein et al. 2010).

1.5.1 Chemotherapie

Verglichen mit einer Monosubstanztherapie erbrachte eine verbesserte Prognose die Kombination von Chemotherapie mit der Gabe von Vincristin, Actinomycin D (Dactinomycin) und Cyclophosphamid (VAC) (Jaffe et al. 1976). Weitere Erfolge wurden durch Chemotherapiezyklen mit Doxorubicin erzielt (Pomeroy et Johnson 1975). Bis heute sind sowohl das VAC- (Vincristin, Actinomycin D, Cyclophosphamid) als auch das Doxorubicinschema die wichtigsten Komponenten in beinahe allen Chemotherapieregimen des Ewing-Sarkoms (Smith et al. 1991). Die Ergebnisse der Studie EICESS-92 geben zudem Hinweise, dass Hochrisiko-Patienten von einer zusätzlichen Gabe von Etoposid profitieren. Das Ereignis-freie Überleben und das Gesamtüberleben konnten gesteigert werden (Paulussen et al. 2008).

1.5.2 Lokalthherapie

Aufgrund der Radiosensibilität von Ewing-Sarkomen galt die Radiotherapie lange als Standard der Lokalthherapie. Fortschritte in der Operationstechnik, Instrumentation und den stabilisierenden Techniken erlauben die Resektion und Rekonstruktion extensiver Tumoren. Auch das Risiko von Lokalrezidiven nach Bestrahlung gibt heute den operativen Verfahren den Vorzug (Jürgens et al. 1998, Schuck et al. 2003). Als effektiv erweist sich die postoperative Strahlentherapie (Cotterill et al. 2000, Merchant et al. 1999, Nilbert et al. 1998).

1.6 Metastasierung und Prognose

Zum Zeitpunkt der Diagnose haben circa ein Viertel aller Ewing-Sarkom-Patienten nachweisbare primäre Metastasen in den Lungen, dem Skelettsystem oder dem Knochenmark (Bacci et al. 2003; Fröhlich et al. 1999; Paulussen et al. 1998; Rodriguez-Galindo et al. 2003). Die Überlebenswahrscheinlichkeit von Ewing-Sarkom-Patienten wird sowohl ungünstig durch eine Metastasierung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung als auch durch die Größe des Primärtumors sowie durch ein ungünstiges Ansprechen auf eine primäre Chemotherapie beeinflusst (Ahrens et al. 1999; Cotterill et al. 2000; Hense et al. 1999; Oberlin et al. 2001). Das ereignisfreie Überleben bei Vorliegen von primären Metastasen ist mit ca. 20-30 % deutlich ungünstiger als bei Patienten ohne Primärmetastasen. Die pulmonale Metastasierung macht bei Ewing-Sarkomen etwa zweifünftel aller Metastasen aus.

Der Nachweis einer primären Metastasierung ist der wichtigste die Prognose ungünstig beeinflussende Faktor (Ahrens et al. 1999; Cotterill et al. 2000; Stahl et al. 2011). Patienten mit Lungenmetastasen haben im Gegensatz zu Patienten mit Skelett- oder Knochenmarkmetastasen oder einer kombinierten Knochen- und Lungenmetastasierung eine bessere Prognose (Cotterill et al. 2000; Paulussen et al. 1998). Patienten, die nach intensiver Erstbehandlung Metastasen entwickeln, haben eine ungünstige Überlebensprognose mit unter 10 % nach 2 Jahren. Der Ort der Metastasierung ist dabei nicht relevant. Für Patienten mit einer relativ spät auftretenden Metastasierung mit über 2 Jahren nach Erstdiagnose lässt sich eine günstigere Überlebensprognose von etwa 20-25 % belegen (Burdach et al. 2003; Fröhlich et al. 1999). In der Regel handelt es sich bei späten Rückfällen um Lokalrezidive in vorbestrahlten Primärtumorregionen oder Lungenmetastasen.

Weitere Prognosefaktoren sind die Lokalisation des Tumors und das Lebensalter (Stahl et al. 2011). Nach jüngeren Erkenntnissen unterscheidet sich die Prognose erwachsener und jugendlicher Patienten bei konsequent durchgeführter Behandlung nicht wesentlich. Die neuronale Differenzierung scheint keinen Einfluss auf die Prognose zu haben. Molekulare Faktoren wie der Typ des Fusionstranskripts (Zoubek et al. 1996) oder der molekulare Nachweis minimaler Knochenmarkserkrankung sind Gegenstand derzeitiger prospektiver Studien (Hattinger et al. 2000; Hattinger et al. 2002; Schleiermacher et al. 2003).

2. ZIEL DIESER ARBEIT

Da Ewing-Sarkome mit einer Langzeit-Überlebenswahrscheinlichkeit von etwa 70 % deutlich schlechter zu heilen sind, als die meisten anderen Krebserkrankungen im Kindesalter, sind die derzeitigen Behandlungsformen noch unbefriedigend und zu verbessern (Burdach 2004). Aus diesem Grund ist man bemüht, neue und effektivere Behandlungsstrategien zu entwickeln.

Das Ziel dieser Arbeit lag in der weiteren Charakterisierung des Tumors, um neue Diagnosemarker und therapeutische Zielstrukturen zu identifizieren. Dabei stand initial das Gen Lipase I im Fokus der Untersuchungen. LIPI wurde bereits zuvor als drastisch überexprimiertes Gen im Ewing-Sarkom im Vergleich zu Normalgeweben mittels Mikroarrayanalyse nachgewiesen (Staege et al. 2004). Zunächst wurde in dieser Arbeit die Expression von LIPI in verschiedenen humanen Geweben, Tumorzelllinien und Primärtumoren untersucht, um in einem nächsten Schritt LIPI als weiteren Marker, neben EWS-FLI1, zur Diagnose eines Ewing-Sarkoms zu evaluieren. Ein weiterer Bestandteil war die Analyse eines in unmittelbarer Nachbarschaft zu LIPI liegenden und ebenfalls in EFT hoch exprimierten Gens, dem RBM11-Gen. Die gemeinsame Expression von LIPI und RBM11 könnte ein Hinweis auf eine gemeinsame Expressionskontrolle sein. RBM11 gehört zu einer großen Familie von RNA-bindenden Proteinen, welche unter anderem in Vorgänge wie RNA-Prozessierung, Apoptose, Fertilität und Gehirnentwicklung involviert sind (Sutherland et al. 2005). Das aus einer differentiellen RBM11-Expression resultierende Expressionsprofil des Ewing-Sarkoms sollte untersucht werden. Die Verifizierung der differentiell exprimierten Gene mittels RT-PCR, quantitativer RT-PCR und Durchflusszytometrie könnte zur Identifikation neuer therapeutischer Zielstrukturen führen und zu einem besseren Verständnis der Signalkaskaden des Ewing-Sarkoms beitragen.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Soweit im Text nicht anders angegeben, wurden die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien von den Firmen VWR (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Merck Eurolab (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (München) bezogen.

2 nd -Strand-Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
Agar Agar	SERVA, Heidelberg
Agarose	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Antifoam	Sigma Aldrich, Steinheim
Aqua B. Braun	B. Braun Biotech, Melsungen
Biotin-CTP	Roche Diagnostics, Mannheim
Biotin-UTP	Roche Diagnostics, Mannheim
Biotin-Anti-Streptavidin-Antikörper	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Blasticidin	PAA, Cölbe
BSA(Rinderserumalbumin)	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloroform	Carl Roth Chemie, Karlsruhe
Control Oligonucleotide B2	Affymetrix, Santa Clara, USA
CXCL14 (BRAK)	Cell Sciences, Canton, USA
Diethylpyrocarbonat-Wasser	Ambion, Austin, USA
DMEM	Biochrom, Berlin
Dimethylsulfoxid	Sigma Aldrich Chemicals, Steinheim
DNA Ladder 100 bp	Fermentas, St. Leon-Rot
DNA <i>ultra low Ladder</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
DNA-Ligase (<i>E. coli</i>)	Invitrogen, Karlsruhe
DNA Polymerase I (<i>E. coli</i>)	Invitrogen, Karlsruhe
DNA-Probenpuffer, 6x	Fermentas, St. Leon-Rot
dNTP-Mix (10 mM)	Invitrogen, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure	Sigma Aldrich, Steinheim,
Ethanol (96 %)	Sigma Aldrich, Steinheim
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich, Steinheim

<i>Eucaryotic Hybridization Controls</i>	Affymetrix, Santa Clara, USA
Ficoll	PAA, Cölbe
Geneticin-Sulfat (G418)	PAA, Cölbe
Glukose	Merck, Darmstadt
Glyzerin	Roth, Kalsruhe
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	SERVA, Heidelberg
Heringssperma DNA	Promega, Mannheim
Humanes Serum-Albumin	Bayer, Wuppertal
Isopropanol	Roth, Kalsruhe
Lysepuffer	Apotheke
Kaliumazetat	Roth, Kalsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Kalsruhe
Kanamycin	PAA, Cölbe
MEGAscript T7 Kit	Ambion, Austin, USA
Magnesiumazetat	Sigma Aldrich, Steinheim
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	SERVA, Heidelberg
Manganchlorid	Merck, Darmstadt
2-Morpholino-ethansulfonsäure	Sigma Aldrich, Steinheim
3-Morpholinpropansulfonsäure	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumazetat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Pepton	Merck, Darmstadt
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol	Sigma Aldrich, Steinheim
Phosphatgepufferte Salzlösung	Biochrom, Berlin
Phycoerythrin Streptavidin	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Proteaseinhibitor-Cocktail	Roche Diagnostics, Mannheim
Rubidiumchlorid	Merck, Darmstadt
RNaseH	Invitrogen, Karlsruhe
RNaseZap®	Ambion, Austin, USA

RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
RPMI	Biochrom, Berlin
Reverse Transkriptase Oligo- dT ₁₂₋₁₈ Primer	Fermentas, St. Leon-Rot
SSPE (20x)	BioWhittaker, Verviers, Belgien
Superscript Choice System	Invitrogen, Karlsruhe
T7-(dT)24-Primer	Invitrogen, Karlsruhe
TRIS-Azetat	Sigma Aldrich, Steinheim
TRIS-Salzsäure	Roth, Karlsruhe
TRizol	Invitrogen, Karlsruhe
Trypanblau	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/EDTA-Lösung	Biochrom, Berlin
Tween-20	Pierce Chemicals, Rockford, USA

3.1.2 Zusammensetzung häufig verwendeter Puffer und Lösungen

50x TAE-Puffer:

Folgende Reagenzien wurden mit Aqua dest. vorsichtig und gut gemischt:
0,4 M TRIS; 0,01 M EDTA; 0,2 M Essigsäure.

Im Anschluss wurde der pH-Wert mittels pH-Meter auf 8,0 eingestellt.

Minipräp-Lösung I:

Folgende Reagenzien wurden mit Aqua dest. vorsichtig und gut gemischt:
50 mM Glukose, 10 mM EDTA, 25 mM TRIS HCl pH 8,0.

Im Anschluss erfolgte eine Autoklavierung der Lösung.

Minipräp-Lösung II:

Folgende Reagenzien wurden mit Aqua dest. vorsichtig und gut gemischt:
0,2 M Natriumhydrochlorid, 1 % SDS.

Im Anschluss wurde der pH-Wert mittels pH-Meter auf 12,5 - 13 eingestellt.

Minipräp-Lösung III:

Folgendes Reagenz wurde mit Aqua dest. vorsichtig und gut gemischt:

3 M Kaliumazetat.

1x TE :

Folgende Reagenzien wurden mit Aqua dest. vorsichtig und gut gemischt:

1 M TRIS HCl; 0,5 M EDTA.

LB:

Folgende Reagenzien wurden mit Aqua dest. vorsichtig und gut gemischt:

8 g/l Natriumchlorid, 10 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt.

Im Anschluss wurde der pH-Wert mittels pH-Meter auf 7,0 eingestellt.

SOB:

Folgende Reagenzien wurden mit Aqua dest. vorsichtig und gut gemischt:

4 % Trypton, 1 % Hefeextrakt, 10 mM Natriumchlorid; 2,5 mM Kaliumchlorid.

Vor Gebrauch der Lösung wurden 10 mM Magnesiumsulfat und 10 mM Magnesiumchlorid zugegeben. Im Anschluss erfolgte eine Autoklavierung der Lösung.

RF:

Folgende Reagenzien wurden mit Aqua dest. vorsichtig und gut gemischt:

1,21 % w/v Rubidiumchlorid; 0,99 % w/v Manganchlorid; 0,29 % w/v Kaliumazetat; 0,15 % w/v Calciumchlorid; 15 % Glycerin.

Im Anschluss wurde der pH-Wert mittels pH-Meter auf 5,8 eingestellt und die Lösung steril filtriert.

RF2:

Folgende Reagenzien wurden mit Aqua dest. vorsichtig und gut gemischt:

0,21 % w/v MOPS; 0,12 % w/v Rubidiumchlorid; 1,1 % w/v Calciumchlorid; 15 % Glycerin.

Im Anschluss wurde der pH-Wert mittels pH-Meter auf 6,8 eingestellt und die Lösung steril filtriert.

5x Fragmentierungspuffer:

Folgende Reagenzien wurden mit Aqua dest. vorsichtig und gut gemischt:

250 mM TRIS-Azetat pH-Wert 8,1; 500 mM Kaliumazetat, 150 mM Magnesiumazetat

Im Anschluss wurde die Lösung steril filtriert.

3.1.3 Verwendete Zelllinien, Gewebe und Medien für eukaryontische Zellkulturen

Soweit nicht anders angegeben, wurden die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) oder der American Type Culture Collection (ATCC, Maryland, USA) bezogen. Für Expressionsuntersuchungen wurde die Gesamt-RNA verschiedener humaner Gewebeproben der Firma Becton Dickinson (Heidelberg) verwendet. Die Tumorproben wurden dankenswerterweise zur Verfügung gestellt: Ewing-Sarkome: EFT-Studie, Dr. Poremba (Klinikum der Universität zu Düsseldorf); Neuroblastome: NB-Studie, Prof. Dr. F. Berthold (Klinikum der Universität zu Köln); Rhabdomyosarkome: RMS-Studie, Beat Schäfer (Experimentelle Infektiologie und Krebsforschung, Universität Zürich, Schweiz). Die murinen Gewebeproben wurden dankenswerterweise vom Tierstall des Klinikums der Universität zu Halle-Wittenberg zur Verfügung gestellt. Die Gewebeproben des Haushuhnes wurden dankenswerterweise vom Kleintierzüchter Rudolf Hesse (Biederitz) zur Verfügung gestellt.

SK-N-MC:

Die Zelllinie SK-N-MC ist eine Ewing-Sarkom-Zelllinie. SK-N-MC-Zellen sind ursprünglich als Metastase eines Neuroblastoms beschrieben worden (Biedler et al. 1973). Heute geht man davon aus, dass SK-N-MC-Zellen aus einem Askin-Tumor etabliert wurden. Die SK-N-MC-Zellen wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) erworben.

Kulturmedium: RPMI 1640; 1 % Penicillin/Streptomycin, 10 % Fötales Kälberserum (FKS).

A673:

Die Zelllinie A673 ist eine Ewing-Sarkom-Zelllinie. A673-Zellen wurden aus Muskel etabliert (Giard et al. 1973). Die A673-Zellen wurden von der American Type Culture Collection (ATCC) erworben.

Kulturmedium: RPMI 1640; 1 % Penicillin/Streptomycin, 10 % FKS.

RD-ES:

RD-ES-Zellen stellen eine Ewing-Sarkom-Zelllinie dar. Diese Zellen wurden aus einem Primärtumor des Humerus eines 19 Jahre alten Patienten etabliert (Hofbauer et al. 1993). Die RD-ES-Zellen wurden von der ATCC erworben.

Kulturmedium: RPMI 1640; 1 % Penicillin/Streptomycin, 10 % FKS.

SK-ES:

Die Zelllinie SK-ES ist eine Ewing-Sarkom-Zelllinie und wurde aus einem nicht näher beschriebenen Knochentumor eines 18 Jahre alten Patienten kaukasischen Ursprungs etabliert (Bloom 1972). Die SK-ES-Zellen wurden dankenswerterweise von Benjamin Schmiedel (Klinikum der Universität zu Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt.

Kulturmedium: RPMI 1640; 1 % Penicillin/Streptomycin, 10 % FKS.

TC32:

Die Zelllinie TC32 ist eine Ewing-Sarkom-Zelllinie (Whang-Peng et al. 1987). Die TC32-Zellen wurden dankenswerterweise von Benjamin Schmiedel (Klinikum der Universität zu Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt.

Kulturmedium: RPMI 1640; 1 % Penicillin/Streptomycin, 10 % FKS.

STA-ET-8:

Die Zelllinie STA-ET-8 ist eine Ewing-Sarkom-Zelllinie (Zucman et al. 1993). Die STA-ET-8-Zellen wurden dankenswerterweise von Benjamin Schmiedel (Klinikum der Universität zu Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt.

Kulturmedium: RPMI 1640; 1 % Penicillin/Streptomycin, 10 % FKS.

TC71:

Die Zellen TC71 stellen eine Ewing-Sarkom-Zelllinie dar. Die Zelllinie TC71 wurde 1981 aus der Humerus-Biopsie eines 22 Jahre alten Mannes mit metastasiertem Ewing-Sarkom etabliert (Whang-Peng et al. 1986). Die TC71-Zellen wurden von der DSMZ erworben.

Kulturmedium: RPMI 1640; 1 % Penicillin/Streptomycin, 10 % FKS.

TTC466:

Die Zelllinie TTC466 ist eine Ewing-Sarkom-Zelllinie und wurde dankenswerterweise von Benjamin Schmiedel (Klinikum der Universität zu Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt (Sorensen et al. 1994).

Kulturmedium: RPMI 1640; 1 % Penicillin/Streptomycin, 10 % FKS.

SH-SY5Y:

Die Zelllinie SH-SY5Y ist eine Neuroblastom-Zelllinie, die aus einem Subklon der 1970 etablierten Zelllinie SK-N-SH aus der Knochenmetastase eines 4-jährigen Mädchens mit metastasierendem Neuroblastom hervorgegangen ist (Biedler et al. 1973). Die SH-SY5Y-Zellen wurden von der DSMZ erworben.

Kulturmedium: DMEM; 2 mM L-Glutamin; 1 % Penicillin/Streptomycin; 20 % FKS.

SIMA:

SIMA-Zellen stellen eine Neuroblastom-Zelllinie dar. Diese wurden aus einem Nebennierentumor eines 20 Monate alten Jungen europäischer Herkunft mit einem Neuroblastom (Stadium III) 1991 etabliert (Marini et al. 1999). Die Zelllinie SIMA wurde von der DSMZ erworben.

Kulturmedium: RPMI 1640; 1 % Penicillin/Streptomycin; 10 % FKS.

CHP-134:

Die Zelllinie CHP-134 ist eine Neuroblastom-Zelllinie und wurde 1976 etabliert (Schlesinger et al. 1976). CHP-134-Zellen wurden dankenswerterweise von Prof. Dr. F. Berthold (Klinikum der Universität zu Köln) zur Verfügung gestellt.

Kulturmedium: DMEM; 2 mM L-Glutamin; 1 % Penicillin/Streptomycin; 10 % FKS.

IMR-5:

Die Zelllinie IMR-5 ist eine Neuroblastom-Zelllinie. IMR-5-Zellen sind kaukasischen Ursprungs (Pastuszko et al. 1988). Die IMR-5-Zelllinie wurde dankenswerterweise von Prof. Dr. F. Berthold (Klinikum der Universität zu Köln) zur Verfügung gestellt.

Kulturmedium: RPMI 1640; 1 % Penicillin/Streptomycin, 10 % FKS.

IMR-32:

Die Zelllinie IMR-32 ist eine Neuroblastom-Zelllinie. IMR-32-Zellen wurden 1967 aus einem abdominalen Neuroblastom eines 1-jährigen Jungen mit kaukasischer Herkunft etabliert (Tumilowicz et al. 1970). Die Zelllinie IMR-32 wurde von der DSMZ erworben.

Kulturmedium: RPMI 1640; 1 % Penicillin/Streptomycin, 10 % FKS.

KELLY:

Die Zelllinie KELLY ist eine Neuroblastom-Zelllinie (Schwab et al. 1983). Die Zelllinie KELLY wurde von der DSMZ erworben.

Kulturmedium: RPMI 1640; 1 % Penicillin/Streptomycin, 10 % FKS.

HEK293:

HEK293-Zellen entstammen einer Zelllinie aus embryonalen Nierenzellen humanen Ursprungs. Diese Zellen wurden mit fragmentierter Adenovirus (AD5)-DNA transfiziert (Graham et al. 1977). Die Zelllinie HEK293 wurde von der ATCC erworben.

Kulturmedium: DMEM; 2 mM L-Glutamin; 1 % Penicillin/Streptomycin; 10 % FKS.

L-1236:

Die Zelllinie L-1236 ist eine Hodgkin-Lymphom-Zelllinie (Wolf et al. 1999). Die L-1236-Zellen wurden von der DSMZ erworben.

Kulturmedium: RPMI 1640; 1 % Penicillin/Streptomycin, 10 % FKS.

KM-H2:

Die Zelllinie KM-H2 ist eine Hodgkin-Lymphom-Zelllinie (Kamesaki et al. 1986). Die KM-H2-Zellen wurden von der DSMZ erworben.

Kulturmedium: RPMI 1640; 1 % Penicillin/Streptomycin, 10 % FKS.

HDLM-2:

Die Zelllinie HDLM-2 ist eine Hodgkin-Lymphom-Zelllinie (Drexler et al. 1986). Die HDLM-2-Zellen wurden von der DSMZ erworben.

Kulturmedium: RPMI 1640; 1 % Penicillin/Streptomycin, 10 % FKS.

L-540:

Die Zelllinie L-540 ist eine Hodgkin-Lymphom-Zelllinie (Diehl et al. 1981). Die L-540-Zellen wurden von der DSMZ erworben.

Kulturmedium: RPMI 1640; 1 % Penicillin/Streptomycin, 10 % FKS.

A-204:

Die Zelllinie A-204 ist eine Rhabdomyosarkom-Zelllinie (Giard et al. 1973). Die A-204-Zellen wurden dankenswerterweise von Helge Taubert (Klinikum der Universität zu Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt.

Kulturmedium: RPMI 1640; 1 % Penicillin/Streptomycin, 10 % FKS.

TE671:

Die Zelllinie TE671 ist eine Rhabdomyosarkom-Zelllinie (Stratton et al. 1989; Chen et al. 1989). Die Zellen wurden dankenswerterweise von Helge Taubert, Klinikum der Universität zu Halle-Wittenberg, zur Verfügung gestellt.

Kulturmedium: RPMI 1640; 1 % Penicillin/Streptomycin, 10 % FKS.

697:

Die 697-Zellen stellen eine humane Pre-B-Zell-Leukämie-Zelllinie dar (Findley et al. 1982). Die Zelllinie 697 wurde von der DSMZ erworben.

Kulturmedium: RPMI 1640; 1 % Penicillin/Streptomycin, 10 % FKS.

HT-1080:

HAT-1080-Zellen wurden aus einem humanen Fibrosarkom etabliert (Rasheed et al. 1974). Die Zelllinie HT-1080 wurde von der DSMZ erworben.

Kulturmedium: DMEM; 2 mM L-Glutamin; 1 % Penicillin/Streptomycin; 10 % FKS.

NALM-6:

NALM-6-Zellen stellen eine humane akute lymphoblastische Pre-B-Zell-Leukämie (B-ALL)-Zelllinie dar (Hurwitz et al. 1979). Die Zelllinie NALM-6 wurde von der DSMZ erworben.

Kulturmedium: RPMI 1640; 1 % Penicillin/Streptomycin, 10 % FKS.

CALL2:

CALL2-Zellen sind eine humane Pre-B-Zell-Leukämie-Zelllinie (Dr. J. Tomeczkowski). Die CALL2-Zellen wurden von der DSMZ erworben.

Kulturmedium: RPMI 1640; 1 % Penicillin/Streptomycin, 10 % FKS.

Jurkat:

Jurkat-Zellen stellen eine humane akute lymphoblastische T-Zell-Leukämie (T-ALL)-Zelllinie dar (Schneider et al. 1977). Die Zelllinie Jurkat wurde dankenswerterweise von Prof. Dr. J. Langner (Klinikum der Universität zu Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt.

Kulturmedium: RPMI 1640; 1 % Penicillin/Streptomycin; 10 % FKS.

CSIII:

CSIII ist eine Epstein-Barr-Virus (EBV)-immortalisierte lymphoblastoide Zelllinie (LCL) (Hönnscheidt et al. 2009). Die Zelllinie CSIII wurde dankenswerterweise von Christian Hönnscheidt (Klinikum der Universität zu Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt.

Kulturmedium: X-VIVO 15.

518A2:

518A2-Zellen sind eine humane Melanom-Zelllinie, welche dankenswerterweise von Dr. T. Müller (Klinikum der Universität zu Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt wurde (Jansen et al. 1999).

Kulturmedium: RPMI; 1 % Penicillin/Streptomycin; 10 % FKS.

31IGR1:

Die Zelllinie 31IGR1 ist eine humane Melanom-Zelllinie (Aubert et al. 1980). Die 31IGR1-Zellen wurden dankenswerterweise von Prof. Dr. J. Wohlrab (Klinikum der Universität zu Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt.

Kulturmedium: RPMI; 1 % Penicillin/Streptomycin; 10 % FKS.

EREB2-5:

EREB2-5-Zellen stellen eine humane B-Lymphozyten-Zelllinie dar, die durch Transformation mit dem EBNA2-defizientem EBV-Stamm P3HR1, der durch ein Fusionsprotein aus dem Östrogenrezeptor und dem EBV-Kernantigen EBNA2 (ER/EB) komplementiert wurde, entstanden ist (Kempkes et al. 1995). Die Zelllinie EREB2-5 wurde dankenswerterweise von G. W. Bornkamm und G. Laux (Klinikum der Universität zu München) zur Verfügung gestellt.

Kulturmedium: RPMI; 1 % Penicillin/Streptomycin; 10 % FKS.

A1:

A1-Zellen stellen eine humane B-Lymphozyten-Zelllinie dar. A1-Zellen wurden aus EREB2-5-Zellen etabliert, indem ein Konstrukt eingebracht wurde, welches das MYC-Gen unter die Kontrolle von Regelementen des Immunglobulin- κ -Lokus stellt (Pollack et al. 1996). Durch das konstitutiv aktivierte MYC-Gen proliferieren die Zellen unabhängig von Östrogen. Die A1-Zellen wurden dankenswerterweise von G.W. Bornkamm und G. Laux (GSF-Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik, München) zur Verfügung gestellt.

Kulturmedium: RPMI; 1 % Penicillin/Streptomycin; 10 % FKS.

P493-6:

P493-6-Zellen sind eine humane B-Lymphozyten-Zelllinie, welche doppelt konditional für das EBV-kodierte EBNA2 und das Onkogen MYC ist (Schuhmacher et al. 1999). Dankenswerterweise wurde die Zelllinie P493-6 von G.W. Bornkamm und G. Laux (GSF-Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik, München) zur Verfügung gestellt.

Kulturmedium: RPMI; 1 % Penicillin/Streptomycin; 10 % FKS.

Alle hier aufgeführten Zellkulturmedien und Zusätze wurden von den Firmen Biochrom AG (Berlin) und Cambrex (BioWhittaker; Walkersville) bezogen.

3.1.4 Sequenzen verwendeter siRNA- und miRNA-Oligonukleotide sowie RT-PCR-Primer

Alle in der Arbeit verwendeten siRNA- und miRNA-Oligonukleotide wurden von den Firmen Qiagen (Hilden) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

siRNA-Oligonukleotide

Tabelle 2-1: Verwendete synthetische siRNA-Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Hersteller
RBM11-siRNA Nr.1	CAGAATCGGTGTCTTATGCCA	Fa. Qiagen
RBM11-siRNA Nr.2	CTCCAACGACTTGA ACTCCAT	Fa. Qiagen
RBM11-siRNA Nr.3	CCGCGTCAAGTTGGTCAACCT	Fa. Qiagen
RBM11-siRNA Nr.4	GGCCAACAAGAAGATGAGTAA	Fa. Qiagen
Kontroll-siRNA (Alexa-Fluor488)	AATTCTCCGAACGTGTCACGT	Fa. Qiagen

Tabelle 2-2: Verwendete synthetische miRNA-Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz	Hersteller
RBM11- miRNA_top	5'-TGCTGATTATACACATGCCACTGCATGTTTTG GCCACTGACTGACATGCAGTGATGTGTATAAT-3'	Fa. Invitrogen
RBM11- miRNA_bottom	5'-CCTGATTATACACATCACTGCATGTCAGTCA GTGGCCAAAACATGCAGTGGCATGTGTATAATC-3'	
LIPI- miRNA_top	5'-TGCTGAACACAGTGGTCCTAAGAGGTGTTTTG GCCACTGACTGACACCTCTTAACCACTGTGTT-3'	Fa. Invitrogen
LIPI- miRNA_bottom	5'-CCTGAACACAGTGGTTAAGAGGTGTCAGTCA GTGGCCAAAACACCTCTTAGGACCACTGTGTTC-3'	
LIPH- miRNA_top	5'-TGCTGGATACATGCAGAATGGGCTCTGTTTTG GCCACTGACTGACAGAGCCCACTGCATGTATC-3'	Fa. Invitrogen

Bezeichnung	Sequenz	Hersteller
LIPH- miRNA_bottom	5'-CCTGGATACATGCAGTGGGCTCTGTTCAGTCAG TGGCCAAAACAGAGCCCATTCTGCATGTATCC-3'	

RT-PCR-Primer

Tabelle 2-3: Verwendete Primer mit humaner Spezifität für die RT-PCR.

Genname	Sequenz	Produktgröße	Zyklenzahl
ACTB	Sense: 5'-GGCATCGTGATGGACTCCG-3'	612 bp	22
	Antisense: 5'-GCTGGAAGGTGGACAGCGA-3'		
RBM11	Sense: 5'-AGAAGATGCAGTGGCATGTG-3'	356 bp	30
	Antisense: 5'-TCGTTGCCTCTGTTGTTGTC-3'		
MYC	Sense: 5'-CCTACCCTCTCAACGACAGC-3'	247 bp	26
	Antisense: 5'-CTCTGACCTTTTGCCAGGAG-3'		
LIPI	Sense: 5'-CCGAGAATAGAGACCATTCTGA-3'	652 bp	30
	Antisense: 5'-GCTCTCTGGTGGTTGCATTT-3'		
ABHD6	Sense: 5'-GTTGAGGCTGGTCAGGAGTC-3'	1093 bp	35
	Antisense: 5'-AGCAGATGCTGTGTGCAGAA-3'		
LPA-R1	Sense: 5'-TCTTCTGGGCCATTTTCAAC-3'	328 bp	35
	Antisense: 5'-TTCTTTGTCGCGGTAGGAGT-3'		
LPA-R2	Sense: 5'-CCTACCTCTTCCTCATGTTC-3'	361 bp	35
	Antisense: 5'-ATGAGCAGGAAGACAAGCA-3'		
LPA-R3	Sense: 5'-GAATTGCCTCTGCAACATCT-3'	380 bp	35
	Antisense: 5'-GAGTAGATGATGGGGTTCA-3'		
LPA-R4	Sense: 5'-GTTTCCGCATGAAAATGAGAA-3'	338 bp	25
	Antisense: 5'-TGGAAAACAAAGAGGCTGAAA-3'		

Genname	Sequenz	Produktgröße	Zykluszahl
LECT1	Sense: 5'-AAGATGCAAGCAAGGGAAGA-3'	302 bp	30
	Antisense: 5'-TATCTTGGGCATGGTGTGAA-3'		
CD117	Sense: 5'-AGGTTGTGGAGGCAACTGCT-3'	617 bp	32
	Antisense: 5'-TCTTTGTGATCCGACCATGA-3'		
CYP26B1	Sense: 5'-CCAACATCGAAAGTGCTTCA -3'	215 bp	30
	Antisense: 5'-TGACAGGATCCCTGTGTTGT-3'		
CD184	Sense: 5'-CTGAGAAGCATGACGGACAA-3'	276 bp	30
	Antisense: 5'-GACGCCAACATAGACCACCT-3'		
CCND1	Sense: 5'-CCACTTGAGCTTGTTACCA -3'	203 bp	30
	Antisense: 5'-AACTACCTGGACCGCTTCCT-3'		
JAK1	Sense: 5'-CACCTGCTCCCCTGTATTGT-3'	266 bp	30
	Antisense: 5'-TGTAAGGAGCTGGCTGACCT-3'		
EWS-FLI1	Sense: 5'-CCACTAGTTACCCACCCCAAAC-3'	331 bp ¹	30
	Antisense: 5'-GTGATACAGCTGGCGTTG GCG-3'		
GAPDH	Sense: 5'-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3'	193 bp	26
	Antisense: 5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3'		
DKK2	Sense: 5'-TGTTCCATTTTCATTTACCAA-3'	226 bp	30
	Antisense: 5'-TTACTTAAATCCCATCTGCAGTC-3'		
EGR2	Sense: 5'-CAAACAAATCAGCTCCGGTA-3'	237 bp	30
	Antisense: 5'-GGTCGCCTTGTGTGATGTAG-3'		
CD99	Sense: 5'-TCCTCCGGTAGCTTTTCAGA-3'	232 bp	30
	Antisense: 5'-TCCCCTTGTTCTGCATTTTC-3'		
ADRB1	Sense: 5'-GGTTTGCCCTACACAAGGAA-3'	289 bp	30

¹ Translokations-Typ I

Genname	Sequenz	Produktgröße	Zykluszahl
PPARBP	Antisense: 5'-GGGGAAGGGAGAAGCATTAG-3'	468 bp	32
	Sense: 5'-ATACGCCACACATCACTCCA-3'		
NF-H	Antisense: 5'-CACTTTGGCTGCTTTTCATCA-3'	315 bp	35
	Sense: 5'-CTGGACGCTGAGCTGAGGAA-3'		
NF-L	Antisense: 5'-CAGTCACTTCTTCAGTCACT-3'	283 bp	32
	Sense: 5'-TCCTACTACACCAGCCATGT-3'		
NF-M	Antisense: 5'-TCCCCAGCACCTTCAACTTT-3'	332 bp	35
	Sense: 5'-TGGGAAATGGCTCGTCATTT-3'		
RASGRF1	Antisense: 5'-CTTCATGGAAGCGGCCAATT-3'	232 bp	35
	Sense: 5'-GAAAAGGGGAACGTGTGAAA-3'		
BCL2	Antisense: 5'-CTGTGCTCCCACATCTCTCA-3'	425 bp	32
	Sense: 5'-TATAAGCTGTCGCAGAGGGG-3'		
CXCL14	Antisense: 5'-ACGCTCTCCACACACATGAC-3'	303 bp	30
	Sense: 5'-CCTCCGGTCAGCATGAGG-3'		
LOX	Antisense: 5'-GTAGACCCTGCGCTTCTCGT-3'	308 bp	32
	Sense: 5'-ATATTCCTGGGAATGGCACA-3'		
PAX7	Antisense: 5'-CCAGGTAGCTGGGGTTTACA-3'	495 bp	32
	Sense: 5'-CCAAGATTCTTTGCCGCTAC-3'		
MST4	Antisense: 5'-CCTCGCGGGTGTATATGTCT-3'	337 bp	32
	Sense: 5'-AAAGCTGCCAATGTCTTGCT-3'		
MAGEA3	Antisense: 5'-CTTTGTTTCAGGCAAGCATCA-3'	422 bp	28
	Sense: 5'-TGAGGCCATTCTTCACTCT-3'		
SDF-1	5'-AAGTCAAGGAAATCCTGGTTTG-3'	215 bp	30
	Sense: 5'-GTGGTCGTGCTGGTCCTC-3'		

Genname	Sequenz	Produktgröße	Zykluszahl
NR4A3	Antisense: 5'-CTTTAGCTTCGGGTCAATGC-3'	503 bp	35
	Sense: 5'-AAGAGACGTCGAAACCGATG-3'		
TRAF1	Antisense: 5'-TGAAGTCGATGCAGGACAAG-3'	325 bp	32
	Sense: 5'-TAAACCTGCTGTTGGGGTTC-3'		
LRDD	Antisense: 5'-AGCTGGCTCTGGTGGATAGA-3'	553 bp	35
	Sense: 5'-TCAACAGCCTGGAGACACTG-3'		
LOH11 CR2A	Antisense: 5'-AACAGTCTGGGCATTTCTGG-3'	370 bp	35
	Sense: 5'-AGGGAGACTCCAGCAAGTGA-3'		
PLA2G5	Antisense: 5'-TCAGCTGCACAAGGTGATTC-3'	240 bp	30
	Sense: 5'-CCCTGACAAACTACGGCTTC-3'		
NUMBL	Antisense: 5'-AGTAGACGAGCTTCCGGTCA-3'	440 bp	32
	Sense: 5'-CCACTGTTTTCTGGCACTGA-3'		
FHL2	Antisense: 5'-GCGAGTTCTTCTGGCTGAGT-3'	255 bp	35
	Sense: 5'-CCAAGAGTTTCATCCCCAAA-3'		
DOC1	Antisense: 5'-CCAGCACACTTCTTGGCATA-3'	314 bp	35
	Sense: 5'-GGCCATCTTCAGAATGGAAA-3'		
	Antisense: 5'-GGGGACATGCCTTGTCTAA-3'		

Tabelle 2-4: Verwendete Primer mit der Spezifität für Maus, Huhn und Schaf für die RT-PCR und Sequenzierung*.

Genname	Sequenz	Produktgröße	Zykluszahl
MmLipi	Sense: 5'-ACTCGAGGCCGGACTGAGACAATCCTA-3'	1521 bp	35
	Antisense: 5'-AAGGATCCTCACTCCATCTGCGTGTTAC-3'		
MmLipi*	Sense: 5'-GCCGGACTGAGACAATCCTA-3'	-	-
	Antisense: 5'-GGGCCTGTACCCATGAATAA-3'		

Genname	Sequenz	Produktgröße	Zykluszahl
MmLipi*	Sense: 5'-GGTTTGTGTGTGGACTGTGG-3' Antisense: 5'-GCGGCACAGTAAGGATTTGT-3'	-	-
MmLipi*	Sense: 5'-TCACTCAACACCCGTTTCAA-3' Antisense: 5'-GGACAACCTGGCTGATGTTT-3'	-	-
MmLiph	Sense: 5'-AACTCGAGGGGAACGCCAGGCTCTGTGC-3' Antisense: 5'-TTGGATCCGATGTCATCACTGCCACAG-3'	1457 bp	35
MmLiph*	Sense: 5'-TATCCCTGCGACTCCTATCG-3' Antisense: 5'-GATGTCATCACTGCCACAG-3'	-	-
GgLipi	Sense: 5'-AACTCGAGTTCAGGATGTTACATAGTAC-3' Antisense: 5'-TTGGATCCTTACCTTTCTGGATTATTAA-3'	1478 bp	35
GgLipi*	Sense: 5'-TTGGAATCGTGGTGCTACAA-3' Antisense: 5'-TAGGAGGCACAAGGGTATGC-3'	-	-
GgLiph	Sense: 5'-AACTCGAGATGCTGTGGCTGTGTGTCAC-3' Antisense: 5'-TTGGATCCTTACCTCTCTGGGTTGCTGA-3'	1595 bp	35
GgLiph*	Sense: 5'-GCCTTGTGGGACAGATGTTT-3' Antisense: 5'-TCAGCTAACACCACGCTGAG-3'	-	-
GgLiph*	Sense: 5'-CCCCACCTTTCGAGAAAGAA-3' Antisense: 5'-TTCTTTCTCGAAAGGTGGGG-3'	-	-
GgLiph*	Sense: 5'-GTGCTCAGCTTCAGCAGCGC-3' Antisense: 5'-GCGCTGCTGAAGCTGAGCAC-3'	-	-

Alle hier für die RT-PCR aufgeführten HPSF-aufgereinigten Primer wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) oder Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

3.1.5 Antikörper für die Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Tabelle 2-5: Verwendete Fluoreszenz-markierte Antikörper in der Durchflusszytometrie.

Spezifität	Marker	Klon	Isotyp	Hersteller
Isotyp	PE	X40	IgG ₁	BD
Isotyp	FITC	X40	IgG ₁	BD
Isotyp	FITC	G155-178	IgG _{2a,K}	BD
CD3	FITC	HIT3a	IgG _{2a,K}	BD
CD4	PE	SK3	IgG _{1,K}	BD
CD8	FITC	HIT8a	IgG _{1,K}	BD
CD14	FITC	MOP9	IgG _{2b}	BD
CD19	FITC	4G7	IgG _{1,K}	BD
CD45	FITC	HI30	IgG _{1,K}	BD
CD56	PE	B159	IgG _{1,K}	BD

3.1.6 Mikroarray-Datensätze

Neben eigenen Mikroarray-Datensätzen wurden die Datensätze GSE3526 (Roth et al. 2006), 8596 (Miyagawa et al. 2008), 2109², 7234³, 9921 (Elkabetz und Studer 2008), 9677 (Fukuhara et al. 2008), 6257 (Johnson et al. 2006), 3744 (Richardson 2006) der GEO-Datenbank⁴ für Untersuchungen zur Korrelation von LIPI, RBM11 und CXCL14 verwendet (GEO Array-Plattform GPL570).

3.1.7 Datenbanken und Programme

Datenbanken:

Deutsches Kinderkrebsregister <http://kinderkrebsregister.de>

Ensembl <http://www.ensembl.org>

NCBI <http://ncbi.nlm.nih.gov>

Programme:

ClustalW <http://www.genome.jp>

ExpASy <http://web.expasy.org>

² <http://www.intgen.org>

³ Kollektion embryonaler Stammzellen und embryonaler Karzinomzellen

⁴ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>

Genesis <http://genome.tugraz.at> (Sturn et al. 2002)

Primer3 <http://frodo.wi.mit.edu>

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Agarosegelelektrophorese

Prinzip der Agarosegel-Elektrophorese:

DNA-Moleküle sind bei ungefähr neutralem pH-Wert stark ionisiert, da die Phosphatgruppe von jedem Nukleotid eine negative Ladung zur Gesamtladung beiträgt. Deshalb wandern DNA-Moleküle während der Gelelektrophorese zur positiv geladenen Elektrode, der Anode. Auspolymerisierte Agarosegele haben je nach Agarose-Konzentration eine unterschiedliche Netzporengröße und beeinflussen dadurch die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA. Kleinere Moleküle können im Vergleich zu größeren Nukleinsäuremolekülen so die Gelmatrix schneller durchwandern, so dass sich unterschiedlich große Moleküle voneinander trennen lassen. Die Gelmatrix schränkt die zufallsbedingte Diffusion der Moleküle ein, weshalb sich Moleküle mit unterschiedlicher Größe in Banden auftrennen, die genauso breit wie die Geltaschen sind, in die das Probengemisch aufgetragen wurde. Die Banden können z.B. nicht-radioaktiv durch Zugabe von Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden. Dieses planare Molekül interkaliert zwischen die Basenpaare. Durch diese Bindung wird Ethidiumbromid in der DNA konzentriert und die Eigenfluoreszenz verstärkt. Bei Bestrahlung des Gels mit ultraviolettem Licht mittels UV-Transilluminator fluoreszieren die DNA-haltigen Gelbereiche viel stärker als die Bereiche ohne DNA und lassen sich so visualisieren (Lodish et al. 2001). Je nach Fragmentgröße wurden Agarosegele zwischen 1 und 4 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer für die DNA-Analytik und MOPS-Puffer für die RNA-Analytik mit 600 ng/ml Ethidiumbromid gegossen. Als Laufpuffer wurden ebenfalls TAE- und MOPS-Puffer verwendet. Die Proben wurden mit den Ladepuffern gemischt und in die Geltaschen aufgetragen. Bei einer Spannung von etwa 10 V/cm (60-140 V) erfolgte die Elektrophorese. Die Aufnahme der Agarosegele erfolgte mit einem Geldokumentationssystem der Firma Bio-Rad (München).

