Identifizierung und Charakterisierung von Tumorsuppressorgenen für die molekulare Prognostik von Tumoren der Ewing Sarkom Familie

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Melanie Hoffmann

aus Meerbusch-Büderich

Düsseldorf, November 2011

aus dem Institut für Pathologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: PD Dr. Karl Ludwig Schäfer Korreferent: Prof. Dr. Martin Beye

Tag der mündlichen Prüfung: 23.01.2012

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Ottaviano L, Schaefer K-L, Gajewski M, Huckenbeck W, Baldus S, Rogel U, Mackintosh C, de Alava E, Myklebost O, Kresse SH, Meza-Zepeda LA, Serra M, Cleton-Jansen A-M, Hogendoorn PCW, Buerger H, Aigner T, Gabbert HE and Poremba C (2010) Molecular Characterization of Commonly Used Cell Lines for Bone Tumor Research: A Trans-European EuroBoNet Effort. GENES, CHROMO-SOMES & CANCER 49:40-51

Teile dieser Arbeit wurden auf folgenden Kongressen vorgestellt:

09. Juni 2008	EuroBoNet Meeting, Research Line 4, Oslo
21. Januar 2009	EuroBoNet Annual Meeting, Valencia
07. Juni 2009	93. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e. V., Freiburg
24. Mai 2010	EuroBoNet Meeting, Research Line 4, Rimini

Für die Zukunft

INHALTSVERZEICHNIS

INHA	ALTSVERZEICHNIS	5
A	Einleitung	8
1.	Maligne Tumoren	8
ŋ	Tumorgonaga	0
Ζ.	rumorgenese	0
3.	Ewing sarcoma family of tumors (ESFTs)	10
3.1	Inzidenz und Diagnose	11
3.2	Molekularbiologie	12
3.3	Prognose und Therapie	13
4.	Potentielle Kandidatengene für die molekulare Prognostik der ESFTs	14
4.1	CDH11 (Cadherin 11)	14
4.2	TERF2IP (telomeric repeat binding factor 2 interacting protein)	16
B	Zielsetzung	19
	g	
C	Material und Methoden	20
5.	Zelllinien- und Patientenkollektiv	20
6.	Molekularbiologische Methoden	21
6.1	Nukleinsäure Extraktion	21
	6.1.1 DNA Isolierung	21
	6.1.2 RNA Isolierung	22
6.2	Polymerase chain reaction (PCR)	23
6.3	Agarose-Gelelektrophorese	24
6.4	Reverse Transkription	24
6.5	Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)	25
6.6	Plasmid-Amplifikation und -Präparation	27
6.7	Herstellung eines pT-Rex-DEST30 Vektors ohne Zielgen (pT-Rex mock Vektor)	29
6.8	Sequenzierung	30
6.9	Detektion von chromosomalen und genomischen Aberrationen	31
	6.9.1 Array comparative genomic hybridization (aCGH)	31
	6.9.2 Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA [®])	32
7.	Proteinbiochemische Methoden	35
7.1	Herstellung von Proteinlysaten	35
7.2	Proteinkonzentrationsbestimmung	35
7.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	35
7.4	Western Blot und Immundetektion	36
7.5	Immunhistochemie	38

8.	Zellbiologische Methoden	40
8.1	Zellkulturbedingungen	40
8.2	Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer	40
8.3	Mykoplasmenkontrolle	41
8.4	Transiente Transfektion	41
8.5	Stabile Transfektion	43
8.6	Funktionelle Analysen	45
	8.6.1 Migrationsassay (Scratch Assay)	45
	8.6.2 Proliferationsassay (MTT-Test)	45
	8.6.3 Invasionsassay	46
	8.6.4 Aggregationsassay (Hanging Drop Assay)	47
9.	Statistik	47
91	Student's t-Test	48
92	Korrelation nach Pearson	48
9.3	Ch ² -Test	48
9.4	Analyse von Überlebenszeiten mit Kaplan-Meier und Log-Rank-Test	49
_		
D	Ergebnisse	50
10.	Auswahl von Kandidatengenen und Methoden für die molekulare Prognostik	
	der Ewing sarcoma family of tumors (ESFTs)	51
10.	1 Literaturrecherche und Vorarbeiten der Arbeitsgruppe	51
10.	2 Etablierung und Validierung der MLPA zur Detektion von Chromosomenveränderungen.	52
	10.2.1 Einfluss der Gewebevorbehandlung auf die Ergebnisse der MLPA	53
	10.2.2 Aberrationsanalyse von 38 Tumorsuppressorgenen	55
	10.2.2.1 Ergebnisse für die ESFT Zelllinienproben	.56
	10.2.2.2 Ergebnisse für die ESFT Patientengewebe	.58
	10.2.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse für die Zelllinien- und Patientenproben	.60
10.	3 Wahl der Kandidatengene	60
	10.3.1 <i>CDH11</i> (Cadherin 11)	61
	10.3.2 TERF2IP (Telomeric repeat binding factor 2 interacting protein)	62
11.	In vitro Charakterisierung der Kandidatengene CDH11 und TERF2IP	62
11.	1 Gendosisbestimmung in ESFT Zelllinien und -Patienten	63
11.	2 Genexpression in ESFT Zelllinien und -Patienten	65
	11.2.1 Quantitative Analyse der RNA Expression	65
	11.2.2 Immunologische Untersuchung der Protein Expression	67
	11.2.2.1 Immunhistochemie an Zelllinienpräparaten und Patienten Tissue-Microarrays	.67
	11.2.2.2 SDS-PAGE, Western Blot und Immundetektion mit Proteinen aus Zelllinien	.70
11.	3 Korrelation von Gendosis und Genexpression	72
11.	4 Statistische Signifikanz der molekularen Daten im Vergleich zu den klinischen Daten der	
	ESFT Patienten	74