3.2.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der Elektrophorese wurden die DNA-Fragmente aus dem Agarosegel mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die nachfolgende Aufarbeitung erfolgte nach dem Protokoll des QIAquick Gel *Elution* Kits der Fa. Qiagen (Düsseldorf) nach Protokoll des Herstellers. Die DNA wurde mit 20 µl Elutionspuffer eluiert und die Konzentration bestimmt.

3.2.3 Konzentrationsbestimmung von RNA- und DNA-Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch bei 260 und 280 nm in einer Quarzküvette. Als Referenz wurde H₂O beziehungsweise DEPC (Diethylpyrocarbonat)-H₂O (RNA) verwendet. Eine optische Dichte (OD) OD₂₆₀ von 1 entspricht bei einer Küvettentiefe von 10 mm einer Konzentration von 50 µg/ml (DNA) bzw. 40 µg/ml (RNA). Durch Bildung des Quotienten von OD₂₆₀/OD₂₈₀ konnte die Reinheit der Nukleinsäuren durch mögliche Verunreinigungen mit Proteinen bestimmt werden. Dieser Quotient sollte sich für einen hohen Reinheitsgrad möglichst zwischen 1,8 und 2,2 befinden (Sambrook et al. 1989).

3.2.4 Affymetrix DNA-Microarrays als Werkzeug der Genexpressions-Analyse

3.2.4.1 Isolation der Gesamt-RNA

Die zu untersuchenden Zelllinien ($1-5 \times 10^6$) wurden in 1ml TRIzol-Reagenz aufgenommen und durch mehrmaliges Auf- und Abziehen in einer Kanüle (20 Gauge) homogenisiert und anschließend bei 12.000 x g (10 min, 4°C) in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß zentrifugiert. Gewebeproben wurden ebenfalls in 1 ml TRIzol aufgenommen und durch ein mit kleinen Kügelchen beladenes Reaktionsgefäß (*fast RNA pulverizer*) im *fast prep*-Gerät aufgeschlossen. Der Zellklumpen-freie Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,5 µl linearem Acrylamid (5 min, Raumtemperatur (RT)) inkubiert. Im Anschluß wurde 0,2 ml Chloroform/1ml TRIzol zur Probe hinzugegeben, für 15 s kräftig geschüttelt und für 5 min bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 12.000 x g (15 min, 4°C) wurde die obere, klare, wässrige Phase, welche die RNA enthält, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,5 ml Isopropanol/ml TRIzol gemischt und bei RT für 10 min inkubiert. Durch eine Zentrifugation (12.000 x g, 10 min, 4°C)

wurde die RNA pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml 80 % Ethanol/ml TRIzol gewaschen. Im Anschluss wurde die RNA erneut zentrifugiert (7.500 x g, 5 min, 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet unter einem Abzug für maximal 10 min vorsichtig getrocknet und in 20-50 µl DEPC-H₂O resuspendiert. Die isolierte Gesamt-RNA wurde auf deren Konzentration und Qualität im Photometer und in einem 1,2 % MOPS-Agarosegel untersucht.

3.2.4.2 Aufreinigung der präparierten Gesamt-RNA

Die präparierte Gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy Mini Kit der Fa. Qiagen gereinigt. Dazu wurde das Probenvolumen mit DEPC-H₂O auf 100 µl eingestellt. Die weitere Aufarbeitung der Probe erfolgte nach dem Herstellerprotokoll. In zwei getrennten Schritten wurde die RNA mit jeweils 25 µl DEPC-H₂O aus den Waschsäulen eluiert und vereint. Die somit gereinigte RNA-Lösung (50 µl) wurde weiterhin auf deren Konzentration und Qualität (RNA-MOPS-Agarosegel) untersucht.

3.2.4.3 Erst-Strang cDNA-Synthese

Die aufgereinigte RNA wurde auf eine Konzentration von 15 µg/10 µl eingestellt. Für die Primer-Hybridisierung wurde 1 µl T7-(dT)₂₄-Primer (100 pmol/µl) mit der Sequenz 5`-GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG-(dT)₂₄-3` zu den 10 µl RNA-Lösung gegeben, für 10 min bei 70°C inkubiert, anzentrifugiert und bei 4°C gelagert. Im Anschluss wurden 7 µl Erst-Strang Master-Mix zu den 11 µl RNA-Primer-Mix hinzugegeben (Tabelle 3-1).

Tabelle 3-1: Pipettierschema der Erst-Strang cDNA-Synthese für einen Ansatz.

Reagenzien	(1x)
Erst-Strang-Puffer (5x)	4 µl
DTT (0,1M)	2 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
Gesamtvolumen	7 µl

Das Reaktionsgemisch wurde bei 37°C für 2 min inkubiert. Durch weitere Zugabe von 2 µl Reverse Transkriptase Superscript RT II wurde der Reaktionsansatz (20 µl Endvolumen) für 60 min bei 37°C inkubiert.

3.2.4.4 Zweit-Strang-Synthese

Aus dem zuvor synthetisierten cDNA-Strang wird in der Zweit-Strang-Synthese ein Doppelstrang produziert. Für diesen Reaktionsschritt wurden 130 µl Zweit-Strang Master-Mix mit den 20 µl des Erst-Strangreaktionsgemisches vereint (Tabelle 3-2). Die Zweit-Strang-Synthese wurde für 2 h bei 16°C inkubiert und im Anschluss durch Zugabe von 10 µl 0,5 M EDTA abgestoppt.

Tabelle 3-2: Pipettierschema der Zweit-Strang-Synthese für einen Ansatz.

Reagenzien	(1x)
H ₂ O	91 µl
Zweit-Strang-Puffer (5x)	30 µl
dNTP (10 mM)	3 µl
<i>E. coli</i> DNA-Ligase (10 U/µl)	1 µl
<i>E. coli</i> DNA-Polymerase I (10 U/µl)	4 µl
RNase H (2 U/µl)	1 µl
Gesamtvolumen	130 µl

3.2.4.5 Phenol-Chloroform-Extraktion der cDNA

Die in der Erst- und Zweitstrangsynthese entwickelte doppelsträngige cDNA wurde durch eine weitere Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt. Durch eine sich in den Reaktionsgefäßen befindliche Gelschicht lassen sich die wässrige und organische Phase leichter voneinander trennen. Zunächst wurden die Phase Lock Gel Tubes zentrifugiert (12.000 x g, 1 min). Im Anschluss wurde der komplette cDNA-Syntheseansatz in die *Phase Lock Gel Tubes* überführt und mit 160 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:21) versetzt, geschüttelt und bei maximaler Drehzahl für 2 min zentrifugiert. Die obere Phase wurde entnommen und mit 1 Volumen 5 M Natriumazetat vermischt. Nach der weiteren Zugabe von 2,5 Volumenanteilen Ethanol und 0,5 µl Glykogen wurde der Ansatz für 10 min bei -20°C

inkubiert. Im darauffolgenden Schritt wurde der Ansatz zentrifugiert (12.000 x g, 30 min, 16°C), das Pellet mit zweimal 500 µl kaltem Ethanol gewaschen und letztlich erneut bei 12.000 x g (5 min, 16°C) zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde zu allerletzt in 3 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert.

3.2.4.6 *In vitro* Transkription (IVT)

In der sich nun anschließenden IVT-Reaktion wird die doppelsträngige cDNA wieder in eine cRNA umgeschrieben. In diesem Synthese-Schritt werden neben unmarkierten auch Biotin-markierte Nukleotide mit in die cRNA eingebaut, die später für die Detektion essenziell sind. Während der IVT kommt es bis zu einer 100fachen Amplifikation von cRNA-Transkripten, die durch eine T7-Polymerase katalysiert wird (Van Gelder et al. 1990). In dieser experimentellen Analyse wurde für die IVT das MEGAscript T7 Kit benutzt. Dazu wurden 1,5 µl der frisch hergestellten cDNA mit 18,5 µl des IVT-Master-Mixes vermischt und für 6 h bei 37°C inkubiert (Tabelle 3-3).

Tabelle 3-3: Pipettierschema der *in vitro* Transkription für einen Ansatz.

Reagenzien	(1x)
Ambion T7 ATP (75 mM)	2 µl
Ambion T7 GTP (75 mM)	2 µl
Ambion T7 CTP (75 mM)	1,5 µl
Ambion T7 UTP (75 mM)	1,5 µl
Biotin-CTP (10 mM)	3,75 µl
Biotin-UTP (10 mM)	3,75 µl
T7-Puffer Mix (10x)	2 µl
T7-Enzym Mix (10x)	2 µl
Gesamtvolumen	18,50 µl

3.2.4.7 IVT-Aufreinigung

Nach Beendigung der IVT-Reaktion wurde die synthetisierte cRNA mittels des RNeasy Mini Kit gereinigt und deren Konzentration photometrisch und Qualität in einer MOPS-Agarosegelelektrophorese analysiert.

3.2.4.8 Fragmentierung der cRNA

Um eine optimale Hybridisierung der Biotin-markierten cRNA mit der DNA des Microarrays zu gewährleisten, muß zunächst die cRNA in etwa 35 bis 200 Basenpaare (bp) große Fragmente prozessiert werden. Dazu wurde eine cRNA-Konzentration von 16 µg / 16 µl eingestellt. Die Prozessierung der cRNA erfolgte durch Zugabe eines 5x Fragmentierungspuffers und inkubierte für 35 min bei 95°C. Die Güte der fragmentierten cRNA wurde in einer MOPS-Agarosegelelektrophorese begutachtet.

3.2.4.9 Hybridisierung

Zu Beginn der Hybridisierungsreaktion wurde die fragmentierte cRNA für 2 min bei 65°C erhitzt. Im Anschluss wurden die 20 µl cRNA mit 280 µl eines Hybridisierungsmaster-Mixes zu einem Hybridisierungscocktail vermengt (Tabelle 3-4).

Tabelle 3-4: Pipettierschema der Hybridisierung für einen Ansatz.

Reagenzien	(1x)
Aqua bidest	104 µl
Eukaryontische Bio Hybr. Kontrolle (20x)	15 µl
B2 Oligonukleotid Kontrolle (3 nM)	5 µl
Heringssperma DNA (10 mg/ml)	3 µl
Azetyliertes BSA (50 mg/ml)	3 µl
MES-Hybridisierungspuffer (2x)	150 µl
Gesamtvolumen	280 µl

Weiterhin wurde dieser Hybridisierungscocktail für 5 min bei 99°C und im Anschluss für 5 min bei 45°C inkubiert. Eine darauffolgende Zentrifugation (12.000 x g; 2 min) unterband das Auftreten von unlöslichen Schwebpartikeln in dieser Lösung. Bevor die Arrays (Genchips) befüllt wurden, erfolgte zunächst eine Erwärmung auf RT. Im nächsten Arbeitsschritt wurden die Arrays mit 200 µl des 1x Hybridisierungspuffer befüllt und für 15 min bei 45°C unter Rotation in einem Hybridisierungssofen präinkubiert. Nach dieser Vorinkubation wurden die Arrays entleert und mit 200 µl des Hybridisierungscocktails befüllt und rotierend für 16 h bei 45°C inkubiert.

3.2.4.10 Waschen und Färben des Microarrays

Nach Abschluss der Hybridisierung wurde die Lösung aus den Microarrays entnommen (optionell bei -80°C lagerbar) und mit 200 µl eines *Non-Stringent-Wash* A-Puffer neu zur weiteren Aufbewahrung (RT; dunkel) befüllt. Im nächsten Arbeitsschritt wurde die SAPE (Streptavidin-Phycoerythrin)-Lösung unter lichtgeschützten Bedingungen hergestellt (Tabelle 3-5).

Tabelle 3-5: Pipettierschema des ersten Färbeschrittes für einen Ansatz.

Reagenzien	(1x)
Färbepuffer (2x)	400 µl
H ₂ O	360 µl
Azetyliertes BSA (50 mg/ml)	32 µl
SAPE (1 mg/ml)	8 µl
Gesamtvolumen	800 µl

Mittels des Waschprogramms EukGE-WS1 wurden die in die Module eingepassten Genchips der Fluidics-Station des Affymetrix Microarray-Systems bei 25°C für 30 min inkubiert und automatisch mit den hergestellten Non Stringent Wash A- und Stringent Wash B-Puffer gewaschen.

3.2.4.11 Scan-Vorgang der Microarrays

Die nun zur Verfügung stehenden Microarrays wurden bei einer Auflösung von 3 µm sowie einer Anregungswellenlänge von 488 nm bei 570 nm zweimal gescannt. Die dabei entstehenden Fluoreszenzsignale wurden automatisch als Bild im gekoppelten Computer gespeichert.

3.2.4.12 Waschen und Zweitfärbung mit Antikörperverstärkung

Durch die weitere Zugabe eines biotinylierten Anti-Streptavidin Antikörpers und erneuter Färbung mit der SAPE-Lösung kommt es zu einer Verstärkung des emittierten Fluoreszenzsignals. Dazu wurden die hybridisierten und bereits einmal gefärbten Microarrays zuerst mit der SAPE-Lösung (10 min; 25°C), dann mit der

Anti-Streptavidin Antikörper-Lösung (10 min; 25°C) (Tabelle 3-6) und zuletzt mit der SAPE-Lösung (10 min; 25°C) in der Fluidics-Station des Affymetrix Microarray-Systems unter der Steuerung des Waschprogramms EukGE-WS2 behandelt.

Tabelle 3-6: Pipettierschema der Zweitfärbung für einen Ansatz.

Reagenzien	(1x)
Färbe-Puffer (2x)	400 µl
Aqua bidest	355,2 µl
Azetyliertes BSA (50 mg/ml)	32 µl
IgG (10 mg/ml)	8 µl
Anti-Streptavidin (0,5 mg/ml)	4,8 µl
Gesamtvolumen	800 µl

3.2.4.13 Scanvorgang der Microarrays nach Antikörperverstärkung

Wie zuvor beschrieben wurden die Microarrays erneut mit einer Auflösung von 3 µm und bei einer Wellenlänge von 570 nm (Anregungswellenlänge: 488 nm) gescannt. Das aus den Fluoreszenzsignalen resultierende Bild wurde automatisch in dem am System gekoppelten Computer gespeichert.

3.2.5 Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

3.2.5.1 Isolation und Aufreinigung der präparierten Gesamt-RNA

Die Durchführung zur Isolation der Gesamt-RNA mittels TRIzol ist aus der zuvorigen Beschreibung zur Aufarbeitung der Proben für die Affymetrix DNA Microarray-gestützte Expressionsanalyse zu entnehmen.

3.2.5.2 Reverse Transkription von mRNA

Für einen 20 µl Reaktionsansatz wurden 2 µg RNA in 13 µl DEPC-H₂O gelöst, die Reagenzien in Form von 7 µl eines Master-Mix hinzugegeben und für 60 min bei

37°C inkubiert (Tabelle 3-7). Im Anschluss wurde der Gesamtansatz von 20 µl durch Erhitzen (5 min, 95°C) inaktiviert.

Tabelle 3-7: Pipettierschema der Reversen Transkription von mRNA für einen Ansatz.

Reagenzien	(1x)
RT-Puffer (5x)	4 µl
Oligo-dT ₍₁₂₋₁₈₎	1 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
H-Minus Reversed Transkriptase	1 µl
Gesamtvolumen	7 µl

3.2.5.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Prinzip:

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode, mit der man *in vitro* definierte DNA-Abschnitte amplifizieren kann, indem man die DNA-Replikation, wie sie *in vivo* im Zellkern abläuft, nachahmt (Saiki et al. 1988; Saiki et al. 1985).

Die PCR besteht aus einem Denaturierungsschritt, einem Annealingschritt und einem Elongationsschritt. Die Denaturierung findet bei 94°C statt. Dabei werden die Stränge der Template-DNA getrennt. Beim Annealing wird die Temperatur abgesenkt, so dass die im Überschuss vorhandenen Primer bei ihrer spezifischen Temperatur, die meist zwischen 55°C und 62°C liegt, an die DNA-Einzelstränge hybridisieren können. Bei der Elongation wird die Temperatur auf 72°C erhöht, welches das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase ist. Die Taq-Polymerase heftet nun Nukleotide an die 3'-OH-Primer-Enden und verlängert so den Primer, in dem sie das jeweilige dNTP komplementär zum Template-Strang in 5'-3'-Richtung anfügt, bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt. Der neu entstandene DNA-Strang dient im nächsten Zyklus wieder als Matrize. Dieser Ablauf erfolgt je nach Art des Templates über ca. 30 bis 35 Zyklen. Das DNA-Fragment wird auf diese Weise exponentiell amplifiziert (2^n , wobei n = Anzahl der Zyklen), (Mülhardt et al. 2002). Voraussetzung für die Durchführung einer PCR ist folglich das Bekanntsein der zu amplifizierenden Sequenz.

Tabelle 3-8: Pipettierschema der Polymerase-Kettenreaktion für einen Ansatz.

Reagenzien	(1x)
Aqua bidest	17,25 µl
10x Polymerase Puffer	2,5 µl
50 mM Magnesiumchlorid	1,5 µl
10 mM dNTP	0,5 µl
25 mM Primer for	0,5 µl
25 mM Primer rev	0,5 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl
Template DNA	2 µl
Gesamtvolumen	25 µl

PCR-Zyklusprofil:

1. 95°C 5 min Initial-Denaturierung
 2. 95°C 45 s Denaturierung
 3. 60°C 45 s Annealing
 4. 72°C 45 - 120 s Elongation (abhängig von der Produktgröße)
 5. 72°C 7 min End-Elongation
- } 35 Zyklen

3.2.5.4 Quantitative RT-PCR-Amplifikation

Die Durchführung der quantitativen RT-PCR (*real-time* PCR) erfolgte mit dem Rotor Gene RG-3000 (Fa. Corbett Research) und wurde mittels dem Programm Rotor-Gene 6 ausgewertet.

Die Detektion erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I, welches ein DNA-bindendes Fluorophor darstellt. Dieser interkalierende Farbstoff bindet Sequenz-unabhängig an die kleine Furche doppelsträngiger DNA. Durch die Bindung wird die Fluoreszenz um das etwa 200fache verstärkt. Am Ende jeder Elongationsphase, wenn die gesamte DNA doppelsträngig vorliegt, wird die Intensität der Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 510 nm gemessen, so dass die zunehmende Menge an PCR-Produkt Zyklus für Zyklus beobachtet werden kann. Das Signal ist der Menge des gebildeten PCR-Produkts proportional. Im Anschluss an die PCR erfolgt eine Schmelzkurvenanalyse. Hierbei wird durch langsamen

Temperaturanstieg und kontinuierliche Messung der Fluoreszenz die für das PCR-Produkt spezifische Schmelztemperatur ermittelt. Die spezifische Schmelztemperatur ist als die Temperatur definiert, bei der die DNA einzelsträngig vorliegt. Sie ermöglicht die Identifikation des PCR-Produktes und die Differenzierung von unspezifischen Produkten wie zum Beispiel Primer-Dimeren (Ririe et al. 1997).

Für jeden Reaktionsansatz wurden 2 µl cDNA in 18 µl eines Real Time RT-PCR Master Mix hinzugegeben. Der Reaktionsmix stammte aus dem QuantiTect SYBR Green PCR-Kit der Fa. Qiagen ab.

Tabelle 3-8: Pipettierschema der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion für einen Ansatz.

Reagenzien	(1x)
Aqua bidest	7 µl
2x SYBR-Green Mastermix	10 µl
25 mM Primer forward	0,5 µl
25 mM Primer reverse	0,5 µl
Template DNA	2 µl
Gesamtvolumen	25 µl

qRT-PCR-Zyklusprofil:

- | | | | |
|---------|--------|-----------------------|-------------|
| 1. 95°C | 15 min | Initial-Denaturierung | |
| 2. 94°C | 45 s | Denaturierung | } 40 Zyklen |
| 3. 60°C | 45 s | Annealing | |
| 4. 72°C | 60 s | Elongation | |
| 5. 72°C | 5 min | End-Elongation | |

3.2.5.5 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode

Die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode wurde bei der Berechnung von relativen Veränderungen der Gen-Expression angewandt. Bei den aus der quantitativen *real-time* PCR erhaltenen Rohdaten wurde der *Threshold Cycle* Ct durch die Verlagerung der *Baseline* in die exponentielle Phase der PCR ermittelt. Der *Threshold Cycle* ist der Zyklus der PCR, in dem die Fluoreszenz einer Probe erstmals signifikant über ihre

Hintergrundfluoreszenz hinaus ansteigt. Damit Proben vergleichbar werden, muss eine einheitliche *Baseline* festgelegt werden. Um eine Aussage über relative Expressionsverhältnisse zu erhalten, müssen die erhaltenen Expressionsdaten der untersuchten Zielgene mit einer internen Kontrolle, zum Beispiel einem Haushaltsgen, normalisiert werden. Die Vorteile der Normalisierung liegen in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen oder Fehler der RT-Reaktion gleichermaßen das untersuchte Zielgen und die interne Kontrolle betreffen. Wird dann die normalisierte experimentelle Probe mit einer normalisierten Kontrollprobe kalibriert, erhält man relative Expressionswerte (*fold change*) (Livak und Schmittgen 2001; Peirson et al. 2003).

Berechnung:

1. ΔCt (Zielgen der Testprobe) = Ct (Zielgen der Testprobe) – Ct (Kontrollgen der Testprobe)
2. $\Delta(\Delta Ct)$ = ΔCt (Zielgen der Testprobe) – ΔCt (Zielgen der Referenzprobe)
3. $fold\ change = 2^{-\Delta(\Delta Ct)}$

3.2.5.6 Sequenzier-PCR

Nach Amplifizierung der cDNA in der RT-PCR, elektrophoretischer Auftrennung in einem TAE-Agarosegel und Gelelution mittels des QIAquick Gel *Eluation* Kits (Qiagen) wurde die cDNA in 20 μ l eluiert. Die aufgereinigte cDNA wurde in zwei für *forward* und *reverse* Primer getrennten Ansätzen eingesetzt (Tabelle 3-9) und in 30 Zyklen mit 96°C für 10 s und 60°C für 4 min vervielfältigt (Sanger et al. 1992). Die in die Sequenzier-PCR eingesetzte cDNA Konzentration betrug für Plasmide 600 ng/ μ l und für PCR-Produkte 10-30 ng/ μ l.

Tabelle 3-9: Pipettierschema der Sequenzier-PCR für einen Ansatz.

Reagenzien	(1x)
Primer, forward oder reverse (10 mM)	0,5 µl
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	4 µl
HPLC-H ₂ O	4,5 µl
Gelextrahierte DNA	1 µl
Gesamtvolumen	10 µl

Im Anschluss an die Sequenzier-PCR ist eine Aufreinigung mittels Fällung notwendig. Dazu wurden 1 µl 3 M Natrium-Azetat (pH 4,6) und 25 µl 100 % Ethanol zur PCR hinzupipettiert und gevortext. Nach einer Inkubation von 15 min (RT) wurde das Gemisch zentrifugiert (13.000 x g; 15 min; RT) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 25 µl einer 75 %igen Ethanollösung gewaschen und erneut zentrifugiert (13.000 x g; 5 min; RT). Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet für maximal 1 h getrocknet und anschließend in 20 µl HPLC-H₂O eluiert. Für die anschließende Sequenzierung wurden 6 µl Sequenzier-Produkt mit 14 µl HPLC-H₂O verdünnt. Die Durchführung der Sequenzierung erfolgte am PRISM 310 DNA Sequencing System (ABI, Foster City, CA, U.S.A.) gemäß Herstellerangaben.

3.2.6 Klonierung

3.2.6.1 Verwendete Plasmide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in Tabelle 3-10 aufgeführten Plasmide verwendet. Diese wurden dankenswerterweise von Benjamin Schmiedel (Klinikum der Universität zu Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt (Schmiedel et al. 2011). Weitere Plasmide wurden unter Verwendung des Expressionsvektors mit den Inserts RBM11 und CXCL14 in dieser Arbeit generiert. Zudem erfolgte eine Klonierung der miRNAs LIPI, LIPH und RBM11 in den Expressionsvektor pcDNA6.2-GW/EmGFP mittels dem BLOCK-iT Pol II miR RNAi *Expression Vector Kit* (Invitrogen) nach dem Protokoll des Herstellers.

Tabelle 3-10: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Vektor	Insert	Gesamtgröße
pIRES2-EGFP	-	5308 bp
pIRES2-EGFP	LIPI FL	6813 bp
pIRES2-EGFP	LIPI DE5	6723 bp

3.2.6.2 Restriktionsendonuklease-Verdau

Die Aufgabe von Restriktionsendonukleasen in Bakterien besteht darin, fremde DNA, die in die Zelle gelangt ist, zu zerstören. Restriktionsendonukleasen der Klasse II sind bakterielle Enzyme, die spezifisch vier bis acht bp lange Sequenzen, die Restriktionsschnittstellen, erkennen und anschließend beide Stränge der DNA an dieser Stelle schneiden. Ein anderes Enzym, das Modifikationsenzym, bewahrt dabei die eigene DNA der Bakterienzelle vor der Spaltung, indem es die DNA an den potentiellen Schnittstellen oder in deren Nähe methyliert. Zusammen mit der Restriktionsendonuklease bildet das methylierende Enzym das Restriktions-Modifikations-System, mit dessen Hilfe die Wirts-DNA geschützt ist, während fremde DNA abgebaut wird (Kaufman und Evans 1990).

Tabelle 3-11: Pipettierschema eines Restriktionsendonuklease-Verdau für einen Ansatz.

Reagenzien	(1x)
Vektor oder Insert	43 µl
10x Restriktionsenzym-Puffer	5 µl
Restriktionsenzym 1	1 µl
Restriktionsenzym 2	1 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Der Ansatz wurde für 1 h in einem Thermoblock bei einer Temperatur inkubiert, bei der das Restriktionsenzym eine Aktivität von 100 % ausweist (in der Regel bei 37°C). Für Vektoren bestand ein weiterer Reaktionsschritt in der Inkubation des Restriktionsendonuklease-Verdau mit 2 µl Alkalische Phosphatase (*Calf intestinal*

alkaline phosphatase (CIAP)) bei 37°C für 1 h. Bei diesem Schritt wurden Phosphatreste an den Enden des linearen Vektors abgebaut, um eine Selbstligation im weiteren Verlauf der Klonierung zu verhindern.

In der Folge wurden die Reaktionsansätze von Vektor und Insert mittels Gelelektrophorese und Verwendung eines Agarose-Gel-Elutionskits (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Im Anschluss wurden die Konzentrationen zur Berechnung des Ligationsansatzes über die OD-Messung ermittelt.

3.2.6.3 XL10-Gold - Kompetente Zellen für Hitzeschock-Transformation

XL10-Gold ist eine hoch-effiziente kompetente *Escherichia coli*-Zelllinie. Die Effizienz liegt bei 5×10^9 Kolonien pro 1 µg DNA im pUC18 Plasmid. Die Bakterien eines Glycerin-Stocks wurden auf einer Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. 2-3 Einzelkolonien wurden gepickt, Übernachtskulturen in 10 ml SOB angeimpft und bei 37°C, 250 rpm geschüttelt. Nach OD₆₀₀-Messung wurden die Zellen mit einer Anfangs-OD von 0,05 zu 100 ml frischer SOB-Lösung gegeben und bis zu einer OD von 0,3-0,5 wachsen gelassen. Die Zellen wurden auf Eis für 15 min gekühlt und anschließend durch Zentrifugation für 10 min bei 6000 x g und 4°C geerntet. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 33 ml eiskaltem RF1 resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen auf Eis für weitere 15 min inkubiert. Dann erfolgte eine erneute Zentrifugation für 10 min bei 6000 x g und 4°C. Der Überstand wurde wieder verworfen und die Zellen mit 8 ml eiskaltem RF2 resuspendiert. Die Zellen wurden wieder für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend in 100 µl Aliquots in vorgekühlten Reaktionsgefäßen aufgeteilt. Die Reaktionsgefäße wurden sofort in Flüssigstickstoff zum Schockgefrieren gebracht und bei -80°C bis zu einem Jahr gelagert.

3.2.6.4 Ligation

Das Standardenzym für die Ligation ist die T4 DNA-Ligase. DNA-Ligasen verknüpfen DNA-Stränge durch Bildung einer Esterbindung zwischen einem Phosphatrest und dem Zucker Desoxyribose. In der Zelle sind sie an der DNA-Replikation und DNA-Reparatur beteiligt. Die T4 DNA-Ligase kann sowohl glatte als auch überhängende Restriktionsenden verknüpfen. Als Kofaktor benötigt dieses Enzym ATP (Lehman 1974).

Der Ligationsansatz wurde mittels folgender Formel berechnet (Mülhardt 2002):
Masse Fragment [ng]=5x Masse Vektor [ng] x Länge Fragment [bp]/Länge Vektor [bp].

Tabelle 3-11: Pipettierschema einer Ligation für einen Ansatz.

Reagenzien	(1x)
Vektor	x µl
Insert	x µl
Ligase-Puffer	1 µl
Ligase	1 µl
Gesamtvolumen	15 µl

Der Ligationsansatz wurde für 1 h bei RT inkubiert.

3.2.6.5 Transformation

Die Transformation bezeichnet die Aufnahme freier DNA bei Bakterien. Da bei einigen Bakterien, wie *Escherichia coli*, keine natürliche Kompetenz zur Aufnahme fremder DNA besteht, wurden diese durch eine geeignete Behandlungsmethode für die Transformation vorbereitet, wie unter 3.2.6.3 beschrieben. Der Ligationsansatz wurde zu den Bakterien gegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte für 45 s bei 42°C in einem Wasserbad und anschließender Kühlung für 2 min auf Eis. Nach Zugabe von 900 µl LB wurde der Ansatz für 1 h bei 37°C und 250 rpm geschüttelt. Nachfolgend wurde der Ansatz für 3 min bei 500 x g zentrifugiert, das Bakterienpellet mit 150 µl LB resuspendiert, auf einer Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Bakterienbrutschrank inkubiert. Die Agarplatte enthielt ein Antibiotikum entsprechend des auf dem transformierten Plasmid befindlichen Resistenzgens.

3.2.6.6 Minipräparation

Es wurden Einzelkolonien von der Agarplatte gepickt, Übernachtskulturen mit 4 ml LB angeimpft und bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Alle nachfolgenden Zentrifugationsschritte erfolgen bei 4°C. Von der Übernachtskultur wurden 2 ml der

Bakterien durch Zentrifugation 3 min bei 4600 x g pelletiert, der Überstand wurde möglichst vollständig verworfen und das Pellet in 100 µl Lösung I resuspendiert. 200 µl der Lösung II wurden dazugegeben, gemischt und für 5 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Lösung III. Nach dem Mischen wurde für 5 min auf Eis inkubiert und 10 min bei 12.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt, mit 400 µl Isopropanol versetzt und für 15 min bei 12.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen und erneut für 5 min bei 12.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und nach kurzer Abzentrifugation der restliche Alkohol mit der Pipette abgenommen. Das Pellet wurde Luft getrocknet bis es glasig war, in 30 µl Tris-EDTA-Puffer + RNase (1:500) aufgenommen und für 15 min bei 37°C gelöst.

3.2.6.7 Maxipräparation

Die Maxipräparation der Plasmide erfolgte mit dem QIAfilter Maxi Kit von Qiagen nach Protokoll des Herstellers.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Kultivierung und Passagieren eukaryotischer Zellen

Alle für die Zellkultur verwendeten Materialien waren steril verpackte Einmalartikel oder wurden vor Benutzung autoklaviert (120°C, 30 min). Die Kultivierung aller aufgelisteten Zelllinien erfolgte bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank der Fa. Heraeus (Hanau). Sämtliche Arbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank (Heraeus) durchgeführt. Um Kontaktinhibition während einer hohen Zelldichte zu vermeiden, wurden adhärent wachsende Zellen zweimal wöchentlich passagiert, bevor deren Kultur konfluent war. Dazu wurde der Zellkulturüberstand einer Kulturflasche abgenommen und mit 5 ml PBS, zur Entfernung toter Zellen und restlichem Mediums, gewaschen. Mit Hilfe von einer Trypsin/EDTA-Lösung (7 min, 37°C, 5 % CO₂) wurden die adhären Zellen von der Oberfläche der Kulturflasche und von benachbarten Zellen abgelöst, in 10 ml Medium resuspendiert und anschließend entsprechend der Proliferationsrate der Zelllinie 1:6 bis 1:12 verdünnt und weiter kultiviert. Für Experimente mit definierter Zellzahl erfolgte vor dem Ausplattieren eine Zellzählung mit Hilfe einer Neubauer-

Zählkammer der Fa. Brandt (Ludwigshafen). Dazu wurde die Zellsuspension mit Trypanblau 1:5 bis 1:20 verdünnt und die Zellzahl in den 4 großen Quadranten der Neubauer-Zählkammer ermittelt.

$$\text{Zellen/ml} = a \times b \times c$$

a = gezählte Zellzahl (Z)
b = Kammerfaktor (2.500/ml)
c = Verdünnungsfaktor

3.3.2 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Zur Konservierung von adhärenenten oder Suspensionszellen wurden jeweils $1-2 \times 10^6$ Zellen in 1 ml Einfriermedium, einem zellspezifischen Medium versetzt mit 10 % DMSO und 10 % FKS, resuspendiert und in 1,5 ml Kryoröhrchen verteilt. Mit Hilfe eines mit Isopropanol gefüllten Kryoeinfrierbehälters wurden die Zellen langsam (-1°C/min) auf -80°C abgekühlt. Die anschließende Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -180°C. Die Rekultivierung der Kryokulturen erfolgte durch Auftauen bei RT und Zugabe der Zellen zu frischem Medium in einem 15 ml Falcon-Röhrchen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (250 x g, 8 min, RT), der DMSO-haltige Überstand wurde verworfen und die Zellen in frischem Medium resuspendiert und kultiviert.

3.3.3 Transfektion

3.3.3.1 Transfektion mit kationischen Polymeren

Die Transfektion der Plasmide erfolgte mit dem Reagenz JetPEI von Fermentas nach Protokoll des Herstellers.

JetPEI ist ein lineares kationisches Polyethylenimin-Derivat. JetPEI bildet mit DNA einen stabilen kationischen Komplex, der an die anionischen Proteoglykane auf der Zelloberfläche bindet und durch Endocytose in die Zelle aufgenommen wird. Im Endosomen fungiert jetPEI als Protonenschwamm (Boussif et al. 1995). Dies führt zum Anschwellen und zur Ruptur der Endosomen, so dass der jetPEI/DNA-Komplex in das Zytoplasma gelangt (Merdan et al. 2002). Der jetPEI/DNA-Komplex wird aufgelöst und gleichzeitig die Aufnahme der DNA in den Zellkern durch jetPEI gefördert (Brunner et al. 2002).

3.3.3.2 Transfektion mit AMAXA Nucleofection-Technologie

Die Nucleofector-Technologie der Fa. AMAXA (Köln) ist eine Elektroporation der Zellen in einem Puffersystem. Diese Technologie ist eine nichtvirale Transfektionsmethode und basiert auf nutzerunbekannten spezifischen elektrischen Parametern und zellspezifischen Pufferlösungen, die der Fa. AMAXA vorbehalten sind. Mittels AMAXA wurden sowohl die verwendeten siRNAs als auch der miRNA-spezifische Vektor pcDNA6.2-GW/EmGFP in die beschriebenen Zelllinien transfiziert. Als Reporter für die Effizienz des Transports von Nukleinsäuren fungierten ALEXA Fluor488-markierte *non-silencing* siRNA und der Kontroll-Vektor pmaxGFP. Das GFP-Protein (*green fluorescent protein*) stammt aus der Qualle *Aequorea victoria* und fluoresziert bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün (Shimomura et al. 1962; Ormo et al. 1996). Die Transfektion der verschiedenen Zelllinien erfolgte nach den Protokollen der AMAXA-Datenbank. Die Transfektionsrate wurde mittels Durchflusszytometrie am FACScan über die ALEXA Fluor488 oder GFP-Expression quantifiziert.

3.3.4 Durchflusszytometrische Analyse von Zellen

3.3.4.1 Das Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrische Analyse von Zellen erfolgte mit dem FACScan, einem Durchflusszytometer/*fluorescence-activated-cell-scanner* der Fa. Becton Dickinson. Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Unterscheidung verschiedener mikroskopisch kleiner Partikel/Zellen anhand ihrer Größe, Struktur, Oberflächeneigenschaften und intrazellulären Zusammensetzung. Für die Messung werden die Zellen mit einem Antikörper, der entweder direkt an einen Fluoreszenzfarbstoff oder mit einem fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper gekoppelt war, über Oberflächenantigene markiert. Die Messung der Zellen im FACS beruht auf der Erfassung der markierten Zellen mit einem Laserstrahl. Das Licht wird beim Auftreffen der Strahlen auf die Zellen/Partikel in der Messküvette gestreut. Das Vorwärtsstreulicht, Forwardscatter (FSC), ist ein Maß für die Größe der gemessenen Zellen. Das Seitwärtsstreulicht, Sidewardscatter (SSC), dient als Maß für die Zellgranularität. Ein Teil der Lichtenergie wird durch die Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper absorbiert (488 nm) und Fluoreszenzlicht einer dem Fluorochrom entsprechenden höheren Wellenlänge emittiert (FITC 519 nm, PE 578 nm).

3.3.4.2 Analyse transfizierter eukaryotischer Zellen

Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz mittels Polyethylenimiden (PEI) oder AMAXA Nucleofection-Technologie wurden ALEXA Fluor 488-markierte siRNAs oder GFP (*green fluorescent protein*) als sogenannter Reporter verwendet. Mittels Durchflusszytometrischer Analyse im FACScan wurden die FITC- und GFP-vermittelten Fluoreszenzen der Zellen ermittelt. Dazu wurden die Zellen trypsinisiert, mit PBS gewaschen, bei 250 x g für 5 min zentrifugiert und 1×10^6 Zellen in 1 ml PBS eingestellt. In der darauffolgenden FACS-Analyse wurden 10.000 Zellen analysiert und die Fluoreszenz von ALEXA-Fluor 488- und GFP-positiven Zellen ermittelt.

3.3.4.3 Analyse fluoreszenzmarkierter Oberflächenantigene

Der Nachweis von Oberflächenantigenen erfolgte über fluoreszenzmarkierte monoklonale Antikörper (mAk).

Für die Untersuchung zur Expression von bestimmten Oberflächenantigenen wurden die Zellen von der Kulturflaschenoberfläche mit 0,5 mM EDTA/PBS gelöst, zentrifugiert (250 x g, 10 min, RT) und mit einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Zellen ($0,5 - 1 \times 10^6$) wurden in 100 μ l PBS im FACS-Röhrchen vorgelegt und anschließend mit 10 μ l des entsprechenden fluoreszenzmarkierten Antikörpers (FITC oder PE) inklusive der dazugehörigen Isotyp-Kontrollen für 30 min (4°C, im Dunkeln) direkt gefärbt. Nach der Direktfärbung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, zentrifugiert (250 x g, 10 min, RT) und in 1 ml PBS resuspendiert und bei 4°C im Dunkeln für die FACS-Messung für maximal 3 h gelagert.

3.3.4.4 Analyse von Zellkulturüberständen eukaryotischer Zellen

Mittels des *Cytometric Bead Array* (CBA)-Tests können die Konzentrationen von Zytokinen in Zellkulturüberständen im Durchflusszytometer quantifiziert werden. Es wurden die humanen TH1 Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-2 sowie die TH2 Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 analysiert. An die Zytokine binden Antikörper, die an Plastikkügelchen, *Beads*, gekoppelt sind, welche unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten aufweisen. Die Fluoreszenzintensitäten der Zytokin-gebundenen *Beads* lassen sich im FL3-Kanal des Durchflußzytometers getrennt voneinander detektieren. Die Konzentration der Zytokine wird über einen PE-

konjugierten Antikörper im FL2-Kanal gemessen, wobei sich die Zytokin-Konzentration proportional zur Fluoreszenzintensität verhält. Die Konzentration der einzelnen Zytokine wurde mittels eines Standards mit definierter Konzentration und einer speziellen CBA-Software bestimmt.

3.3.5 Fluoreszenzmikroskopie von Zellen

Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen von GFP-markierten Zellen erfolgten am Axiovert 25 der Fa. Zeiss. Das Prinzip liegt in der Absorption von kurzwelligem und der Emission von längerwelligem Licht. Dieser als Stokes-Differenz bezeichnete Effekt entsteht, wenn monochromatisches Licht auf Fluorochrom-markierte Zellen gerichtet wird. Viele Fluorochrom-Farbstoffe (Quinin, Fluorescein, Rhodamin und Acridinorange) haben oft aromatische Ringsysteme mit delokalisierten Elektronensystemen. Diese Elektronen werden durch das kurzwellige Licht in energetisch höhere Elektronenschalen (Energiezustände) angehoben und geben durch den Rückfall in den ursprünglichen Zustand langwelliges Licht ab. Dieses schwache Fluoreszenzlicht der Fluorochrome kann vom hellen Anregungslicht im Strahlengang des Mikroskops durch eine Auswahl an Filtern getrennt und kompensiert werden. Dadurch gelangt nur das Fluoreszenzlicht zur Bildentstehung.

3.3.6 Untersuchungen zur Zellviabilität

3.3.6.1 LDH-Test

Der Laktat-Dehydrogenase (LDH)-Test wurde mit dem Cytotoxicity Detection-Kit der Fa. Roche Applied Science durchgeführt im Maßstab einer 96-Lochplatte. Der LDH-Test ist ein *in vitro* Zytotoxizitätstest, dessen Prinzip auf der Bestimmung der Enzymaktivität von Laktatdehydrogenase (LDH) im Zytoplasma basiert, welches aus zerstörten oder Membran-beschädigten Zellen freigesetzt wird und folglich im Zellkulturüberstand nachweisbar ist. Die Laktatdehydrogenase ist ein stabiles ubiquitäres zytoplasmatisches Enzym, das schnell in das Zellkulturmedium diffundiert, wenn die Zellmembran zerstört ist. Bei höheren Tieren kommt LDH auch in freier Form in Hämolymphe oder im Blut vor. Die LDH-Aktivität wird mittels eines enzymatischen Tests bestimmt. Es finden zwei Redoxreaktionen statt: Im ersten

Schritt wird Laktat durch die Oxidoreduktase LDH zu Pyruvat oxidiert, während das Coenzym NAD^+ durch die Übertragung von Wasserstoff (vom Substrat Laktat) zu NADH/H^+ reduziert wird. Im zweiten Schritt transferiert der im Testreagenz enthaltene Katalysator Diaphorase Wasserstoff vom entstandenen NADH/H^+ auf das schwach gelbfarbene Tetrazolium-Salz INT (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid), welches dadurch zu dem rot gefärbten Formazan-Salz reduziert wird, während das NADH/H^+ zu NAD^+ oxidiert wird (Abbildung 3-1).

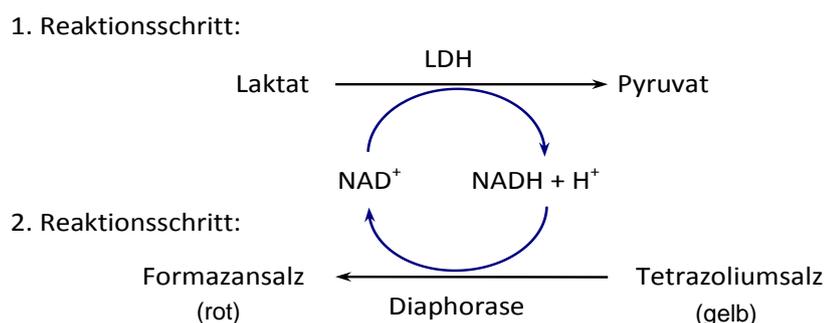


Abbildung 3-1: Vereinfachte Darstellung eines LDH-Tests.

Je höher der Grad der Zellschädigung ist, desto größer ist die Menge an freigesetztem LDH im Überstand (Medium). Diese Menge an LDH korreliert direkt mit der Menge an gebildetem Formazan-Salz und ist daher direkt proportional zur Anzahl geschädigter Zellen. Als Referenz dienen Kontrollansätze, d.h. Zellen, die unter Zugabe des Detergens Triton-X-100 (2 %, in Zellkulturmedium verdünnt) vollständig lysiert wurden und deren Substratumsetzung daher als maximal (100 %, Positivkontrolle) eingestuft wird, bzw. solche, die nur mit reinem Zellkulturmedium behandelt wurden und deshalb eine minimale (0 %, Negativkontrolle) LDH-Enzymaktivität im Überstand besitzen. Zur Bestimmung der LDH-Aktivität wurde das *Cytotoxicity Detection Kit* von Boehringer Mannheim eingesetzt.

Nach 72 h Inkubation wurden 100 μl Überstand entnommen, in eine Flachboden-96 Loch-Mikrotiterplatte pipettiert und mit 100 μl Reaktionspuffer versetzt. Der Reaktionspuffer enthielt das Tetrazolium-Salz 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazoliumchlorid und als Katalysator Diaphorase. Im Dunkeln wurde bei RT für 30 min inkubiert. Die Auswertung fand mit einem Mikrotiterplatten-Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm statt.

Berechnung der Zell-vermittelten Zytotoxizität:

$$\text{Zytotoxizität (\%)} = \frac{(\text{Effektor-Target-Zellmix} - \text{Effektor-Kontrolle}) - \text{Kontrolle}_{\text{min}}}{\text{Kontrolle}_{\text{max}} - \text{Kontrolle}_{\text{min}}} \times 100$$

3.3.7 RNA-Interferenz

3.3.7.1 Prinzip der RNA-Interferenz

RNA-Interferenz (RNAi, *RNA-Silencing*) ist ein natürlicher Mechanismus in eukaryotischen Zellen, welcher die Expression einzelner Gene hemmt (Elbashir et al. 2001). Die RNA-Interferenz kann auf Chromatin-Ebene, posttranskriptionell oder translationell eintreten. Als zielerkennende RNA können siRNA (*short interfering RNA*) oder miRNA (MicroRNA) wirken. Die miRNA wird auf eigenen pri-miRNA-Genen kodiert, während die siRNA aus längerer freier dsRNA, z.B. von Viren oder Transposons, entsteht. Die Inhibierung und der Abbau des mRNA-Transkriptes werden durch Bindung von 21-22 Nukleotid großen doppelsträngigen, linearen siRNAs oder miRNAs an den komplementären *antisense*-Strang initiiert. Dafür muß die doppelsträngige RNA-Vorstufe zunächst in 21 bis 23 lange Nukleotidfragmente durch einen Dicer (RNase III) prozessiert werden. Als Ergebnis werden 21 bis 23 Nukleotide lange einzelsträngige siRNAs bzw. miRNAs in einen RISC-Komplex (*RNA-induced silencing complex*) eingebaut. RISC ist ein RNA-haltiger Multiproteinkomplex, der sich an die Ziel-mRNA sequenzspezifisch anlagert und das Transkript selbst in weitere 21 bis 23 Nukleotide lange RNA-Stücke prozessiert. Diese Fragmente dienen in weiteren Folgezyklen erneut als inhibitorische RNA-Moleküle und verstärken somit den Prozess der RNA-Interferenz.

Zur näheren Charakterisierung der Bedeutung des RBM11 für das Ewing-Sarkom wurde ein RNA-Interferenz-Experiment mittels siRNA zur Verringerung der Expression von RBM11 in der EFT-Zelllinie SK-N-MC durchgeführt.

3.3.7.2 RNA-Interferenz mittels miRNA

Die durch MicroRNAs (miRNAs) vermittelte RNA-Interferenz ist eine posttranskriptionelle Inhibition der Expression eines Gens durch gezielten Abbau des komplementären mRNA-Transkriptes (Ambros 2001). Die miRNA wurde in den Vektor pcDNA6.2-GW/EmGFP kloniert, welcher endogen 22 Nukleotid lange Oligonukleotide synthetisierte, die ihre Wirkung über den beschriebenen Mechanismus der RNAi ausübten (Bartel 2004). Die zu einer *hairpin*-Struktur transkribierten miRNAs werden durch die RNA-Polymerase II gebildet (Lee et al. 2004). Die zunächst als pri-miRNAs exprimierten Oligonukleotide werden durch eine nukleäre RNase III (*Drosha*) in 70 Nukleotid große miRNA-Vorstufen (pre-miRNAs) prozessiert (Zeng et al. 2005). Anschließend werden die prozessierten pre-miRNAs durch das doppelsträngige RNA-bindende Protein Exportin 5 vom Zellkern in das Zytoplasma transportiert (Bohnsack et al. 2004). Die pre-miRNAs werden in einem *RNA-induced silencing*-Komplex (miRISC) vereinigt und durch die Ribonuklease Dicer in 22 Nukleotid lange reife miRNAs geschnitten (Cullen 2004).

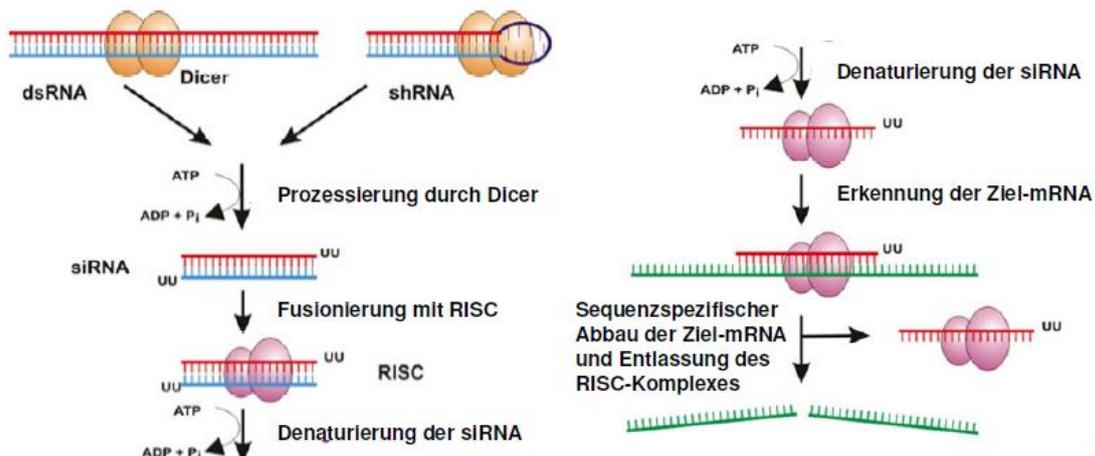


Abbildung 3-2: Vereinfachte Darstellung der RNA-Interferenz (RNAi) in Eukaryoten (Rutz et Scheffold 2004; modifiziert).

3.3.7.2.1 miRNA basierende RNA-Interferenz von LIPI, LIPH und RBM11

Die miRNA vermittelte RNA-Interferenz wurde anhand des *BLOCK-iTTM Pol II miR RNAi Expression Vector Kit* der Fa. Invitrogen (Karlsruhe) durchgeführt. Zunächst wurden die beiden einzelsträngigen Oligonukleotide (*ssOligo*; *single stranded Oligo*) in DNase/RNase-freien H₂O mit einer Endkonzentration von 200 µM gelöst. Im

nächsten Arbeitsschritt wurden durch Anlagerung (*Annealing*) die beiden einzelsträngigen Oligonukleotide zu doppelsträngigen Oligonukleotide hybridisiert. Hierfür wurden in jedem Reaktionsansatz die in Tabelle 3-11 aufgeführten Reagenzien hinzugegeben und für 4 min bei 95°C inkubiert:

Tabelle 3-12: Pipettierschema zur Hybridisierung einzelsträngiger Oligonukleotide zu doppelsträngigen Oligonukleotiden.

Reagenz	Volumen (µl)
<i>top strand ssOligo</i> (200 µM)	5
<i>bottom strand ssOligo</i> (200 µM)	5
<i>Oligo-Annealing-Puffer</i> (10x)	2
DNase/RNase-freies H ₂ O	8
Totalvolumen	20

Durch das langsame Abkühlen der Reaktionsansätze bei Raumtemperatur (10 min) erfolgte die Anlagerung zu doppelsträngigen Oligonukleotiden (dsOligos). Nach einer kurzen Zentrifugation (5 s) wurden die doppelsträngigen Oligonukleotide in zwei Schritten verdünnt. Im ersten Verdünnungsschritt (1:100) wurde 1 µl der doppelsträngigen Oligonukleotide (50 µM) mit 99 µl DNase/RNase-freiem H₂O gemischt.

Tabelle 3-13: Pipettierschema zur Ligation der doppelsträngigen Oligonukleotide in den Expressionsvektor.

Reagenz	Volumen (µl)
Ligations-Puffer (5x)	4
linearisierter Vektor pcDNA TM	2
6.2-GW/EmGFP-miR	4
miR-ds Oligo (10 nM)	4
DNase/RNase-freies H ₂ O	9
T4 DNA-Ligase	1
Totalvolumen	20

Die nun auf eine Konzentration von 500 nM reduzierten doppelsträngigen Oligonukleotide wurden in einem zweiten Verdünnungsschritt (1:50), bestehend aus 5 μ l *Oligo-Annealing-Puffer* (10x), 44 μ l DNase/RNase-freien H₂O und 1 μ l doppelsträngigen Oligonukleotiden, auf eine Endkonzentration von 10 nM verdünnt. Als Qualitätskontrolle für die erfolgreiche Aneinanderlagerung wurden jeweils 5 μ l der 500 nM doppelsträngigen Oligonukleotide und 5 μ l der 1:400 verdünnten einzelsträngigen Oligonukleotide (200 μ M) auf ein 4 %iges Agarosegel aufgetragen und verglichen. Im nächsten Arbeitsschritt erfolgte die Ligation der dsOligos in den Expressionsvektor, der als Transfektionskontrolle das grün-fluoreszierende Protein (EmGFP) enthielt. Für einen Ligations-Ansatz wurden die in Tabelle 3.12 aufgeführten Reagenzien verwendet. Nach Zugabe aller Reagenzien wurde der Reaktionsansatz durch Vortexen gut vermischt. Die Ligation erfolgte für 15 min bei Raumtemperatur und wurde durch Inkubation auf Eis gestoppt. Für die anschließende Transformation in *Escherichia coli* (TOP10 cells) wurden 2 μ l des Ligations-Ansatzes mit 100 μ l des Reagenz *One Shot[®] TOP10 chemically component E. coli* gemischt und auf Eis für 5 min inkubiert. Die Transformation der Zellen erfolgte mittels der Hitzeschock-Methode (45 s, 42°C) und wurde durch Inkubation auf Eis gestoppt. Als nächstes wurden die Zellen in 250 μ l S.O.C.-Medium im Schüttler (250 rpm) für 60 min bei 37°C inkubiert. Innerhalb dieser Zeit wurden in den Bakterien die Gene für die erforderliche Resistenz gegenüber dem Antibiotika transkribiert. 250 μ l jedes Transformations-Ansatzes wurden auf eine LB-Agarplatte inklusive 100 μ g/ml des Antibiotika Blasticidin überführt und für 24 h bei 37°C kultiviert. Nach der Isolation eines Blasticidin-resistenten Klons wurden Übernachtkulturen mit 4 ml LB-Medium angeimpft und im Schüttelinkubator (37°C, 250 rpm) vervielfältigt. Im Anschluß wurde die Plasmid-DNA mittels Mini-Präparation isoliert. In einer RT-PCR wurde die erfolgreiche Ligation der doppelsträngigen Oligonukleotide in den Vektor (pcDNATM 6.2-GW/EmGFP-miR) anhand von spezifischen Nachweis-Primern kontrolliert. Mittels des EmGFP *forward sequencing primer* und des miRNA *reverse sequencing primer* konnte im Agarosegel zwischen Klonen mit ligierter miRNA und einer Basenpaargröße von 282 bp sowie Klonen mit Leervektor und einer Basenpaargröße von 218 bp unterschieden werden. Die Ewing-Sarkom-Zelllinie SK-N-MC wurde mit 3 μ g in TE-Puffer gelöster Plasmid-DNA transfiziert. Die Transfektion erfolgte mittels der Elektroporations-Methode der Fa.

AMAXA. Die Selektionierung der Plasmid-haltigen und nicht Plasmid-haltigen Zellen erfolgte durch Anwesenheit von 100 µg/ml Blastocidin im Kulturmedium.

3.4 Phylogenetische Methoden

Zur Untersuchung der evolutionären Verwandtschaft von Lipasen verschiedener Spezies wurde bioinformatisch ein Aminosäuren-Sequenzvergleich mittels CustalW durchgeführt (Thompson 1994).

3.4.1 Berechnung Homologie Score für LIPI

Der LIPI-Homologie Score wurde für jede Lipase mittels nachstehender Formel berechnet:

$$\text{Score} = \sum_{i=1}^n \text{Scl}_i - \sum_{k=1}^m \text{Sch}_k$$

Scl_i : Homologie Score zwischen der analysierten Lipase und bekannten anderen Lipase I-Proteinen

Sch_k : Homologie Score zwischen der analysierten Lipase und bekannten anderen Lipase H-Proteinen

Auf dieser Gleichung basierend haben Lipasen mit einer hohen Homologie zu anderen Lipase I-Proteinen einen hoch positiven Score. Für Lipasen mit einer hohen Homologie zu Lipase H-Proteinen ergibt sich ein hoch negativer Score.

4. Ergebnisse⁵

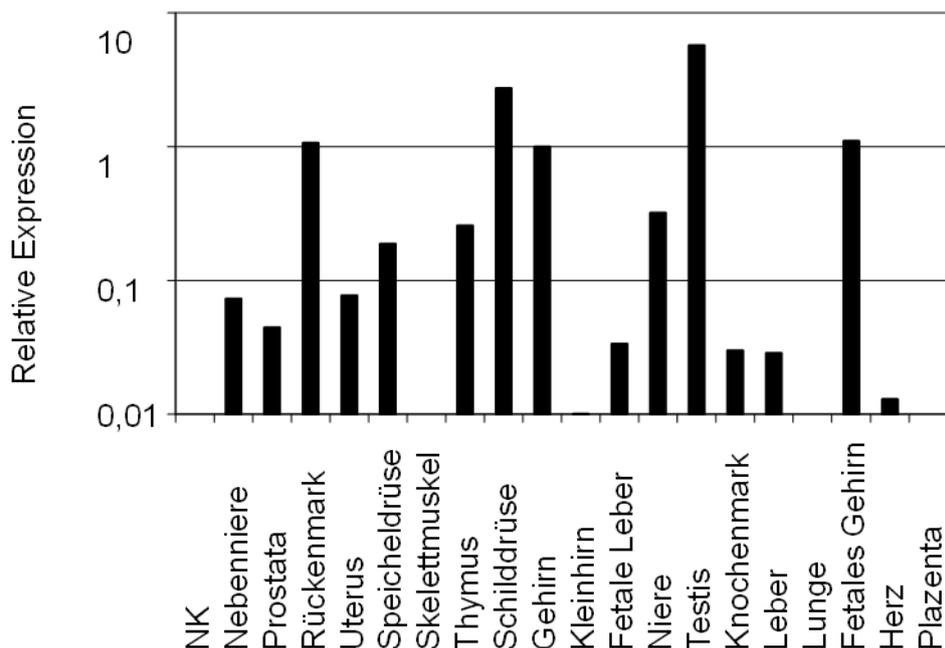
4.1 LIPI – ein Ewing-Sarkom-assoziiertes *Cancer/Testis*-Antigen (CTA)

4.1.1 Expression von LIPI in Normalgeweben

Mittels Mikroarrayanalyse konnten in vorhergehenden Studien bereits circa 40 Gene identifiziert werden, die in EFT im Vergleich zu Normalgeweben drastisch überexprimiert werden. Die Expression einiger Gene war dabei ausschliesslich auf den EFT begrenzt. Eines dieser Gene ist die Lipase I (LIPI) (Staege et al. 2004).

Zunächst wurde in dieser Arbeit die Expression von LIPI in verschiedenen humanen Geweben mittels konventioneller und quantitativer RT-PCR untersucht, wobei eine hohe Expression erwartungsgemäß im Hoden, jedoch zusätzlich auch in der Schilddrüse zu verzeichnen war. Schwache Signale waren noch im Rückenmark und im fötalen Gehirn detektierbar (Abbildung 4-1).

A



⁵ Die hier dargestellten Ergebnisse wurden teilweise bereits veröffentlicht: Föll et al. 2008; Schmiedel et al. 2011; Max et al. 2009; Hesse et al. 2012.

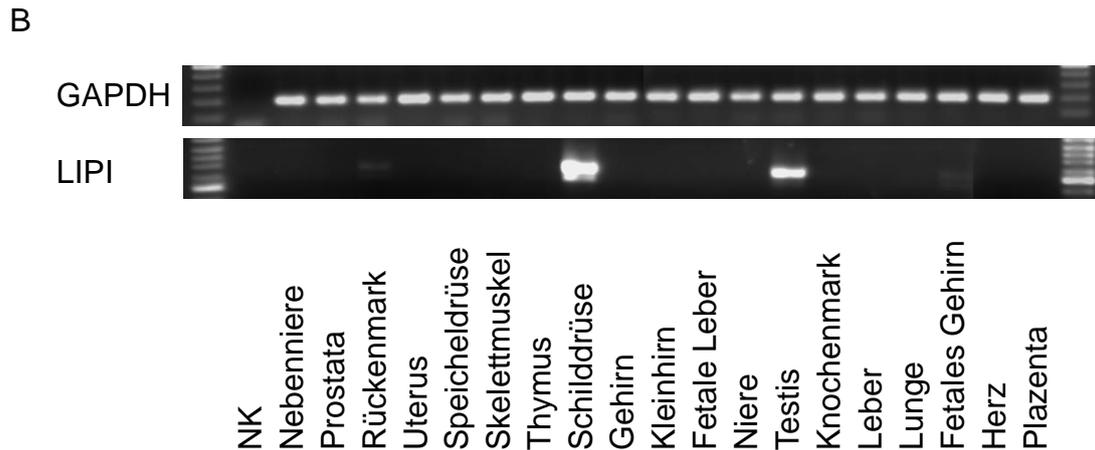


Abbildung 4-1: Detektion von LIPI in Normalgeweben. A: Die Analyse wurde mittels qRT-PCR durchgeführt. Die relative Expression des Gehirns wurde 1 gesetzt. Untersucht wurden alle in Abbildung B aufgeführten Normalgewebe. B: Die Analyse wurde mittels RT-PCR durchgeführt. NK: Negativkontrolle ohne cDNA.

Die mRNA-Transkripte der *full-length*-Transkriptvariante (Abbildung 4-1 A) und der Splicevariante LIPI~~Exon5~~ (Schmiedel et al. 2011; siehe auch Abbildung 5-1) wurden im Hoden, der Schilddrüse, dem Rückenmark und im fetalen Gehirn coexprimiert vorgefunden (Abbildung 4-1 B).

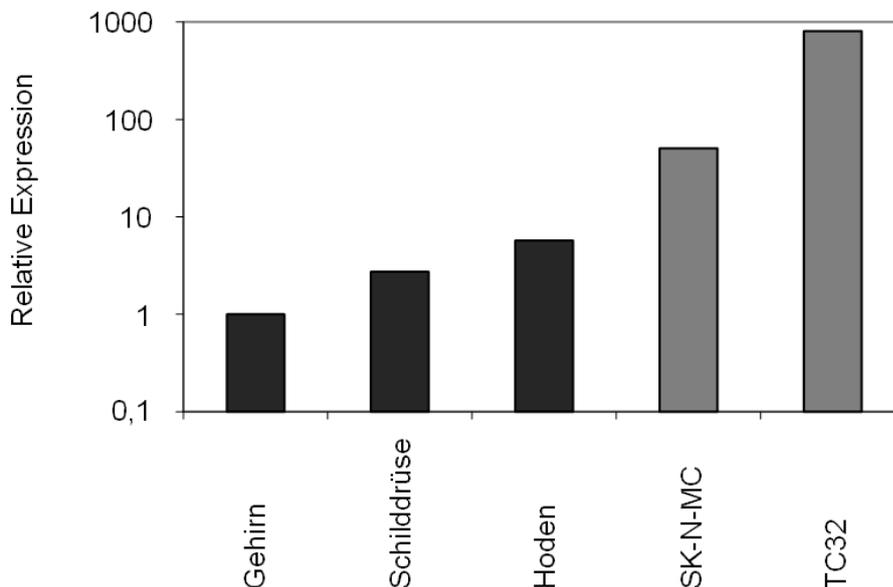


Abbildung 4-2: Vergleich der Expression von LIPI in Geweben und EFT-Zelllinien. Die Analyse wurde mittels qRT-PCR durchgeführt und mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode ausgewertet. Die Expression im Gehirn wurde als 1 gesetzt.

Im Vergleich zu EFT-Zelllinien war die relative Expression von LIPI im Hoden und in der Schilddrüse um das 10 – 100 fache geringer (Abbildung 4-2).

4.1.2 Expression von EFT-assoziierten Genen im Hoden und der Schilddrüse

Die unerwartete Expression von LIPI in der Schilddrüse führte zur Überprüfung der Expression von anderen EFT-assoziierten Genen in diesem Gewebe. Sowohl die Schilddrüse als auch der Hoden exprimierten alle untersuchten EFT-assoziierten Gene (Abbildung 4-2). Da sowohl Stammzellen der Neuralleiste als auch Mesenchymale Stammzellen (MSC) Kandidaten für die EFT-Stammzelle darstellen, wurde das Expressionsmuster von MSC aber auch von anderen Tumor-Zelllinien, welche aus der Neuralleiste abgeleitet werden, analysiert. LIPI war nicht detektierbar in MSC, Neuroblastomen oder Melanom-Zelllinien. Des Weiteren wurde die Mehrheit der übrigen EFT-assoziierten Gene in diesen Zellen ebenfalls nur schwach bzw. nicht exprimiert (Abbildung 4-3).

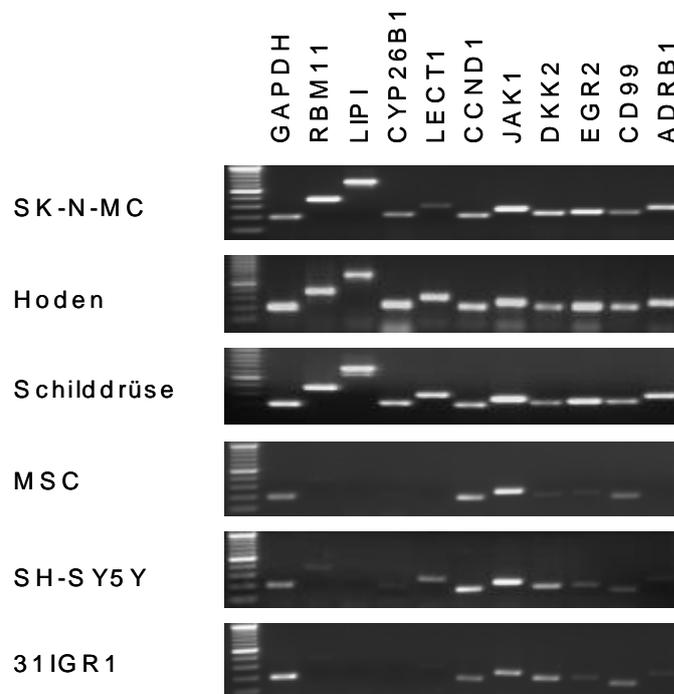


Abbildung 4-3: Expression von EFT-assoziierten Genen mittels RT-PCR. Die Expression von EFT-assoziierten Genen wurde in der EFT-Zelllinie SK-N-MC, im Hoden, in der Schilddrüse, in MSC, in der Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y sowie der Melanom-Zelllinie 31IGR1 analysiert.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei Verwendung von MSC eines anderen Spenders und der Melanom-Zelllinie 518A2 erhalten (Daten nicht gezeigt).

4.1.3 Expression von LIPI in Tumor-Zelllinien und Primärtumoren

Aufgrund der ausschließlichen Expression von LIPI im Hoden und der Schilddrüse wurde die LIPI-Expression in verschiedenen Tumor-Zelllinien und Primärtumoren untersucht, um der Fragestellung nachzugehen, ob LIPI, neben EWS-FLI1, als weiterer möglicher diagnostischer Marker zum Nachweis von Ewing-Sarkomen von Nutzen sein könnte.

Die Expression von LIPI wurde mittels RT-PCR und quantitativer RT-PCR in den EFT-Zelllinien SK-N-MC, A673, RD-ES, SK-ES, STA-ET-8, TC71, TTC466 und TC32, den Neuroblastom-Zelllinien SIMA, SH-SY5Y, KELLY, CHP-134 und IMR-5, den Hodgkin-Lymphom-Zelllinien L-1236, L-540, HDLM2, KM-H2, den Rhabdomyosarkom-Zelllinien A-204 und RD, den Epstein-Barr-Virus immortalisierten Zelllinien LCL1-LCL6, den Melanom-Zelllinien 518A2 und 31IGR1, den Leukämie-Zelllinien NALM6, CALL2, 697 und in der humanen embryonalen Nieren-Zelllinie HEK293 sowie in PBMC analysiert.

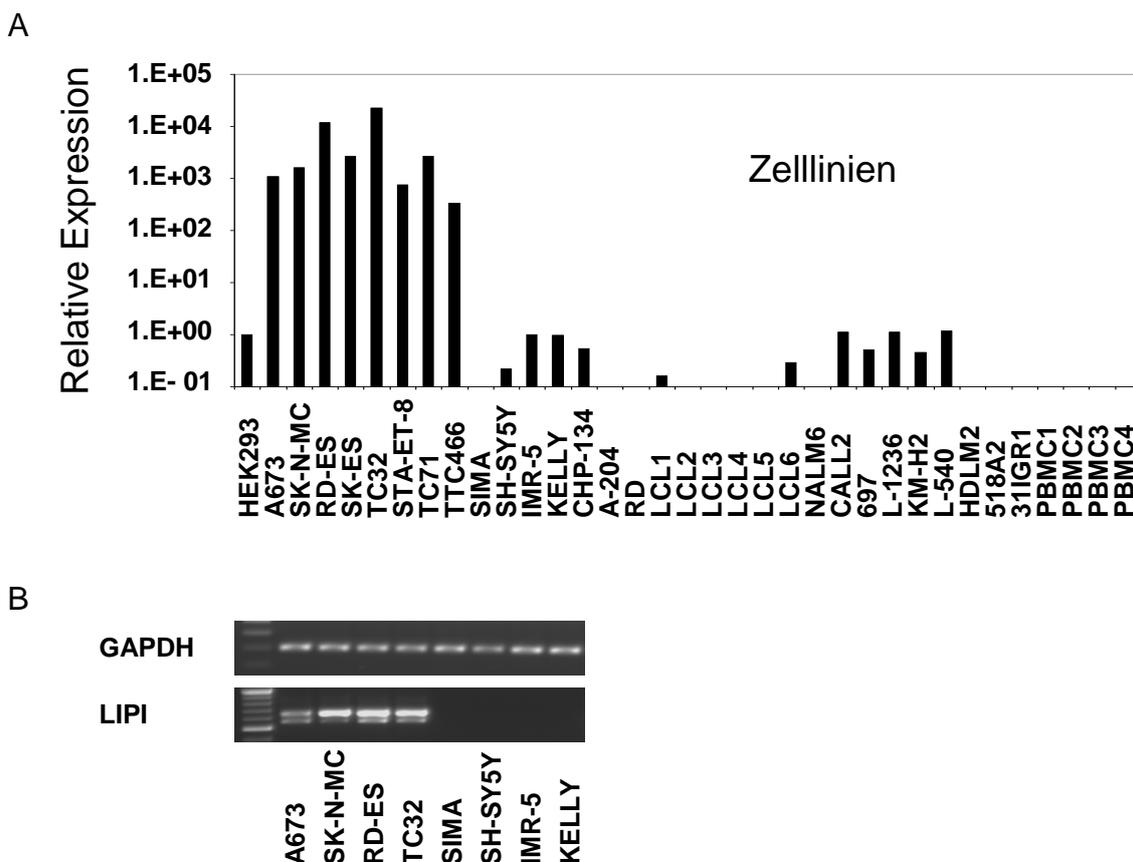


Abbildung 4-4: Expression von LIPI in humanen Tumor-Zelllinien. A: Die Analyse wurde mittels qRT-PCR durchgeführt und mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode ausgewertet. Die relative Expression von HEK293-Zellen wurde 1 gesetzt. B: Für die RT-PCR wurden je 4 EFT- und Neuroblastom-Zelllinien ausgewählt.

LIPI war in 8/8 EFT-Zelllinien mittels RT-PCR nachweisbar, jedoch nicht in allen anderen untersuchten Zelllinien sowie PBMCs (Abbildung 4-4).

Ebenfalls konnte LIPI in 8/8 Primärtumoren der Ewing-Familie nachgewiesen werden, jedoch nicht in Neuroblastomen (NB, 6 Proben), embryonalen Rhabdomyosarkomen (ERMS, 10 Proben) oder alveolaren Rhabdomyosarkomen (ARMS, 10 Proben) (Abbildung 4-5). Die prominente Spleißvariante LIPI~~Exon5~~ der Lipase I wurde in der RT-PCR sowohl in EFT-Zelllinien als auch EFT-Primärtumoren mit der *full-length*-Variante von LIPI coexprimiert vorgefunden.

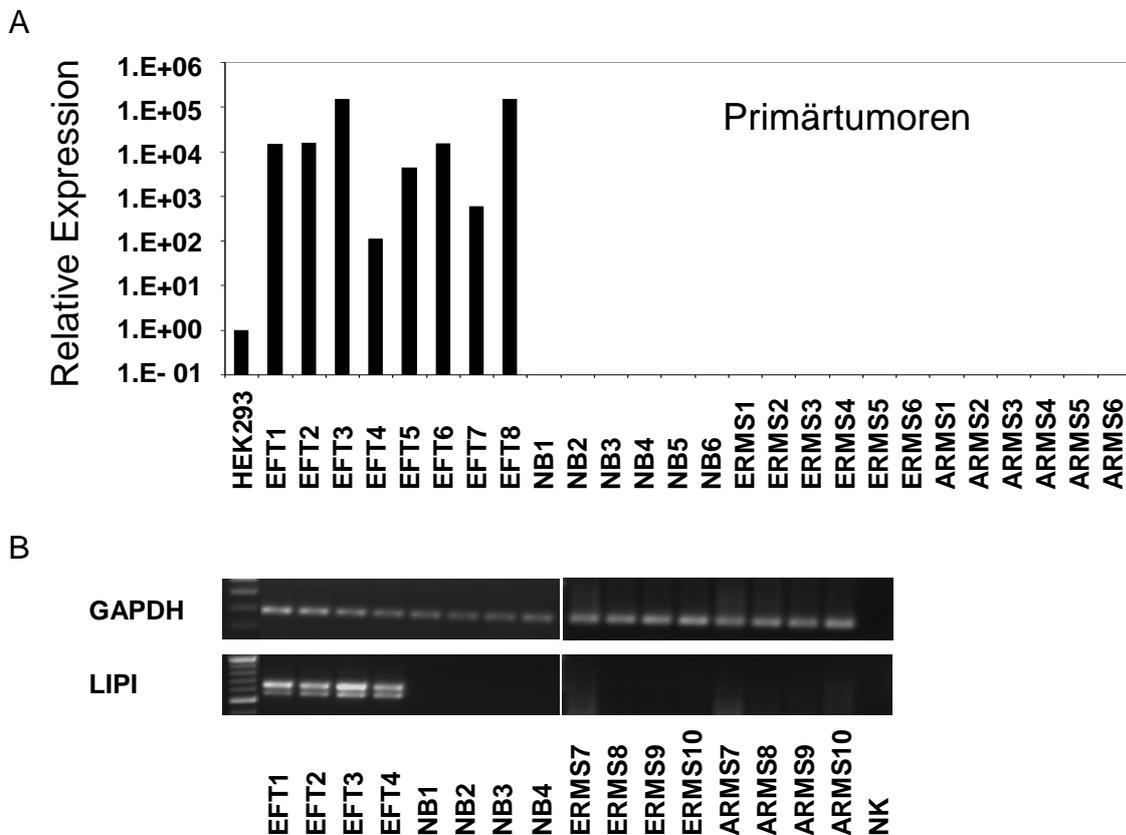


Abbildung 4-5: Expression von LIPI in Primärtumoren. A: Die Analyse wurde mittels qRT-PCR durchgeführt und mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode ausgewertet. Die relative Expression von HEK293-Zellen wurde 1 gesetzt. B: Für die RT-PCR wurden jeweils 4 EFT- und Neuroblastom-Primärtumoren sowie je 4 embryonale und alveolare Rhabdomyosarkome ausgewählt. NK: Negativkontrolle ohne cDNA.

4.1.4 Evaluierung von LIPI als Marker bei der Diagnosestellung von EFT

Mittels konventioneller PCR wurde die Sensitivität der LIPI-PCR mit der EWS-FLI1-PCR verglichen. Wie in Abbildung 4-6 zu sehen, war die Sensitivität der LIPI-spezifischen RT-PCR mit der EWS-FLI1-RT-PCR vergleichbar.

Die Sensitivität der *nested* RT-PCR für EWS-FLI1 lag in einem Bereich von 1 Tumorzelle bei 10^5 bis 10^6 PBMCs. Bei einer Verdünnung von $1:10^7$ konnte auch EWS-FLI1 nicht mehr detektiert werden, wobei die erwartete Zahl an Tumorzellen bei dieser Verdünnung unter 1 lag.

In einigen klinischen Fällen, bei denen nur ein schwaches Produkt für EWS-FLI1 nachgewiesen werden konnte, ergab die LIPI-spezifische PCR ein eindeutiges Signal. Erst die *nested* RT-PCR für EWS-FLI1 konnte die Präsenz von Tumorzellen bestätigen (Föll et al. 2008).

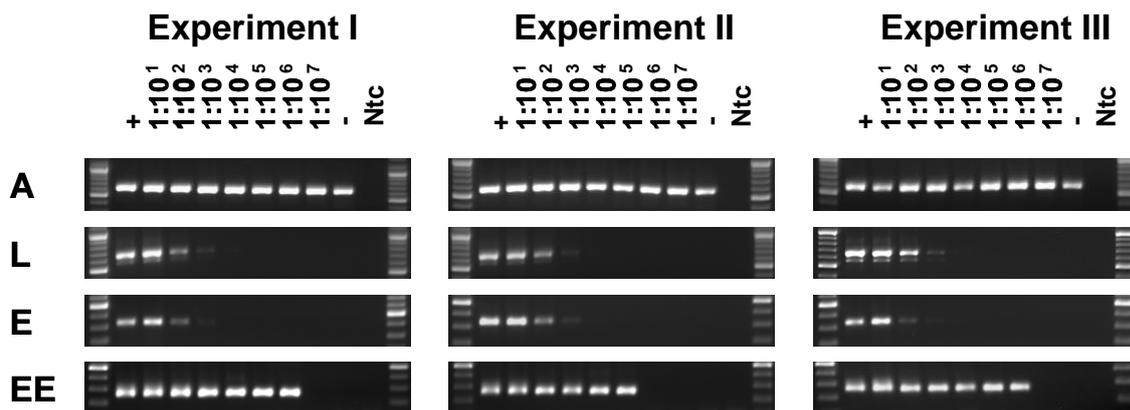


Abbildung 4-6: Sensitivität der LIPI-RT-PCR. 3 unabhängige Verdünnungsreihen von SK-N-MC mit PBMCs wurden erstellt (Exp. I, Exp. II, Exp. III). Aktin (A), LIPI (L) und EWS-FLI1 (E) wurden mittels RT-PCR nachgewiesen. Zusätzlich erfolgte eine *nested* RT-PCR für EWS-FLI1 (EE). Das Verhältnis von SK-N-MC zu PBMCs lag zwischen 1:10 und $1:10^7$. (+) SK-N-MC ohne PBMC, (-) PBMC ohne SK-N-MC, Ntc: Negativkontrolle ohne RNA.

Letztlich wurde die Sensitivität der quantitativen PCR für LIPI getestet. Sowohl LIPI als auch EWS-FLI1 waren bis zu einer Verdünnung von $1:10^5$ nachweisbar (Abbildung 4-7).

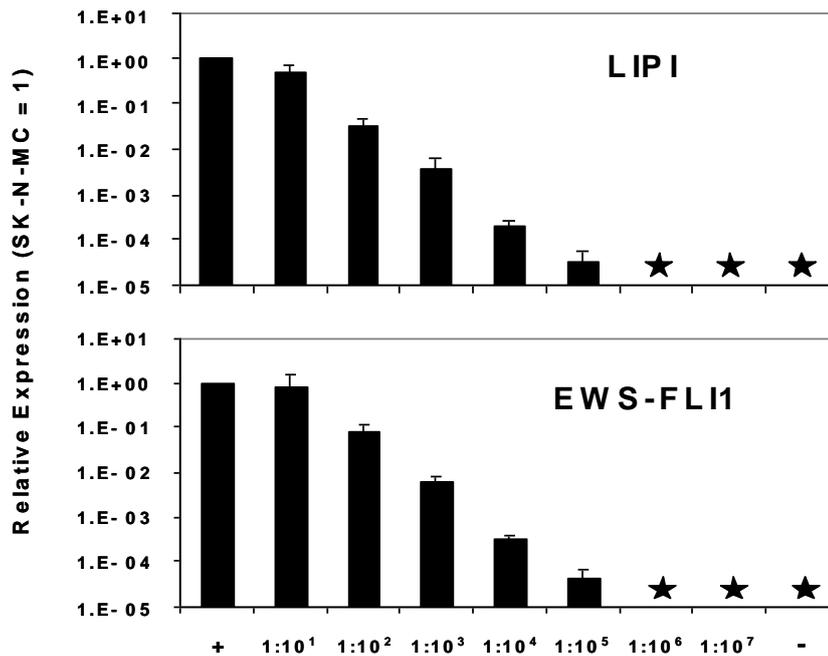


Abbildung 4-7: Sensitivität der quantitativen LIPI-RT-PCR. Die Analyse wurde mittels qRT-PCR durchgeführt und mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode ausgewertet. Mittelwert und Standardabweichung der LIPI- und EWS-FLI1-Expression sind für die unabhängigen Experimente I, II und III dargestellt. Die relative Expression von SK-N-MC wurde als 1 gesetzt. Proben, für die nach 40 Zyklen kein Ct-Wert ermittelt werden konnte, sind mit einem Stern markiert. (+) SK-N-MC ohne PBMC, (-) PBMC ohne SK-N-MC.

4.1.5 Phylogenetische Aspekte von Lipase I und der verwandten Lipase H

4.1.5.1 Expressionsprofil von Lipase H in humanen Zelllinien

Die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von LIPI und ihrer verwandten membrangebundenen Phospholipase A1 Alpha (Lipase H; LIPH) sind von hoher Homologie. Nachfolgend soll mittels Untersuchung des Expressionsprofils und phylogenetischer Aspekte der Frage nachgegangen werden, ob beide Gene durch Gen-Duplikation hervorgegangen sind und/oder LIPH ebenfalls ein CTA darstellt.

Die Expression von Lipase H wurde in den EFT-Zelllinien SK-N-MC, A673, RD-ES, TC-32, den Neuroblastom-Zelllinien SH-SY5Y, SIMA, IMR-5, den lymphoblastoiden Zelllinien LCL1 und LCL2, den Hodgkin-Lymphom-Zelllinien L-1236 und KM-H2 sowie der embryonalen Nieren-Zelllinie HEK293 analysiert. Die LIPI-Expression war nur in EFT-Zelllinien nachweisbar. Im Gegensatz zu LIPI konnte eine LIPH-Expression nicht nur in EFT-Zelllinien sondern auch in Hodgkin-Lymphom-Zelllinien und HEK293 nachgewiesen werden (Abbildung 4-8).

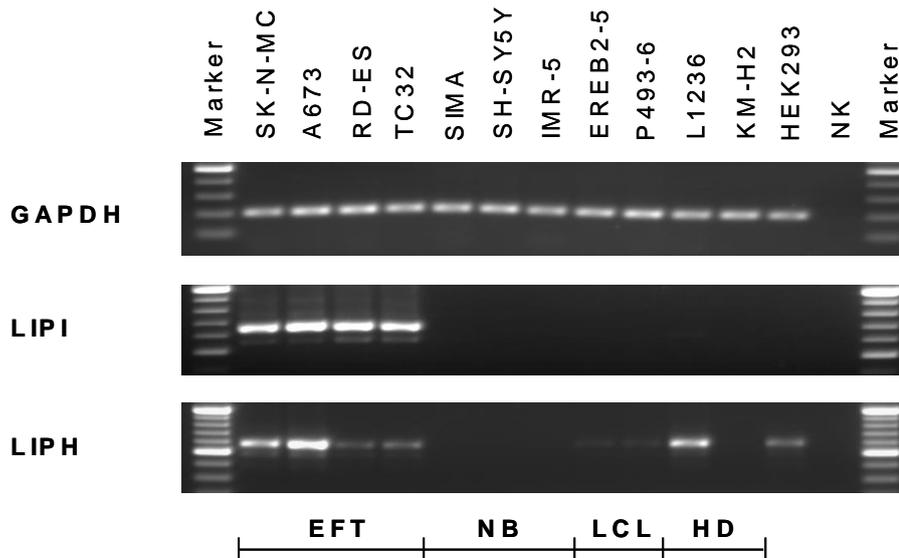
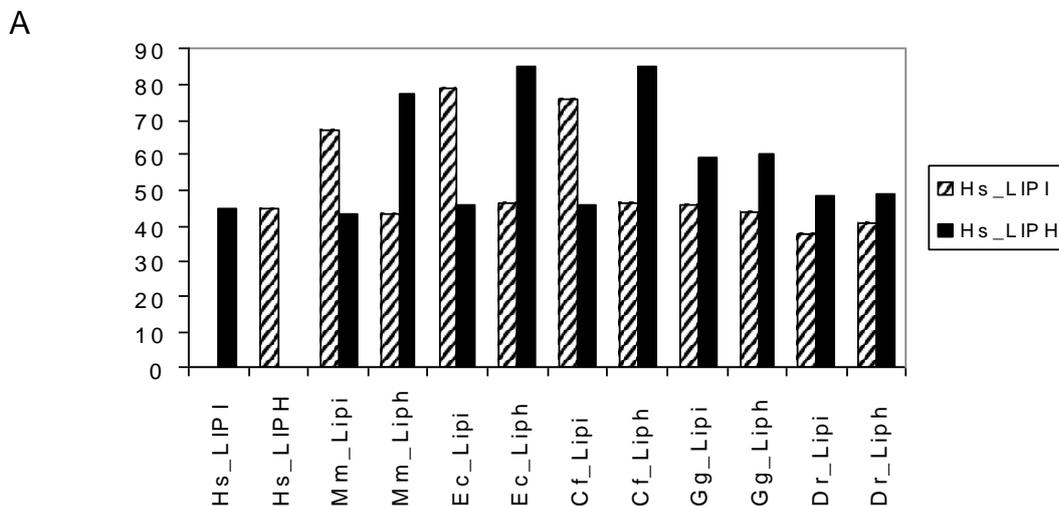


Abbildung 4-8: Expressionsprofil von LIPI und LIPH in humanen Zelllinien. Die Expression von LIPI und LIPH wurde in EFT-Zelllinien, Neuroblastom-Zelllinien (NB), lymphoblastoiden Zelllinien (LCL), Hodgkin-Lymphom-Zelllinien (HD) und HEK293 untersucht. NK: Negativkontrolle.