12. Funktionelle Studien nach forcierter Überexpression von CDH11 und TER	F2IP
in ESFT Zelllinien	77
12.1 Austestung der forcierten Überexpression durch transiente Transfektion	78
12.1.1 Optimale Verdünnung der Vektor DNA im Verhältnis zum Transfektionsreagen	z 79
12.1.2 Austestung der Inkubationszeit	81
12.2 Herstellung stabiler Transfektanten	83
12.2.1 CDH11 Transfektanten	84
12.2.2 TERF2IP Transfektanten	86
12.3 Funktionelle Analysen an stabilen Transfektanten	88
12.3.1 Bedeutung der Kandidatengen-Überexpression für die Zellmigration	88
12.3.2 Auswirkungen auf die Proliferation der Zellen	91
12.3.3 Invasivität der Zellen nach forcierter Überexpression	94
12.3.4 Aggregationsverhalten von Einzelzellen	95
E Diskussion	97
13. Auswahl von Kandidatengenen und Methoden für die molekulare Prognos	stik
der Ewing sarcoma family of tumors (ESFTs)	98
13.1 Etablierung und Validierung der MI PA zur Detektion von Chromosomenveränderung	nen 98
13.2 Wahl der Kandidatengene	102
14. In vitro Charakterisierung der Kandidatengene CDH11 und TERF2IP	103
14.1 Gendosis und Genexpression in ESFT Zelllinien und -Patienten	103
14.2 Statistische Signifikanz der molekularen Daten im Vergleich zu den klinischen Daten ESFT Patienten	der 106
15. Funktionelle Studien nach forcierter Überexpression von CDH11 und TER	RF2IP
in ESFT Zelllinien	108
15.1 Etablierung stabiler CDH11 und TERF2IP Transfektanten	108
15.2 Funktionelle Analysen an stabilen Transfektanten	109
15.2.1 Migration	109
15.2.2 Proliferation	110
15.2.3 Invasion	111
15.2.4 Aggregation	112
F Zusammenfassung	113
LITERATURVERZEICHNIS	118
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	131
DANKSAGUNG	134
LEBENSLAUF	135
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	136

A Einleitung

1. Maligne Tumoren

Als Tumor wird jede Gewebeneubildung (Neoplasie) bezeichnet, die durch unkontrolliertes Wachstum aus normalen Zellen des Körpers hervorgegangen ist. Solange der Tumor von dem umliegenden Gewebe abgrenzbar ist und es weder zerstört noch infiltriert, wird er als gutartig (benigne) bezeichnet. Die allgemein als Krebs bezeichneten bösartigen (malignen) Tumore sind dagegen unter anderem in der Lage durch ihr Wachstum (Proliferation) andere Gewebe zu zerstören, in sie einzudringen (Invasion) und sekundäre Tumoren (Metastasen) an anderen Stellen des Körpers auszubilden (Übersichtsartikel: Hanahan und Weinberg 2000). Die Systematik der malignen Tumore richtet sich nach dem Ursprung des entarteten Gewebes. Am häufigsten entstehen Neoplasien aus dem Epithel (Drüsen- und Deckgewebe) und werden dann als Karzinome bezeichnet. Die in dieser Arbeit untersuchte Ewing sarcoma family of tumors (ESFTs) gehört zu den Sarkomen, die sich vom Stützgewebe (zum Beispiel Bindegewebe, Knochen und Muskeln) ableiten. Nach den Herz-Kreislauferkrankungen sind maligne Tumoren die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Nach Angaben des Robert-Koch-Instituts (RKI) starben im Jahr 2006 etwa 359.000 Männer und Frauen an einer Herz-Kreislauferkrankung während etwa 211.000 Personen an den Folgen eines malignen Tumors verstarben (Robert Koch Institut 2010).

2. Tumorgenese

Die Transformation von normalen Zellen in entartete, maligne Zellen (auch Tumorprogression genannt) ist ein komplexer Prozess, der durch eine sukzessive Ansammlung genetischer Mutationen ausgelöst wird. Dabei steht der Begriff "Mutation" für jegliche Veränderung in der Genomsequenz, die sowohl ganze chromosomale Bereiche als auch einzelne Gene betreffen kann (Übersichtsartikel: Vogelstein und Kinzler 2004). Die Zellen können einen Wachstumsvorteil erlangen, wenn durch die Mutationen Gene betroffen sind, die für die Regulation grundlegender zellulärer Funktionen verantwortlich sind, wie zum Beispiel den Zellzyklus oder die Apoptose. Diese Gene werden in drei verschiedene Gruppen eingeteilt: die (Proto-) Onkogene, Tumorsuppressorgene und Stabilitätsgene (Abbildung 2-1).

Die Proto-Onkogene sind in normalen Zellen für das Zellwachstum verantwortlich. Durch Mutationen kann es zu einer konstitutiven Aktivierung dieser Gene kommen, so dass die Zellen unaufhörlich proliferieren. Da Onkogene dominant wirken, reicht die Veränderung eines Allels aus, um zu einer Überexpression der Gene zu führen. Beispiel für ein Proto-Onkogen ist das *MYK* (myelocytomatosis) Gen, welches für einen Transkriptionsfaktor kodiert (Knippers 2001). Im Gegensatz zu den Proto-Onkogenen haben Tumorsuppressorgene in normalen Zellen einen hemmenden Einfluss auf das Zellwachstum und fördern die Apoptose. Durch Mutationen in beiden Allelen (rezessive Wirkung; Knudson 1971) kommt es zu einem Funktionsverlust, der zu einer unkontrollierten Proliferation der Zelle führt. Beispiel für ein Tumorsuppressorgen ist das *CDKN2A* (cyclin*dependent kinase inhibitor 2A*) Gen, welches für den Kinase Inhibitor p16 kodiert (Knippers 2001). Die Stabilitätsgene kodieren für Proteine des Reparatursystems, die spontane Genmutationen (Häufigkeit: 10⁻⁶ pro Gen und Zellteilung; Alberts 2004) reparieren. Wie bei den Tumorsuppressorgenen müssen beide Allele mutiert sein, damit es zu einem Funktionsverlust kommt. Die erhöhte Mutationsrate kann dann zu einem Wachstumsvorteil der Zellen führen. Beispiele sind Gene für die Missmatch- und Exzisions-Reparatur wie *MLH1*, *MSH2* und *MSH6* (Murata et al. 2005; Lawes et al. 2005).



Abbildung 2-1 Tumorgenese durch Onkogene, Tumorsuppressorgene und Stabilitätsgene.