4.1.5.2 Datenbankrecherche und bioinformatische Analysen zur Identifizierung homologer Lipasen der LIPI/LIPH-Familie

Zur Identifizierung anderer Lipasen mit Homologie zur humanen LIPI/LIPH-Familie wurde eine Datenbankrecherche durchgeführt. In verschiedenen Vertebraten konnten 2 nah verwandte Lipasen mit hoher Homologie zur humanen LIPI und LIPH identifiziert werden (Abbildung 4-9).



B

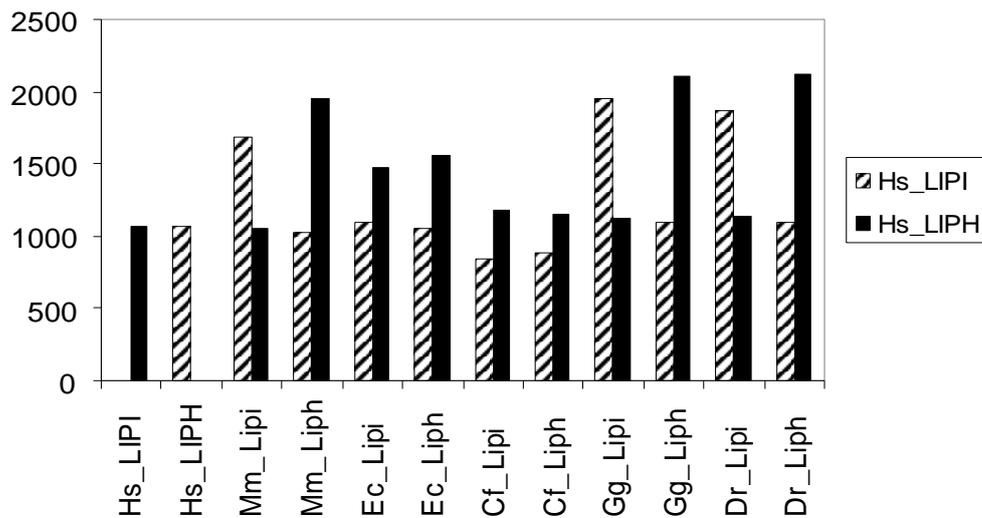


Abbildung 4-9: Homologie-Vergleich von LIPI und LIPH verschiedener Vertebraten. Darstellung eines multiplen Homologie-Vergleiches von Aminosäuresequenzen der humanen LIPI und LIPH im Vergleich zu nicht-humanen Vertebraten in Prozent (%) (A) und als Homologie-Score (B). Die Analysen wurden basierend auf den Needleman-Wunsch Algorithmen⁶ berechnet (Needleman und Wunsch, 1970). Es sind die Sequenz-Homologien von *H. sapiens* (Hs), *E. caballus* (Ec), *C. familiaris* (Cf), *M. musculus* (Mm), *G. gallus* (Gg) und *D. rerio* (Dr) dargestellt.

Die vorhergesagten Sequenzen für LIPI und LIPH des Menschen, der Maus und dem Haushuhn wurden mittels Sequenzierung von PCR-Produkten validiert. Bisher in ihrer Sequenz unbekannte Exons von LIPI und LIPH weiterer Spezies wurden durch Vergleich der genomischen Sequenzen mit Mensch, Maus und Huhn identifiziert. Nur eine Lipase konnte im Frosch (*Xenopus sp.*) gefunden werden. Basierend auf den Homologie-Vergleichen konnten alle Lipasen der Mammalia als LIPI oder LIPH identifiziert werden. Im Gegensatz dazu wiesen alle Lipasen von Nicht-Säugetern eine höhere Homologie zur humanen Lipase H als zur humanen Lipase I auf (Abbildung 4-10).

⁶ <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/>

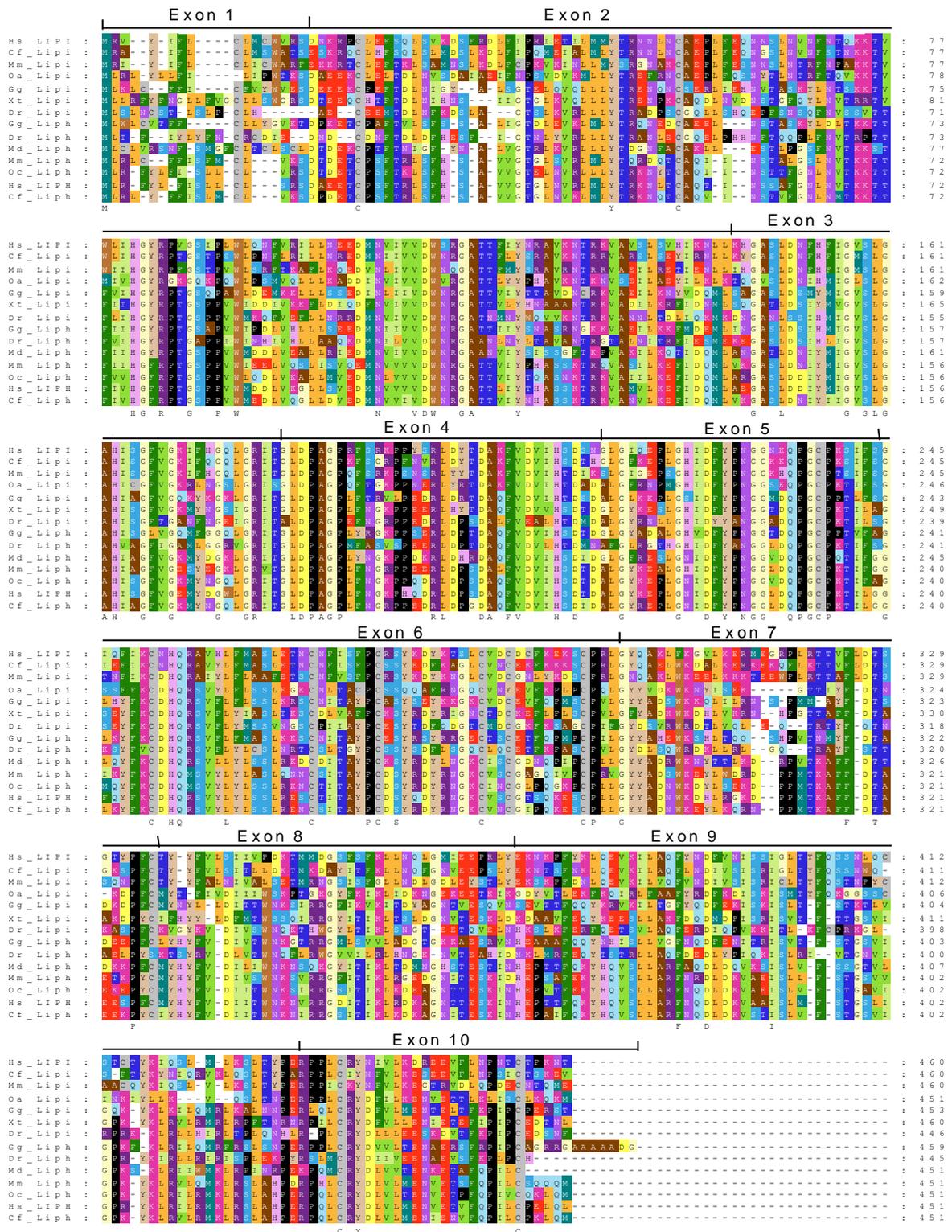


Abbildung 4-10: Multipler Sequenzvergleich von LIPI und LIPH verschiedener Vertebraten. Der multiple Vergleich von Aminosäuresequenzen wurde mittels der Algorithmen von CLUSTALW⁷ erstellt (Thompson et al. 1994). Es sind die Sequenzen von *H. sapiens* (Hs), *E. caballus* (Ec), *C. familiaris* (Cf), *M. musculus* (Mm), *G. gallus* (Gg), *D. rerio* (Dr), und *X. tropicalis* (Xt) dargestellt.

⁷ <http://align.genome.jp/>

4.1.5.3 Genomischer Kontext von LIPI und LIPH

Das Gen der humanen LIPI ist auf Chromosom 21 in direkter Nachbarschaft zum RNA-Bindemotiv-Protein 11 (RBM11) lokalisiert. Das Gen der humanen LIPH liegt auf Chromosom 3 neben dem Transmembranprotein 41A (TMEM41A). Dieser genomische Kontext ist bei Vertebraten hoch konserviert. Die meisten Gene in unmittelbarer Nachbarschaft zum Locus der LIPI bzw. LIPH waren auch in anderen Säugetieren zu finden. Ausnahmen stellen dabei die Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kinase-Kinase 13 (MAP3K13) des Hundes (*C. familiaris*) dar, welche bisher nicht beschrieben ist und ein ATP-Transporter, *ATP-binding cassette transporter* 13, (ABCC13) der Maus (*M. musculus*), der bei Nagetieren stark degeneriert ist (Annilo und Dean 2004). Im Anhang ist in Abbildung 9-1 der genomische Kontext von Säugetieren sowie dem Haushuhn, Zebrafisch und Frosch zusammengestellt.

Der genomische Kontext einer der zwei Lipasen des Haushuhnes (*G. gallus*) mit Homologie zur humanen LIPH war stark homolog zum genomischen Kontext der LIPI der Säugetiere, während der Kontext der anderen Lipase stark homolog zur LIPH der Mammalia war. Deshalb scheint es evident, dass das Gen mit der GenID 418466 das Homolog der Vögel zur humanen LIPI und das Gen mit der GenID 424874 das Homolog zur humanen LIPH ist (Abbildung 4-11A, Abbildung 4-11B, Abbildung 9-1). Die andere Lipase der Fische befindet sich in direkter Nachbarschaft zu einem Gen mit starker Homologie zum humanen ABCC13. Der Homologie-Score der Lipase, die durch das Gen mit der GenID 445105 kodiert wird und der humanen LIPI war geringfügig höher als der Homologie-Score der Lipase, die durch das Gen mit der GenID 559233 kodiert wird und der humanen LIPI (Abbildung 4-11A, Abbildung 4-11B, Abbildung 9-1). Umgekehrt war die Homologie dieser Lipase und der humanen LIPH geringfügig höher (Abbildung 4-9).

4.1.5.4 Multiples Sequenzalignment von LIPI und LIPH

Eine phylogenetische Stammbaum-Analyse aller verfügbaren Aminosäuresequenzen von LIPI und LIPH verschiedener Spezies verdeutlicht einen größeren evolutionären Abstand von LIPI und LIPH innerhalb der Gruppe der Mammalia als dies der Fall für andere Vertebraten ist (Abbildung 4-11A).

Ausgehend von den Homologie-Scores konnten alle Lipasen aus der Gruppe der Mammalia eindeutig als Lipase I oder Lipase H identifiziert werden (Abbildung 4-11B).

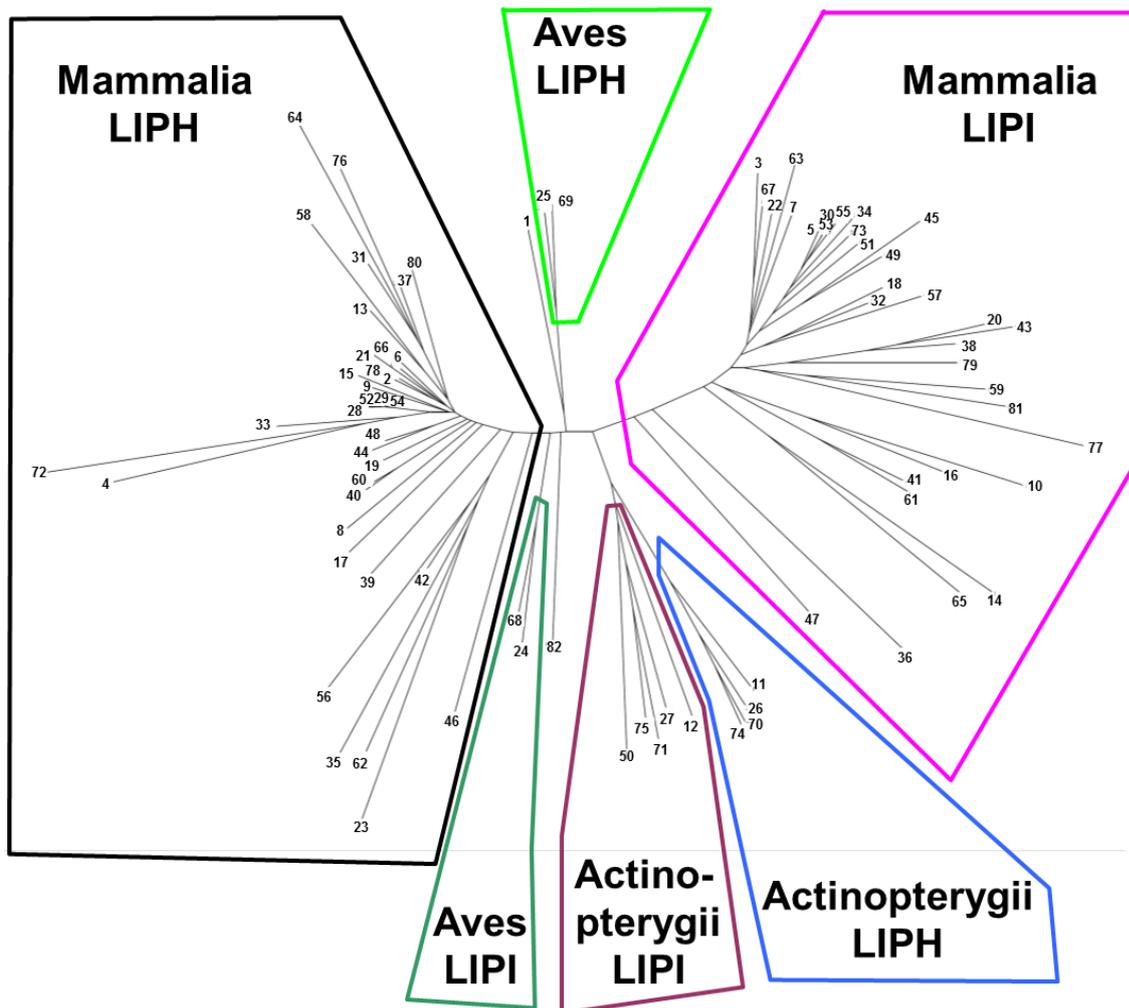


Abbildung 4-11A: Phylogenetische Stammbaum-Analyse von LIPI und LIPH verschiedener Vertebraten. Die Aminosäuresequenzen von LIPI und LIPH nachfolgend aufgeführter Spezies wurden mittels CLUSTALW (Thompson et al. 1994) verglichen: 1: *Anolis carolinensis* LIPI; 2: *Bos taurus* LIPH; 3: *Bos taurus* LIPI; 4: *Callithrix jacchus* LIPH; 5: *Callithrix jacchus* LIPI; 6: *Canis familiaris* LIPH; 7: *Canis familiaris* LIPI; 8: *Cavia porcellus* LIPH; 9: *Choloepus hoffmanni* LIPH; 10: *Choloepus hoffmanni* LIPI; 11: *Danio rerio* LIPH; 12: *Danio rerio* LIPI; 13: *Dasybus novemcinctus* LIPH; 14: *Dasybus novemcinctus* LIPI; 15: *Dipodomys ordii* LIPH; 16: *Dipodomys ordii* LIPI; 17: *Echinops telfairi* LIPH; 18: *Echinops telfairi* LIPI; 19: *Erinaceus europaeus* LIPH; 20: *Erinaceus europaeus* LIPI; 21: *Equus caballus* LIPH; 22: *Equus caballus* LIPI; 23: *Felis catus* LIPH; 24: *Gallus gallus* LIPH; 25: *Gallus gallus* LIPI; 26: *Gasterosteus aculeatus* LIPH; 27: *Gasterosteus aculeatus* LIPI; 28: *Gorilla gorilla* LIPH; 29: *Homo sapiens* LIPH; 30: *Homo sapiens* LIPI; 31: *Loxodonta africana* LIPH; 32: *Loxodonta africana* LIPI; 33: *Macaca mulatta* LIPH; 34: *Macaca mulatta* LIPI; 35: *Macropus eugenii* LIPH; 36: *Macropus eugenii* LIPI; 37: *Microcebus murinus* LIPH; 38: *Microcebus murinus* LIPI; 39: *Monodelphis domestica* LIPH; 40: *Mus musculus* LIPH; 41: *Mus musculus* LIPI; 42: *Myotis lucifugus* LIPH; 43: *Myotis lucifugus* LIPI; 44: *Ochotona princeps* LIPH; 45: *Ochotona princeps* LIPI; 46: *Ornithorhynchus anatinus* LIPH; 47: *Ornithorhynchus anatinus* LIPI; 48: *Oryctolagus caniculus* LIPH; 49: *Oryctolagus caniculus* LIPI; 50: *Oryzias latipes* LIPI; 51: *Otolemur garnetti* LIPI; 52: *Pan troglodytes* LIPH; 53: *Pan troglodytes* LIPI; 54: *Pongo pygmaeus* LIPH; 55: *Pongo pygmaeus* LIPI; 56: *Procavia capensis* LIPH; 57: *Procavia capensis* LIPI; 58: *Pteropus vampyrus* LIPH; 59: *Pteropus*

vampyrus LIPI; 60: *Rattus norvegicus* LIPH; 61: *Rattus norvegicus* LIPI; 62: *Sorex araneus* LIPH; 63: *Sorex araneus* LIPI; 64: ***Sperm tridecemlin*** LIPH; 65: ***Sperm tridecemlin*** LIPI; 66: *Sus scrofa* LIPH; 67: *Sus scrofa* LIPI; 68: *Taeniopygia guttata* LIPH; 69: *Taeniopygia guttata* LIPI; 70: *Takifugu rubripes* LIPH; 71: *Takifugu rubripes* LIPI; 72: *Tarsius syrichta* LIPH; 73: *Tarsius syrichta* LIPI; 74: *Tetraodon nigroviridis* LIPH; 75: *Tetraodon nigroviridis* LIPI; 76: *Tupaia belangeri* LIPH; 77: *Tupaia belangeri* LIPI; 78: *Tursiops truncatus* LIPH; 79: *Tursiops truncatus* LIPI; 80: *Lama pacos* LIPH; 81: *Lama pacos* LIPI; 82: *Xenopus tropicalis* LIPI.

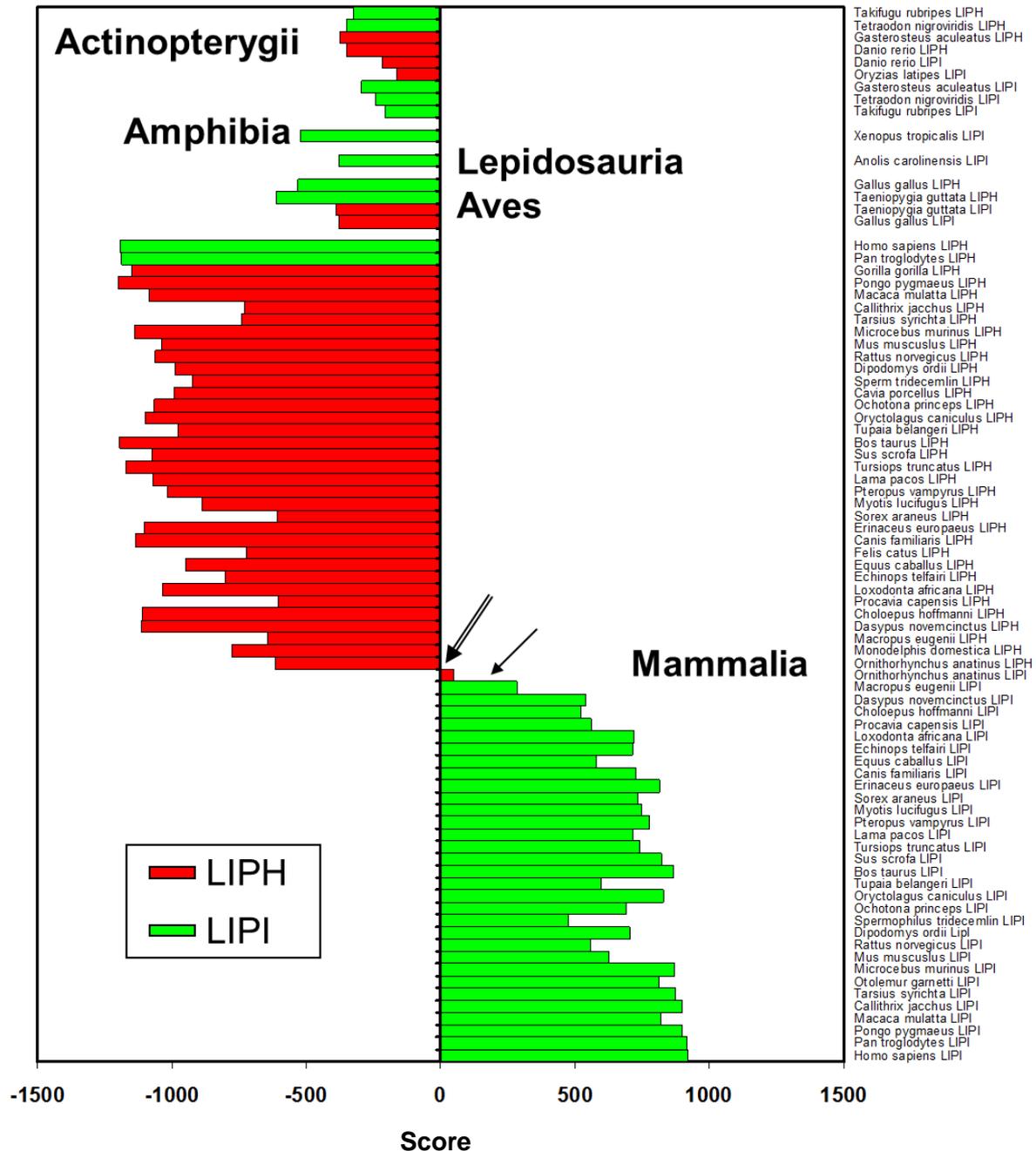


Abbildung 4-11 B: LIPI-Homologie Scores von Lipase I und Lipase H verschiedener Spezies. Die Homologie Scores wurden mit CLUSTALW berechnet. Alle untersuchten Lipasen von Nicht-Säugetieren hatten eine höhere Homologie zum humanen LIPH-Gen als zum humanen LIPI-Gen. Einen deutlich geringen Homologie Score wiesen die Sequenzen des Lipi-Gens von *Ornithorynchus anatinus* und *Macropus eugenii* zum humanen Gen LIPI auf. Die Positionen der Lipase I des *Ornithorynchus anatinus* und *Macropus eugenii* sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

4.1.5.5 LIPI - ein CTA in Mammalia

Die Ergebnisse der phylogenetischen Recherche deuteten darauf hin, dass LIPI-ähnliche Lipasen nur in Säugern vorkommen. Alle LIPI-ähnlichen Lipasen von Nicht-Säugern zeigten eine höhere Homologie zur LIPH der Mammalia. Dies führte zu der Überlegung, ob die Testis-spezifische Expression folglich auch auf die Säugetiere beschränkt ist. Eine Expressionsanalyse von LIPI und LIPH von *H. sapiens*, *M. musculus* und *G. gallus* in verschiedenen Geweben mittels konventioneller RT-PCR zeigte, dass die LIPI-Expression bei Mensch und Maus beinahe ausschließlich auf den Hoden begrenzt ist. Eine schwache Expression war auch im Rückenmark und in der Leber zu finden. Im Gegensatz dazu, wies LIPI des Haushuhnes eine breite Expression, ähnlich der LIPH aller untersuchten Spezies, auf. Zudem war das Auftreten von Spleißvarianten der humanen LIPI und LIPH sowie der murinen LIPH zu beobachten (Abbildung 4-12).

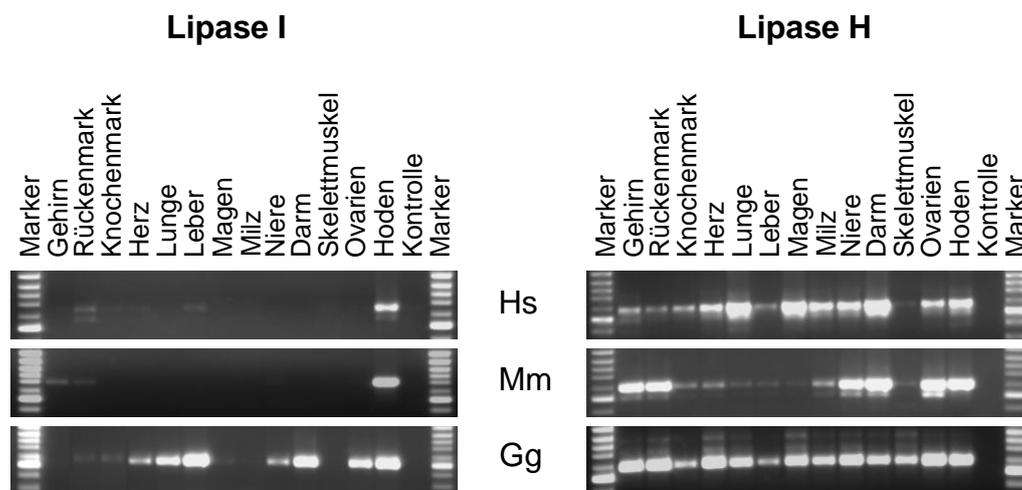


Abbildung 4-12: Expressionsprofil von LIPI und LIPH in verschiedenen Geweben von *H. sapiens*, *M. musculus* und *G. gallus*. Darstellung der LIPI- und LIPH-Expression in verschiedenen Geweben der Vertebraten *H. sapiens*, *M. musculus* und *G. gallus*. Die Expression wurde mittels RT-PCR untersucht.

4.2 RBM11 – seine Bedeutung für das Ewing-Sarkom

4.2.1 Korrelation der LIPI- und RBM11-Expression

Das Gen für die humane LIPI liegt in direkter transkriptioneller Kopf-an-Kopf-Orientierung auf dem Chromosom 21 zu einem ebenfalls laut EST-Datenbankrecherchen in EFT hoch exprimierten Gen, RBM11 (Abbildung 4-13).

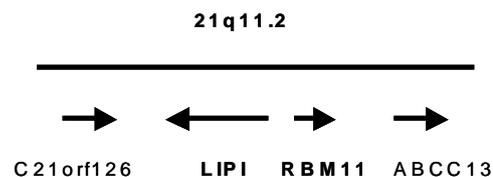


Abbildung 4-13: Genomischer Kontext von LIPI und RBM11 des Menschen. LIPI und RBM11 liegen auf Chromosom 21 in transkriptioneller Kopf-an-Kopf-Orientierung unmittelbar nebeneinander.

Die Auswertung verschiedener Mikroarray-Datensätze ergab eine hohe Korrelation der Expression von RBM11 und LIPI in humanen Geweben und Zelllinien (Abbildung 4-14). Die gemeinsame Expression von LIPI und RBM11 könnte ein Hinweis auf eine gemeinsame Expressionskontrolle sein.

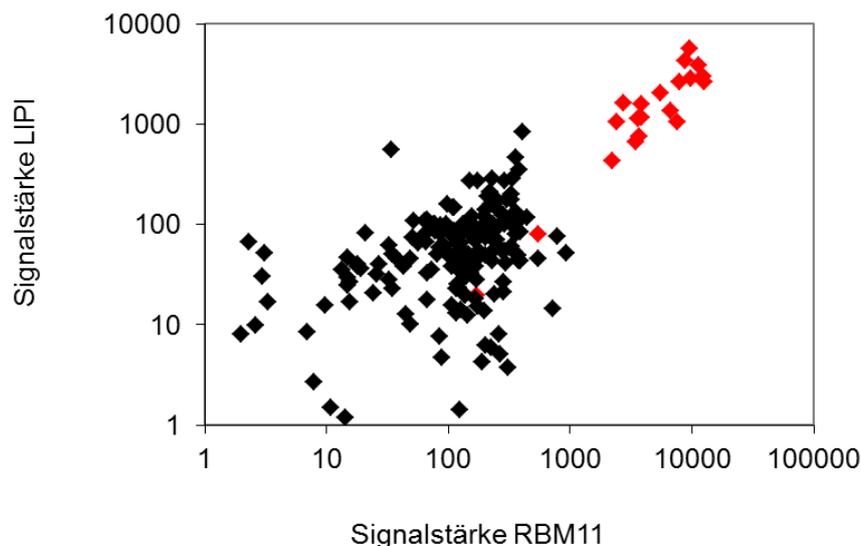


Abbildung 4-14: Korrelation der Signalstärken von LIPI und RBM11. Dargestellt ist die Korrelation der Signalstärken von LIPI und RBM11 nach Auswertung der Mikroarray-Datensätze GSE3526, 8596, 2109, 7234, 9921, 9677, 6257, 3744 der GEO-Datenbank. EFTs sind rot markiert.

4.2.2 Expressionsprofil in humanen Tumor-Zelllinien

RBM11 wird wie LIPI in EFT-Zelllinien in hohem Maße exprimiert (Abbildung 4-15).

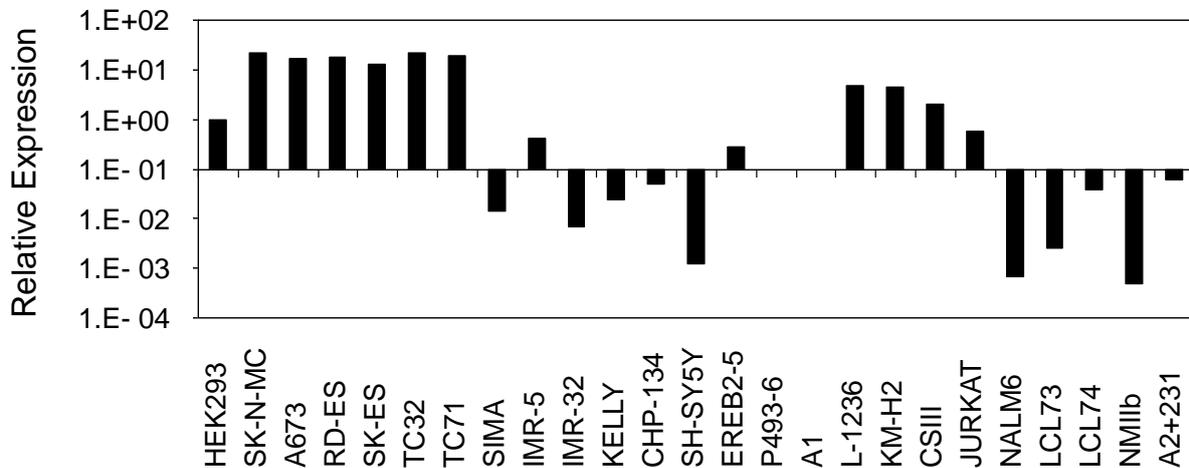


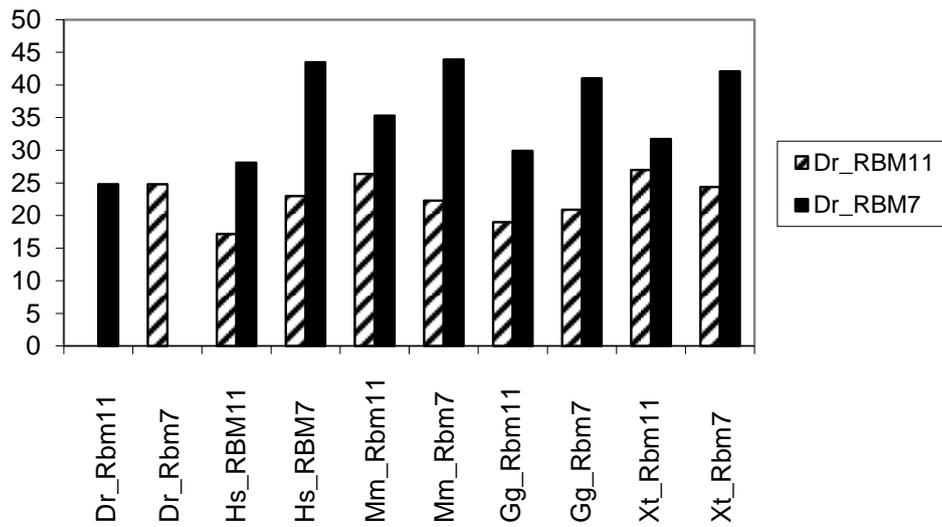
Abbildung 4-15: Expressionsprofil von RBM11 in humanen Zelllinien. Die Analyse wurde mittels qRT-PCR durchgeführt und mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode ausgewertet. Die Expression in HEK293-Zellen wurde auf 1 gesetzt.

Im Gegensatz zur LIPI fand sich eine moderate RBM11-Expression auch vereinzelt in Zelllinien von Neuroblastomen (NB) und Hodgkin-Lymphomen (HD) sowie in lymphoblastoiden Zelllinien (LCL).

4.2.3 Phylogenetische Analyse von RBM7 und RBM11

Die Untersuchung des genomischen Kontextes und phylogenetische Analyse von RBM7 und RBM11 ergaben, dass eine Lipase aus *D. rerio*, die sowohl homolog zur LIPI als auch LIPH des Menschen ist, in unmittelbarer Nachbarschaft eines RBM-Gens lokalisiert ist (Abbildung 9-1). Die Homologie-Vergleiche der Sequenzen des humanen RBM11 und RBM7 im Vergleich zu nicht-humanen Vertebraten sind in Abbildung 4-16 zusammengefasst.

A



B

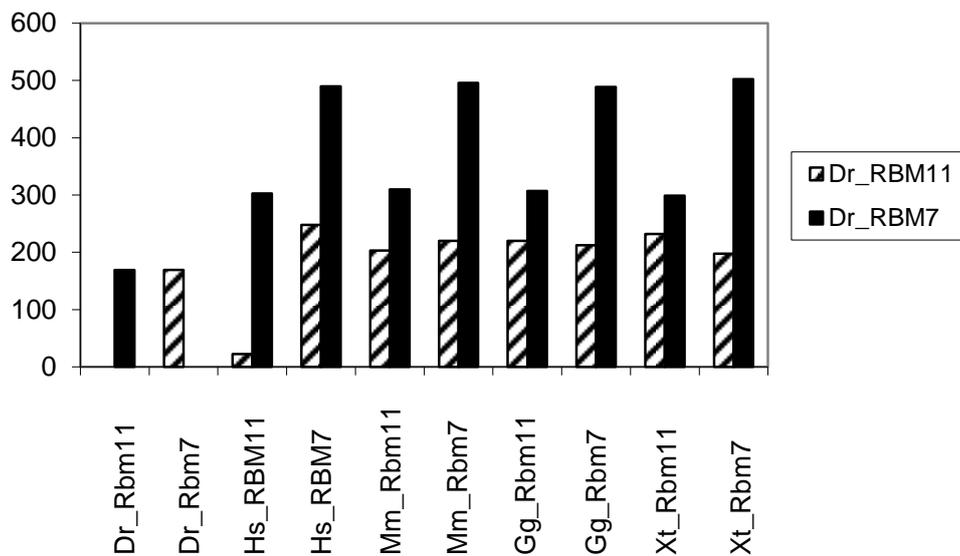


Abbildung 4-16: Homologie-Vergleich von RBM7 und RBM11 verschiedener Vertebraten. Darstellung eines multiplen Homologie-Vergleiches der Aminosäuresequenzen des humanen RBM11 und RBM7 im Vergleich zu nicht-humanen Vertebraten in Prozent (%) (A) und als Homologie-Score (B). Die Analysen wurden basierend auf den Needleman-Wunsch Algorithmen berechnet (Needleman und Wunsch, 1970). Es sind die Sequenz-Homologien von *H. sapiens* (Hs), *M. musculus* (Mm), *G. gallus* (Gg), *D. rerio* (Dr) und *X. tropicalis* (Xt) dargestellt.

Diese Lipase hat eine geringfügig höhere Homologie zur LIPI. Interessanterweise besitzt dieses RBM-Gen sowohl zum RBM7 als auch zum RBM11 des Menschen eine hohe Homologie.

Sequenz-Analysen ergaben, dass es sich bei dem auf Chromosom 21 mit der Gen-ID 565904 lokalisierten Rbm-Gen von *D. rerio* um das Rbm11-Gen handeln muss,

weitgehend dem des Menschen. Jedoch konnte bei der Maus im Knochenmark, der Lunge, dem Magen sowie der Milz keine RBM11-Expression nachgewiesen werden. Demgegenüber lag beim Haushuhn eine relativ starke RBM11-Expression in allen untersuchten Geweben, mit Ausnahme des Knochenmarks, vor.

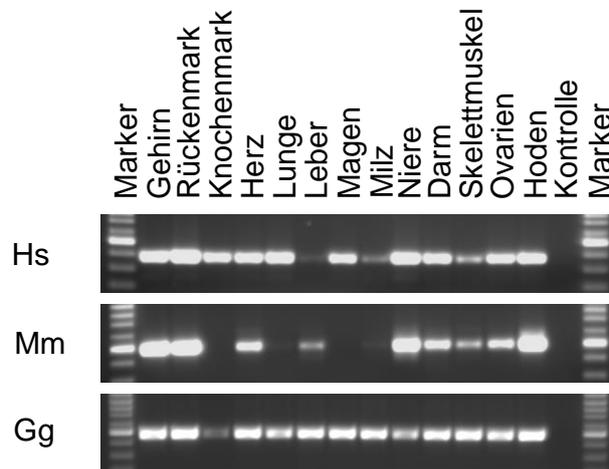


Abbildung 4-18: Expression von RBM11 in Normalgeweben. Darstellung der RBM11-Expression in verschiedenen Geweben der Vertebraten *H. sapiens*, *M. musculus* und *G. gallus*. Die RBM11-Expression wurde mittels RT-PCR untersucht.

4.2.5 RNA-Interferenz mittels siRNA

Zur näheren Charakterisierung der Bedeutung des RBM11 für das Ewing-Sarkom wurde ein RNA-Interferenz-Experiment mittels siRNA zur Verringerung der Expression von RBM11 in der EFT-Zelllinie SK-N-MC durchgeführt. Nach Behandlung der SK-N-MC-Zellen (1×10^6) mit Medium, non-siRNA (2 μ g) und RBM11-spezifischer siRNA (2 μ g) mittels Transfektion und anschließender Kultivierung für 24 h (37°C, 5 % CO₂) wurde die Gesamt-RNA aus dem Trizol-Reagenz gewonnen. Sowohl in der semiquantitativen RT-PCR als auch in der *real-time* PCR konnte eine Verringerung des Transkriptionsproduktes des RBM11-Gens nachgewiesen werden (Abbildung 4-19). Die quantitative PCR ergab eine Verringerung der RBM11-Expression auf eine relative Expression von 0,1 im Vergleich zur non-siRNA-Kontrolle mit einer relativen Expression von 1. Medium entsprach mit einer relativen Expression von 1,01 der non-siRNA. Dieses RNA-Interferenz-Experiment wurde durch 3 weitere bestätigt, bei denen jeweils eine Herunterregulation auf das zumindest 0,2fache der relativen Expression im Vergleich

zur Kontrolle beobachtet werden konnte. Daraufhin wurde eine Mikroarray-Analyse durchgeführt.

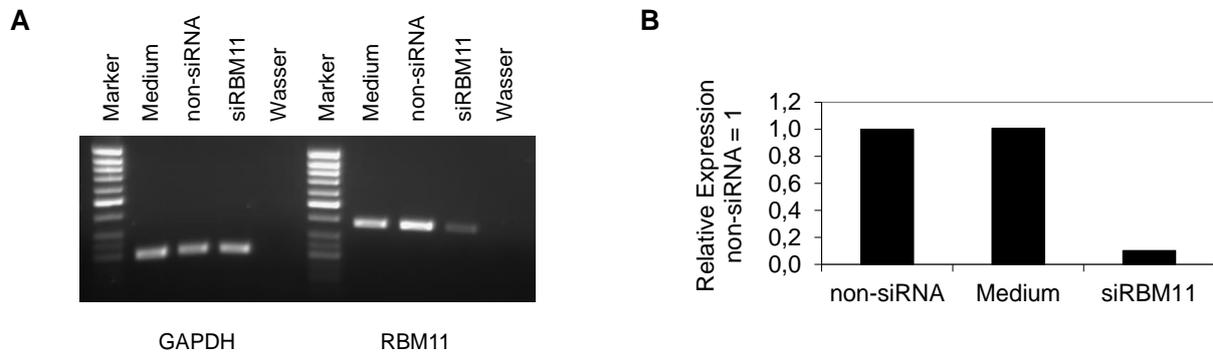


Abbildung 4-19: Herunterregulation des RBM11-Gens mittels RBM11-spezifischer siRNA in SK-N-MC-Zellen. A: semiquantitative RT-PCR. B: quantitative RT-PCR. Die relative Expression der non-siRNA wurde 1 gesetzt. Die relative Expression von RBM11 wurde durch Kombination zweier siRNAs auf das 0,1fache reduziert.

4.2.6 DNA-Mikroarray-Analyse zur Bestimmung des Expressionsprofils der Ewing-Sarkom-Zelllinie SK-N-MC nach RNA-Interferenz

Im Anschluss an das RNA-Interferenz-Experiment in der Zelllinie SK-N-MC mittels RBM11-spezifischer siRNA wurde im DNA-Mikroarray das Expressionsprofil untersucht. Dafür wurden auf den Affymetrix Genchip HG-U133 Plus 2.0 die Biotin-markierten cRNA-Proben aus SK-N-MC, bestehend aus Medium, non-siRNA und RBM11-siRNA (siRBM11-4), aufgetragen und hybridisiert. Die gewonnenen Expressionsdaten wurden mit dem Computerprogramm Microarray Analysis Suite (MAS, Version 5.0) ausgewertet und in Excel überführt. Zur Berechnung der differentiellen Genexpression wurde der Faktor eines über- oder unterexprimierten Gens (Fold Change) zwischen den RBM11-siRNA- und Medium-behandelten Zellen bzw. den RBM11-siRNA- und non-siRNA-behandelten Zellen herangezogen.