Die zunehmende Entartung von Zellen ist durch verschiedene Veränderungen in der Zellphysiologie gekennzeichnet (Abbildung 2-2). So sind maligne Zellen in der Lage unabhängig von Wachstumsfaktoren und auch trotz inhibierender Signale zu wachsen. Zum Beispiel führt bei etwa 25 % der humanen Tumoren eine Veränderung im Onkogen *Ras (Rat sarcoma)* zu einer Aktivierung der Proliferation, ohne dass ein Wachstumssignal vorliegt (Übersichtsartikel: Hanahan und Weinberg 2000). Dagegen führen Mutationen im Tumorsuppressorgen *Rb (Retinoblastoma)* zu einer fehlenden Inhibition des Zellzyklus, selbst wenn Anti-Proliferative Signale vorhanden sind (Weinberg 1995). Eine weitere Eigenschaft maligner Zellen ist häufig die Fähigkeit in andere Gewebe einzudringen und sich über Lymph- und Blutgefäße weiter im Körper auszubreiten (Invasion und Metastasierung). Tumorzellen können sich auch unbegrenzt teilen. Häufig exprimieren sie dazu das Enzym Telomerase (bei 85 % - 95 % der malignen Zellen), welches die Stabilität der Telomeren aufrecht erhält (Shay und Bacchetti 1997, Bryan und Cech 1999). Eine weitere Fähigkeit, die maligne Zellen erwerben können, ist die Induktion neuer Blutgefäße (Angiogenese) zur Versorgung des Tumors mit Nährstoffen und Sauerstoff (Übersichtsartikel: Hanahan und Weinberg 2000). Zusätzlich sind Tumorzellen in der Lage eine Apoptose Resistenz zu entwickeln, die bei mehr als 50 % der humanen Tumoren durch Mutationen des Tumorsuppressorgens *p53* (*tumor protein 53*) verursacht werden (Harris 1996, Evan und Littlewood 1998).



Abbildung 2-2 Physiologie maligner Zellen (nach Hanahan und Weinberg 2000).

3. Ewing sarcoma family of tumors (ESFTs)

Arthur Purdy Stout beschrieb 1918 einen Tumor am Ellebogen-Nerv (*Nervus ulnaris*) eines 42-jährigen Patienten, der kleine in Rosettenform angeordnete, runde Zellen aufwies (Stout 1918). Drei Jahre später entdeckte James Ewing, dass der undifferenzierte Knochentumor einer 14-jährigen Patientin eine eigene Tumorentität darstellt, der er seinen Namen gab (Ewing 1921). Damit waren die beiden Wissenschaftler die ersten, welche die primitiven neuroektodermalen Tumoren (PNET) und die Ewing Sarkome (ES) beschrieben. Aufgrund ähnlicher histologischer und molekularer Eigenschaften werden sie mittlerweile zusammen mit den Askin Tumoren (PNET der Brustwand) und den atypischen Ewing Sarkomen als Tumoren der Ewing Sarkom Familie (ESFTs) zusammengefasst (Übersichtsartikel: Khoury 2005).

3.1 Inzidenz und Diagnose

Mit einer Inzidenz von 0,3 Neuerkrankungen pro 100.000 Kindern unter 15 Jahren, gehören die ESFTs zu den häufigsten malignen Knochenerkrankungen bei Kindern. Die Tumoren treten häufiger bei Jungen als bei Mädchen auf (Verhältnis 1,5 : 1) und das mediane Erkrankungsalter beträgt 10,5 Jahre (Deutsches Kinderkrebsregister 2003 - 2007). Klinische Symptome der Erkrankung sind vor allem regional begrenzter Schmerz und manchmal auch eine deutlich tastbare Tumormasse (bei etwa 34 % der Patienten; Widhe und Widhe 2000). Zur Abklärung des Befundes wird eine Röntgenuntersuchung, Magnetresonanztomographie (MRT) und / oder Computertomographie (CT) durchgeführt. Dabei kann die Lage, Größe, Abgrenzung des Tumors zum Nachbargewebe und auch das Vorliegen von Metastasen bestimmt werden. Zusätzlich wird eine Biopsie des Tumorgewebes durchgeführt und histologisch sowie molekularbiologisch ausgewertet (Interdisziplinäre Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft und der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie 2009).

Das Tumorstadium wird anhand der TNM-Klassifikation maligner Knochentumoren angegeben (Wittekind et al. 2002). Dabei steht (T) für die Ausdehnung des Primärtumors, (N) für das Streuen von Zellen in die Lymphknoten und (M) für etwaige Fernmetastasen. Zusätzlich kann der Differenzierungsgrad (G) des Tumors angegeben werden (Tabelle 3-1).

т	Primärtumor	Ν	Regionäre Lymphknoten
Тх	Primärtumor kann nicht beurteilt werden	Nx	Lymphknoten können nicht beurteilt werden
Т0	kein Anhalt für Primärtumor	N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
T1	Tumor überschreitet Kortikalis nicht	N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen
T2	Tumor infiltriert Gewebe jenseits der Kortikalis		
М	Fernmetastasen	G	Histopathologisches Grading
Мx	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden	Gx	Differenzierung kann nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen	G1	gut differenziert
M1	Fernmetastasen	G2	mäßig differenziert
		G3	schlecht differenziert

Tabelle 3-1 TNM-Klassifikation maligner Knochentumoren (verändert nach Wittekind et al. 2002).

Die Tumorzellen der ESFTs sind klein, rund, undifferenziert und haben nur wenig Cytoplasma. Dadurch sind die Zellen in der Histologie vor allem durch ihre blau gegengefärbten Kerne (Methodenbeschreibung: Seite 38) gekennzeichnet, weshalb sie auch als "small blue round cells" bezeichnet werden. Diese Zellform kommt aber nicht nur bei ESFTs vor, sondern zum Beispiel auch bei bestimmten Formen von Neuroblastomen oder Lymphomen (Übersichtsartikel: Li und Siegal 2010). Zur Charakterisierung der Tumorentität wird außerdem die Expression des *MIC-2* Gens (CD99 (Cluster of Differentiation 99) Protein) immunologisch bestimmt (Ambros et al. 1991, Fellinger et al. 1991). Allerdings wird das CD99 Protein auch von anderen Tumorentitäten, zum Beispiel den Chondrosarkomen und Osteosarkomen exprimiert (Kovar et al. 1990, Devaney et al. 1995). Aus diesen Gründen ist die Diagnose eines ESFTs nur anhand der Histologie äußerst schwierig und erfordert weitere Untersuchungen durch molekulare Marker (Baer et al. 2004, Bovée und Hogendoorn 2010).

3.2 Molekularbiologie

Kennzeichnend für ESFTs ist eine reziproke Translokation des langen Arms von Chromosom 22 (22q12), von der das Gen *EWSR1* (*ewing sarcoma breakpoint region 1*) betroffen ist. Bei etwa 90 % bis 95 % der ESFTs wird das Gen mit einem Mitglied der ETS (e-twenty six) Transkriptionsfaktor Familie, dem *FLI1* (*friend leukemia virus integration 1*) Gen auf Chromosom 11q24 rekombiniert (Abbildung 3-1 A; Turc-Carel et al. 1983, Delattre et al. 1992, Delattre et al. 1994). Dadurch entsteht ein chimäres EWS-ETS Transkript und Fusionsprotein, welches onkogene Eigenschaften besitzt (May et al. 1993, Ohno et al. 1993, Sandberg und Bridge 2001). Innerhalb der Gene variiert die Lokalisation der Bruchpunkte für die Translokation. So gibt es mindestens 12 Varianten des *EWSR1-FLI1* Transkripts, die unterschiedliche Exone der beiden Gene enthalten. In den meisten Fällen (etwa 81 % der ESFTs) wird Exon 7 von *EWSR1* mit Exon 6 (Typ 1 Fusion) oder Exon 5 (Typ 2 Fusion) von *FLI1* rekombiniert (Abbildung 3-1 B; Zucman et al. 1993, Zoubek et al. 1996, de Alava et al. 1998).



Abbildung 3-1 Fusion von *EWSR1* mit *FLI1*. Darstellung der Chromosomen- (**A**, verändert nach Sandberg und Bridge 2001) und der Exon-Rekombination (**B**, Typ 1 Fusion; verändert nach Burchill et al. 2003).

Bei etwa 5 % bis 10 % der ESFTs wird das *EWSR1* Gen mit dem *ERG* (*ets related gene*) fusioniert. Weitere Fusionen mit anderen Mitgliedern der ETS Familie wie *FEV* (*fifth ewing variant*), *E1AF* (*ets variant 4*) und *ETV1* (*ets variant 1*) sind dagegen deutlich seltener (Tabelle 3-2). Mit Hilfe der qRT-PCR (quantitative Real-Time PCR; Methodenbeschreibung: Seite 25) kann für jeden ESFT Patienten die jeweilige Translokation bestimmt werden (Sorensen et al. 1993, Delattre et al. 1994).

Etwa 50 % bis 90 % der ESFT Patienten zeigen neben den charakteristischen *EWS-ETS* Translokationen weitere, sekundäre chromosomale Veränderungen (Sandberg und Bridge 2001, Roberts et al. 2008, Savola et al. 2009). Zu den häufigsten numerischen Chromosomenaberrationen in ESFTs gehören die Trisomie 8, die bei etwa 35 % bis 65 % der ESFT Patienten vorliegt und die Trisomie 12, die bei ungefähr 25 % bis 30 % der Patienten diagnostiziert wird (Armengol et al. 1997, Tarkkanen et al. 1999, Hattinger et al. 1999, Savola et al. 2009). Die häufigste strukturelle Chromosomenaberration ist ein Verlust des langen Arms von Chromosom 16 (16q), der bei circa 15 % bis 30 % der ESFT Patienten vorkommt (Ozaki et al. 2001, Hattinger et al. 2002, Höglund et al. 2005, Roberts et al. 2008, Savola et al. 2009). Bei den Genmutationen ist die Deletion des Tumorsuppressors *CDKN2A* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*, kodiert für p16/p14^{ARF}) bei 15 % bis 30 % der primären ESFT Tumoren eine der häufigsten Aberrationen (Kapitel 3.3).

EWS-ETS Fusion	Karyotyp	Häufigkeit*	Referenz		
EWSR1-FLI1	t(11;22)(q24;q12)	90 % - 95 %	(Delattre et al. 1992) (Delattre et al. 1994)		
EWSR1-ERG	t(21;22)(q22;q12)	5 % - 10 %	(Sorensen et al. 1993) (Zucman et al. 1993)		
EWSR1-FEV	t(2;21;22)(q33;q22;q12)	1 %	(Peter et al. 1997)		
EWSR1-ETV1	t(7;22)(p22;q12)	1 %	(Jeon et al. 1995)		
EWSR1-E1AF	t(17;22)(q12;q12)	< 1 %	(Kaneko et al. 1996) (Urano et al. 1996)		

Tabelle 3-2 EWS-ETS Translokationen in ESFTS (verändert nach Arvand und Denny 2001).

* geschätzte Häufigkeit der Translokation bei ESFTs

3.3 Prognose und Therapie

Einer der wichtigsten Prognosefaktoren in ESFTs ist das Vorliegen von Metastasen bei Diagnose (Jürgens et al. 1988, Terrier et al. 1996). So liegt die Überlebenswahrscheinlichkeit von ESFT Patienten mit einem lokal begrenzten Tumor bei etwa 60 %, während sie sich bei Metastasen halbiert (30 % Überlebenswahrscheinlichkeit; Cotterill et al. 2000). Weitere klinische Prognosefaktoren sind das Ansprechen des Tumors auf die initiale Chemotherapie (Koscielniak et al. 1992), ein Tumorvolumen von mehr als 100 ml (Jürgens et al. 1988) und eine zentrale Lokalisation des Tumors im Körper (Rud et al. 1989).

Neben den klinischen Prognosefaktoren werden bislang keine molekularen Prognosemarker in der Routine Diagnostik von ESFTs verwendet. Es wurden bisher auch nur wenige genetische Aberrationen identifiziert, die eine spezifische Prognose erlauben würden und diese betreffen auch nur einen Teil der Patienten. Die viel versprechenden retrospektiven Forschungsergebnisse, wonach eine *EWSR1-FLI1* Genfusion vom Typ 1 bei lokalem Tumor mit einer besseren Prognose korreliert (de Alava et al. 1998, Zoubek et al. 1996), wurden kürzlich von prospektiven Studien widerlegt (Le Deley et al. 2010, van Doorninck et al. 2010). Die unabhängigen und statistisch signifikanten Deletionen von *CDKN2A* liegen lediglich bei etwa 15 % bis 30 % der primären Tumoren vor (de Alava et al. 2000, Wei et al. 2000, Maitra et al. 2001, Huang et al. 2005, Honoki et al. 2007). Auch die bei vielen Tumorentitäten häufig vorkommenden Mutationen im Tumorsuppressorgen *p53* (TP53 Protein; zum Beispiel bei etwa 50 % der primären Osteosarkome; Tsuchiya et al. 2000), sind bei pri-

mären ESFTs relativ selten (bei etwa 5 % bis 10 %; Kovar et al. 1993, de Alava et al. 2000, Alldinger et al. 2007). Die Mutationen scheinen jedoch für diese kleine Untergruppe an ESFT Patienten eine prognostische Rolle zu spielen (Huang et al. 2005, Ottaviano et al. 2010). Während ein komplexer Karyotyp bei ESFT Patienten generell mit einer schlechteren Prognose assoziiert zu sein scheint (Kullendorff et al. 1999, Ozaki et al. 2001, Zielenska et al. 2001), zeigten sich bei den häufigsten numerischen Chromosomenaberrationen (Trisomie 8 und 12) bislang keine eindeutig signifikanten Korrelationen mit der Prognose (Hattinger et al. 1999, Tarkkanen et al. 1999). Dagegen wurde die häufigste strukturelle Chromosomenaberration, die Deletion von 16q, bereits mit einer signifikant schlechteren Prognose bei ESFT Patienten korreliert (Hattinger et al. 1999, Ozaki et al. 2001, Hattinger et al. 2002).