Zu den am stärksten regulierten Genen nach RNA-Interferenz mittels RBM11-spezifischer siRNA zählte das Chemokin CXCL14. Dieses Gen wurde in EFT-Zellen mit unterdrückter RBM11-Expression gegenüber Medium- oder non-siRNA-behandelten Zellen um den Faktor 14 überexprimiert (Abbildung 4-20).

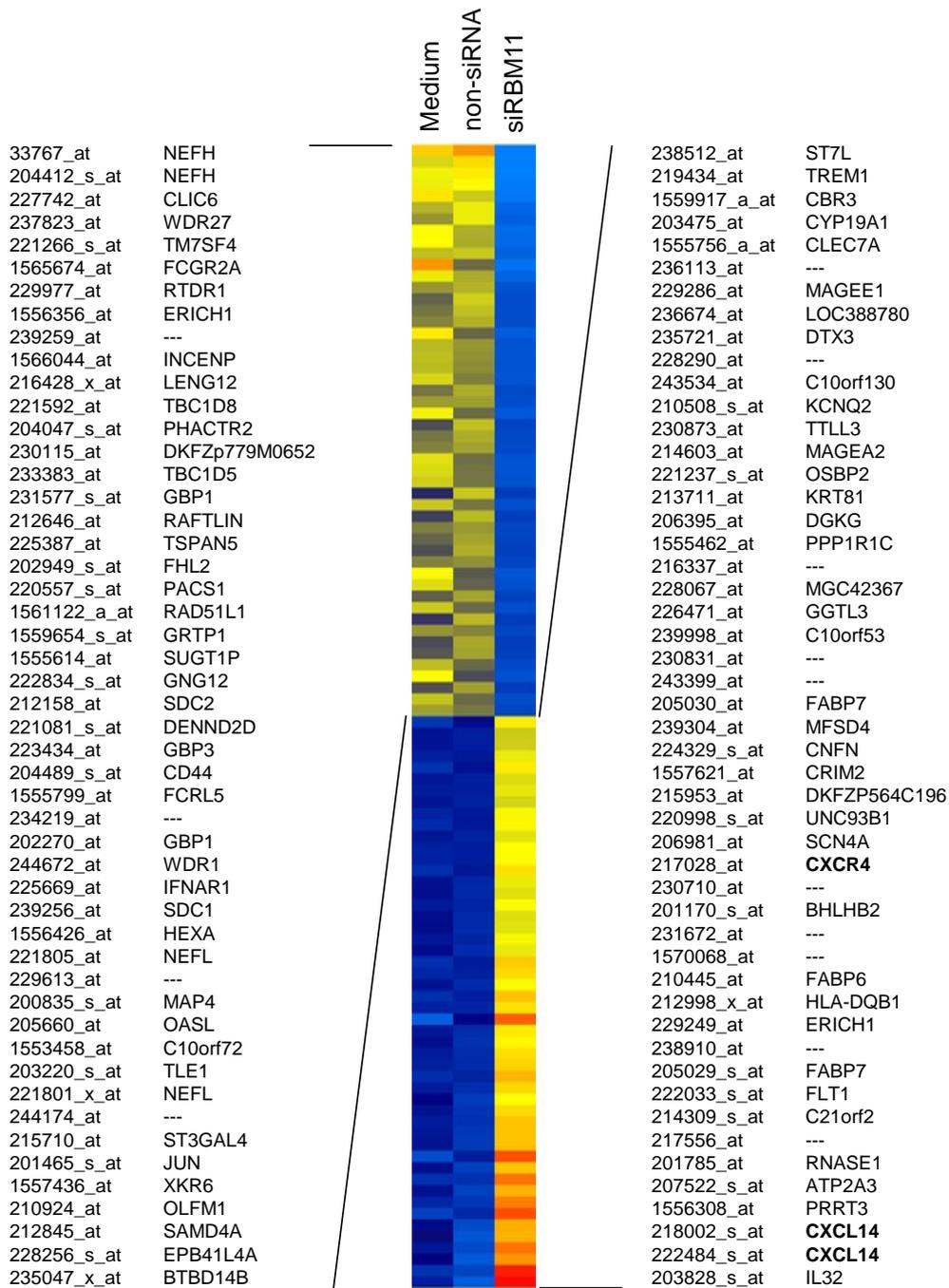


Abbildung 4-20: DNA-Mikroarray-Analyse nach Hemmung der RBM11-Expression mittels siRNA. Dargestellt sind die 100 am stärksten differenziell regulierten Gene der Gruppe siRBM11 versus Kontroll-siRNA (non-siRNA). Zusätzlich mussten die Werte der jeweils höher exprimierenden Gruppe größer als 100 und der *Fold Change* mindestens 3 sein (siRBM11 versus Medium; siRBM11 versus Kontroll-siRNA). Die Werte wurden log₂-transformiert und mean-zentriert sowie nach dem höchsten *Fold Change* sortiert (siRBM11 versus Kontroll-siRNA). Gene, die eine hohe Expressionsstärke aufweisen, werden in der Abbildung gelblich-orange-rot dargestellt, während Gene mit niedriger Expression bläulich markiert sind. Die Analyse wurde mittels des Bioinformatikprogrammes Genesis (Sturn et al. 2002) erstellt. Gene von besonderem Interesse sind fett formatiert.

Weitere interessante Gene sind der Chemokin-Rezeptor CXCR4 unter den hochregulierten bzw. die Neurofilamente NEFL und –H, Olfactomedin 1 (OLFM1), der EWS-Fusionspartner NR4A3 (nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3) (Abbildung 5-2) sowie die Lysyl-Oxidase (LOX) unter den herunterregulierten Genen. Eine Zusammenstellung der differenziell exprimierten Gene aus der Microarray-Analyse findet sich im Anhang in Tabelle 9-1.

4.2.7 Validation der DNA-Mikroarray-Analyse

Die Validation der Mikroarraydaten mittels qRT-PCR bestätigte die Erniedrigung von charakteristischen Genen wie LOX, NR4A3, MST4 oder NEFH nach Behandlung der Ewing-Sarkom-Zelllinie SK-N-MC mit siRBM11 sowie eine Hochregulation von CXCL14. Die relative Expression der non-siRNA-behandelten Probe wurde dabei als 1 gesetzt. Die Expression von PPARBP war mit einem *Fold Change* von 0,01 nach siRBM11-Interferenz besonders stark erniedrigt. Jedoch auch bei Genen wie NR4A3, MST4 und LOX war eine deutlich verminderte Expression mit einem *Fold Change* von 0,19, 0,21 und 0,28 zu beobachten. Auf die Transkription der Gene PAX7, NEFH, NUMBL, NEFL sowie FHL2 mit einer relativen Expression von 0,41, 0,48, 0,51, 0,55 und 0,59 hatte die RNA-Interferenz von RBM11 nur eine geringfügige Auswirkung (Abbildung 4-21).

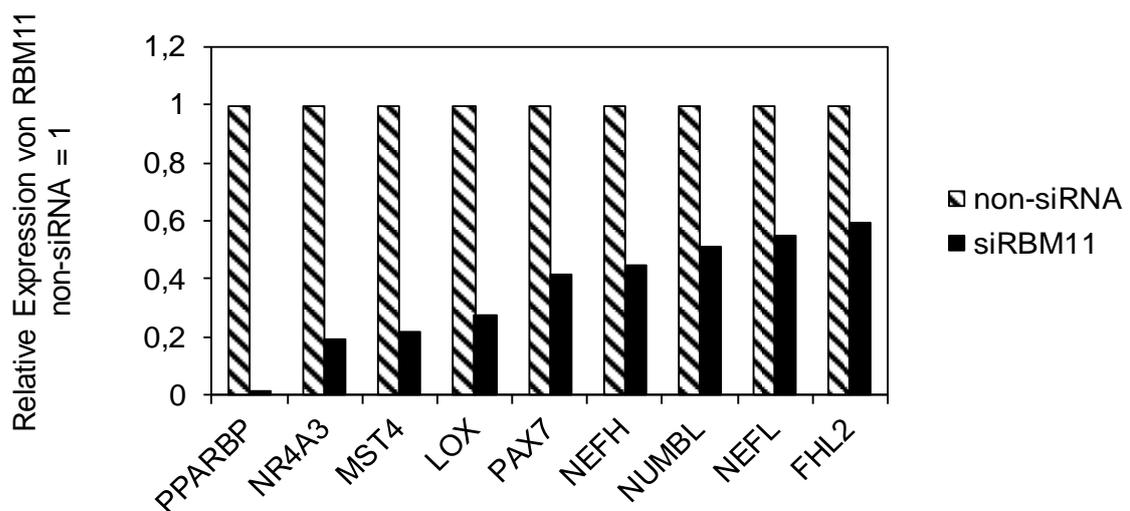


Abbildung 4-21: Validierung herunterregulierter Gene nach Mikroarray-Analyse mittels qRT-PCR. Die qRT-PCR wurde mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode ausgewertet. Die relative Expression nach Behandlung von SK-N-MC mit non-siRNA wurde 1 gesetzt. Die Abbildung zeigt eine verminderte Genexpression nach Behandlung mit RBM11-spezifischer siRNA.

Die Validierung der Mikroarray-Daten mittels quantitativer und konventioneller RT-PCR bestätigte die drastische Überexpression des Chemokins CXCL14 mit einem *Fold Change* von 24,08 nach RBM11-Inaktivierung. Gene wie TRAF1, PLA2G5, LRDD mit einem *Fold Change* von 3,61, 3,25, 2,95, CXCR4 und sein Ligand SDF-1 mit 2,39 und 2,69, das Ewing-Sarkom-assoziierte Gen (Staege et al. 2004) LECT1 mit 2,69 sowie MAGEA3 und LOH11CR2A mit 2,6 und 2,51 wiesen eine leichte Expressionserhöhung auf (Abbildung 4-22).

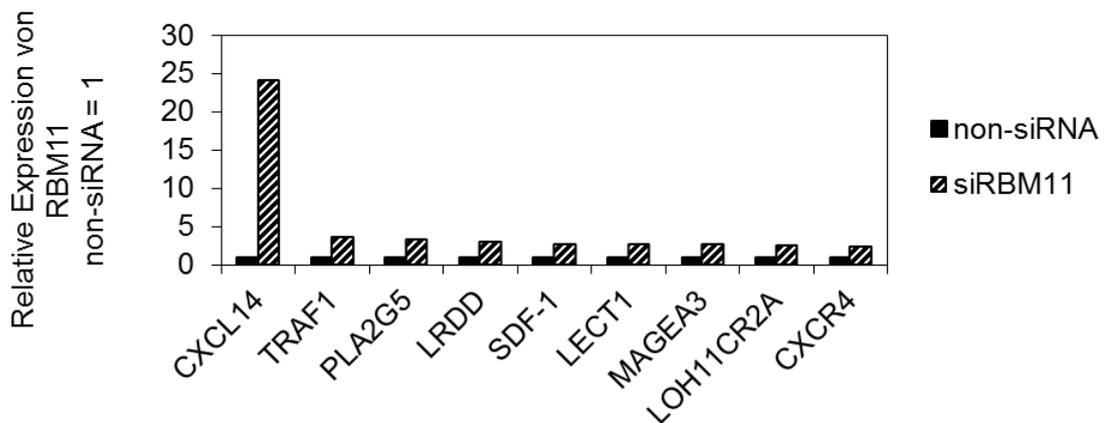


Abbildung 4-22: Auswahl an Genen mit erhöhter Expression nach Herunterregulation von RBM11. Die Validierung hochregulierter Gene nach Mikroarray-Analyse erfolgte mittels qRT-PCR. Die qRT-PCR wurde mit der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode ausgewertet. Die relative Expression nach Behandlung von SK-N-MC mit non-siRNA wurde 1 gesetzt.

Die Ewing-Sarkom assoziierten Gene LIPI und EWS-FLI1 sowie das Protoonkogen MYC wurden in ihrer Expression jedoch nicht beeinflusst (Abbildung 4-23).

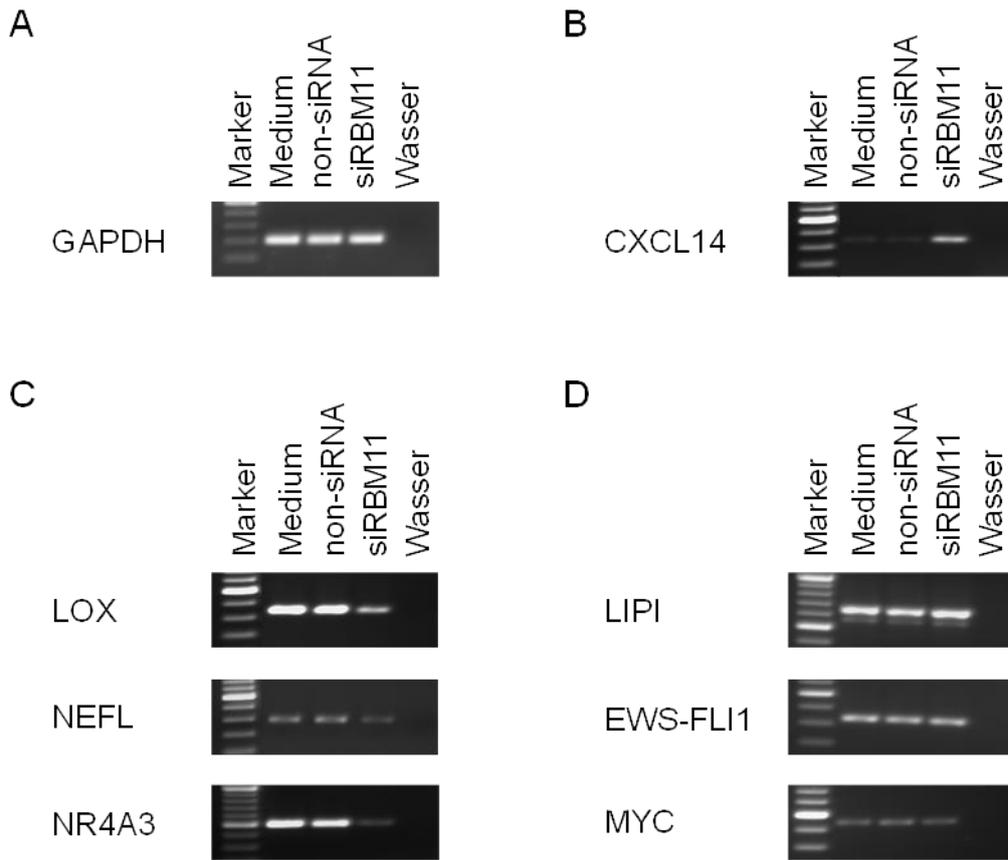


Abbildung 4-23: Validierung der Mikroarray-Analyse mittels RT-PCR. **A:** Amplifizierung des Haushaltsgens GAPDH für Medium, non-siRNA und siRBM11. **B:** Darstellung der Expression des hochregulierten Chemokins CXCL14 nach RBM11-*knockdown*. **C:** Auswahl herunterregulierter Gene wie Neurofilament NEFL, des EWS-Fusionspartner NR4A3 sowie der Lysyl-Oxidase LOX nach siRBM11-Behandlung. **D:** Gene wie LIPI, EWS-FLI1 und MYC wurden in ihrer Expression durch RBM11-spezifische RNA-Interferenz nicht beeinflusst.

4.3 Einfluss von CXCL14 auf Ewing-Sarkom-Zellen

4.3.1 Korrelation von CXCL14 und RBM11

Nach Unterdrückung der RBM11-Expression mittels siRNA konnte eine verstärkte Expression des Chemokins CXCL14 festgestellt werden. Auch in Mikroarray-Daten korrelierten die Signalstärken von CXCL14 und RBM11 invers für die Familie der Ewing-Sarkome (Abbildung 4-24).

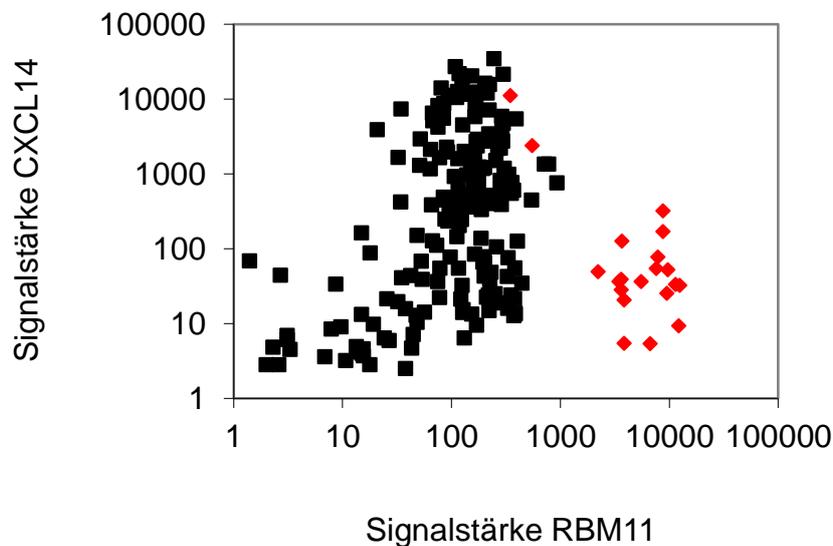


Abbildung 4-24: Korrelation der Expressions-Signalstärken von CXCL14 und RBM11 in EFT und humanen Geweben und Zelllinien. DNA-Mikroarray-Analyse der Expression von CXCL14 und RBM11 in Ewing-Sarkomen (rot) und humanen Geweben (schwarz). Der Auswertung liegen die Mikroarray-Datensätze GSE3526, 8596, 2109, 7234, 9921, 9677, 6257, 3744 der GEO-Datenbank zugrunde.

4.3.2 Expressionsprofil von CXCL14 in humanen Normalgeweben

Ursprünglich wurde CXCL14 aus Brust- und Nierenzellen isoliert und erhielt den Namen BRAK (*breast and kidney*). CXCL14 wurde in allen untersuchten Normalgeweben exprimiert, besonders stark in der Niere, Milz und Magen (Abbildung 4-25).

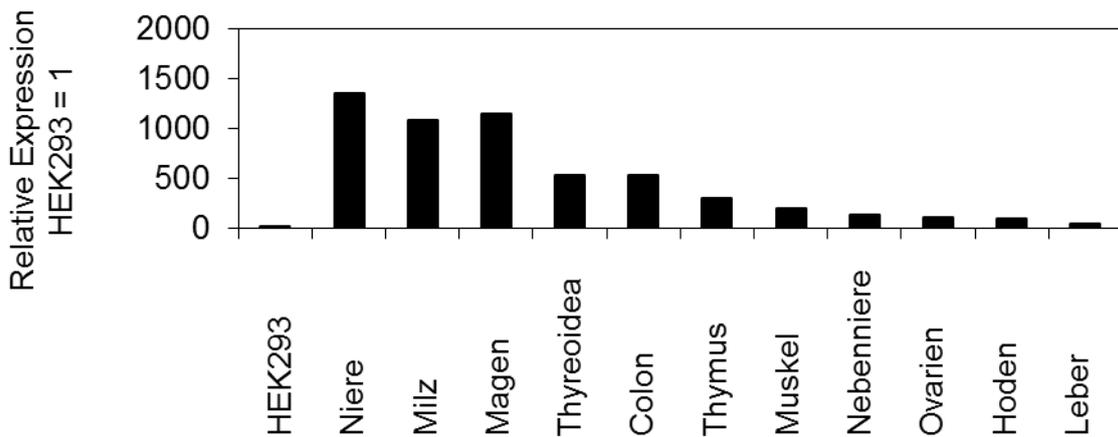


Abbildung 4-25: Expressionsprofil von CXCL14 in humanen Geweben. Die Analyse wurde mittels qRT-PCR durchgeführt und mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode ausgewertet. Die Expression in HEK293-Zellen wurde 1 gesetzt. CXCL14 wird in hohem Maße in der Niere, dem Magen und der Milz exprimiert. Eine geringere Expression war auch in der Schilddrüse und Colon zu verzeichnen.

4.3.3 Expressionsprofil von CXCL14 in humanen Tumor-Zelllinien

Eine CXCL14-Expression war in 4 von 18 untersuchten humanen Tumor-Zelllinien mittels quantitativer RT-PCR detektierbar.

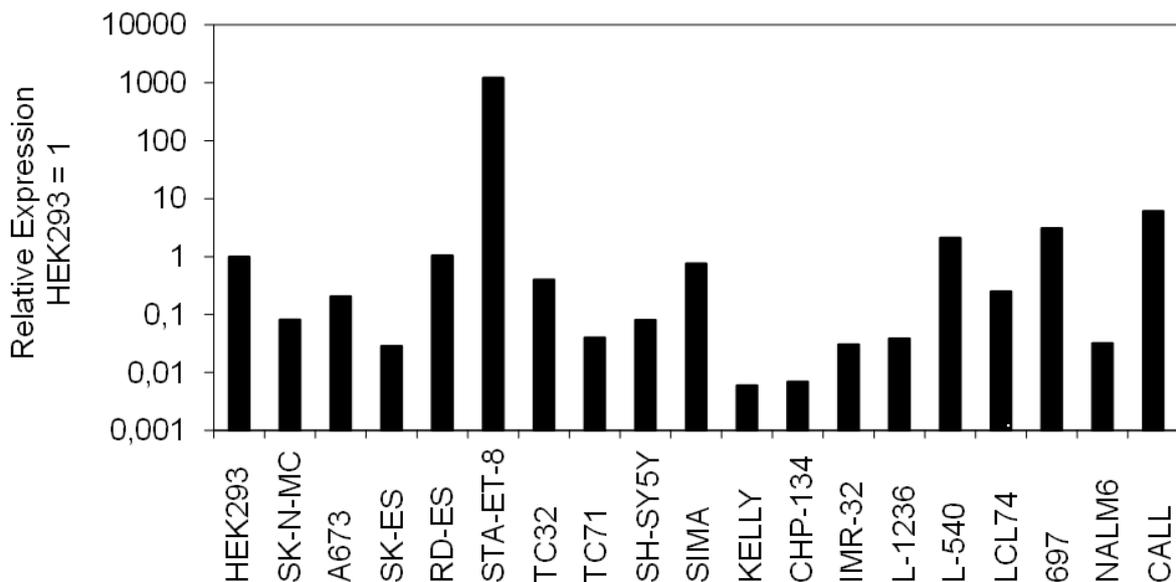


Abbildung 4-26: Expressionsprofil von CXCL14 in humanen Zelllinien. Die Analyse wurde mittels qRT-PCR durchgeführt und mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode ausgewertet. Die Expression in HEK293-Zellen wurde 1 gesetzt.

Eine basale Expression von CXCL14 ist in Zelllinien der Familie der Ewing-Sarkome nur in STA-ET-8 vorzufinden (Abbildung 4-26). In den untersuchten Neuroblastom-Zelllinien wurde keine CXCL14-Expression nachgewiesen. In der Hodgkin-Lymphom-Zelllinie L-540 sowie den Leukämie-Zelllinien 697 und CALL wurde CXCL14 schwach exprimiert.

4.3.4 Expressionsprofil von CXCL14 in humanen Primärtumoren

Im Gegensatz zu den untersuchten humanen Tumor-Zelllinien wurde CXCL14 in 11 von 12 humanen Primärtumoren transkribiert. CXCL14 wird in 6/6 Ewing-Sarkomen (EFT), 4/4 Neuroblastomen (NB) sowie 1/2 Akuten Lymphatischen Leukämien (ALL) in moderatem bis hohem Maße exprimiert (Abbildung 4-27).

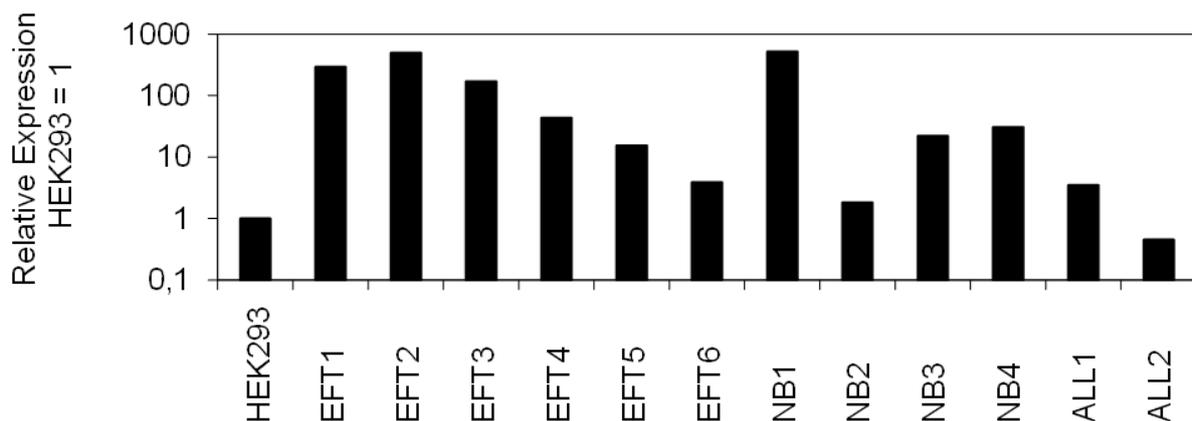
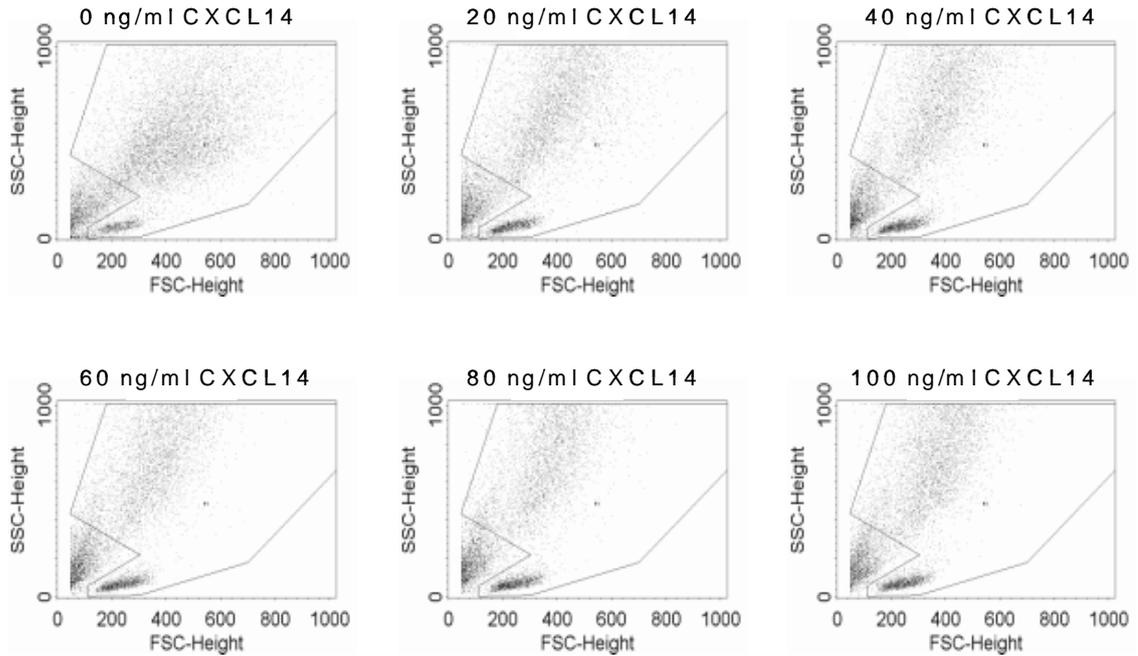


Abbildung 4-27: Expressionsprofil von CXCL14 in humanen Primärtumoren. Analyse wurde mittels qRT-PCR durchgeführt und mit der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode ausgewertet. Relative Expression von HEK293 wurde „1“ gesetzt. EFT: Ewing-Sarkom; NB: Neuroblastom; ALL: Akute Lymphatische Leukämie.

4.3.5 Tumorzell-Viabilität nach *in vitro* CXCL14-Behandlung

In einem Co-Kultur-Experiment wurden SK-N-MC-Zellen mit mononukleären Blutzellen (PBMC) in einem Verhältnis von 1:4 und mit ansteigenden Konzentrationen des Chemokins CXCL14 für 3 Tage in einer 6-Lochplatte kultiviert. Im Anschluss fand eine Durchflusszytometeranalyse unter Verwendung der humanen Antikörper CD117 zur Detektion der Tumorzellen und CD45 zur Detektion von PBMC statt.

A



B

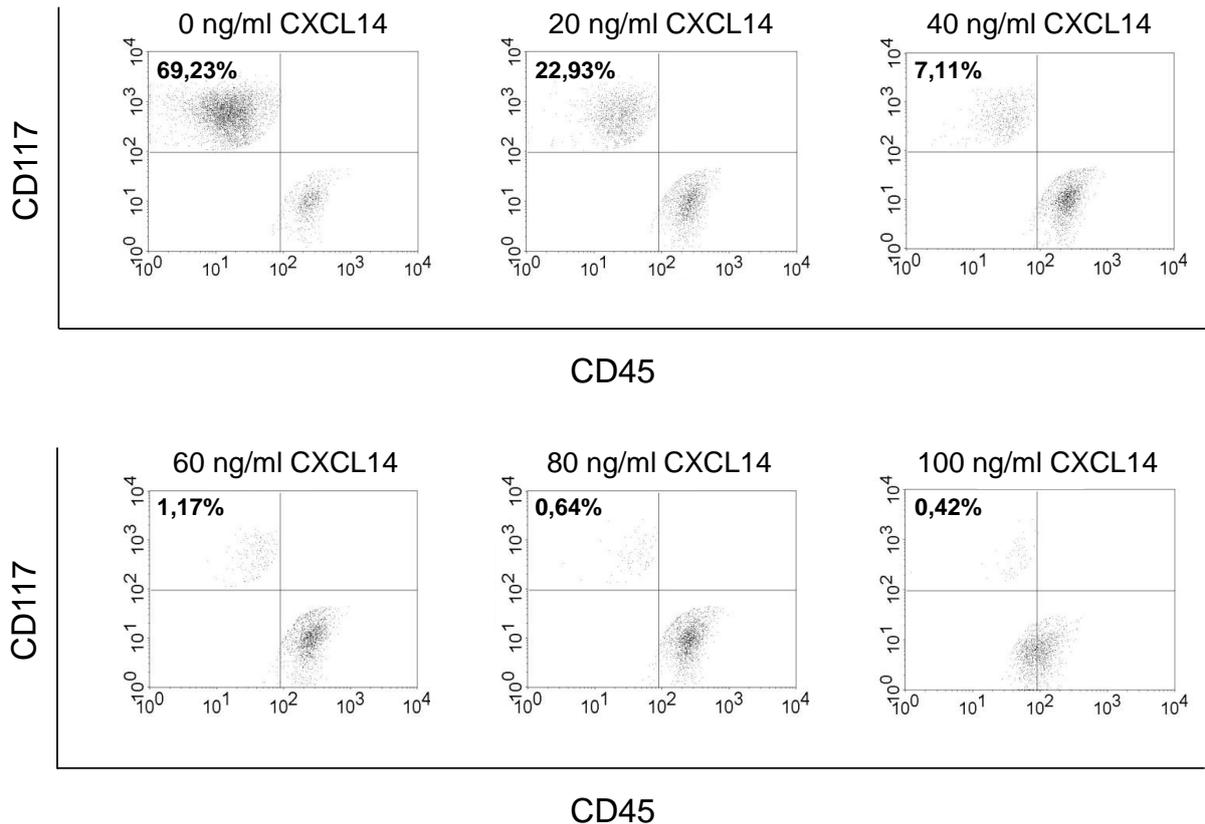


Abbildung 4-28: Sinkende Tumorzell-Viabilität von SK-N-MC-Zellen bei ansteigender Konzentration von CXCL14 *in vitro*. SK-N-MC-Zellen ($2,5 \times 10^5$) wurden mit PBMC (1×10^6) und ansteigender Konzentration des Chemokins CXCL14 von 0, 20, 40, 60, 80 auf 100 ng/ml für 3 Tage in einer 6-Lochplatte in RPMI kultiviert. Im Anschluss erfolgte eine Analyse der Tumorzell-Viabilität mittels Durchflusszytometrie. A: Darstellung der Tumorzellen im Vorwärts- (FSC), Seitwärtsstreulicht (SSC). B: Die Detektion der Tumorzellen erfolgte mittels des Antigens CD117 und die Detektion der PBMC mittels CD45.

Mit steigender Konzentration des Chemokins CXCL14 bis zu 100 ng/ml konnte eine stetige Abnahme der Tumorzell-Viabilität beobachtet werden. Die Zahl vitaler Tumorzellen betrug ohne Chemokin-Zusatz 69,23 % und sank bei Gabe von 100 ng/ml CXCL14 auf 0,42 % (Abbildung 4-28).

Die biologische Wirkung von CXCL14 wurde im nachfolgenden Experiment für 3 unabhängige Ansätze untersucht. SK-N-MC-Zellen wurden erneut mit PBMC und ansteigender Konzentration des Chemokins CXCL14 von 0, 20, 40, 60, 80 auf 100 ng/ml für 3 Tage in einer 6-Lochplatte in RPMI kultiviert. Mit steigender Konzentration des Chemokins CXCL14 auf bis zu 100 ng/ml konnte eine stetige Abnahme der Tumorzell-Viabilität auf 1,91 % beobachtet werden (Abbildung 4-29).

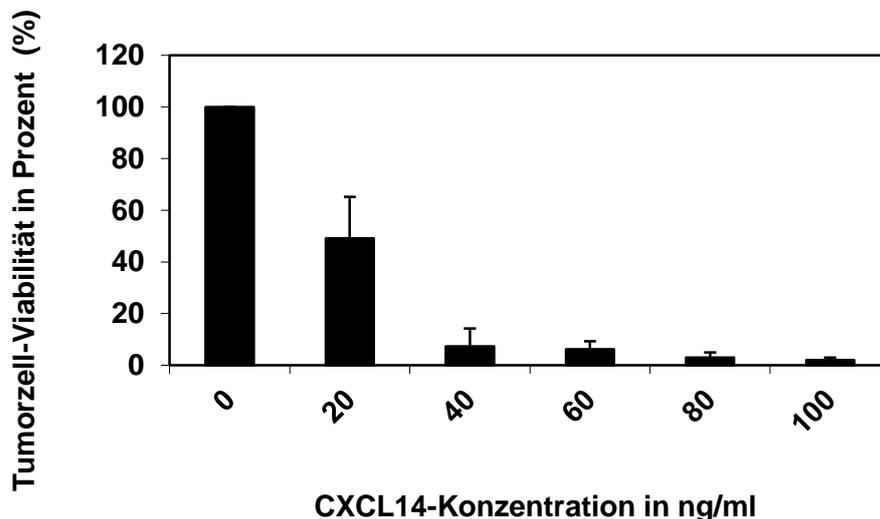


Abbildung 4-29: Darstellung von 3 unabhängigen Experimenten zur Tumorzell-Viabilität einer gemischten Lymphozyten/Tumorzell-Kultur nach *in vitro* CXCL14-Behandlung. In einem Co-Kultur-Experiment wurden SK-N-MC-Zellen ($2,5 \times 10^5$) mit PBMC (1×10^6) und einer ansteigenden Konzentration des Chemokins CXCL14 von 0, 20, 40, 60, 80 auf 100 ng/ml in einer 6-Lochplatte in RPMI für 72 h kultiviert (37 °C, 5 % CO₂). Für 3 unabhängige Experimente wurde die relative Zahl lebender Tumorzellen mittels FACS ermittelt. Eine Tumorzell-Viabilität von 100 % wurde für das Zellgemisch von SK-N-MC und PBMC mit 0 ng/ml CXCL14 zugrunde gelegt. Dargestellt wurden Mittelwerte und Standardabweichungen.

In Co-Kultur-Experimenten mit weiteren Ewing-Sarkom-Zelllinien wie A673, SK-ES, RD-ES, TC32, TC71, STA-ET-8 und TTC466, Neuroblastom-Zelllinien SIMA, SH-SY5Y und IMR-32 sowie Hodgkin-Lymphom-Zelllinien L-1236 und L-540 konnte kein Effekt von CXCL14 auf die Tumor-Viabilität beobachtet werden.

4.3.6 Analyse von PBMC nach *in vitro* CXCL14-Behandlung

In einem weiteren Co-Kultur-Experiment wurden SK-N-MC-Zellen ($2,5 \times 10^5$) mit PBMC (1×10^6) und einer CXCL14-Konzentrationen von 0 und 100 ng/ml für 72 h in einer 6-Lochplatte in RPMI kultiviert. Im Anschluss wurde eine Analyse des Status der B-, T- und NK-Zellen sowie der Monozyten im Durchflusszytometer durchgeführt. Zur Charakterisierung der nachfolgend aufgeführten immunologischen Zellen wurden monoklonale, PE-markierte Antikörper verwendet: anti-CD19 für B-Lymphozyten, anti-CD4 für T-Helferzellen, anti-CD8 für zytotoxische T-Lymphozyten, anti-CD56 für Natürliche Killerzellen sowie anti-CD14 für Monozyten. Die Menge der CXCL14-unbehandelten B-, T- und NK-Zellen sowie der Monozyten wurde 100 % gesetzt. Während die Menge der CXCL14-behandelten Monozyten mit 98 % nahezu konstant blieb, erhöhten sich die T-Helferzellen auf 192 % und die zytotoxischen T-Zellen auf 174 %. Die B-Lymphozyten stiegen auf 161 % an und die Menge der NK-Zellen steigerte sich auf 153 %. Die sich aus 3 Experimenten ergebende Standardabweichung ist mit der natürlichen Varianz des Immunsystems der PBMC-Spender zu erklären (Abbildung 4-30).

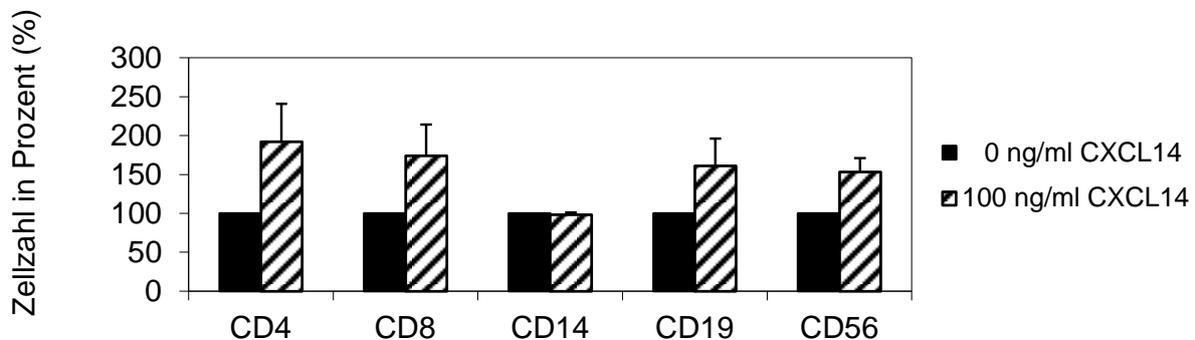


Abbildung 4-30: Durchflusszytometrische Untersuchung von PBMCs nach *in vitro* CXCL14-Behandlung. In einem Co-Kultur-Experiment wurden SK-N-MC-Zellen ($2,5 \times 10^5$) mit PBMC (1×10^6) und einer CXCL14-Konzentrationen von 0 und 100 ng/ml für 72 h in einer 6-Lochplatte in RPMI kultiviert (37°C , 5 % CO_2). In getrennten Ansätzen wurden $1,25 \times 10^5$ Zellen in 100 μl PBS mit 10 μl eines monoklonalen direkt PE-markierten Antikörpers gegen CD4, CD8, CD14, CD19 oder CD56 bzw. der Isotypen-Kontrolle (Maus-IgG1-PE) für 30 min (4°C , dunkel) gefärbt. Im FACScan wurden 1×10^4 Zellen untersucht. Repräsentiert werden 3 unabhängige Experimente, aus denen der Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt wurden.

4.3.7 CBA-Assay

Mittels des *Cytokine Bead Array* (CBA)-Assays konnten die Konzentrationen von Zytokinen in den Zellkulturüberständen der Co-Kulturen von SK-N-MC-Zellen und PBMC mit und ohne CXCL14-Behandlung im Durchflusszytometer quantifiziert werden. Es wurden die humanen TH1 Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-2 sowie die TH2 Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 analysiert. Die Auswertung der Zytokin-Konzentrationen umfasst jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten.

Bei Betrachtung der Einzelkultur von Tumorzellen bzw. PBMC übte CXCL14 keinen Effekt auf die IFN- γ -Produktion aus. In den Überständen der Tumorzellen konnte eine IFN- γ -Konzentration von 40,7 ng/ml \pm 2,33 ng/ml ohne bzw. 41,2 ng/ml \pm 1,81 ng/ml mit Chemokin-Behandlung nachgewiesen werden. Ähnlich war es bei Kultur der PBMC mit und ohne CXCL14 mit einer IFN- γ -Konzentration von 36,7 ng/ml \pm 3,14 ng/ml bzw. 39 ng/ml \pm 1,67 ng/ml. Bei Co-Kultur von SK-N-MC und PBMC nahm jedoch die Konzentration des proinflammatorischen Zytokines IFN- γ mit ansteigender CXCL14-Konzentration zu. Ohne Chemokin-Zusatz erhöhte sich die Konzentration von IFN- γ leicht auf 60,2 ng/ml \pm 5,14 ng/ml und erreicht bei höchster CXCL14-Konzentration mit 100 ng/ml einen Wert von 1189,6 ng/ml \pm 654,22 ng/ml (Abbildung 4-31).

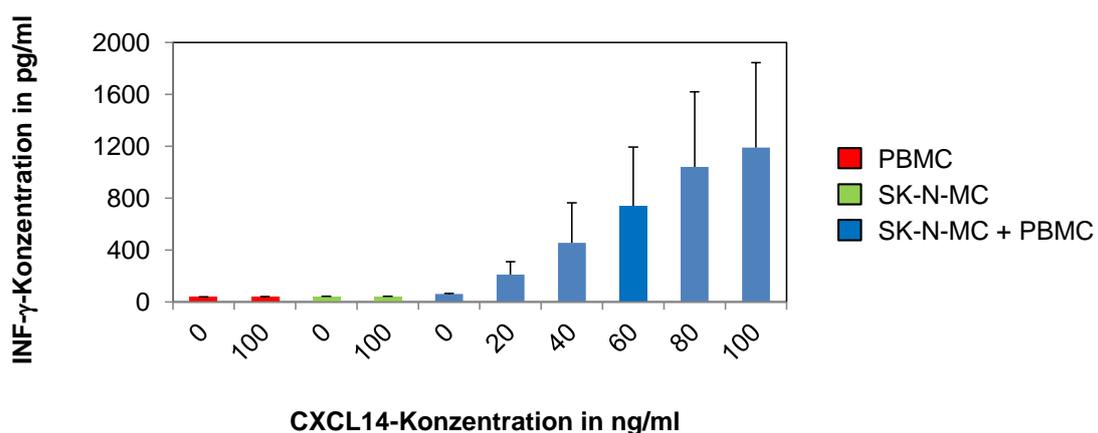


Abbildung 4-31: CBA-Assay des Zytokines IFN- γ . In einer Tumorzell / Lymphozyten-Kultur wurden SK-N-MC-Zellen ($2,5 \times 10^5$) mit PBMC (1×10^6) mit einer ansteigenden Konzentration des Chemokins CXCL14 von 0, 20, 40, 60, 80 und 100 ng/ml für 72 h in einer 6-Lochplatte in RPMI kultiviert. Der Darstellung sind 3 unabhängige Experimente zu Grunde gelegt, aus denen der Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt wurden.