Die Behandlung von Patienten mit diagnostiziertem ESFT erfolgt lokal (Operation und häufig auch Strahlentherapie) sowie systemisch (Chemotherapie) und richtet sich nach den aktuellen Richtlinien der EURO-E.W.I.N.G. 99 Studie (EUROpean Ewing tumour Working Initiative of National Groups - Ewing Tumour Studies 1999). Dabei erhalten die Patienten vor der lokalen Behandlung eine Chemotherapie aus 6 Zyklen mit Vincristin, Ifosamid, Doxorubicin und Etoposid sowie nach der Lokaltherapie eine weitere randomisierte systemische Behandlung. Dabei kommen entweder Kombinationen von A) Vincristin, Dactinomycin und Ifosfamid oder B) Vincristin, Dactinomycin und Cyclophosphamid oder C) Busulfan und Melphalan zum Einsatz. Trotz der verbesserten systemischen Therapie haben dennoch 20 % der Patienten innerhalb von 4 Jahren ein Rezidiv und sterben an den Folgen dieses erneut auftretenden Tumors (Shankar et al. 2003).

4. Potentielle Kandidatengene für die molekulare Prognostik der ESFTs

Bei Prognosemarkern handelt es sich um molekulare Substanzen, anhand derer eine individuelle Prognoseabschätzung und damit auch verbesserte Therapie für den Patienten erfolgen kann. Der Vorteil ist weiterhin, dass auch Aberrationen identifiziert werden können, die anhand einer rein cytogenetischen Analyse (Begutachtung der Chromosomen) nicht sichtbar sind.

4.1 CDH11 (Cadherin 11)

Cadherine sind Zellmembran durchziehende Glykoproteine, die zusammen mit den Integrinen, Immunglobulinen und Selektinen zu der großen Gruppe von Zelladhäsionsmolekülen gehören (Takeichi 1991). Adhäsionsproteine sind für wichtige zelluläre Funktion verantwortlich, wie zum Beispiel für Aggregation, Embryogenese, Zellmorphologie und Zellkommunikation (Übersichtsartikel: Wheelock und Johnson 2003). Die Cadherin Familie lässt sich in mehrere Untergruppen aufteilen, wobei alle Mitglieder einen ähnlichen Aufbau aufweisen, mit mindestens vier extrazellulären Domänen, mindestens einer Membran durchziehenden (Transmembran-) Domäne und einer intrazellulären Domäne (Tabelle 4-1; Tanihara et al. 1994). Die beiden bislang am meist erforschten Gruppen sind die klassischen Cadherine vom Typ I und II, die im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern über ß-Catenin mit dem Cytoskelett der Zelle verbunden sind (Übersichtsartikel: Stemmler 2008). Es gibt mehr als 100 verschiedene Cadherinmoleküle, die durch ihre unterschiedlichen Funktionen während der Embryonalentwicklung auch in unterschiedlichen Geweben zu finden sind. So wird zum Beispiel E-Cadherin in Epithelien, M-Cadherin in Muskeln und N-Cadherin in neuralen Zellen exprimiert.

Untergruppe	Eigenschaften	Beispiele
Klassische Cadherine, Typ I	Konserviertes HAV* Motiv; 5 ECs**	E-, M-, N-Cadherin
Klassische Cadherine, Typ II	Kein HAV* Motiv; 5 ECs**	Cadherin 7, Cadherin 11
Protocadherine	6 ECs**	Protocadherin 4
Desmosomale Cadherine	Kommen in Desmosomen vor; 4 ECs**	Desmoglein-1, -2
7-Transmembran Cadherine	Sieben Transmembran Domänen	Flamingo, CELSR1

Tabelle 4-1 Untergruppen der Cadherin Familie (verändert nach Stemmler 2008).

*HAV = Histidin-Alanin-Valin Motiv; **ECs = Extrazelluläre Domänen

Cadherin 11 gehört zu den klassischen Cadherinen vom Typ II und wurde 1994 zunächst in Maus Osteoblasten (knochenbildende Zellen) entdeckt, weshalb es auch OB-Cadherin genannt wird (Okazaki et al. 1994). Die humane Variante wurde ein Jahr später von Hoffmann et al. entdeckt und stimmt zu 97 % mit dem Protein aus der Maus überein (Hoffmann und Balling 1995). Das humane Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 16 (16q22) lokalisiert und die resultierende mRNA ist 3654 Basenpaare lang. Das CDH11 Protein besitzt 796 Aminosäuren und ein Molekular-gewicht von etwa 120 Kilodalton (kD). Es ist unterteilt in fünf extrazelluläre, eine transmembrane und eine intrazelluläre Domäne (Abbildung 4-1 A). Für die spezifische Zell-Zell-Adhäsion müssen sich zwei Cadherinmoleküle miteinander verbinden (dimerisieren). Die Verbindung dimerisierter Cadherine erfolgt homotypisch (nur Cadherine vom gleichen Typ binden aneinander) über die extrazellulären Dömanen und nur bei Vorliegen von Kalzium-Ionen (Ca²⁺; Takeichi 1991). Die cytoplasmatischen Domänen sind über die Proteine p120^{ctn}-, Beta- und Alpha-Catenin mit dem Cytoskelett verbunden (Abbildung 4-1 B).

Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass die Cadherin 11 Expression während der Embryonalentwicklung beim Übergang der epithelialen in die mesenchymale Phase einsetzt und im ausgereiften Organismus nur in mesenchymalen Zellen vorhanden ist (Simonneau et al. 1995, Goomer et al. 1998). Die Höhe der Cadherin 11 Expression ist offenbar auch ein wichtiges Kriterium bei der Entwicklung der Osteoblasten die sich aus mesenchymalen Zellen entwickeln (Cheng et al. 1998, Kawaguchi et al. 2001).

Eine eindeutige Zuordnung des *Cadherin 11* Gens zur Kategorie der Tumorsuppressorgene oder Onkogene ist nicht möglich, da unterschiedliche Ergebnisse für verschiedene Tumorentitäten gefunden wurden. So führt eine erhöhte Expression im Mammakarzinom zu aggressiveren Tumorstadien (Pishvaian et al. 1999), während eine erniedrigte Expression im Retinoblastom zu einem schnelleren Tumorwachstum führt (Marchong et al. 2010). In ESFTs wurde die Rolle des *Cadherin 11* Gens bislang noch nicht untersucht. Untersuchungsergebnisse des nahe verwandten Osteosarkoms lassen jedoch eine Funktion als Tumorsuppressorgen vermuten. Hier konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine verringerte Expression mit einem signifikant verkürzten Überleben von Osteosarkom Patienten korreliert (Nakajima et al. 2008).



Abbildung 4-1 Aufbau des CDH11 Proteins (**A**) und Zell-Zell-Adhäsion nach Dimerisierung des Proteins (**B**). EC = Extrazelluläre Domäne, TM = Transmembrane Domäne, CP = Cytoplasmatische Domäne (Kiener und Brenner 2005).

4.2 TERF2IP (telomeric repeat binding factor 2 interacting protein)

Telomere sind spezielle Nukleotidsequenzen (Hexanukleotidwiederholungen: 5'-TTAGGG-3') am Ende der linearen eukaryotischen Chromosomen. Sie schützen die Chromosomenenden vor Abbauenzymen, davor miteinander zu fusionieren und von dem zelleigenen DNA Reparaturmechanismus angegriffen zu werden (Alberts 2004). In humanen Keim- und Stammzellen dienen sie zusätzlich als Erkennungsstelle für das Enzym Telomerase. Denn bei der Mitose besteht durch die linearen Chromosomen das Problem, dass am Chromosomenende kein RNA Primer synthetisiert werden kann, um das letzte DNA Stück durch die 5'-3' Polymerase zu replizieren. Dadurch verkürzen sich die Telomerenden mit jeder Replikation, bis die Zelle ihre Teilungen einstellt (Seneszenz; Allsopp et al. 1992, Wright et al. 1996). Dies ist der Fall für die meisten humanen somatischen Zellen, für Keim- und Stammzellen wäre dieser Verlust an genetischer Information aber fatal. Daher exprimieren diese Zellen die Telomerase (Übersichtsartikel: Samassekou et al. 2010). Durch seine Funktion als Reverse Transkriptase kann das Enzym mit Hilfe einer eigenen RNA Matrize die Telomerenden verlängern (Greider und Blackburn 1985, Greider und Blackburn 1989). Abbildung 4-2 zeigt die Synthese der DNA an den Chromosomenenden durch die Telomerase.

Zunächst bindet die Telomerase über seine komplementäre RNA Matrize an den überhängenden 5'-3' DNA Strang. Die RNA dient dann als Vorlage für die Verlängerung des DNA Strangs durch eine reverse Transkription der Telomerase. Dadurch wird der 5'-3' DNA Strang soweit verlängert, dass das Enzym Primase einen RNA Primer synthetisieren kann, den die Polymerase als Start-

punkt für die DNA Synthese verwenden kann. Nach der Entfernung des RNA Primers ist die Telomer DNA um ein Hexanukleotid verlängert (Cooper und Hausman 2004).



Abbildung 4-2 Verlängerung der Telomeren durch die Telomerase (verändert nach Cooper und Hausman 2004).

Die Regulation der Telomerverlängerung erfolgt zum einen durch die Expression des *Telomerase* Gens (*hTERT*, *human telomerase reverse transcriptase*) und zum anderen durch regulatorische Proteine an den Telomerenden (Ulaner et al. 1998, Cech 2004). Eines dieser regulatorischen Proteine ist das TERF2IP, welches durch seine Entdeckung in Hefen auch hRAP1 (human repressor activator protein 1) genannt wird (Buchman et al. 1988). Es ist an den Telomerenden lokalisiert und bindet indirekt über das TERF2 (telomeric repeat binding factor 2) Protein an die DNA (Li et al. 2000). Die genaue Funktion des TERF2IP Proteins ist noch nicht vollständig geklärt, aber wahrscheinlich verhindert es im Komplex mit TERF2 und weiteren Proteinen ("Shelterin-Komplex") das Anlagern der Telomerase an die Telomerenden (Smogorzewska et al. 2000, O'Connor et al. 2004, Palm und de Lange 2008).

Das *TERF2IP* Gen befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 16 (16q23) und kodiert ein 399 Aminosäuren langes Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 47 Kilodalton (kD). Es besitzt fünf verschiedene Domänen (Abbildung 4-3), von denen die N-terminale BRCT (breast cancer gene 1 C terminus) und die C-terminale RCT (Rap1p C terminus) Domäne an die Proteine des Shelterin-Komplexes binden können (Li et al. 2000).

BRCT	Myb	Coil	RCT

Abbildung 4-3 Aufbau des TERF2IP Proteins. BRCT = breast cancer gene 1 C terminus; Myb = Myb-related HTH motif (Helix-Turn-Helix Motiv); Coil = coiled domain; RCT = Rap1p C terminus (verändert nach Li et al. 2000).

Die meisten humanen Tumoren (etwa 85 % bis 95 %) weisen eine aktive Telomerase auf, wodurch sich die malignen Zellen möglicherweise unbegrenzt teilen können (Shay und Bacchetti 1997, Bryan und Cech 1999). Auch viele Knochentumoren (43 % bis 84 %) besitzen eine aktive Telomerase, was mit aggressiveren Tumoren und einem schlechteren klinischen Verlauf bei Patienten korreliert werden konnte (Ohali et al. 2003, Umehara et al. 2004). Dagegen ist die Rolle von TERF2IP bei der Entstehung von bösartigen Tumoren bislang noch wenig erforscht und die bisherigen Ergebnisse scheinen sich zu widersprechen. So wiesen Li et al. bei der Überexpression von *TERF2IP* ein Verlängerung der Telomeren nach (Li et al. 2000), während O'Connor et al. eine Telomerverlängerung nach dem Ausschalten ("Knockdown") des Gens zeigen konnten (O'Connor et al. 2004). Neuere Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass TERF2IP nicht nur in Verbindung mit den Proteinen des Shelterin-Komplexes an den Telomerenden seine Funktion ausübt, sondern möglicherweise auch als Transkriptionsfaktor auf die Regulation bestimmter Gene einwirkt (Martinez et al. 2010).

B Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die molekularbiologische Erforschung der seltenen Ewing sarcoma family of tumors (ESFTs), insbesondere im Hinblick auf eine Verbesserung der Diagnostik und Prognostik bei ESFT Patienten. Bislang werden für die Prognostik keine molekularbiologischen Marker eingesetzt, auch weil die wenigen bisher erforschten chromosomalen Veränderungen jeweils nur für einen Teil der Patienten gefunden wurden. Daher sollte in dieser Arbeit eine Methode ausgesucht und etabliert werden, die sich für die Untersuchung von mehreren verschiedenen chromosomalen Veränderungen und für die Erfordernisse der Routine Diagnostik (schnell und kostengünstig) eignet.

Zusätzlich sollten weitere molekulare Prognosemarker für die ESFTs gefunden werden. Grundlage für diese Suche waren dabei Literaturrecherchen zu häufig vorkommenden chromosomalen Aberrationen und Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zum Verlust der Heterozygotie (loss of heterocygosity, LOH) auf Chromosom 16 bei ESFT Zelllinien. Die neuen Kandidatengene sollten dann auf ihre Bedeutung in ESFTs untersucht werden. Zum einen sollte eine Charakterisierung der Gene durch die *in vitro* Untersuchung von mehreren ESFT Zelllinien und Patientengeweben durch Analyse der Gendosis, DNA-, RNA- und Protein Expression erfolgen. Bei Hinweisen auf eine Tumor-assoziierte Funktion der Gene sollten aber zum anderen auch mögliche physiologische Auswirkungen einer veränderten Expression der Gene bei Zelllinien in Kultur untersucht werden.

C Material und Methoden

5. Zelllinien- und Patientenkollektiv

Es wurden 14 etablierte ESFT (Ewing sarcoma family of tumors) Zelllinien in dieser Arbeit verwendet; Tabelle 5-1). Für alle wurde eine *EWSR1 / ETS* (*Ewing sarcoma region 1 / E-twenty six*) Genfusion nachgewiesen und durch das so genannte DNA-Fingerprinting mit den genRES[®] MPX-2 und MPX-3 Kits (Serac) die Identität der Zelllinien überprüft (Ottaviano et al. 2010). Kontaminationen mit Mykoplasmen wurden mit dem PCR- (Polymerase chain reaction) basierten Venor[®]GeM mycoplasma detection kit (Minerva Biolabs) ausgeschlossen (Methodenbeschreibung: Seite 41). Die Kultivierung erfolgte nach Standardmethoden, welche in Kapitel 8.1 (Seite 40) näher beschrieben werden.

Zelllinie	Lokalisation	Diagnose	Genfusion	Herkunft
A673	Muskel	ES	t(11;22)	ATCC*
CADO-ES	Pleuraerguss	ES	t(21;22)	F. van Valen, Münster 1998
CHP-100	Mediastinum	PNET	t(11;22)	F. van Valen, Münster 1998
ET10	Muskel	ES	t(2;22)	(Peter et al. 1997)
EW3	Rippe	ES	t(21;22)	(Urano et al. 1996)
RD-ES	Humerus	ES	t(11;22)	ATCC*
RM-82	Femur	ES	t(21;22)	F. van Valen, Münster 1998
SK-ES1	Knochen	ES	t(11;22)	ATCC*
SK-N-MC	Supraorbital	PNET	t(11;22)	ATCC*
STA-ET1	Humerus	PNET	t(11;22)	F. van Valen, Münster 1998
STA-ET2.1	Fibula	PNET	t(11;22)	F. van Valen, Münster 1998
TC71	Humerus	ES	t(11;22)	F. van Valen, Münster 1998
VH-64	Pleuraerguss	ES	t(11;22)	F. van Valen, Münster 1998
WE-68	Fibula	ES	t(11;22)	F. van Valen, Münster 1998

Tabelle 5-1 Verwendete ESFT Zelllinien (ES = Ewing Sarkom, PNET = primitive neuroektodermale Tumoren).

* American Type Culture Collection

Das Patientenkollektiv umfasste 86 Tumorproben (DNA, RNA und Gewebeschnitte) von 67 verschiedenen Patienten, bei denen zwischen 2003 und 2009 ein ESFT diagnostiziert wurde. Das Alter der Patienten bei Diagnose lag zwischen 12 Monaten und 43 Jahren (Median = 15 Jahre) und das männliche Geschlecht war häufiger vertreten (Anzahl = 42), als das weibliche (Anzahl = 25). DNA Proben standen von 23 ESFT Patienten zur Verfügung und wurden für die Gendosis Analyse (Methodenbeschreibung: Seite 31) eingesetzt. Für die RNA Analyse (Methodenbeschreibung: Seite 25) waren Proben von 33 Patienten (für 19 dieser Patienten gab es auch eine DNA Probe) verfügbar. Zusätzlich waren Gewebeschnitte von 30 ESFT Patienten für eine Protein Analyse (Methodenbeschreibung: Seite 38) vorhanden. Von den ESFT Patienten wurden 49 entsprechend dem EURO-E.W.I.N.G. 99 (EUROpean Ewing tumour Working Initiative of National Groups) Protokoll behandelt, so dass hier klinische Daten aus der Studienzentrale in Münster (Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster) vorlagen.

DNA gesunder Spender

Für die Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA[®], Methodenbeschreibung: Seite 32) wurden gesunden Probanden Blutproben entnommen (Anzahl = 6). Nach einer Vorbehandlung der Proben mit Erythrozyten-Lysepuffer wurde die DNA nach dem Puregene DNA Protokoll extrahiert (Methodenbeschreibung: Kapitel 6.1.1). Die DNA wurde anschließend noch mit dem QIA-quick[®] PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt, um Gewebe- und Blut-extrahierte DNA vergleichen zu können. Die DNA der gesunden Probanden wurde zur Normalisierung der gewonnenen Aberrationsdaten verwendet.