Ähnlich verhielt es sich mit der Konzentration von TNF- α in den Zellkulturüberständen der Einzel- und Co-Kulturen von Tumorzellen und PBMC. Auch hier übte CXCL14 bei Einzelkultur von Tumorzellen bzw. PBMC keinen Effekt auf die TNF- α -Produktion aus. In den Überständen der Tumorzellen konnte eine TNF- α -Konzentration von 19,4 ng/ml \pm 2,24 ng/ml ohne bzw. 20,4 ng/ml \pm 0,84 ng/ml mit CXCL14-Behandlung nachgewiesen werden. Bei Kultur der PBMC mit und ohne CXCL14 war eine TNF- α -Konzentration von 21,7 ng/ml \pm 0,62 ng/ml bzw. 19,7 ng/ml \pm 0,79 ng/ml nachweisbar. Bei Co-Kultur von SK-N-MC-Zellen und PBMC ohne Chemokin-Zusatz erhöhte sich die Konzentration von TNF- α deutlich auf 119,6 ng/ml \pm 24,94 ng/ml und erreichte bei höchster CXCL14-Konzentration mit 100 ng/ml einen Wert von 349,2 ng/ml \pm 127,41 ng/ml (Abbildung 4-32).

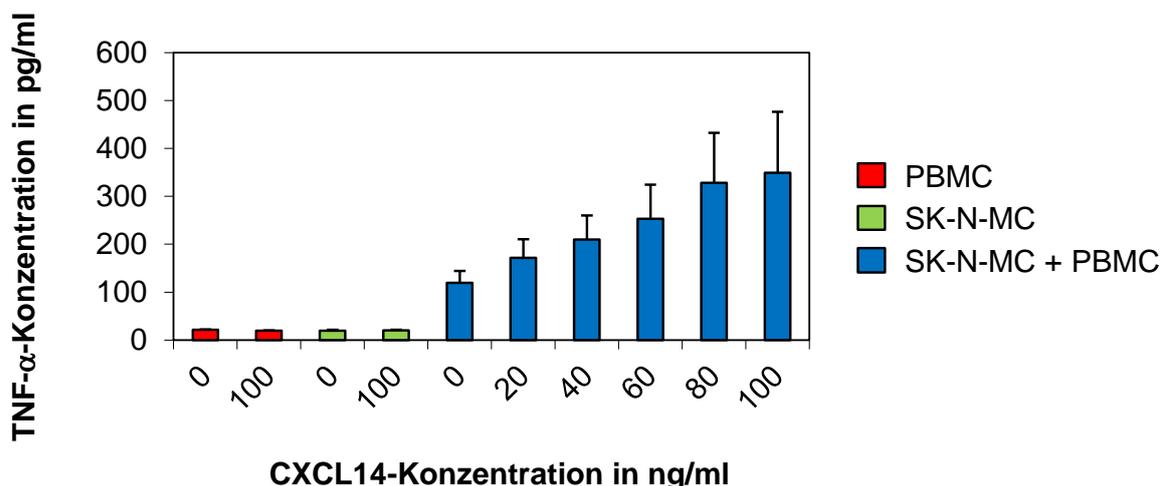


Abbildung 4-32: CBA-Analyse des Zytokines TNF- α . In einem Co-Kultur-Experiment wurden SK-N-MC-Zellen ($2,5 \times 10^5$) mit PBMC (1×10^6) und ansteigenden Konzentrationen des Chemokins CXCL14 von 0, 20, 40, 60, 80 und 100 ng/ml für 72 h in einer 6-Lochplatte in RPMI kultiviert. Der Darstellung sind 3 unabhängige Experimente zu Grunde gelegt, aus denen der Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt wurden.

Analog zum TNF- α erhöhte sich auch die Konzentration des antiinflammatorischen Zytokines IL-10 bereits durch Co-Kultur von Tumorzellen mit PBMC ohne Chemokin-Zugabe auf 841,3 ng/ml \pm 414,37 ng/ml, nahm dann aber mit ansteigender Konzentration von CXCL14 auf 677,7 ng/ml \pm 298,02 ng/ml ab. Die Konzentration von IL-10 in den Überständen der Einzelkultur von Tumorzellen betrug ohne CXCL14-Zugabe 89 ng/ml \pm 9,16 ng/ml und mit CXCL14 90,7 ng/ml \pm 11,27 ng/ml

und in den Überständen von PBMC ohne CXCL14 $27,5 \text{ ng/ml} \pm 1,58 \text{ ng/ml}$ und mit CXCL14-Zugabe $29,5 \text{ ng/ml} \pm 0,83 \text{ ng/ml}$ (Abbildung 4-33).

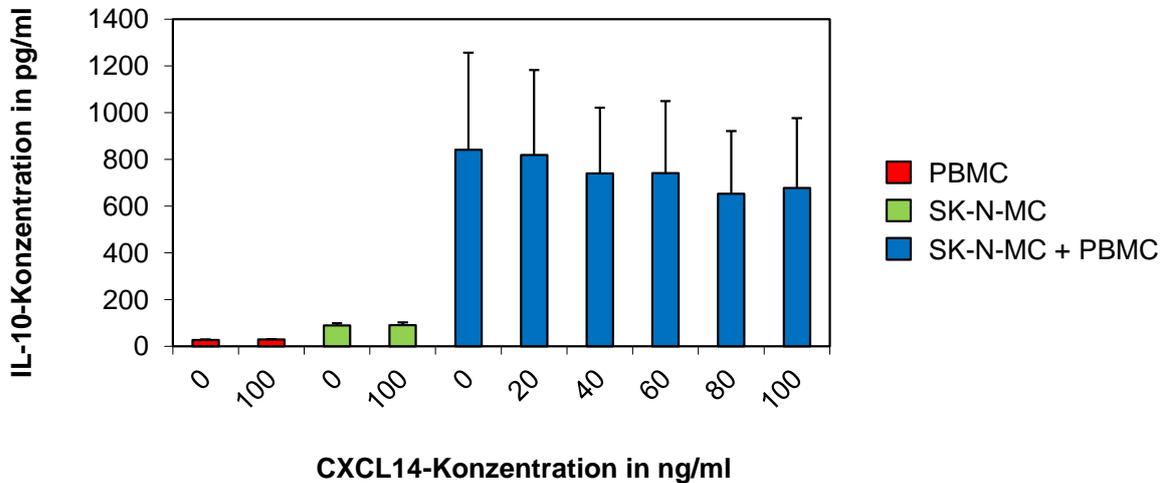


Abbildung 4-33: CBA-Assay des Zytokines IL-10. In einem Co-Kultur-Experiment wurden SK-N-MC-Zellen ($2,5 \times 10^5$) mit PBMC (1×10^6) und ansteigenden Konzentrationen des Chemokins CXCL14 von 0, 20, 40, 60, 80 und 100 ng/ml für 72 h in einer 6-Lochplatte in RPMI kultiviert. Der Darstellung sind 3 unabhängige Experimente zu Grunde gelegt, aus denen der Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt wurden.

Die Konzentration an Interleukin-4 betrug sowohl in den Zellkulturüberständen der Einzelkulturen von Tumorzellen und PBMC als auch in der Co-Kultur in An- und Abwesenheit von CXCL14 $55 \text{ ng/ml} \pm 1,58 \text{ ng/ml}$ (Daten nicht gezeigt).

Die Interleukine-2 und -5 konnten in den Einzel- und Co-Kulturen von SK-N-MC und PBMC nicht nachgewiesen werden.

4.3.8 Zytotoxizitätstest

Zusätzlich zur FACS-Analyse wurde ein Zytotoxizitätstest nach 3tägiger Inkubation von Tumorzellen der Ewing-Sarkom-Zelllinie SK-N-MC mit PBMC in An- und Abwesenheit des Chemokins CXCL14 durchgeführt. Die sinkende Tumorzell-Viabilität der SK-N-MC-Zellen bei ansteigender Konzentration an CXCL14 *in vitro* wurde mittels Laktat-Dehydrogenase (LDH)-Test photometrisch analysiert. Mithilfe dieses Versuches konnte eine zelluläre Immunreaktion von PBMC gegenüber Tumorzellen nachgewiesen werden. Die Kultivierung von PBMC mit SK-N-MC-Zellen in Abwesenheit von CXCL14 führte zu einer PBMC-vermittelten zytotoxischen

Immunantwort von 14,1 %. Mit ansteigender CXCL14-Konzentration war eine auf 74,5 % zunehmende PBMC-vermittelte Zytotoxizität zu beobachten (Abbildung 4-34).

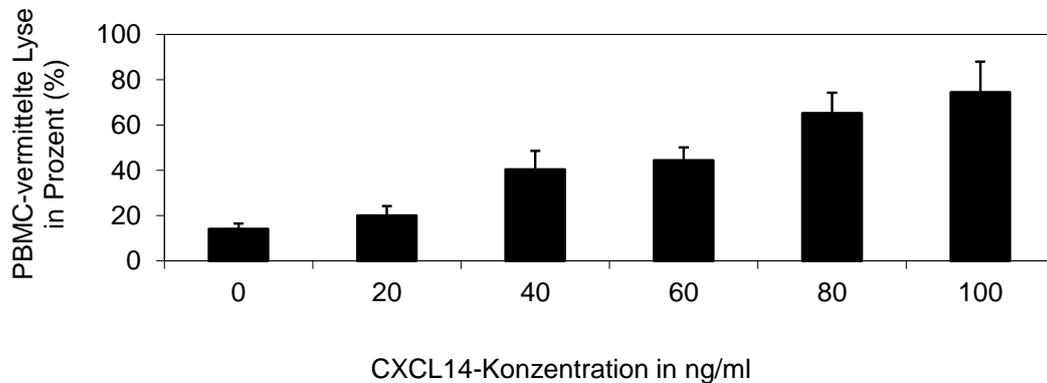


Abbildung 4-34: PBMC-vermittelte Lyse von EFT-Zellen bei Kultur mit CXCL14. SK-N-MC-Zellen ($2,5 \times 10^5$) wurden mit PBMC (1×10^6) und in Anwesenheit von CXCL14 mit ansteigender Konzentration von 0, 20, 40, 60, 80 und 100 ng/ml für 72 h in einer 6-Lochplatte in RPMI kultiviert. Aus dem Zellkulturüberstand wurde die LDH-Aktivität von Triplikaten je Experiment photometrisch bei einer Wellenlänge von 490 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm gemessen. Der Mittelwert und die Standardabweichung wurden aus 3 unabhängigen Experimenten ermittelt.

4.3.9 Stabil verminderte Transkriptionseffizienz der Gene RBM11, LIPI und LIPH in SK-N-MC-Zellen über miRNAs

Um Langzeiteffekte einer verminderten Transkriptionseffizienz der Gene RBM11, LIPI und LIPH zu analysieren, wurden spezifisch für diese Gene synthetische miRNAs entworfen. Dabei wurde ein prä-miRNA-exprimierender Vektor pcDNATM6.2-GW/EmGFP mit humanem CMV-Promoter generiert, welcher zudem co-cistronisch zur miRNA die Transkription von EmGFP ermöglicht. Die Erzeugung von stabilen Transfektanden in SK-N-MC-Zellen sollte es ermöglichen, Langzeiteffekte auf die Expression von RBM11-, LIPH- und LIPI-regulierten Genen zu untersuchen. Eine Verminderung der Transkription von RBM11 war jedoch mit einem *Fold Change* von 0,8 nur unzureichend möglich. Auch durch Generierung einer 2. miRNA für RBM11 ließ sich kein stärkerer Effekt in der Herunterregulation erzielen. Damit war es nicht möglich, Langzeiteffekte auf RBM11-assoziierte Gene zu untersuchen. Anders verhielt es sich für die Gene LIPI und LIPH. Die relative Transkriptionseffizienz von LIPI konnte auf 0,4 und von LIPH sogar auf 0,06 vermindert werden, während es zu keiner reziproken Transkriptions-Regulation beider Gene kam. Die

Herunterregulierung von LIPI und LIPH bewirkte eine verringerte relative RBM11-Expression von 0,59 bzw. 0,44. Eine Co-Regulation von LIPI und LIPH hatte keinen verstärkten Einfluss auf eine verminderte Transkription von RBM11. Die Verringerung der Expression von LIPI oder LIPH führte analog zum siRBM11-Experiment gleichzeitig zur Erhöhung der Transkriptionseffizienz des Chemokins CXCL14 mit einer relativen Expression von 2,14 für miR LIPI und 2,81 für miR LIPH sowie 2,99 für die Co-Regulation beider Lipasen. Die Verringerung der LIPH-Expression wirkte sich auf EWS-FLI1 mit einem *Fold Change* von 0,08 besonders deutlich aus. Weniger drastisch wurde die relative Expression von EWS-FLI1 mit einem *Fold Change* von 0,42 durch RNA-Interferenz von LIPI bzw. durch Co-RNA-Interferenz von LIPI und LIPH mit einem *Fold Change* von 0,28 beeinflusst. Das RNA-Interferenz-Experiment hatte auf die Expression des Proto-Onkogens MYC keinen Einfluss (Abbildung 4-35).

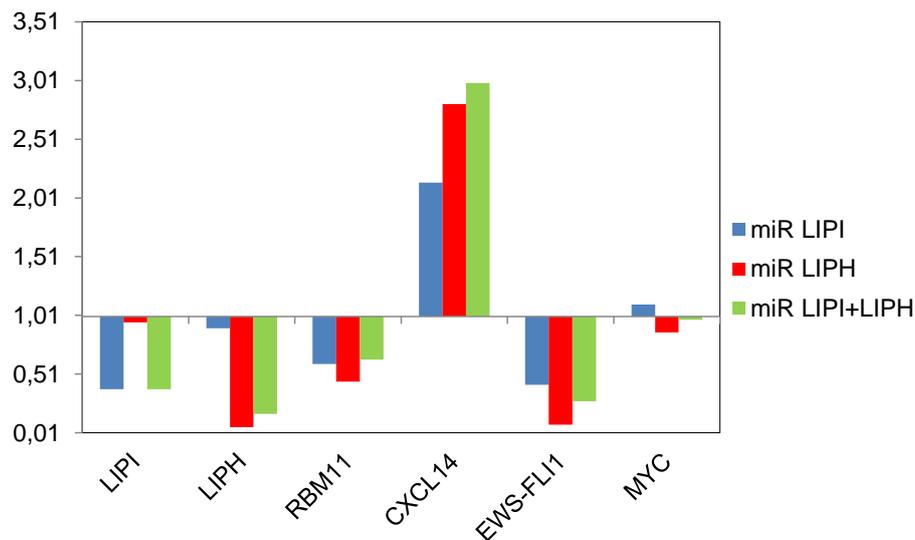


Abbildung 4-35: Genexpressionsprofil von SK-N-MC-Zellen mit stabil verminderten Transkriptionseffizienzen der Gene LIPI und LIPH über miRNAs. Jeweils 3 µg eines LIPI-miRNA-, LIPH-miRNA- oder Gen-unspezifischen miRNA-ligierten Vektors pcDNA™ 6.2-GW/EmGFP wurden mittels der AMAXA-Technologie in SK-N-MC-Zellen transfiziert und über Blasticidin (15 ng/ml) selektioniert. Es erfolgte eine quantitative real-time RT-PCR zur Bestimmung des differentiellen Genexpressionsprofils von LIPI-und/oder LIPH-inhibierten (LIPI-und/oder LIPH-miRNA) im Vergleich zu konstitutiv LIPI-und LIPH-exprimierenden (negative miRNA) Ewing-Sarkom-Zellen. Die qRT-PCR wurde mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode ausgewertet. Dargestellt wurde die relative Expression (Fold Change) der mit LIPI-und/oder LIPH-miRNAs kultivierten SK-N-MC-Zellen im Bezug auf die negativen miRNA-haltigen Zellen.

5. Diskussion

In etwa 85 % aller Ewing-Sarkome ist eine Translokation $t(11;22)(q24;q12)$ und als molekulares Äquivalent eine EWS-FLI1-Genfusion nachweisbar (Delattre et al. 1992, 1994). Diesem molekulargenetischen Ereignis wird eine Schlüsselrolle in der Tumorphagenese und Tumorbiologie von EFT zugeschrieben, wenngleich der histogenetische Ursprung von EFT zum gegenwärtigen Zeitpunkt ungeklärt ist. Die Hypothesen weisen in der Mehrheit in Richtung einer primitiven pluripotenten neuroektodermalen oder mesenchymalen Stammzelle als Ursprungszelle der Ewing-Sarkome (de Alava et al. 2000, Kovar 1998, 2001, 2003). Die Diagnosestellung erfolgt über die konventionelle Histologie und Immunhistologie sowie den molekulargenetischen Nachweis des Transfusionsstranskripts EWS-FLI1 (Dagher et al. 2001). Obwohl die Behandlungsergebnisse von Patienten mit Tumoren der Ewing-Familie in den letzten Jahrzehnten deutlich verbessert werden konnten, ist die Prognose insbesondere für Patienten mit frühem Rezidiv bzw. für Patienten, welche bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung Metastasen aufweisen, immer noch ungünstig (Burdach 2004; Burdach 2003; Burdach und Jürgens 2002), sodass die Identifikation neuer Zielstrukturen wünschenswert ist.

In unserer Arbeitsgruppe konnten bei Genexpressionsanalysen circa 40 Gene identifiziert werden, welche in EFT im Vergleich zu Normalgeweben drastisch überexprimiert werden. Eines dieser Gene kodiert eine bislang nur ungenügend charakterisierte Phospholipase, Lipase I (LIPI) (Staege et al. 2004). Basierend auf dem Expressionsprofil konnte LIPI als typisches CTA identifiziert werden (Scanlan et al. 2002; Scanlan et al. 2004). Die physiologische Funktion der meisten CTA wie auch LIPI ist bislang unbekannt. Die enzymatische Aktivität von Lipasen hydrolysiert Phosphatidylsäure (PA) zu Lysophosphatidylsäure (LPA) und wird durch eine sogenannte Deckel-Domäne reguliert (Aoki et al. 2007). Die Hydrolyse ist durch Vanadat hemmbar. Da Lysophosphatidylsäure eine biologisch aktive Substanz darstellt, welche Wachstum und Metastasierungskapazität von Tumorzellen steigern kann, könnte LIPI an diesen Prozessen beteiligt sein (Hiramatsu et al. 2003; Moolenaar et al. 2004). Mutationen im LIPI-Gen wurden bei hypertriglycerinämischen Patienten nachgewiesen (Wen et al. 2003). Wie dies mit der restringenten Expression in Einklang zu bringen ist, bleibt unklar. LIPI wurde ursprünglich als sezernierte, über Heparansulfat an Zellen in detergent-unlöslicher Form gebundene Lipase mit nahezu ausschließlicher Expression im Hoden, speziell auf den Spermien,

charakterisiert (Hiramatsu et al. 2003). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in EFT-Zelllinien LPA-Rezeptoren stark exprimiert werden (Schmiedel et al. 2010) und eine Inhibition von LPA zur Inhibition des Wachstums von Tumorzellen führte. Die Bedeutung der LIPI für die Pathogenese von EFT konnte bisher nicht geklärt werden. In der Diskussion steht eine mögliche Beteiligung von LIPI an Prozessen wie Zellteilung und Migration bei Tumoren der Ewing-Familie. In die Signalkaskade könnten LPA-Rezeptoren eine wichtige Schlüsselrolle spielen (Staege et al. 2010; Kumar et al. 2009; Yamada et al. 2008; Shida et al. 2003). Demnach könnte LIPI als interessante Zielstruktur für die Entwicklung neuer Therapieformen von Bedeutung sein.

5.1 Charakterisierung des Expressionsmusters der Lipase I und Ewing-Sarkom-assoziiierter Gene

Die Ursprungszelle von Tumoren der Ewing-Familie ist nach derzeitigem Kenntnisstand nicht identifiziert. Im Fokus der Hypothesen steht eine primitive pluripotente Stammzelle der Neuralleiste oder MSC (Staege et al. 2004; Miyagawa et al. 2008; Tirode et al. 2007, Kovar et al. 2003).

Mittels RT-PCR wurde das Expressionsprofil von LIPI und der nahe verwandten LIPH in verschiedenen Zelllinien und Geweben des Menschen und anderer Spezies analysiert. Erwartungsgemäß konnte in Normalgeweben eine hohe Expression des CTA Lipase I im Hoden nachgewiesen werden (Abbildung 4-1). Zusätzlich wurde eine, wenngleich auch geringfügigere relative Expression in der Schilddrüse detektiert. Die LIPI-Expression im Hoden und der Schilddrüse ist verglichen mit EFT-Zelllinien jedoch um das 10 bis 100fache niedriger (Abbildung 4-2). Dies führte zur Überprüfung des Expressionsverhaltens weiterer EFT-assoziiierter Gene in diesen Geweben.

Interessanterweise exprimierten sowohl die Schilddrüse als auch der Hoden alle analysierten EFT-assoziierten Gene (Abbildung 4-3). Die Expression zahlreicher EFT-assoziiierter Gene in der Schilddrüse wie ADRB1 (β 1-Adrenozeptor) (Hellgren et al. 2000), EGR2 (*earl growth response 2*) (Foukakis et al. 2007) und LECT1 (*leukocyte cell derived chemotaxin 1*) (Jain et al. 2004) wurde bereits beschrieben. Das Expressionsprofil des Chemotaxins LECT1 in Normalgeweben entspricht weitgehend dem der Lipase I (Staege et al. 2004).

Die im Vergleich zu EFT-Zelllinien und Testis verminderte LIPI-Expression in der Schilddrüse könnte darauf hindeuten, dass nur eine bestimmte Zellpopulation in der Schilddrüse molekulargenetische Eigenschaften von EFT-Zellen aufweist. Ähnlich wurde zum Beispiel eine LECT1-Expression hauptsächlich in den C-Zellen der Schilddrüse nachgewiesen (Jain et al. 2004). Die Schilddrüse enthält aus der Neuralleiste hervorgegangene Zellen. So unterstützt die Expression von EFT-assoziierten Genen in diesen Zellen die hohe Ähnlichkeit zwischen EFT und neuroektodermalen Geweben.

Die Untersuchung einer Auswahl an Neuroblastom- und Melanom-Zelllinien ergab keinen Nachweis einer LIPI-Expression (Abbildung 4-4). Neuroblastome und Melanome stellen Tumore dar, die ihren Ursprung in der Neuralleiste haben (Ross et al. 2007; Chudnovsky et al. 2005). Dies indiziert, dass eine LIPI-Expression kein charakteristisches Merkmal von aus der Neuralleiste hervorgegangenen Zellen ist. Bisher gibt es keinen Beleg für eine Expression von LIPI in neuronal differenzierten Zellen (Elkabetz et al. 2008).

Ähnlich verhält es sich in MSC. Es besteht freilich die Möglichkeit, dass die LIPI-Expression in den erwähnten Zelltypen während der onkogenen Transformation angeschaltet werden kann. Die Untersuchung des Expressionsprofils von EWS/FLI1- und EWS/ERG-transgenen MSC ergab indes keinen Hinweis darauf, dass es zu einer Heraufregulation von LIPI durch EFT-assoziierte Fusionsproteine kommt (Miyagawa et al. 2008). Dies deckt sich mit den Beobachtungen in der Zellkultur. Zellen, die EWS-FLI1 transient oder stabil exprimierten, zeigten keine Expression von LIPI. Zudem konnte gezeigt werden, dass sich LIPI nicht durch EWS-FLI1 induzieren lässt bzw. EWS-FLI1 allein zur Induktion nicht ausreicht. Somit muss die Expression von LIPI in EFT durch andere Faktoren bewirkt werden. Dies wird auch durch die Expression von LIPI in einzelnen nicht EFT wie Nierentumoren und Mammakarzinomen unterstützt (Scanlan et al. 2002). Eine Ausnahme hierzu bilden Mesenchymale Stammzellen von jungen Spendern (Riggi et al. 2010). In diesen MSC konnte eine Heraufregulation von LIPI durch EWS-FLI1 beobachtet werden.

Ähnlich wie bei der humanen LIPI konnten wir die murine LIPI beinahe ausschließlich im Hoden nachweisen (Abbildung 4-12). LIPI wurde jedoch nicht wie beim Mensch in der Schilddrüse der Maus exprimiert (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu, wies LIPI des Haushuhnes eine breite Expression, ähnlich der LIPH aller untersuchten Spezies, auf. Zudem war das Auftreten von Spleißvarianten der humanen LIPI und

LIPH sowie der murinen LIPH zu beobachten (Abbildung 4-12). Eine *in silico* Strukturanalyse der prominenten Spleißvariante LIPI del Exon 5 zeigt hierbei, dass dieser Variante eine regulatorisch wichtige Domäne fehlt, so dass diese Variante ein konstitutiv aktiviertes Enzym repräsentieren könnte (Abbildung 5-1) (Schmiedel et al. 2011).

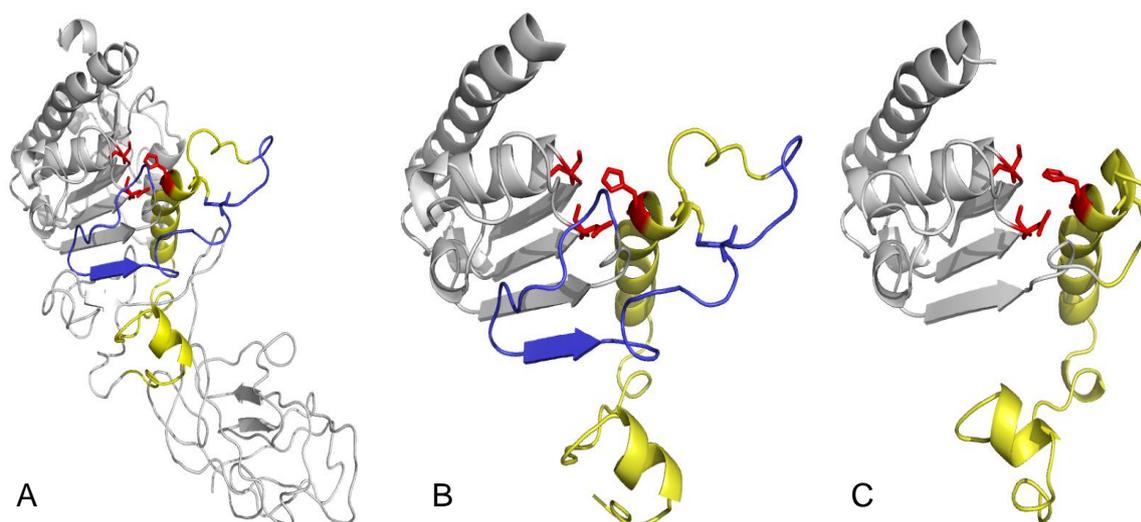


Abbildung 5-1: Hypothetische Proteinstrukturen von LIPI (nach Daten von ModBase). Dargestellt sind die Gesamtstruktur des LIPI-Proteins (A) und Ausschnitte des durch Spleißen betroffenen Bereichs aus LIPI (B) und der Spleißvariante LIPI del Exon 5 (C). Markiert sind die katalytisch aktiven Aminosäuren Serin159, Asp183, His253 (rot), das der Spleißvariante fehlende Exon 5 (blau) und das unterschiedlich gefaltete Exon 6 (gelb).

In der Literatur wurden bereits weitere Lipasen und Phospholipasen beschrieben und mit einem differenziellen Spleißverhalten assoziiert (Botma et al. 2007; Larsson et al. 1999). Des Weiteren wurden bereits für Lipase H und die Phosphatidylserin-spezifische Lipase, beide nah verwandt mit LIPI (Hiramatsu et al. 2003), verschiedene Spleißtranskripte beschrieben (Sonoda et al. 2002; Nagai et al. 1999). Eine aberrante Regulation von Lipasen in verschiedenen Tumor-Modellen konnte bereits gezeigt werden (Staege et al. 2010; Lu et al. 2008).

Im Gegensatz zu LIPI konnte eine LIPH-Expression nicht nur in EFT-Zelllinien sondern auch in Hodgkin-Lymphom-Zelllinien und HEK293-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 4-8).

Bei dem Vergleich der LIPI-Sequenzen verschiedener Spezies stellten wir fest, dass LIPI bei Nicht-Säugetieren eine wesentlich höhere Sequenzähnlichkeit mit LIPH aufweist, als bei Säugetieren (Abbildung 4-9, Abbildung 4-10). Nur bei Säugetieren konnten bislang Sequenzen identifiziert werden, welche eindeutig LIPI-spezifische Eigenschaften

aufweisen. Somit korreliert hier die LIPH-ähnliche Sequenz mit einem LIPH-ähnlichen Expressionsprofil.

In der Diskussion stehen bereits Strategien für die Entwicklung spezifischer und selektiver Inhibitoren von Lipasen und Serin-Hydrolasen (Li et al. 2007). Der Vergleich der Sequenzen, berechneter Strukturen und Expressionsmuster von LIPI und LIPI-Spleißvarianten verschiedener Spezies lieferte wertvolle Daten, welche die Hypothese einer potenziellen pathophysiologischen Funktion dieser Enzyme für Ewing-Sarkome stützen (Foell et al. 2008; Schmiedel et al. 2011; Hesse et al. 2012).

5.2 Lipase I als diagnostischer Marker

Da die LIPI-Expression hauptsächlich auf Hoden und Schilddrüse begrenzt ist, jedoch diese Gewebe nicht EFT-typisch sind, prüften wir die Möglichkeit des Einsatzes von LIPI als diagnostischen Marker. Erwartungsgemäß war LIPI nur in EFT-Zelllinien und primären EFT-Tumoren nachweisbar (Abbildung 4-4, Abbildung 4-5). Mittels RT-PCR kamen wir zu dem Ergebnis, dass die Sensitivität einer LIPI-PCR vergleichbar mit einer herkömmlichen EWS-FLI1-PCR ist. Überraschenderweise gab es in Proben mit schwachem EWS-FLI1-Signal noch ein deutliches LIPI Signal (Abbildung 4-6). Die Sensitivität der *nested* PCR lag zwischen $1:10^5$ und $1:10^6$. In der quantitativen PCR waren sowohl LIPI als auch EWS-FLI1 bis zu einer Verdünnung von 10^5 nachweisbar (Abbildung 4-7). In Verdünnungen von $1:10^7$ konnte LIPI nicht detektiert werden, da die erwartete Zahl an Tumorzellen unter 1 lag. In Fällen, in denen keine LIPI-Expression nachzuweisen ist, sollte man alternative Diagnosen sorgfältig prüfen. Da in Neuroblastomen und Rhabdomyosarkomen keine LIPI-Transkripte detektierbar waren, könnte LIPI als Marker zur Abgrenzung der EFT innerhalb der Gruppe der kleinen blauen rundzelligen Tumore dienen (Abbildung 4-5). In der *Oncomine* Datenbank (Rhodes et al. 2004) konnten keine anderen Proben mit Ausnahme von EFT gefunden werden, die LIPI in hohem Maße exprimieren. Datensätze der *International Genomics Consortium expO*⁸ zeigten keine LIPI-Expression in anderen untersuchten Sarkomen. Zusätzlich zu den präsentierten Daten und der Initialstudie der Genexpression in EFT (Staege et al. 2004) ist dies ein Datensatz, der die hohe und spezifische Expression der LIPI in EFT demonstriert.

⁸ <http://www.intgen.org>

Im Knochenmark, peripherem Blut oder transformierten B-Zelllinien (lymphoblastoide Zelllinien, Leukämie- oder Hodgkin-Lymphom-Zelllinien) konnten wir kein LIPI nachweisen (Abbildung 4-1, Abbildung 4-4). In einer sehr kleinen Gruppe von Patienten mit multiplen Myelomen wurde die Expression von LIPI beschrieben (Atanackovic et al. 2007). Dies deutet auf die Möglichkeit hin, dass unter bestimmten Bedingungen LIPI in hämatopoetischen Zellen exprimiert werden kann.

Die gewonnenen Daten weisen auf die Möglichkeit hin, dass LIPI ein interessantes Gen für die Diagnosestellung darstellt, insbesondere in Fällen bei denen Ergebnisse aus der EWS-FLI1-PCR unklar sind trotz typischer Histologie und immunologisch passendem Phänotyp (Abbildung 4-6).

5.3 Phylogenetische Analyse von Lipase I und Lipase verwandter Familienmitglieder

Die Lipase I besitzt eine hohe Homologie zu einem anderen Mitglied der Lipase-Familie, der Phospholipase A1 Alpha, Lipase H (LIPH). Dies führt zu der Vermutung, dass beide Gene aus einem gemeinsamen Vorläufer-Gen durch Gen-Duplikation hervorgegangen sind. Innerhalb der humanen Lipasen repräsentieren LIPI und LIPH Mitglieder einer neuen Subfamilie, welche durch eine sehr kurze regulatorische Deckel-Domäne des Katalyse-Zentrums charakterisiert ist (Abbildung 5-1). Bislang wurden LIPI-Sequenzen nur in Mammalia identifiziert. Basierend auf der konservierten genomischen Organisation der LIPI und LIPH wurden in Nicht-Mammalia, Vögeln und Fischen, für beide Lipasen Sequenzen identifiziert (Abbildung 4-10). In allen untersuchten Spezies befindet sich die Lipase mit höherer Homologie zur humanen LIPI in direkter Nachbarschaft mit einem Mitglied der Familie der RNA-Bindemotive, RBM11 (Abbildung 4-13). Daher ist es wahrscheinlich, dass diese Lipase die LIPI der Nicht-Mammalia repräsentiert. Interessanterweise wurde bei *Xenopus* eine Lipase lokalisiert, die ebenfalls in direkter Nachbarschaft zu einem RBM11-Ortholog liegt (Abbildung 9-1). Da der genomische Kontext von LIPI und RBM11 zwischen Fischen und Amnioten konserviert ist, scheint es offensichtlich, dass die Lipase der Amphibien im selben genomischen Kontext auch die Lipase I ist. In *Xenopus* war es jedoch nicht möglich, eine zweite LIPI/LIPH-ähnliche Lipase zu identifizieren. Es bleibt dabei offen, ob eine solche homologe Lipase-Sequenz bisher nicht identifiziert wurde oder Amphibien allgemein keine LIPH besitzen. Mutationen in der humanen LIPH sind für eine autosomal, rezessive Hypotrichose (Kazantseva et

al. 2006; Ali et al. 2007) verantwortlich. Diese Krankheit ist durch Haarverlust gekennzeichnet. Die Patienten zeigen jedoch keinerlei andere Symptome. Dies lässt vermuten, dass LIPH für das Leben entbehrlich ist. Man könnte spekulieren, dass der Verlust von LIPH in haarlosen Amphibien während der Evolution aufgetreten ist, ohne einen Einfluss auf die überlebensnotwendige Fitness der Lebewesen zu haben. Wie in den Abbildungen 4-11A und 4-11B erkennbar, haben LIPI und LIPH der Nicht-Mammalia eine höhere Sequenz-Homologie zur LIPH der Mammalia als zur LIPI der Mammalia. LIPI des Eier-legenden Schnabeltieres (Mammalia) zeigt ein intermediäres Verhalten, so dass sich die LIPI-spezifische Sequenz während der Säugetier-Evolution entwickelt haben könnte.

Das RBM11-verwandte Gen der Fische in unmittelbarer Nachbarschaft zum LIPI-Lokus hat eine hohe Homologie sowohl zum humanen RBM7 als auch RBM11 (Abbildung 4-16 und Abbildung 4-17). Die physiologische Rolle von RBM7 und RBM11 ist bislang unbekannt, jedoch scheint RBM7 in die mRNA-Prozessierung (Guo et al. 2003) involviert zu sein. Wie LIPI wird RBM7 im Hoden exprimiert (Guo et al. 2003). RBM11 wird laut EST-Datenbank-Recherchen ebenfalls im Hoden und in Ewing-Sarkom-Zelllinien in hohem Maße exprimiert. Weiterhin wurde eine Interaktion von RBM11 und dem Transkriptionsfaktor RHOXF2 beschrieben (Rual et al. 2005). Dieser Transkriptionsfaktor wird ebenfalls im Hoden stark exprimiert, was zu der Möglichkeit führt, dass RBM11 und interagierende Moleküle eine Rolle bei der Spermio-genese spielen könnten.

Die höhere Homologie zwischen der LIPI der Vögel und der humanen LIPH korreliert mit dem LIPH-ähnlich breitem Expressionsmuster (Abbildung 4-12). Auf Grund dessen kann LIPI nur in Säugern als CTA definiert werden. Da alle LIPI und LIPH von Nicht-Mammalia eine hohe Sequenz-Homologie zur LIPH von Mammalia besitzen, scheint es, dass die charakteristische Sequenz der Säuger-LIPI sowie das auf den Hoden begrenzte Expressionsprofil apomorphe Merkmale sind. Viele CTA werden von perizentrischen Genen kodiert, was zu der Annahme führt, dass die Expression dieser Gene in Keimzellen die Dekondensierung des Chromatins reflektiert (Mudge und Jackson 2005). Die Anwesenheit von LIPI-Protein auf reifen Spermatischen (Hiramatsu et al. 2003) deutet auf eine funktionelle Rolle der LIPI-Expression im Hoden. Säuger-Gene, die in die männliche Fertilität und Spermien-Funktion involviert sind, stehen unter einem starken evolutionären Druck (Wyckoff,

Wang und Wu, 2000). So scheint es, dass sich die Säuger-spezifische Sequenz der LIPI in der Folge dieses evolutionären Druckes herausgebildet hat.

Verfügbare Genexpressionsdaten zeigen, dass innerhalb der verschiedenen Tumoren nur Ewing-Sarkome in hohem Maße LIPI exprimieren (Hesse et al. 2008; *Oncomine* Datenbank (Rhodes et al. 2004)). Ungeklärt bleibt, ob die hohe Expression der LIPI die Konsequenz der onkogenen Transformation ist oder den unbekanntem histogenetischen Ursprung des EFT reflektiert. Abgesehen vom konservierten genomischen Kontext ist das Expressionsmuster der LIPI zwischen Mammalia und Vögeln komplett unterschiedlich. Die Analyse von Faktoren, welche für diese unterschiedliche Expression bei Mammalia und Vögeln verantwortlich sind, könnte zur Identifikation von Faktoren führen, die maßgeblich zu der starken LIPI-Expression in EFT führen.

5.4 RBM11 – seine Bedeutung für das Ewing-Sarkom

Das Gen für die humane LIPI liegt auf dem Chromosom 21 in unmittelbarer Nachbarschaft zu einem ebenfalls in EFT hoch exprimierten Gen, RBM11. Die gemeinsame Expression von LIPI und RBM11 könnte ein Hinweis auf gemeinsame Expressionskontrolle sein. RBM11 gehört zu einer großen Familie von RNA-bindenden Proteinen, welche unter anderem in Vorgänge wie RNA-Prozessierung, Apoptose, Fertilität und Gehirnentwicklung involviert sind (Sutherland et al. 2005). Die Interaktion von RNA-bindenden Proteinen und deren Substraten wird durch spezifische Sequenzen innerhalb der Proteine selbst bestimmt wie dem RNA-Erkennungsmotiv (RRM), RNA-Bindemotiv (RBM), Ribonukleotidproteinmotiv (RNP) (Burd und Dreyfuss 1994), dem Arginin-reichen Motiv (ARM) (Burd und Dreyfuss 1994), , der *cold shock*-Domäne (CSD) (Manival et al. 2001), der k-homologen (KH) Domäne (Gibson et al. 1993; Siomi et al. 1993; Adinolfi et al. 1999) und der Arginin-Glycin-Glycin (AGG) Box (Kiledjian und Dreyfuss 1992). Das primäre Strukturmotiv ist RRM und besteht aus 80 bis 100 AS, von denen 2 Sub-Domänen hochkonservierte Bereiche darstellen, RNP-1 und RNP-2. RNP-1 besteht aus einer Oktapeptid-Konsensus-Sequenz (Birney et al. 1993) und RNP-2 aus einer weniger gut konservierten Hexapeptid-Konsensus-Sequenz (Burd und Dreyfuss 1994). Die RRM-Domäne besteht strukturell aus 4 β -Faltblättern und 2 α -Helices (Nagai et al. 1990). Die RRM-Domäne ist das am weitverbreitetste RNA-Bindemotiv. Zweifellos

scheint die biologische Funktion von RRM-Domänen von Bedeutung zu sein, da diese in praktisch jeder Organelle einer Zelle zu finden sind, in welcher RNA vorkommt und sowohl in Tieren als auch Pflanzen, Hefen, Viren und Bakterien konserviert sind. Die Sequenzen, die von der RRM-Domäne erkannt werden, variieren stark und RRM-Proteine können mehr als ein RNA-Molekül gleichzeitig binden (Kenan et al. 1991). Die Affinität der Bindung wird durch Sequenzen zwischen den RRM-Domänen bestimmt (Shamoo et al. 1995).

RBM11 ist ein bislang in seiner biologischen Funktion unbekanntes Mitglied der RNA-bindenden Proteine. Den genomischen Kontext betrachtend, liegt RBM11 in direkter Nachbarschaft zur LIPI auf Chromosom 21. Die Transkription beider Gene findet in Kopf-an-Kopf-Orientierung statt (Abbildung 4-13). Laut Datenbankrecherchen ist RBM11 ebenfalls ein wie LIPI in EFT hoch exprimiertes Gen. Die Auswertung verschiedener Mikroarray-Datensätze ergab eine hohe Korrelation der Expression von LIPI und RBM11 (Abbildung 4-14). Dies führte zu der Fragestellung, ob beide Gene unter gemeinsamer Expressionskontrolle stehen könnten. Die Untersuchung des Expressionsprofils von humanen Zelllinien führte zu dem Ergebnis, dass RBM11 in EFT-Zelllinien in hohem Maße exprimiert wird, aber in moderater Expression auch vereinzelt in Neuroblastom-, lymphoblastoiden und Hodgkin-Lymphom-Zelllinien zu finden ist (Abbildung 4-15). Weiterhin wird es in zahlreichen Normalgeweben stark exprimiert. Ausnahmen bilden dabei die Leber, Milz und Skelettmuskel mit verminderter Expression (Abbildung 4-18). RBM11 ist in der Folge kein in der Expression auf das Ewing-Sarkom begrenztes Gen und nicht als klassisches *Cancer/Testis*-Antigen anzusprechen.

5.5 Der Einfluss von CXCL14 auf Ewing-Sarkom-Zellen

Zur näheren Charakterisierung der Bedeutung von RBM11 für das Ewing-Sarkom wurde ein RNA-Interferenz-Experiment mittels siRNA zur Verringerung der Expression von RBM11 in der EFT-Zelllinie SK-N-MC durchgeführt. Sowohl die RT-PCR (Abbildung 4-19) als auch die *real-time* PCR (Abbildung 4-20) zeigten eine deutliche Verringerung des Transkriptionsproduktes des RBM11-Gens, wenngleich die Expression von RBM11 nicht vollständig unterdrückt werden konnte. Dieses Ergebnis wurde durch 3 weitere unabhängige RBM11-RNA-Interferenz-Experimente

bestätigt. Daraufhin wurde eine Mikroarray-Analyse des in Abbildung 4-19 und Abbildung 4-20 dargestellten Experimentes durchgeführt.

Die Validierung der Mikroarraydaten mittels quantitativer RT-PCR ergab eine starke Hochregulation von CXCL14 (Abbildung 4-20, Abbildung 4-22).

Eine deutliche Verminderung der Expression war von charakteristischen Genen wie PPARBP, LOX, NR4A3, MST4 oder NEFH in der Ewing-Sarkom-Zelllinie SK-N-MC zu beobachten (Abbildung 4-21).

NR4A3 ist dabei von besonderem Interesse, da es einen EWS-Translokationspartner darstellt (Clark et al. 1996) (Abbildung 5-2).

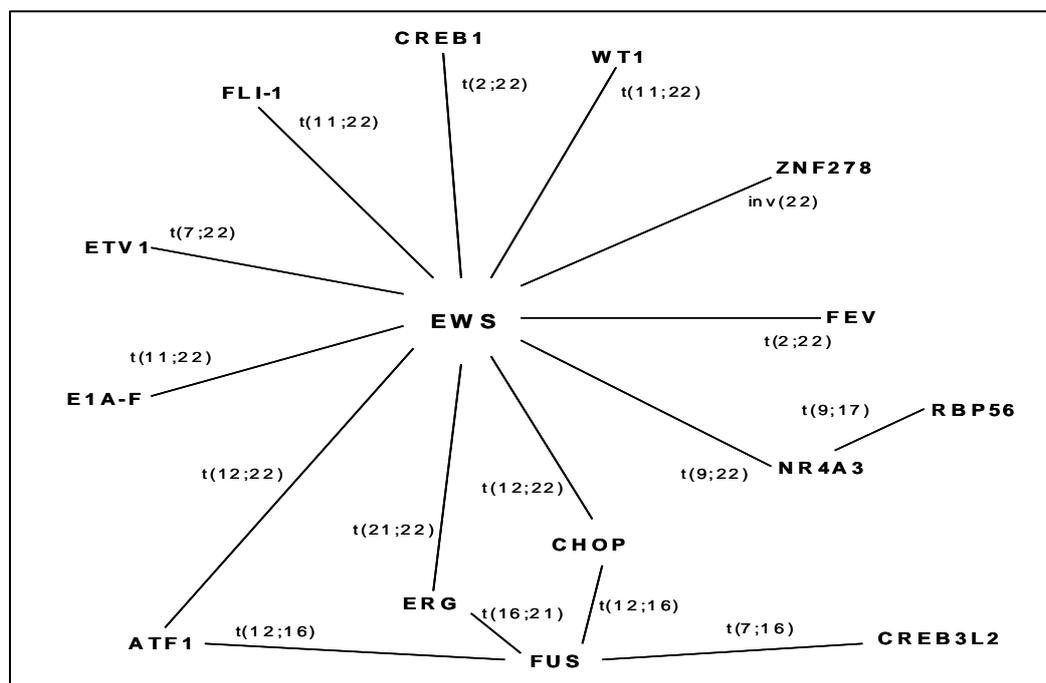


Abbildung 5-2: EWS-Translokationspartner. Unterschiedliche Translokationspartner des EWS-Gens wurden zusammengefasst in Staeger und Max 2009.

Das Ewing-Sarkom assoziierte Gen EWS-FLI1 sowie auch LIPI und das Protoonkogen MYC wurden durch eine verminderte RBM11-Expression in ihrer Expression jedoch nicht beeinflusst (Abbildung 4-23).

Das Chemokin CXCL14 war aufgrund der besonders hohen Expression im Vergleich aller differenziell regulierten Gene von besonderem Interesse.

Chemokine sind allgemein kleine Proteine von 8 bis 12 kD, deren Namen von ihren chemotaktischen Fähigkeiten abgeleitet wurde. Chemokine ist ein Akronym für chemotaktische Zytokine und reflektiert ihre Entdeckung und Charakterisierung als

wichtige Chemolockstoffe in der proinflammatorischen Phase der Immunantwort. Die Funktion der Chemokine liegt in der Anlockung und Aktivierung von Leukozyten, einschließlich Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten und Dendritischen Zellen sowie verschiedenster anderer Zelltypen (Wang et al. 1998). Obwohl ihre primäre Funktion in der Steuerung der Leukozyten-Migration und endothelialen Transmembran-Migration zu liegen scheint, spielen sie eine wichtige Rolle bei zahlreichen homöostatischen und pathologischen Prozessen wie Entwicklung, Hämatopoese, Allergien, entzündlichen Syndromen, Angiogenese und Tumoren (Wang et al. 1998; Baggiolini 1997, 1998, 2001; Sallusto und Baggiolini 2008; Gale und McColl 1999). Die Mehrheit der Chemokine wird in Antwort auf einen Reiz exprimiert. Einige Chemokine werden dagegen auch konstitutiv exprimiert (Wang et al. 1998; Baggiolini et al. 1997; Gale und McColl 1999). Ein akkumuliertes Auftreten von Chemokinen deutet auf eine kritische regulatorische Rolle während der Entwicklung von metastasierenden Tumoren mittels stimulierter Angiogenese und Tumorwachstum. Zusätzlich beeinflussen Chemokine über die Regulation des Immunsystems eine Antitumor-Immunantwort und chronische Entzündungen wie sie mit zahlreichen Neoplasien assoziiert sind (McColl 2002; Ueno et al. 2000; Negus et al. 1997).

CXCL14 wurde 1999 von Robert Hromas erstmals aus Brust- und Nierengewebe isoliert und kloniert und in der Folge BRAK (*breast and kidney*) genannt (Hromas et al. 1999). CXCL14 gehört zur Familie der CXC-Chemokine. Chemokine können basierend auf den Variationen ihrer Struktur motive der konservierten aminoproximalen Cystein-Reste in die 4 Subfamilien CXC, CC, CX₃C und C klassifiziert werden (Murphy et al. 2000). Die CXC-Familie der Mammalia kann weiterhin unterteilt werden bezüglich der An- und Abwesenheit des konservierten Glutamin-Leucin-Arginin (ELR)-Struktur motives am NH₂-Terminus.

Familienmitglieder, die das ELR-Strukturmotiv tragen wie CXCL1, CXCL5 und CXCL8 wirken aktivierend auf die Angiogenese. CXC-Chemokine, die negativ für das ELR-Strukturmotiv sind und sich zudem durch Interferon- γ induzieren lassen wie zum Beispiel CXCL4, CXCL9 oder CXCL10 wirken als Inhibitoren auf die Angiogenese (Belperio et al. 2000). Obwohl CXCL14 negativ für das ELR-Strukturmotiv ist, lässt es sich nicht durch Interferon- γ induzieren (Frederick et al. 2000). Chemokine agieren über einen 7-Transmembran-Domänen-G-Protein-

gekoppelten Rezeptor, welcher verschiedenste Liganden innerhalb der Chemokin-Subfamilien bindet (Zlotnik et al. 1999, Baggiolini et al. 1997).

CXCL14 ist ein Chemokin mit bisher nicht exakt geklärter Funktion und Rezeptor-Selektivität (Frederick et al. 2000; Hromas et al. 1999; Sleeman et al. 2000). Es gibt jedoch einen ersten Hinweis, dass CXCL14 eine große Bindungsaffinität zum Rezeptor CXCR4 besitzt und über die CXCL12-CXCR4-Achse wichtige physiologische Prozesse modulieren könnte (Tanegashima et al. 2013). Der CXCL12-CXCR4-Signalweg wird von verschiedenen Tumoren für Wachstum, Angiogenese und Metastasierung genutzt (Balkwill 2004).

CXCL14-Transkripte liegen in den untersuchten Geweben am Höchsten in der Niere, der Milz und dem Magen vor (Abbildung 4-22), werden aber laut Sleeman et al. 2000 auch in hohem Maße in Leber, Dünndarm und zahlreichen Epithelien einschließlich Basal-Keratinozyten und Fibroblasten der Haut exprimiert. In 7 analysierten Ewing-Sarkom-Zelllinien war eine CXCL14-Expression nur in STA-ET-8 nachweisbar. Während in Neuroblastomen keine Expression von CXCL14 nachgewiesen werden konnte, war diese in Hodgkin-Lymphom- sowie in LCL-Zelllinien teils geringfügig erhöht (Abbildung 4-26). In Primärtumoren konnte dagegen eine bis zu 1000fache Überexpression beobachtet werden (Abbildung 4-27).

In einer gemischten Lymphozyten/Tumorzell-Kultur, bei der Ewing-Sarkomzellen der Linie SK-N-MC mit mononukleären Blutzellen und verschiedenen Konzentrationen des Chemokins CXCL14 für 3 Tage kultiviert wurden, konnten mittels FACS-Analyse in Anwesenheit von CXCL14 keine lebenden Tumorzellen (CD117-positiv) in den Kulturen nachgewiesen werden (Abbildung 4-28). Bereits bei Konzentrationen von CXCL14 mit 40 ng/ml konnte eine drastische Suppression der Tumorzellen beobachtet werden (Abbildung 4-29). Eine weitere Untersuchung mittels LDH-Freisetzungstest konnte eine CXCL14-vermittelte Lyse der Tumorzellen in den Mischkulturen bestätigen (Abbildung 4-30). Die Analysen lassen die Schlussfolgerung zu, dass CXCL14 das Wachstum von EFT-Zellen in der gemischten Lymphozyten/Tumorzell-Kultur unterdrückt.

Eine FACS-Untersuchung zur näheren Charakterisierung der PBMC der gemischten Lymphozyten/Tumorzell-Kultur ergab, dass die Zahl der Monozyten nach CXCL14-Inkubation nahezu konstant blieb, während sich die Zahl der T-Helferzellen, zytotoxischen T-Zellen und B-Lymphozyten sowie der NK-Zellen erhöhte (Abbildung 4-30).

In einem weiteren Experiment wurden die Überstände der gemischten Lymphozyten/Tumorzell-Kultur gewonnen und mittels *Cytometric Bead Assay* analysiert. Dabei ließ sich eine Induktion von TH1-Zytokinen, Interferon- γ und Tumor-Nekrosefaktor- α durch CXCL14 in der gemischten Lymphozyten/Tumorzell-Kultur beobachten, während das TH2-Zytokin Interleukin-10 geringfügig unterdrückt wurde (Abbildung 4-31, Abbildung 4-32 und Abbildung 4-33).

Die Induktion von TH1-Zytokinen weist auf eine zelluläre Immunantwort hin, bei der es zu einer Aktivierung von zytolytischen T-Zellen und Makrophagen kommt. Interferon- γ wird von TH1-Zellen, T-Zellen und NK-Zellen produziert. Wichtige Zielzellen stellen Makrophagen, wobei Interferon- γ die Makrophagenaktivierung bewirkt. Diese Fähigkeit ist von entscheidender Bedeutung bei der Abtötung von intrazellulären Erregern und der Zerstörung von Tumorzellen. Ebenfalls fördert IFN- γ den Klassenwechsel der von den B-Zellen gebildeten Antikörper. Der Tumor-Nekrosefaktor- α wird nicht nur von Makrophagen freigesetzt, sondern wirkt auf diese auch aktivierend. Des Weiteren fungiert TNF- α als Entzündungsmediator auf Endothelzellen. Interleukin-10 wird von TH2-Zellen, regulatorischen T-Zellen und Makrophagen produziert und besitzt hauptsächlich immuninhibitorische Fähigkeiten. Insbesondere hemmt es die Aktivierung von Makrophagen und T-Zellen (Janeway 2005).

Die Phänotypisierung der gemischten Lymphozyten/Tumorzell-Kulturen nach CXCL14-Behandlung sowie dessen Untersuchung der Zellkultur-Überstände führten zu dem Ergebnis, dass CXCL14 *in vitro* auf die Proliferation und/oder Aktivität von T-Helferzellen, zytotoxischen T-Zellen und B-Lymphozyten sowie der NK-Zellen einen Einfluss hat.

Die in der Literatur assoziierten biologischen Funktionen von CXCL14 stehen miteinander in Widerspruch (Kurth et al. 2001, Shellenberger et al. 2004, Shurin et al. 2005, Allinen et al. 2004).

CXCL14 wurde beschrieben, vornehmlich in Normalgewebe ohne Notwendigkeit von inflammatorischen Stimuli exprimiert zu werden, jedoch nicht oder nur minimal in malignen Zellen *in vivo* (Frederick et al. 2000, Hromas et al. 1999, McKinnon et al. 2008, Shellenberger et al. 2004, Komori et al. 2010). Andere Untersuchungen ergaben eine hohe CXCL14-Expression in Adenokarzinomen wie z.B. Prostatakrebs (Schwarze et al. 2005), Mammakarzinom (Allinen et al. 2004) oder Pankreastumoren (Wente et al. 2008). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Effekte von

CXCL14 auf Entwicklung und Progression eines Tumorgeschehens von gänzlich unterschiedlicher Natur sein könnten.

In Prostatatumorgewebe wird CXCL14 deutlich überexprimiert. *In vitro* Studien identifizierten in Fibroblasten exprimiertes CXCL14 als potenzielles Prostatatumorstimulierendes Protein. Dabei übt CXCL14 u.a. über parakrine Mechanismen einen Einfluss auf Tumorwachstum und Angiogenese aus (Augsten et al. 2009). Erstaunlicherweise zeigten *in vivo* Modelle jedoch, dass CXCL14 einen inhibitorischen Effekt auf das Prostatatumorwachstum bewirkt (Schwarze et al. 2005). Eine suppressive Rolle von CXCL14 bei der Tumorprogression wurde auch bei oralen Karzinomen nachgewiesen (Ozawa et al. 2006, 2009; Ito et al. 2010, Hata 2012). Im Gegensatz dazu wird CXCL14 bei Mammakarzinomen mit der Entstehung und Progression assoziiert. Eine hohe Genexpression korreliert zudem mit einer frühzeitigen Entwicklung von Metastasen bei Brustkrebspatienten (Chiu et al. 2008). Die Motilität von Mammakarzinomzellen wird durch CXCL14 begünstigt, da es die Freisetzung von Calcium ins Zytosol induzieren kann (Pelicano et al. 2009). Dieser progressiven Rolle von CXCL14 widerspricht eine jüngere Mammakarzinomen-Studie, in deren Ergebnis CXCL14 erstmals als Negativ-Regulator für Tumorwachstum und Metastasierung beschrieben wird (Gu et al. 2012).

In Pankreastumoren scheint CXCL14 die Invasivität der Zellen durch Aktivierung des NF- κ B-Signalweges zu erhöhen (Wente et al. 2008).

Weiterhin wird CXCL14 in Tumorgewebe umgebenden Normalgewebe vermindert exprimiert (Frederick et al. 2000), so dass sich die Frage nach einer regulierenden Rolle von CXCL14 bei der lokalen Tumordinvasion stellt. Eine Hochregulation von CXCL14 mRNA in inflammatorischen Zellen in der Mikroumgebung verschiedener maligner Tumoren wurde beobachtet, sowie eine CXCL14 mRNA-Expression in Fibroblasten in stromalen Tumorregionen (Schwarze et al. 2005).

Zahlreiche Analysen deuten darauf hin, dass CXCL14 keinen chemotaktischen Einfluss auf ruhende Granulozyten, Monozyten, sowie B- und T-Zellen hat (Hromas et al. 1999). In aktivierten Monozyten (Sleeman et al. 2000, Kurth et al. 2001) und unreifen Dendritischen Zellen (DC) (Shellenberger et al. 2004, Shurin et al. 2005), aber auch aktivierten NK-Zellen (natürliche Killerzellen) (Starnes et al. 2006) führt CXCL14 jedoch zu einer erhöhten Chemotaxis. Ein Einfluss auf die Proliferation oder zytotoxische Aktivität von normalen NK-Zellen durch CXCL14 konnte nicht nachgewiesen werden (Starnes et al. 2006). Starnes et al. postulierten, dass

CXCL14 eine wichtige Rolle bei der Anlockung von NK-Zellen an Orte übernimmt, an denen entzündliche Prozesse oder maligne Transformationen ablaufen. Eine verminderte CXCL14-Expression durch maligne Zellen könnte eine Infiltration von aktivierten NK-Zellen und in der Folge eine Restriktion des Tumorzellklons verhindern (Frederick et al. 2000, Hromas et al. 1999, Sleeman et al. 2000, Cao et al. 2000).

Eine „außer Kraft gesetzte“ CXCL14-Expression in Tumorzellen könnte dem Tumor somit einen selektiven Vorteil *in vivo* geben. Derartige Modelle zeigten eine CXCL14-Funktion als potenter Inhibitor bei der Neovaskularisierung. Hingegen führt ein Verlust der CXCL14-Expression zu einer erhöhten Neoangiogenese des Tumors (Shellenberger et al. 2004). Dies führt zu der Hypothese, dass ein Verlust der CXCL14-Expression in Tumoren immunologische Tumor-Interaktionen bzw. Tumor-Escape-Mechanismen fördert.

Zum Verständnis der pleiotropen Funktion von CXCL14 ist die eindeutige Identifikation der Rezeptorselektivität von essenzieller Bedeutung. Ein weiterer wertvoller Schritt ist die Kenntniss von Molekülen, die auf das Chemokin CXCL14 aktivierend oder inhibierend wirken. Über Aktivatoren und Inhibitoren von CXCL14 besteht die Möglichkeit, Tumor-spezifische Einsichten in ihre Escape-Mechanismen über eine differenzielle CXCL14-Expression mit nachfolgender Modulation der immunologischen Zellen zu erhalten. Diese Erkenntnisse könnten in *in vivo* Modellen dazu beitragen, das Wachstum und die Invasivität von Tumorzellen zu vermindern oder zu unterdrücken.

6. Zusammenfassung

Unsere Arbeitsgruppe konnte mittels Mikroarray-Analyse 38 Gene identifizieren, die in EFT im Vergleich zum Normalgewebe differenziell reguliert sind. Eines dieser Gene ist die membrangebundene Phospholipase A1 Beta aus der Familie der Lipasen (LIPI).

Die Lipase I konnte als *Cancer/Testis*-Antigen (CTA) identifiziert werden, da sie vornehmlich auf Tumorzellen und im Hoden sowie der Schilddrüse exprimiert wird, insbesondere in Tumoren der Familie der Ewing-Sarkome.

Aufgrund der stringenten Expression von LIPI wurde die LIPI-Expression in verschiedenen Tumor-Zelllinien und Primärtumoren untersucht, um der Fragestellung nachzugehen, ob LIPI, neben EWS-FLI1, als weiterer möglicher diagnostischer Marker zum Nachweis von Ewing-Sarkomen von Nutzen sein könnte. Die gewonnenen Daten wiesen auf die Möglichkeit hin, dass LIPI ein interessantes Gen für die Diagnosestellung darstellt, insbesondere in Fällen bei denen Ergebnisse aus der EWS-FLI1-PCR unklar sind trotz typischer Histologie und immunologischem Phänotyps.

LIPI ist auf Chromosom 21 in unmittelbarer Nähe und transkriptioneller Kopf-an-Kopf-Orientierung mit einem anderen Gen, RBM11, welches in EFT ebenfalls in starkem Maße exprimiert wird, lokalisiert. Dies führte zu der Überlegung, dass beide Gene ko-reguliert sein könnten.

RBM11 gehört zu einer großen, neuen Gen-Familie von RNA-Bindemotiven, von denen bekannt ist, dass sie in Prozesse der RNA-Prozessierung und posttranskriptionellen Regulation involviert sind. Für einige Mitglieder der RBM-Familie konnte bisher gezeigt werden, dass sie eine wichtige Rolle in der Apoptose-Regulation spielen. Das Expressionsprofil von RBM11 in verschiedenen Geweben und Zelllinien wurde analysiert. Im Gegensatz zur LIPI wird RBM11 in den meisten Geweben und Zelllinien moderat exprimiert.

Zur näheren Charakterisierung der Funktion von RBM11 in EFT wurde die Expression von RBM11 mittels RNA-Interferenz über spezifische siRNA in EFT-Zellen herunterreguliert. Das Genexpressionsprofil dieser Zellen wurde mittels Affymetrix HG-U133Plus 2.0 Mikroarrays analysiert und die differenziell regulierten Gene über quantitative RT-PCR validiert. Die Daten zeigten, dass RBM11 verschiedene Gene reguliert, die eine Rolle beim Tumorwachstum, Metastasierung oder neuronaler Differenzierung spielen. Ansatzweise konnte dies auch durch RNA-

Interferenz von RBM11 mittels miRNAs zur Untersuchung von Langzeiteffekten auf EFT-Zellen bestätigt werden.

Eines dieser Gene war CXCL14, ein Chemokin, welches das Wachstum von humanen Tumorzellen inhibieren kann. In CXCL14 behandelten gemischten Lymphozyten/Ewing-Sarkomzell-Kulturen konnte gezeigt werden, dass es bei ansteigender Dosis zum Zelltod der Ewing-Sarkomzellen kam. Die Untersuchung der Zellkulturüberstände ergab, dass es simultan zu ansteigenden Konzentrationen der Zytokine IFN- γ und TNF- α mit zunehmender CXCL14-Konzentration kam. Basierend auf diesen Ergebnissen könnte CXCL14 eine entscheidende Rolle bei der therapeutischen Behandlung von Tumoren zukommen.

Die Analyse der molekularen Evolution von LIPI und ihrer verwandten LIPH sowie RBM11 war ein anderer Aspekt dieser Arbeit. Die hohe Homologie der LIPI und der Phospholipase A1 Alpha (LIPH) deutete darauf hin, dass beide Gene aus einem Vorläufer-Gen durch Duplikation hervorgegangen sind. Im Gegensatz zur LIPI wurde LIPH in moderatem bis starkem Maße in verschiedenen Geweben und Zelllinien exprimiert. Nur in Mammalia wurden bis zum heutigen Zeitpunkt LIPI-Sequenzen identifiziert. Basierend auf der hoch konservierten genomischen Organisation von LIPI und LIPH führten die Untersuchungen zur Identifikation von beiden Lipasen in Fischen und Vögeln. In allen Vertebraten liegt der LIPI-Lokus in direkter Nachbarschaft zu einem Mitglied der Familie von RNA-Bindemotiven (RBM). In Fischen könnte das Gen RBM als Vorläufer der Gene RBM7 und RBM11 in höheren Vertebraten gelten. Weiterhin ergaben Homologie-Vergleiche, dass LIPI und LIPH eine höhere Sequenz-Homologie in Spezies der Nicht-Mammalia als in Mammalia aufwiesen. Zusätzlich zeigten die Untersuchungen eine breite Expression der LIPI der Vögel in verschiedenen Geweben, analog zum Expressionsprofil der humanen LIPH. Die Daten deuteten darauf hin, dass LIPI nur in Spezies der Mammalia ein CTA darstellt und die Sequenz-Merkmale des LIPI/RBM11-Lokus zusammen mit dem CTA-entsprechendem Expressionsmuster der LIPI entstanden sind.

7. Literaturverzeichnis

- Adinolfi S, Bagni C, Castiglione Morelli MA, Fraternali F, Musco G, Pastore A: *Novel RNA-binding motif: the KH module*. Biopolymers, 1999;**51**:153-64.
- Ahrens S, Hoffmann C, Jabar S, Braun-Munzinger G, Paulussen M, Dunst J, Rube C, Winkelmann W, Heinecke A, Göbel U, Winkler K, Harms D, Treuner J, Jürgens H: *Evaluation of prognostic factors in a tumor volume-adapted treatment strategy for localized Ewing sarcoma of bone: the CESS 86 experience. Cooperative Ewing Sarcoma Study*. Med Pediatr Oncol, 1999;**32**:186-95.
- Ali G, Chishti MS, Raza SI, John P, Ahmad W: *A mutation in the lipase H (LIPH) gene underlie autosomal recessive hypotrichosis*. Hum Genet, 2007;**121**:319-25.
- Allinen M, Beroukhi R, Cai L, Brennan C, Lahti-Domenici J, Huang H, Porter D, Hu M, Chin L, Richardson A, Schnitt S, Sellers WR, Polyak K: *Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer*. Cancer Cell, 2004;**6**:17-32.
- Ambros IM, Ambros PF, Strehl S, Kovar H, Gardner H, Salzer-Kuntschik M: *MIC2 is a specific marker for Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. Evidence for a common histogenesis of Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors from MIC2 expression and specific chromosome aberration*. Cancer, 1991;**67**:1886-93.
- Ambros V: *microRNAs: tiny regulators with great potential*. Cell, 2001;**107**:823-6.
- Annilo T, Dean M: *Degeneration of an ATP-binding cassette transporter gene, ABCC13, in different mammalian lineages*. Genomics, 2004;**84**:34-46.
- Aoki J, Inoue A, Makide K, Saiki N, Arai H. *Structure and function of extracellular phospholipase A1 belonging to the pancreatic lipase gene family*. Biochemie, 2007;**89**:197-204.
- Atanackovic D, Arfsten J, Cao Y, Gnjatic S, Schnieders F, Bartels K, Schilling G, Faltz C, Wolschke C, Dierlamm J, Ritter G, Eiermann T, Hossfeld DK, Zander AR, Jungbluth AA, Old LJ, Bokemeyer C, Kröger N: *Cancer-testis antigens are commonly expressed in multiple myeloma and induce systemic immunity following allogeneic stem cell transplantation*. Blood, 2007;**109**:1103-12.
- Aubert C, Rouge F, Galindo JR: *Tumorigenicity of human malignant melanocytes in nude mice in relation to their differentiation in vitro*. J Natl Cancer Inst, 1980;**64**:1029-40.
- Augsten M, Hägglöf C, Olsson E, Stolz C, Tsagozis P, Levchenko T, Frederick MJ, Borg A, Micke P, Egevad L, Ostman A: *CXCL14 is an autocrine growth factor for fibroblasts and acts as a multi-modal stimulator of prostate tumor growth*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009;**106**:3414-9.
- Bacci G, Ferrari S, Longhi A, Rimondini S, Versari M, Zanone A, Forni C: *Prognostic significance of serum LDH in Ewing's sarcoma of bone*. Oncol Rep, 1999;**6**:807-11.
- Bacci G, Ferrari S, Mercuri M, Longhi A, Giacomini S, Forni C, Bertoni F, Manfrini M, Barbieri E, Lari S, Donati D: *Multimodal therapy for the treatment of nonmetastatic Ewing sarcoma of pelvis*. J Pediatr Hematol Oncol, 2003;**25**:118-24.
- Baggiolini M: *Chemokines and leukocyte traffic*. Nature, 1998;**392**:565-8.
- Baggiolini M, Dewald B, Moser B: *Human chemokines: an update*. Annu Rev Immunol, 1997;**15**:675-705.

- Baggiolini M: *Chemokines in pathology and medicine*. J Intern Med, 2001;**250**:91-104.
- Balkwill, F: *Cancer and the chemokine network*. Nat Rev Cancer, 2004;**4**:540-50.
- Bartel, DP: *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004;**116**:281.
- Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison CL, Ehlert JE, Burdick MD, Strieter RM: *CXC chemokines in angiogenesis*. J Leukoc Biol, 2000;**68**:1-8.
- Bernstein M, Kovar H, Paulussen M, Randall RL, Schuck A, Teot LA, Juergens H: *Ewing's sarcoma family of tumors: current management*. Oncologist, 2006;**11**:503-19.
- Biedler JL, Helson L, Spengler BA: Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. Cancer Res, 1973;**33**:2643-52.
- Birney E, Kumar S, Krainer AR: *Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors*. Nucleic Acids Res, 1993;**21**:5803-16.
- Bloom, ET: *Further definition by cytotoxicity tests of cell surface antigens of human sarcomas in culture*. Cancer Res, 1972;**32**:960-7.
- Bohnsack MT, Czapinski K, Gorlich D: *Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs*. RNA, 2004;**10**:185-91.
- Botma GJ, Heuveling M, Lamers JM, Jansen H, Verhoeven AJ: *Cloning, expression, and promoter analysis of hepatic lipase derived from human hyperplastic adrenals: evidence for alternative mRNA splicing*. Cell Biochem Biophys, 2007;**47**:149-18.
- Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP: *A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995;**92**:7297-301.
- Brunner S, Fürtbauer E, Sauer T, Kursa M, Wagner E: *Overcoming the nuclear barrier: cell cycle independent nonviral gene transfer with linear polyethylenimine or electroporation*. Mol Ther, 2002;**5**:80-6.
- Burd CG, Dreyfuss G: *Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins*. Science, 1994;**265**:615-21.
- Burdach S, Jürgens H: *High-dose chemoradiotherapy (HDC) in the Ewing family of tumors (EFT)*. Crit Rev Oncol Hematol, 2002;**41**:169-89.
- Burdach S, Meyer-Bahlburg A, Laws HJ, Haase R, van Kaik B, Metzner B, Wawer A, Finke R, Göbel U, Haerting J, Pape H, Gadner H, Dunst J, Juergens H: *High-dose therapy for patients with primary multifocal and early relapsed Ewing's tumors: results of two consecutive regimens assessing the role of total-body irradiation*. J Clin Oncol, 2003;**21**:3072-8.
- Burdach S: *Treatment of advanced Ewing tumors by combined radiochemotherapy and engineered cellular transplants*. Pediatr Transplant, 2004;**8**:67-82.
- Cangir A, Vietti TJ, Gehan EA, Burgert EO Jr, Thomas P, Tefft M, Nesbit ME, Kissane J, Pritchard D: *Ewing's sarcoma metastatic at diagnosis: Results and comparison of two intergroup Ewing's sarcoma studies*. Cancer, 1990;**66**:887-893.
- Campanacci M, Mercuri M, Gasbarrini A, Campanacci L: *The value of imaging in the diagnosis and treatment of bone tumors*. Eur J Radiol, 1998;**27**:116-22.
- Cao X, Zhang W, Wan T, He L, Chen T, Yuan Z, Ma S, Yu Y, Chen G: *Molecular cloning and characterization of a novel CXC chemokine macrophage inflammatory protein-2 gamma chemoattractant for human neutrophils and dendritic cells*. J Immunol, 2000;**165**:2588-95.

- Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, Zamecnik PC, Wolf DE: *Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988;**85**:8790-4.
- Chiu SH, Chen CC, Lin TH: *Using support vector regression to model the correlation between the clinical metastases time and gene expression profile for breast cancer*. Artif Intell Med, 2008;**44**:221-31.
- Chudnovsky Y, Khavari PA, Adams AE: *Melanoma genetics and the development of rational therapeutics*. J Clin Invest, 2005;**115**:813-24.
- Clark J, Benjamin H, Gill S, Sidhar S, Goodwin G, Crew J, Gusterson BA, Shipley J, Cooper CS: *Fusion of the EWS gene to CHN, a member of the steroid/thyroid receptor gene superfamily, in a human myxoid chondrosarcoma*. Oncogene, 1996;**12**:229-35.
- Cotterill SJ, Ahrens S, Paulussen M, Jürgens HF, Voûte PA, Gardner H, Craft AW: *Prognostic factors in Ewing's tumor of bone: analysis of 975 patients from the European Intergroup Cooperative Ewing's Sarcoma Study Group*. J Clin Oncol, 2000;**18**:3108-14.
- Cullen BR: *Transcription and processing of human microRNA precursors*. Mol Cell, 2004;**16**:861.
- Dagher R, Pham TA, Sorbara L, Kumar S, Long L, Bernstein D, Mackall C, Raffeld M, Tsokos M, Helman L: *Molecular confirmation of Ewing sarcoma*. J Pediatr Hematol Oncol, 2001;**23**:221-4.
- de Alava E und Gerald WL: *Molecular biology of the Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor family*. J Clin Oncol, 2000;**18**:204-13.
- Delattre O, Zucman J, Melot T, Garau XS, Zucker JM, Lenoir GM, Ambros PF, Sheer D, Turc-Carel C, Triche TJ, et al: *The Ewing family of tumors--a subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts*. N Engl J Med, 1994;**331**:294-9.
- Delattre O, Zucman J, Plougastel B, Desmaze C, Melot T, Peter M, Kovar H, Joubert I, de Jong P, Rouleau G, et al: *Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours*. Nature, 1992;**359**:162-5.
- Dick T, Staeger MS, Reichmann G, Reske-Kunz AB: *Manifestation of the MHC-unrestricted killing potential of a cytotoxic T cell clone requires activation in response to MHC-restricted self-presentation of antigen*. J Immunol, 1993;**150**:2575-83.
- Diehl V, Kirchner HH, Schaadt M, Fonatsch C, Stein H, Gerdes J, Boie C: *Hodgkin's disease: establishment and characterization of four in vitro cell lines*. J Cancer Res Clin Oncol, 1981;**101**:111-24.
- Dockhorn-Dworniczak B, Schäfer KL, Dantcheva R, Blasius S, Winkelmann W, Strehl S, Burdach S, van Valen F, Jürgens H, Böcker W: *Diagnostic value of the molecular genetic detection of the t(11;22) translocation in Ewing's tumours*. Virchows Arch, 1994;**425**:107-12.
- Drexler HG, Gaedicke G, Lok MS, Diehl V, Minowada J: *Hodgkin's disease derived cell lines HDLM-2 and L-428: comparison of morphology, immunological and isoenzyme profiles*. Leuk Res, 1986;**10**:487-500.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T: *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*. Nature, 2001;**411**:494-8.
- Elhames H, Bertrand JR, Maccario J, Maksimenko A, Malvy C. *Antitumor vectorized oligonucleotides in a model of ewing sarcoma: unexpected role of nanoparticles*. Oligonucleotides, 2009;**19**:255-264.

- Elkabetz Y, Panagiotakos G, Al Shamy G, Socci ND, Tabar V, Studer L: Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage. *Genes Dev*, 2008;**22**:152-65.
- Enneking WF: *A system of staging musculoskeletal neoplasms*. *Clin Orthop Relat Res*, 1986;**204**:9-24.
- Ewing J: Diffuse endothelioma of bone. *Proc NY Pathol Soc*, 1921;**21**:17-24.
- Ewing J: *Further report of endothelial myeloma of bone*. *Proc NY Pathol Soc*, 1924;**24**:93-100.
- Ewing J: *A review of classification of bone tumors*. *Surg Gynecol Obstet*, 1939;**68**:971-976.
- Findley HW Jr, Cooper MD, Kim TH, Alvarado C, Ragab AH: *Two new acute lymphoblastic leukemia cell lines with early B-cell phenotypes*. *Blood*, 1982;**60**:1305-9.
- Foell JL, Hesse M, Volkmer I, Schmiedel BJ, Neumann I, Staeger MS: *Membrane-associated phospholipase A1 beta (LIPI) is an Ewing tumour-associated cancer/testis antigen*. *Pediatr Blood Cancer*, 2008;**51**:228-34.
- Foukakis T, Gusnanto A, Au AY, Höög A, Lui WO, Larsson C, Wallin G, Zedenius J: *A PCR-based expression signature of malignancy in follicular thyroid tumors*. *Endocr Relat Cancer*, 2007;**14**:381-91.
- Franzius C, Sciuk J, Daldrup-Link HE, Jürgens H, Schober O: *FDG-PET for detection of osseous metastases from malignant primary bone tumours: comparison with bone scintigraphy*. *Eur J Nucl Med*, 2000;**27**:1305-11.
- Frederick MJ, Henderson Y, Xu X, Deavers MT, Sahin AA, Wu H, Lewis DE, El-Naggar AK, Clayman GL: *In vivo expression of the novel CXC chemokine BRAK in normal and cancerous human tissue*. *Am J Pathol*, 2000;**156**:1937-50.
- Fröhlich B, Ahrens S, Burdach S, Klingebiel T, Ladenstein R, Paulussen M, Zoubek A, Jürgens H: *Hochdosistherapie bei primär metastasiertem und rezidiviertem Ewing-Sarkom*. *Klin Padiatr*, 1999;**211**:284-90.
- Fukuhara S, Sako K, Minami T, Noda K, Kim HZ, Kodama T, Shibuya M, Takakura N, Koh GY, Mochizuki N: *Differential function of Tie2 at cell-cell contacts and cell-substratum contacts regulated by angiopoietin-1*. *Nat Cell Biol*, 2008;**10**:513-26.
- Gale LM, McColl SR: *Chemokines: extracellular messengers for all occasions?* *Bioessays*, 1999;**21**:17-28.
- Gerlier D, Thomasset N: *Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation*. *J Immunol Methods*, 1986;**94**:57-63.
- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP: *In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors*. *J Natl Cancer Inst*, 1973;**51**:1417-23.
- Gibson TJ, Thompson JD, Heringa J: *The KH domain occurs in a diverse set of RNA-binding proteins that include the antiterminator NusA and is probably involved in binding to nucleic acid*. *FEBS Lett*, 1993;**324**:361-6.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R: *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. *J Gen Virol*, 1977;**36**:59-74.
- Gu XL, Ou ZL, Lin FJ, Yang XL, Luo JM, Shen ZZ, Shao ZM: *Expression of CXCL14 and its anticancer role in breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 2012;**135**:725-35.
- Guo TB, Boros LG, Chan KC, Hikim AP, Hudson AP, Swerdloff RS, Mitchell AP, Salameh WA: *Spermatogenic expression of RNA-binding motif protein 7, a protein that interacts with splicing factors*. *J Androl*, 2003;**24**:204-14.

- Hatta R: A New Strategy to Find Targets for Anticancer Therapy: *Chemokine CXCL14/BRAK Is a Multifunctional Tumor Suppressor for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*. ISRN Otolaryngol, 2012;**2012**:797619.
- Hattinger CM, Pötschger U, Tarkkanen M, Squire J, Zielenska M, Kiuru-Kuhlefelt S, Kager L, Thorner P, Knuutila S, Niggli FK, Ambros PF, Gardner H, Betts DR: *Prognostic impact of chromosomal aberrations in Ewing tumours*. Br J Cancer, 2002;**86**:1763-9.
- Hattinger CM, Zoubek A, Ambros PF: *Molecular Cytogenetics in Ewing Tumors: Diagnostic and Prognostic Information*. Onkologie, 2000;**23**:416-422.
- Hellgren I, Sylven C, Magnusson Y: *Study of the beta1 adrenergic receptor expression in human tissues: immunological approach*. Biol Pharm Bull, 2000;**23**:700-3.
- Hense HW, Ahrens S, Paulussen M, Lehnert M, Jürgens H: *Factors associated with tumor volume and primary metastases in Ewing tumors: results from the (E)CESS studies*. Ann Oncol, 1999;**10**:1073-7.
- Hesse M, Willscher E, Schmiedel BJ, Posch S, Golbik RP, Staeger MS: *Sequence and expression of the chicken membrane-associated phospholipases A1 alpha (LIPH) and beta (LIPI)*. Mol Biol Rep, 2011;**39**:761-9.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R: *Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions*. Biotechnology (N Y), 1993;**11**:1026-30.
- Hiramatsu T, Sonoda H, Takanezawa Y, Morikawa R, Ishida M, Kasahara K, Sanai Y, Taguchi R, Aoki J, Arai H: *Biochemical and molecular characterization of two phosphatidic acid-selective phospholipase A1s, mPA-PLA1alpha and mPA-PLA1beta*. J Biol Chem, 2003;**278**:49438-47.
- Hoennscheidt C, Max D, Richter N, Staeger MS: *Expression of CD4 on Epstein-Barr virus-immortalized B cells*. Scand J Immunol, 2009;**70**:216-25.
- Hofbauer S, Hamilton G, Theyer G, Wollmann K, Gabor F: *Insulin-like growth factor-I-dependent growth and in vitro chemosensitivity of Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumour cell lines*. Eur J Cancer, 1993;**29A**:241-5.
- Hromas R, Broxmeyer HE, Kim C, Nakshatri H, Christopherson K 2nd, Azam M, Hou YH: *Cloning of BRAK, a novel divergent CXC chemokine preferentially expressed in normal versus malignant cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1999;**255**:703-6.
- Hurwitz R, Hozier J, LeBien T, Minowada J, Gajl-Peczalska K, Kubonishi I, Kersey J: *Characterization of a leukemic cell line of the pre-B phenotype*. Int J Cancer, 1979;**23**:174-80.
- Hühn R, Staeger MS, Hesse M, Liebig B, Burdach SE: *Cleavage of the Ewing tumour-specific EWSR1-FLI1 mRNA by hammerhead ribozymes*. Anticancer Res, 2009;**29**:1901-8.
- Ito S, Ozawa S, Ikoma T, Yajima N, Kiyono T, Hata R: *Expression of a chemokine BRAK/CXCL14 in oral floor carcinoma cells reduces the settlement rate of the cells and suppresses their proliferation in vivo*. Biomed Res, 2010;**31**:199-206.
- Jaffe N, Paed D, Traggis D, Salian S, Cassady JR: *Improved outlook for Ewing's sarcoma with combination chemotherapy (vincristine, actinomycin D and cyclophosphamide) and radiation therapy*. Cancer, 1976;**38**:1925-30.
- Jain S, Watson MA, DeBenedetti MK, Hiraki Y, Moley JF, Milbrandt J: *Expression profiles provide insights into early malignant potential and skeletal abnormalities in multiple endocrine neoplasia type 2B syndrome tumors*. Cancer Res, 2004;**64**:3907-13.

- Janeway C: *Immunobiology: the immune system in health and disease*. 2005. New York, Garland Science.
- Jansen B, Schlagbauer-Wadl H, Kahr H, Heere-Ress E, Mayer BX, Eichler H, Pehamberger H, Gana-Weisz M, Ben-David E, Kloog Y, Wolff K: *Novel Ras antagonist blocks human melanoma growth*. Proc Natl Acad Sci USA, 1999;**96**:14019-24.
- Jeon IS, Davis JN, Braun BS, Sublett JE, Roussel MF, Denny CT, Shapiro DN: *A variant Ewing's sarcoma translocation (7;22) fuses the EWS gene to the ETS gene ETV1*. Oncogene, 1995;**10**:1229-34.
- Johnson LA, Clasper S, Holt AP, Lalor PF, Baban D, Jackson DG: *An inflammation-induced mechanism for leukocyte transmigration across lymphatic vessel endothelium*. J Exp Med, 2006;**203**:2763-77.
- Jürgens H, Ahrens S, Bielack S, et al: *Trends in local therapy of Ewing tumours: the (E)CESS experience*. Med Pediatr Oncol, 1998;**31**:204.
- Kamesaki H, Fukuhara S, Tatsumi E, Uchino H, Yamabe H, Miwa H, Shirakawa S, Hatanaka M, Honjo T: *Cytochemical, immunologic, chromosomal, and molecular genetic analysis of a novel cell line derived from Hodgkin's disease*. Blood, 1986;**68**:285-92.
- Kaufman DL, Evans GA: *Restriction endonuclease cleavage at the termini of PCR products*. Biotechniques, 1990;**9**:304-305.
- Kazantseva A, Goltsov A, Zinchenko R, Grigorenko AP, Abrukova AV, Moliaka YK, Kirillov AG, Guo Z, Lyle S, Ginter EK, Rogaev EI: *Human hair growth deficiency is linked to a genetic defect in the phospholipase gene LIPH*. Science, 2006;**314**:982-5.
- Kempkes B, Pawlita M, Zimber-Strobl U, Eissner G, Laux G, Bornkamm GW: *Epstein-Barr virus nuclear antigen 2-estrogen receptor fusion proteins transactivate viral and cellular genes and interact with RBP-J kappa in a conditional fashion*. Virology, 1995;**214**:675-9.
- Kiledjian M, Dreyfuss G: *Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box*. Embo J, 1992;**11**:2655-64.
- Kenan DJ, Query CC, Keene JD: *RNA recognition: towards identifying determinants of specificity*. Trends Biochem Sci, 1991;**16**:214-20.
- Komori R, Ozawa S, Kato Y, Shinji H, Kimoto S, Hata R: *Functional characterization of proximal promoter of gene for human BRAK/CXCL14, a tumor-suppressing chemokine*. Biomed Res, 2010;**31**:123-31.
- Kovar H: *Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors after their genetic union*. Curr Opin Oncol, 1998;**10**:334-42.
- Kovar H: *E1A and the Ewing tumor translocation*. Nat Med, 1999;**5**:1331.
- Kovar H: *Ewing tumor biology: perspectives for innovative treatment approaches*. Adv Exp Med Biol, 2003;**532**:27-37.
- Kurth I, Willmann K, Schaerli P, Hunziker T, Clark-Lewis I, Moser B: *Monocyte selectivity and tissue localization suggests a role for breast and kidney-expressed chemokine (BRAK) in macrophage development*. J Exp Med, 2001;**194**:855-61.
- Ladenstein U, Pötschger U, Le Deley MC, Whelan J, Paulussen M, Oberlin O, van den Berg H, Dirksen U, Hjorth L, Michon J, Lewis I, Craft A, Jürgens H: *Primary disseminated multifocal Ewing sarcoma: results of the Euro-EWING 99 trial*. J Clin Oncol, 2010;**28**:3284-3291.
- Lambert G, Bertrand JR, Fattal E, Subra F, Pinto-Alphandary H, Malvy C, Auclair C, Couvreur P: *EWS fli-1 antisense nanocapsules inhibits ewing sarcoma-related tumor in mice*. Biochem Biophys Res Commun, 2000;**279**:401-6.

- Larsson Forsell PK, Kennedy BP, Claesson HE. The human calciumindependent phospholipase A2 gene multiple enzymes with distinct properties from a single gene. *Eur J Biochem*, 1999;**262**:575-85.
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN: *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. *EMBO J*, 2004;**23**:4051-60.
- Lehman IR: *DNA ligase: structure, mechanism, and function*. *Science*, 1974;**186**:790-7.
- Li W, Blankman JL, Cravatt BF. *A functional proteomic strategy to discover inhibitors for uncharacterized hydrolases*. *J Am Chem Soc*, 2007;**129**:9594-5.
- Livak KJ, Schmittgen TD: *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Method*, 2001;**25**:402-408.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE: *Molekulare Zellbiologie*. 2. Auflage. 2001, Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag.
- Lu J, Li J, Ji C, Yu W, Xu Z, Huang S: *Expression of lipoprotein lipase associated with lung adenocarcinoma tissues*. *Mol Biol Rep*, 2008;**35**:59-63.
- Mackall CL, Rhee EH, Read EJ, Khoo HM, Leitman SF, Bernstein D, Tesso M, Long LM, Grindler D, Merino M, Kopp W, Tsokos M, Berzofsky JA, Helman LJ: *A pilot study of consolidative immunotherapy in patients with high-risk pediatric sarcomas*. *Clin Cancer Res*, 2008;**14**:4850-8.
- Manival X, Ghisolfi-Nieto L, Joseph G, Bouvet P, Erard M: *RNA-binding strategies common to cold-shock domain- and RNA recognition motif-containing proteins*. *Nucleic Acids Res*, 2001;**29**:2223-33.
- Marini P, MacLeod RA, Treuner C, Bruchelt G, Böhm W, Wolburg H, Schweizer P, Girgert R: *SiMa, a new neuroblastoma cell line combining poor prognostic cytogenetic markers with high adrenergic differentiation*. *Cancer Genet Cytogenet*, 1999;**112**:161-4.
- Mateo-Lozano S, Gokhale PC, Soldatenkov VA, Dritschilo A, Tirado OM, Notario V: *Combined transcriptional and translational targeting of EWS/FLI-1 in Ewing's sarcoma*. *Clin Cancer Res*, 2006;**12**:6781-90.
- Matsumoto Y, Tanaka K, Nakatani F, Matsunobu T, Matsuda S, Iwamoto Y: *Downregulation and forced expression of EWS-Fli1 fusion gene results in changes in the expression of G(1)regulatory genes*. *Br J Cancer*, 2001;**84**:768-775.
- McAllister RM, Isaacs H, Rongey R, Peer M, Au W, Soukup SW, Gardner, MB: *Establishment of a human medulloblastoma cell line*. *Int J Cancer*, 1977;**20**:206-12.
- McColl SR: *Chemokines and dendritic cells: a crucial alliance*. *Immunol Cell Biol*, 2002;**80**:489-96.
- McKinnon CM, Lygoe KA, Skelton L, Mitter R, Mellor H: *The atypical Rho GTPase RhoBTB2 is required for expression of the chemokine CXCL14 in normal and cancerous epithelial cells*. *Oncogene*, 2008;**27**:6856-65.
- Mendenhall CM, Marcus RB Jr, Enneking WF, Springfield DS, Thar TL, Million RR: *The prognostic significance of soft tissue extension in Ewing's sarcoma*. *Cancer*, 1983;**51**:913-917.
- Merchant TE, Kushner BH, Sheldon JM, LaQuaglia M, Healey JH: *Effect of low-dose radiation therapy when combined with surgical resection for Ewing's sarcoma*. *Med Pediatr Oncol*, 1999;**33**:65-70.
- Merdan T, Kunath K, Fischer D, Kopecek J, Kissel T: *Intracellular processing of poly(ethylene imine)/ribozyme complexes can be observed in living cells by*

- using confocal laser scanning microscopy and inhibitor experiments.* Pharm Res, 2002;**19**:140-6.
- Miyagawa Y, Okita H, Nakajima H, Horiuchi Y, Sato B, Taguchi T, Toyoda M, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata J, Umezawa A, Kiyokawa N: *Inducible expression of chimeric EWS/ETS proteins confers Ewing's family tumor-like phenotypes to human mesenchymal progenitor cells.* Mol Cell Biol, 2008;**28**:2125-37.
- Moolenaar WH, van Meeteren LA, Giepmans BN: *The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling.* Bioessays, 2004;**26**:870-81.
- Mosmann T: *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.* J Immunol Methods, 1983;**65**:55-63.
- Mudge JM, Jackson MS: *Evolutionary implications of pericentromeric gene expression in humans.* Cytogenet Genome Res, 2005;**108**:47-57.
- Mülhardt C: *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics.* 2002. Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag.
- Nagai K, Oubridge C, Jessen TH, Li J, Evans PR: *Crystal structure of the RNA-binding domain of the U1 small nuclear ribonucleoprotein A.* Nature, 1990;**348**:515-20.
- Nagai Y, Aoki J, Sato T, Amano K, Matsuda Y, Arai H, Inoue K: *An alternative splicing form of phosphatidylserine-specific phospholipase A1 that exhibits lysophosphatidylserine-specific lysophospholipase activity in humans.* J Biol Chem, 1999;**274**:11053-9.
- Needleman SB, Wunsch CD: *A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins.* J Mol Biol, 1970;**48**:443-53.
- Negus RP, Stamp GW, Hadley J, Balkwill FR: *Quantitative assessment of the leukocyte infiltrate in ovarian cancer and its relationship to the expression of C-C chemokines.* Am J Pathol, 1997;**150**:1723-34.
- Nilbert M, Saeter G, Elomaa I, Monge OR, Wiebe T, Alvegård TA: *Ewing's sarcoma treatment in Scandinavia 1984 - 1990: ten years results of the Scandinavian Sarcoma Group Protocol SSGIV.* Acta Oncol, 1998;**37**:375-8.
- Oberlin O, Deley MC, Bui BN, Gentet JC, Philip T, Terrier P, Carrie C, Mechinaud F, Schmitt C, Babin-Boilletot A, Michon J; French Society of Paediatric Oncology: *Prognostic factors in localized Ewing's tumours and peripheral neuroectodermal tumours: the third study of the French Society of Paediatric Oncology (EW88 study).* Br J Cancer, 2001;**85**:1646-54.
- Ormo M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY, Remington SJ: *Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein.* Science, 1996;**273**:1392.
- O'Regan S, Diebler MF, Meunier FM, Vyas S: *A Ewing's sarcoma cell line showing some, but not all, of the traits of a cholinergic neuron.* J Neurochem, 1995;**64**:69-76.
- Ouchida M, Ohno T, Fujimura Y, Rao VN, Reddy ES. *Loss of tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells expressing antisense RNA to EWS-fusion transcripts.* Oncogene, 1995;**11**:1049-54.
- Ozawa S, Kato Y, Komori R, Maehata Y, Kubota E, Hata R: *BRAK/CXCL14 expression suppresses tumor growth in vivo in human oral carcinoma cells.* Biochem Biophys Res Commun, 2006;**348**:406-12.
- Ozawa S, Kato Y, Kubota E, Hata R: *BRAK/CXCL14 expression in oral carcinoma cells completely suppresses tumor cell xenografts in SCID mouse.* Biomed Res, 2009;**30**:315-8.

- Pajic A, Spitkovsky D, Christoph B, Kempkes B, Schuhmacher M, Staeger MS, Brielmeier M, Ellwart J, Kohlhuber F, Bornkamm GW, Polack A, Eick D: *Cell cycle activation by MYC in a burkitt lymphoma model cell line*. Int J Cancer, 2000;**87**:787-93.
- Pastuszko A, Yee DK, Nelson D, Wilson DF: *Calcium dependent regulation of catecholamine and serotonin metabolism in human neuroblastoma cells*. Cancer Biochem Biophys, 1988;**10**:67-76.
- Paulussen M, Ahrens S, Burdach S, Craft A, Dockhorn-Dworniczak B, Dunst J, Fröhlich B, Winkelmann W, Zoubek A, Jürgens H: *Primary metastatic (stage IV) Ewing tumor: survival analysis of 171 patients from the EICESS studies*. European Intergroup Cooperative Ewing Sarcoma Studies. Ann Oncol, 1998;**9**:275-81.
- Paulussen M, Ahrens S, Braun-Munzinger G, Craft AW, Dockhorn-Dworniczak B, Dörffel W, Dunst J, Fröhlich B, Göbel U, Häussler M, Klingebiel T, Koscielniak E, Mittler U, Rube C, Winkelmann W, Voûte PA, Zoubek A, Jürgens H: *EICESS 92 (European Intergroup of Ewing's Sarcoma Study) preliminary results*. Klin Padiatr, 1999;**211**:276-83.
- Paulussen M, Bielack S, Jürgens H, Casali P.G.: *Ewing's sarcoma of the bone: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2009;**20**:140-142.
- Paulussen M, Craft AW, Lewis I, Hackshaw A, Douglas C, Dunst J, Schuck A, Winkelmann W, Köhler G, Poremba C, Zoubek A, Ladenstein R, van den Berg H, Hunold A, Cassoni A, Spooner D, Grimer R, Whelan J, McTiernan A, Jürgens H; European Intergroup Cooperative Ewing's Sarcoma Study-92: *Results of the EICESS-92 Study: two randomized trials of Ewing's sarcoma treatment--cyclophosphamide compared with ifosfamide in standard-risk patients and assessment of benefit of etoposide added to standard treatment in high-risk patients*. J Clin Oncol, 2008;**26**:4385-93.
- Paulussen M, Fröhlich B, Jürgens H: *Ewing tumour: incidence, prognosis and treatment options*. Paediatr Drugs, 2001a;**3**:899-913.
- Paulussen M, Schuck PC, Winkelmann A, Dunst W, Jürgens J: *Behandlungskonzept des Ewing-Sarkoms*. Der Onkologe, 2001;**7**:428-437.
- Pein F, Hartmann O, Sakiroglu C, Bayle C, Terrier-Lacombe MJ, Valteau-Couanet D, Lumbroso J, Oberlin O, Couanet D, Patte C, et al.: *Research on bone marrow involvement in the diagnosis of solid tumors in children. Methods, results and interpretation*. Arch Pediatr, 1995;**2**:580-8.
- Peirson SN, Butler JN, Foster RG: *Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis*. Nucleic Acids Res, 2003;**31**:73.
- Pelicano H, Lu W, Zhou Y, Zhang W, Chen Z, Hu Y, Huang P: *Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species imbalance promote breast cancer cell motility through a CXCL14-mediated mechanism*. Cancer Res, 2009;**69**:2375-83.
- Peter M, Couturier J, Pacquement H, Michon J, Thomas G, Magdelenat H, Delattre O: *A new member of the ETS family fused to EWS in Ewing tumors*. Oncogene, 1997;**14**:1159-64.
- Peter M, Magdelenat H, Michon J, Melot T, Oberlin O, Zucker JM, Thomas G, Delattre O: *Sensitive detection of occult Ewing's cells by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction*. Br J Cancer, 1995;**72**:96-100.
- Pfeifle C, Reinhardt K, Heins S, Burdach S, Staeger MS: *Development and characterization of HAT-sensitive Ewing tumour cells for immunotherapy*.

- Anticancer Res, 2009;**29**:4489-96.
- Polack A, Hörtnagel K, Pajic A, Christoph B, Baier B, Falk M, Mautner J, Geltinger C, Bornkamm GW, Kempkes B: *C-myc activation renders proliferation of Epstein-Barr virus (EBV)-transformed cells independent of EBV nuclear antigen 2 and latent membrane protein 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996;**93**:10411-6.
- Pomeroy TC, Johnson RE: *Prognostic factors for survival in Ewing's sarcoma*. Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med, 1975;**123**:598-606.
- Rasheed S, Nelson-Rees WA, Toth EM, Arnstein P, Gardner MB: *Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080)*. Cancer, 1974;**33**:1027-33.
- Rhodes DR, Yu J, Shanker K, Deshpande N, Varambally R, Ghosh D, Barrette T, Pandey A, Chinnaiyan AM: *ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform*. Neoplasia, 2004;**6**:1-6.
- Richardson AL, Wang ZC, De Nicolo A, Lu X, Brown M, Miron A, Liao X, Iglehart JD, Livingston DM, Ganesan S: *X chromosomal abnormalities in basal-like human breast cancer*. Cancer Cell, 2006;**9**:121-32.
- Riggi N, Suva` ML, De Vito C, Provero P, Stehle JC, Baumer K, Cironi L, Janiszewska M, Petricevic T, Suva` D, Tercier S, Joseph JM, Guillou L, Stamenkovic I: *EWS-FLI-1 modulates miRNA145 and SOX2 expression to initiate mesenchymal stem cell reprogramming toward Ewing sarcoma cancer stem cells*. Genes Dev, 2010;**24**:916–932.
- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT: *Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction*. Anal Biochem, 1997;**245**:154-60.
- Rodriguez-Galindo C, Spunt SL, Pappo AS: *Treatment of Ewing sarcoma family of tumors: current status and outlook for the future*. Med Pediatr Oncol, 2003;**40**:276-87.
- Roessner A, Jürgens H: *Round cell tumours of bone*. Pathol Res Pract, 1993;**189**:111-36.
- Roessner A, Mellin W, Hiddemann W, Voss B, Vollmer E, Grundmann E: *New cytomorphologic methods in the diagnosis of bone tumors: possibilities and limitations*. Semin Diagn Pathol, 1984;**1**:199-214.
- Roessner A, Mittler U, Röse I, Radig K, Grote H: *Pathologie des Ewing-Sarkoms*. Pathologe, 1996;**17**:6-17.
- Ross RA, Spengler BA: *Human neuroblastoma stem cells*. Semin Cancer Biol, 2007;**17**:241-7.
- Roth RB, Hevezi P, Lee J, Willhite D, Lechner SM, Foster AC, Zlotnik A: *Gene expression analyses reveal molecular relationships among 20 regions of the human CNS*. Neurogenetics, 2006;**7**:67-80.
- Rual JF, Venkatesan K, Hao T, Hirozane-Kishikawa T, Dricot A, Li N, Berriz GF, Gibbons FD, Dreze M, Ayivi-Guedehoussou N, Klitgord N, Simon C, Boxem M, Milstein S, Rosenberg J, Goldberg DS, Zhang LV, Wong SL, Franklin G, Li S, Albala JS, Lim J, Fraughton C, Llamasas E, Cevik S, Bex C, Lamesch P, Sikorski RS, Vandenhaute J, Zoghbi HY, Smolyar A, Bosak S, Sequerra R, Doucette-Stamm L, Cusick ME, Hill DE, Roth FP, Vidal M: *Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network*. Nature, 2005;**437**:1173-8.
- Rutz S, Scheffold A: *Towards in vivo application of RNA interference – new toys, old problems*. Arthritis Res Ther, 2004;**6**:78-85.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science, 1988;**239**:487-91.

- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N: *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. Science, 1985;**230**:1350-4.
- Sallusto F und Baggiolini M: *Chemokines and leukocyte traffic*. Nat Immunol, 2008;**9**:949-52.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular cloning: a laboratory manual*. 1998. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. 1977. Biotechnology, 1992;**24**:104-8.
- Scanlan MJ, Gordon CM, Williamson B, Lee SY, Chen YT, Stockert E, Jungbluth A, Ritter G, Jäger D, Jäger E, Knuth A, Old LJ: *Identification of cancer/testis genes by database mining and mRNA expression analysis*. Int J Cancer, 2002;**98**:485-92.
- Scanlan MJ, Simpson AJ, Old LJ: *The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary*. Cancer Immun, 2004;**4**:1.
- Schleiermacher G, Peter M, Oberlin O, Philip T, Rubie H, Mechinaud F, Sommelet-Olive D, Landman-Parker J, Bours D, Michon J, Delattre O; Société Française d'Oncologie Pédiatrique: *Increased risk of systemic relapses associated with bone marrow micrometastasis and circulating tumor cells in localized ewing tumor*. J Clin Oncol, 2003;**21**:85-91.
- Schlesinger HR, Gerson JM, Moorhead PS, Maguire H, Hummeler K: *Establishment and characterization of human neuroblastoma cell lines*. Cancer Res, 1976;**36**:3094-100.
- Schmidt D, Herrmann C, Jürgens H, Harms D: *Malignant peripheral neuroectodermal tumor and its necessary distinction from Ewing's sarcoma. A report from the Kiel Pediatric Tumor Registry*. Cancer, 1991;**68**:2251-9.
- Schmiedel BJ, Hutter C, Hesse M, Staeger MS: *Expression of multiple membrane-associated phospholipase A1 beta transcript variants and lysophosphatidic acid receptors in Ewing tumor cells*. Mol Biol Rep, 2011;**38**:4619-28.
- Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G: *Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma*. Int J Cancer, 1977;**19**:621-6.
- Schorlemer, Ines: *Ewing-Sarkom der Wirbelsäule: Behandlungsergebnisse und Lokalrezidivanalyse*. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Universität Münster, 2006.
- Schuck A, Ahrens S, Paulussen M, Kühlen M, Könemann S, Rube C, Winkelmann W, Kotz R, Dunst J, Willich N, Jürgens H: *Local therapy in localized Ewing tumors: results of 1058 patients treated in the CESS 81, CESS 86, and EICESS 92 trials*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2003;**55**:168-77.
- Schuhmacher M, Staeger MS, Pajic A, Polack A, Weidle UH, Bornkamm GW, Eick D, Kohlhuber F: *Control of cell growth by c-Myc in the absence of cell division*. Curr Biol, 1999;**9**:1255-8.
- Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH, Varmus HE, Bishop JM, Gilbert F, Brodeur G, Goldstein M, Trent J: *Amplified DNA with limited homology to MYC cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour*. Nature, 1983;**305**:245-8.
- Schwarze SR, Luo J, Isaacs WB, Jarrard DF: *Modulation of CXCL14 (BRAX) expression in prostate cancer*. Prostate, 2005;**64**:67-74.
- Shamoo Y, Abdul-Manan N, Williams KR: *Multiple RNA binding domains (RBDs) just don't add up*. Nucleic Acids Res, 1995;**23**:725-8.

- Shellenberger TD, Wang M, Gujrati M, Jayakumar A, Strieter RM, Burdick MD, Ioannides CG, Efferson CL, El-Naggar AK, Roberts D, Clayman GL, Frederick MJ: *BRAK/CXCL14 is a potent inhibitor of angiogenesis and a chemotactic factor for immature dendritic cells*. *Cancer Res*, 2004;**64**:8262-70.
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y: *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea*. *J Cell Comp Physiol*, 1962;**59**:223-39.
- Shurin GV, Ferris RL, Tourkova IL, Perez L, Lokshin A, Balkir L, Collins B, Chatta GS, Shurin MR: *Loss of new chemokine CXCL14 in tumor tissue is associated with low infiltration by dendritic cells (DC), while restoration of human CXCL14 expression in tumor cells causes attraction of DC both in vitro and in vivo*. *J Immunol*, 2005;**174**:5490-8.
- Siomi H, Matunis MJ, Michael WM, Dreyfuss G: *The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif*. *Nucleic Acids Res*, 1993;**21**:1193-8.
- Sleeman MA, Fraser JK, Murison JG, Kelly SL, Prestidge RL, Palmer DJ, Watson JD, Kumble KD: *B cell- and monocyte-activating chemokine (BMAC), a novel non-ELR alpha-chemokine*. *Int Immunol*, 2000;**12**:677-89.
- Smith MA, Ungerleider RS, Horowitz ME, Simon R: *Influence of doxorubicin dose intensity on response and outcome for patients with osteogenetic sarcoma and Ewing's sarcoma*. *J Natl Cancer Inst*, 1991;**83**:1460-70.
- Sorensen PH, Lessnick SL, Lopez-Terrada D, Liu XF, Triche TJ, Denny CT: *A second Ewing's sarcoma translocation, t(21;22), fuses the EWS gene to another ETS-family transcription factor, ERG*. *Nat Genet*, 1994;**6**:146-51.
- Staege MS, Hesse M, Max D: *Lipases and related molecules in cancer*. *Cancer Growth Metastasis*, 2010;**3**:11-20.
- Staege MS, Hutter C, Neumann I, Foja S, Hattenhorst UE, Hansen G, Afar D, Burdach SE: *DNA microarrays reveal relationship of Ewing family tumors to both endothelial and fetal neural crest-derived cells and define novel targets*. *Cancer Res*, 2004;**64**:8213-21.
- Staege MS, Max D: *Genetics and epigenetics of the TET-ETS translocation network*. *Genetics and Epigenetics*, 2009;**2**:1-15.
- Stahl M, Ranft A, Paulussen M, Bölling T, Vieth V, Bielack S, Görtitz I, Braun-Munzinger G, Harges J, Jürgens H, Dirksen U: *Risk of recurrence and survival after relapse in patients with Ewing sarcoma*. *Pediatr Blood Cancer*, 2011;**57**:549-553.
- Starnes T, Rasila KK, Robertson MJ, Brahmi Z, Dahl R, Christopherson K, Hromas R: *The chemokine CXCL14 (BRAK) stimulates activated NK cell migration: implications for the downregulation of CXCL14 in malignancy*. *Exp Hematol*, 2006;**34**:1101-5.
- Sturn A, Quackenbush J, Trajanoski Z: *Genesis: cluster analysis of microarray data*. *Bioinformatics*, 2002;**18**:207-8.
- Sonoda H, Aoki J, Hiramatsu T, Ishida M, Bando K, Nagai Y, Taguchi R, Inoue K, Arai H: *A novel phosphatidic acid-selective phospholipase A1 that produces lysophosphatidic acid*. *J Biol Chem*, 2002;**277**:34254-63.
- Sutherland LC, Rintala-Maki ND, White RD, Morin CD: *RNA binding motif (RBM) proteins: a novel family of apoptosis modulators?* *J Cell Biochem*, 2005;**94**:5-24.
- Tanegashima K, Suzuki K, Nakayama Y, Tsuji K, Shigenaga A, Otaka A, Hara T: *CXCL14 is a natural inhibitor of the CXCL12-CXCR4 signaling axis*. *FEBS Lett*, 2013;**587**:1731-5.

- Tanegashima K, Tsuji K, Suzuki K, Shigenaga A, Otaka A, Hara T: *Dimeric peptides of the C-terminal region of CXCL14 function as CXCL12 inhibitors*. FEBS Lett, 2013;**587**:3770-5.
- Thiele CJ: *Pediatric peripheral neuroectodermal tumors, oncogenes, and differentiation*. Cancer Invest, 1990;**8**:629-39.
- Thomson JD, Higgins DG und Gibson TJ: *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice*. Nucleic Acids Res, 1994;**22**:4673-80.
- Tirode F, Laud-Duval K, Prieur A, Delorme B, Charbord P, Delattre O: *Mesenchymal stem cell features of Ewing tumors*. Cancer Cell, 2007;**11**:421-9.
- Todorova R: *In vitro interaction between the N-terminus of the Ewing's sarcoma protein and the subunit of RNA polymerase II hsRPB7*. Mol Biol Rep, 2009;**36**:1269-74.
- Toub N, Bertrand JR, Malvy C, Fattal E, Couvreur P: *Antisense oligonucleotide nanocapsules efficiently inhibit EWS-Fli1 expression in a Ewing's sarcoma model*. Oligonucleotides, 2006;**16**:158-68.
- Tumilowicz JJ, Nichols WW, Cholon JJ, Greene AE: *Definition of a continuous human cell line derived from neuroblastoma*. Cancer Res, 1970;**30**:2110-8.
- Ueno T, Toi M, Saji H, Muta M, Bando H, Kuroi K, Koike M, Inadera H, Matsushima K: *Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer*. Clin Cancer Res, 2000;**6**:3282-9.
- Van Gelder RN, von Zastrow ME, Yool A, Dement WC, Barchas JD, Eberwine JH: *Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990;**87**:1663-7.
- Venkateswaran L, Rodriguez-Galindo C, Merchant TE, Poquette CA, Rao BN, Pappo AS: *Primary Ewing tumor of the vertebrae: clinical characteristics, prognostic factors, and outcome*. Med Pediatr Oncol, 2001;**37**:30-35.
- Wang JM, Deng X, Gong W, Su S: *Chemokines and their role in tumor growth and metastasis*. J Immunol Methods, 1998;**220**:1-17.
- Wen XY, Hegele RA, Wang J, Wang DY, Cheung J, Wilson M, Yahyapour M, Bai Y, Zhuang L, Skaug J, Young TK, Connelly PW, Koop BF, Tsui LC, Stewart AK: *Identification of a novel lipase gene mutated in lpd mice with hypertriglyceridemia and associated with dyslipidemia in humans*. Hum Mol Genet, 2003;**12**:1131-43.
- Wente MN, Mayer C, Gaida MM, Michalski CW, Giese T, Bergmann F, Giese NA, Büchler MW, Friess H: *CXCL14 expression and potential function in pancreatic cancer*. Cancer Lett, 2008;**259**:209-17.
- Whang-Peng J, Triche TJ, Knutsen T, Miser J, Kao-Shan S, Tsai S, Israel MA: *Cytogenetic characterization of selected small round cell tumors of childhood*. Cancer Genet Cytogenet, 1986;**21**:185-208.
- Wolf J, Kapp U, Bohlen H, Kornacker M, Schoch C, Stahl B, Mücke S, von Kalle C, Fonatsch C, Schaefer HE, Hansmann ML, Diehl V: *Peripheral blood mononuclear cells of a patient with advanced Hodgkin's lymphoma give rise to permanently growing Hodgkin-Reed Sternberg cells*. Blood, 1996;**87**:3418-28.
- Wyckoff GJ, Wang W, Wu CI: *Rapid evolution of male reproductive genes in the descent of man*. Nature, 2000;**403**:304-9.
- Zeng Y und Cullen BR: *Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences*. J Biol Chem, 2005;**280**:27595.

- Zhang PJ, Barcos M, Stewart CC, Block AW, Sait S, Brooks JJ: *Immunoreactivity of MIC2 (CD99) in acute myelogenous leukemia and related diseases*. Mod Pathol, 2000;**13**:452-8.
- Zimber-Strobl U, Strobl L, Höfelmayr H, Kempkes B, Staeger MS, Laux G, Christoph B, Polack A, Bornkamm GW: *EBNA2 and MYC in B cell immortalization by Epstein-Barr virus and in the pathogenesis of Burkitt's lymphoma*. Curr Top Microbiol Immunol, 1999;**246**:315-20.
- Zlotnik A, Morales J, Hedrick JA: *Recent advances in chemokines and chemokine receptors*. Crit Rev Immunol, 1999;**19**:1-47.
- Zucman J, Melot T, Desmaze C, Ghysdael J, Plougastel B, Peter M, Zucker JM, Triche TJ, Sheer D, Turc-Carel C, et al: *Combinatorial generation of variable fusion proteins in the Ewing family of tumours*. EMBO J, 1993;**12**:4481-7.

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

8.1 Allgemeine Abkürzungen, Chemikalien und Maßeinheiten⁹

μ	Mikro
°C	Grad Celsius
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ABHD6	<i>Abhydrolase Domain Containing 6</i>
ALL	Akute Lymphoblastische Leukämie
AS	Aminosäuren
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
Bt	<i>Bos taurus</i>
bzw.	beziehungsweise
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA
Cf	<i>Canis lupus familiaris</i>
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
CTA	<i>Cancer/Testis Antigen</i>
CTP	Cysteintriphosphat
CXCL14	Chemokine (CXC Motif) 14
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbeccos' modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>DNase</i>	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
Dr	<i>Danio rerio</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol

⁹ Begriffe in englischer Sprache sind in kursiv gehalten.

Ec	<i>Equus caballus</i>
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EFT	<i>Ewing family tumors</i>
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
et al.	et alii
EtBr	Ethidiumbromid
ETS	<i>erythroblatosis virus transferring sequence</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated-cell sorting</i>
FC	<i>Fold change</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FI	Fluoreszenz
FLI1	<i>friend leukemia virus integration site 1</i>
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glyceraldehyd-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
Gg	<i>Gallus gallus</i>
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HD	<i>Hodgkin's Disease</i>
Hs	<i>Homo sapiens</i>
IRES	<i>Internal ribosomal entry site</i>
IVT	<i>In vitro</i> Transkription
k	Kilo
l	Liter
LB	<i>Lysogeny medium</i> (Nährmedium)
LCL	<i>Lymphoblastoid cell line</i>
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LPA	<i>Lysophosphatidic Acid</i>
LIPI	Lipase I
LIPH	Lipase H
m	Milli
M	Molar

MCS	<i>Multiple cloning site</i>
min	Minute
Mm	<i>Mus musculus</i>
miRNA	<i>microsomale ribonucleic acid</i>
Mock-Vektor	Leer-Vektor (enthält kein Insert in der MCS)
MOPS	3-Morpholinosulfonsäure
mRNA	messenger <i>ribonucleic acid</i>
n	Nano
NB	Neuroblastom
nt	Nukleotide
N-Terminus	Amino-Terminus
Oa	<i>Ornithorhynchus anatinus</i>
Oc	<i>Oryctolagus cuniculus</i>
OD	Optische Dichte
Oligo-dT	Oligo-Desoxythymidin
OMIM	Online Mendelian inheritance in Man
p	Pico
PBMCs	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	Phosphatgepufferte physiologische Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglycol
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionen-Konzentration
Pt	<i>Pan troglodytes</i>
RBM11	<i>RNA Binding Motif 11</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RRM	<i>RNA recognition motif</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat

siRNA	<i>Short interfering ribonucleic acid</i>
TAE	Tris-Azetat-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X100	4-(2',2',4',4'-Tetramethylbutyl)-Phenyldecaethylglycol
TTP	Thymidintriphosphat
U	<i>unit</i> , Einheit der Enzymaktivität
ÜN	Über Nacht
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
v/v	Verhältnis Volumen/Volumen
w/v	Verhältnis Gewicht/Volumen
Xt	<i>Xenopus tropicalis</i>

8.2 Abkürzungen der Aminosäuren

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

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

9. ANHANG

Tabelle 9-1: Gene der Microarray-Analyse. OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*) ist eine Datenbank des NCBI, die eine umfassende und aktuelle Sammlung aller Gene des Menschen, Genotyp-Phänotyp-Korrelationen und assoziierte Erbkrankheiten beinhaltet.

Gen	Symbol	OMIM
<i>Chemokine, CXC Motif, Ligand 14</i>	CXCL14	604186
<i>Chemokine, CXC Motif, Receptor 4</i>	CXCR4	162643
<i>Chemokine, CXC Motif, Ligand 12</i>	CXCL12	600835
<i>Neurofilament Protein, Light Polypeptide</i>	NEFL	162280
<i>Neurofilament Protein, Heavy Polypeptide</i>	NEFH	162230
<i>Olfactomedin 1</i>	OLFM1	605366
<i>Nuclear Receptor Subfamily 4, Group A, Member 1</i>	NR4A3	600542
<i>Lysyl Oxidase</i>	LOX	153455
<i>MST3- and SOK1-related Kinase</i>	MST4	300547
<i>Paired Box Gene 7</i>	PAX7	167410
<i>NUMB, Drosophila, Homolog-Like</i>	NUMBL	604018
<i>Four-and-A-Half LIM Domains 2</i>	FHL2	602633
<i>TNF Receptor-associated Factor 1</i>	TRAF1	601711
<i>Phospholipase A2, Group V</i>	PLA2G5	601192
<i>Leucine-rich Repeats- and Death Domain-containing Protein</i>	LRDD	605247
<i>Leukocyte Cell-Derived Chemotaxin 1</i>	LECT1	605147
<i>Melanoma Antigen, Family , 3</i>	MAGEA3	300174
<i>Loss of Heterozygosity, Chromosome 11, Region 2, Gene A</i>	LOH11CR2A	602929
<i>Peroxisome Proliferator-activated Receptor-binding Protein</i>	PPARBP	604311

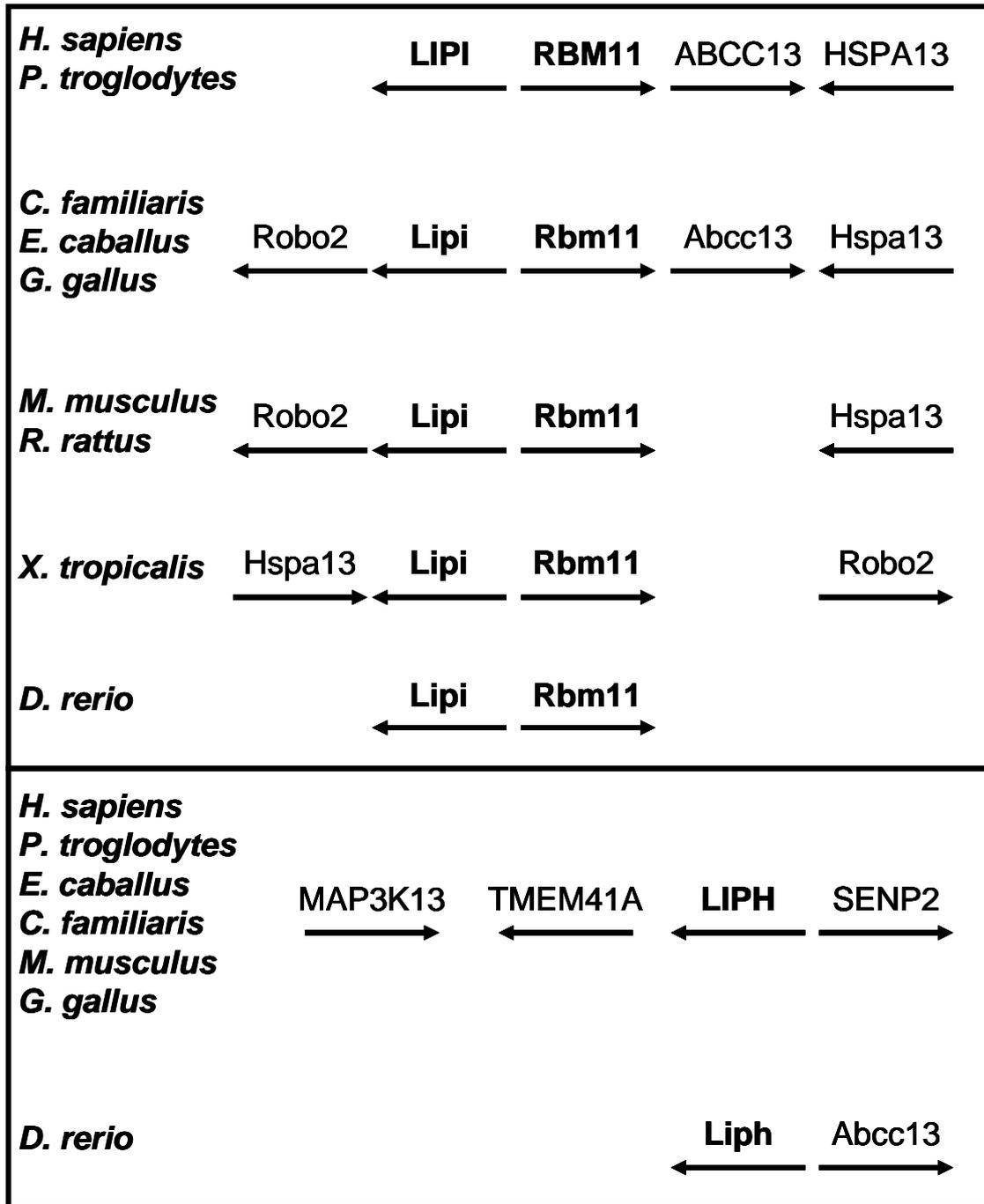


Abbildung 9-1: Genomischer Kontext von LIPI und LIPH verschiedener Spezies. Präsentiert werden der genomische Kontext von Mensch (*H. sapiens*), Schimpanse (*P. troglodytes*), Hund (*C. familiaris*), Pferd (*E. caballus*), Maus (*M. musculus*), Ratte (*R. rattus*), Huhn (*G. gallus*), Zebrafisch (*D. rerio*) und Frosch (*X. tropicalis*).

9.1 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne andere als die aufgeführten Hilfsmittel angefertigt wurde. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht. Ich bewerbe mich erstmals um die Erlangung des Doktorgrades. Diese Arbeit wurde in keiner anderen Hochschule oder Universität zur Promotion eingereicht.

Godern, Februar 2014

Manuela Hesse

10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. M.S. Staeger für die wissenschaftliche Anleitung, den hilfreichen Diskussionen und nützlichen Anregungen. Gleicher Dank gilt auch Herrn PD Dr. R. Golbik.

Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. G. Horneff, Herrn Prof. Dr. R. Grabitz und Herrn Prof. Dr. D. Körholz für finanzielle Unterstützung und Bereitstellung des Arbeitsplatzes bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt Ines Volkmer und Corinna Giersberg sowie der gesamten Arbeitsgruppe des Forschungszentrums für krebskranke Kinder für die gute Zusammenarbeit.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei meinen Eltern bedanken, die mich auf meinem Weg stets unterstützten.

Mein besonderer Dank gilt meinem Partner Ingo, der mich im und außerhalb des Labors stets motivierte und an mich glaubte.

11. Lebenslauf

3.1 Zur Person

Name: Manuela Hesse

Anschrift: Wiesenblick 7
19065 Pinnow OT Godern

E-Mail: manuela.hesse@labor-schwerin.de

Geburtsdatum: 05.10.1977

Geburtsort: Wolmirstedt (Ohre-Landkreis, Land Sachsen-Anhalt)

Staatsangehörigkeit: Bundesrepublik Deutschland

3.2 Schulbildung

1984-1991 Realschule „Gotthold Ephraim Lessing“ in Magdeburg

1991-1996 Gymnasium „Humboldt“ in Magdeburg
Abschluss mit der Note „1,6“
(Leistungskurse: Biologie, Mathematik)

3.3 Hochschulstudium

10.1997 – 09.1998 Studium der Soziologie, Pädagogik und Philosophie in Magdeburg

10.1998 - 09.2001 Grundstudium der Biologie in Halle

10.2001 - 11.2004 Hauptstudium der Neurobiologie an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

09.2003 Diplomprüfung

11.2003 – 09.2004 Diplomarbeit im Forschungslabor der Humangenetik Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg unter der Leitung von Prof. Dr. P. Wieacker und PD Dr. I. Wieland

- 11.2004 Thema der Diplomarbeit:
„Die Androgen-abhängige Genexpression im Gehirn einer testikulär feminisierten Maus“
Beendigung des Studiums der Neurobiologie mit der Note „gut“ (1,8)
- 12.2004 – 05.2005 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Zell- und Virus-AG unter der Leitung von PD Dr. M. Messerle, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- 06.2005 – 08.2008 Promotion im Fach Biologie im Forschungslabor für krebskranke Kinder im Landeszentrum für Zell- und Gentherapie (LZG) an der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, unter der Leitung von PD Dr. rer. nat., rer. medic. habil. M.S. Staeger
Betreuender Hochschullehrer der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Fakultät I: PD Dr. R. Golbik
- Thema der Dissertation:
„Untersuchungen zur Expression und Funktion Ewing-Sarkom-assoziiierter Gene“

3.4 Berufstätigkeit

- 06.2005 – 08.2008 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Forschungslabor für krebskranke Kinder; Landeszentrum für Zell- und Gentherapie (LZG); Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Halle (Saale)
- 09.2008 – 06.2011 Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Fa. Diagenom GmbH Rostock; Abteilung Molekulargenetik
- Seit 07.2011 Wissenschaftliche Mitarbeiterin des Labor MVZ Westmecklenburg Schwerin; Laborleiterin Abteilung Molekulargenetik

12. PUBLIKATIONEN

Föll JL, Hesse M, Volkmer I, Schmiedel BJ, Neumann I, Staeger MS: *Membrane-associated phospholipase A1 beta (LIPI) is an Ewing tumour-associated cancer/testis antigen*. *Pediatr Blood Cancer*, 2008;**51**:228-234.

Hühn R, Staeger MS, Hesse M, Liebig B, Burdach SEG: *Cleavage of the tumour-specific EWSR1-FLI1 mRNA by hammerhead ribozymes*. *Anticancer Res*, 2009;**29**:1901-1908.

Max D, Hesse M, Volkmer I, Staeger MS: *High expression of the evolutionarily conserved alpha/beta hydrolase domain containing 6 (ABHD6) in Ewing tumors*. *Cancer Sci*, 2009;**100**:2383-2389.

Staeger MS, Hesse M, Max D: *Lipases and related molecules in cancer*. *Cancer Growth and Metastasis*, 2010;**3**:11-20.

Schmiedel BJ, Hutter C, Hesse M, Staeger MS: *Expression of multiple membrane-associated phospholipase A1 beta transcript variants and lysophosphatidic acid receptors in Ewing tumor cells*. *Mol Biol Rep*, 2011;**38**:4619-4628.

Hesse M, Willscher E, Schmiedel BJ, Posch S, Golbik RP, Staeger MS: *Sequence and expression of the chicken membrane-associated phospholipases A1 alpha (LIPH) and beta (LIPI)*. *Mol Biol Rep*, 2012;**39**:761-769.