6. Molekularbiologische Methoden

6.1 Nukleinsäure Extraktion

6.1.1 DNA Isolierung

Die Extraktion der DNA erfolgte analog zum "Puregene DNA Extraction Protocol" von Biozym. Es wurden frische und gefrorene ESFT Zelllinien, gefrorenes Patienten-Tumorgewebe und Blutproben zur Isolation verwendet. Das Patientengewebe musste dazu zunächst mit einem Gefriermikrotom in 10 µm dünne Schichten geschnitten werden. Von den Blutproben wurden jeweils 3 ml zur Vorbehandlung mit 12 ml 4 °C kaltem Erythrozyten-Lysepuffer* 5 Minuten (min) auf Eis inkubiert und für 5 min bei 2.500 Umdrehungen pro Minute (U/min) zentrifugiert, um die mononukleären Zellen zu erhalten. Die Blutzellen wurden mit weiteren 10 ml Lysepuffer resuspendiert und bis zur vollständigen Lyse der Erythrozyten (etwa 5 min) bei 4 °C inkubiert sowie anschließend abzentrifugiert. Alle Proben wurden mit 500 µl Zell-Lysepuffer** versetzt und für 15 min auf 65 °C erhitzt. Der Gewebeverdau erfolgte für mindestens 12 Stunden ("über Nacht") bei 56℃ mit Proteinase K (je nach Gewebemenge 20-200 µl; Merck). Danach wurden 0,2 µl RNAse A (Merck) je 100 µl Ansatz zu den verdauten Proben gegeben und diese für 1 Stunde bei 37℃ inkubiert. Nach jedem der folgenden drei Schritte wurden die Proben für 3 min bei 10.500 U/min zentrifugiert: Es wurden 50 µl 6-Molares Natriumchlorid (6M NaCl, Merck) je 100 μl Ansatz hinzugefügt, dann das DNA-Pellet mit 600 μl eiskaltem Isopropanol (Sigma-Aldrich) gefällt und mit 70 % Ethanol (Merck) gereinigt. Abschließend wurde das DNA Pellet getrocknet und in 50 µl TE-Puffer*** aufgenommen.

Aufgrund der unterschiedlichen Herkunft der Proben (Zellkultur, Gewebe, Blut) wurde zur besseren Vergleichbarkeit die isolierte DNA mit dem QIAquick[®] PCR Purification Kit von Qiagen weiter aufgereinigt.

QIAquick[®] PCR Purification

Alle Zentrifugationsschritte wurden für 1 min bei 13.000 U/min in einer Tischzentrifuge durchgeführt. Zu 50 µl isolierter DNA wurden 250 µl PB-Puffer (aus Kit) gegeben und gut gemischt. Der Ansatz wurde in eine QIAquick-Säule pipettiert und zentrifugiert. Zur Erhöhung der an die Säule gebundenen DNA wurde abweichend vom Protokoll der Durchfluss erneut auf die Säule gegeben und zentrifugiert. Die Säule wurde dann mit 750 µl PE-Puffer (aus Kit) und einem Zentrifugationsschritt gewaschen. Mit einer weiteren Zentrifugation wurde der restliche Waschpuffer entfernt. Zur Elution der DNA wurden 30 µl erwärmter EB-Puffer (aus Kit, circa 10 min bei 70°C erwärmt) auf die Säule pipettiert, 1 min inkubiert und anschließend zentrifugiert.

Die Menge und Qualität der isolierten DNA wurde durch das Verhältnis von E260 zu E280 bei 260 nm im Photometer ermittelt.

*Erythrozyten-Lysepuffer: 16,58 g Ammoniumchlorid (Merck), 2 g Kaliumhydrogenkarbonat (Merck), 400 μl 0,5 M EDTA pH 8,0 (Ethylendiamintetraessigsäure, Sigma), ad 2 Liter (I) Aqua bidest, pH 7,4 einstellen und autoklavieren

**Zell-Lysepuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,4 (Merck), 25 mM EDTA (Sigma), 500 mM NaCl (Merck), 0,1 % NP-40 (Abott), 1 % SDS (sodium dodecyl sulfate, Sigma)

***TE-Puffer: 10 mM Tris (Merck), 1 mM EDTA (Sigma), pH 7,9 einstellen

6.1.2 RNA Isolierung

Die RNA wurde unter Verwendung des kommerziell erhältlichen TRI-Reagenz[®] (Sigma-Aldrich) aus frischen und gefrorenen ESFT Zelllinien gewonnen. Das Reagenz besteht aus einer Lösung von Phenol und Guanidin-Thiocyanat, welche die Zellen aufschließt und gleichzeitig die RNA vor dem Abbau durch RNAsen schützt. Der Versuchsablauf basiert auf dem Protokoll von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski und Sacchi 1987).

Die Zellen wurden in 1 ml kaltem TRI-Reagenz[®] vollständig gelöst, mit 200 µl Chloroform (Merck) versetzt und die Lösung gut gemischt. Durch 15 min Zentrifugation bei 11.000 U/min wird die Mischung in drei Phasen separiert: eine wässrige Phase (enthält RNA), eine Interphase (enthält DNA) und eine organische Phase (enthält Proteine). Um eine Kontamination der RNA mit genomischer DNA zu verhindern, erfolgte die Zentrifugation in speziellen Reaktionsgefäßen, die die Trennung der Phasen durch eine wachsartige Schicht unterstützt (peqGOLD PhaseTrap, PeqLab). Mit 500 µl Isopropanol (Sigma-Aldrich) wurde die RNA bei -20 °C über Nacht präzipitiert und nach Zentrifugation (10 min, 11.000 U/min) das Pellet zweimal mit 70 % Ethanol (Merck) gereinigt (Zentrifugation: 5 min, 8.500 U/min). Das getrocknete Pellet wurde in 30 µl DEPC-Wasser (Diethylpyrocarbonat behandeltes Wasser, Sigma) gelöst, für 10 min auf 70 °C erhitzt und die Konzentration der isolierten RNA bei 260 nm photometrisch bestimmt. Die RNA wurde im Weiteren durch eine reverse Transkription in cDNA (copy-DNA) umgeschrieben und mittels quantitativer Real-Time-PCR die Expression der Zielgene gemessen (Methodenbeschreibung: Seite 25).

6.2 Polymerase chain reaction (PCR)

Die PCR (Polymerase Kettenreaktion) wurde 1987 von K.B. Mullis entwickelt (Mullis 1987) und wird zur *in vitro* Amplifikation von definierten DNA Abschnitten eingesetzt. Der Bereich der DNA, der vervielfältigt werden soll, wird dabei durch zwei synthetisch hergestellte DNA-Oligonukleotide (Primer) eingegrenzt. Die Primer binden durch komplementäre Basenpaarung an Einzelstrangbereiche der denaturierten DNA (Annealing) und dienen einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase als Startpunkt der Synthese. Das Polymerase-Enzym verlängert die Primer komplementär zum DNA Strang mit Nukleotidtriphosphaten (dNTPs) in 5'–3' Richtung (Polymerisation). Durch die Verwendung einer hitzestabilen *Taq*-Polymerase (*Thermus aquaticus*-Polymerase) können mehrere Zyklen von Denaturierung, Primer Annealing und Polymerisation durchlaufen werden.

In dieser Arbeit wurde die PCR unter anderem dazu verwendet, die Primer für die quantitative Real-Time-PCR zu testen (Methodenbeschreibung: Seite 25). Bei der Entwicklung der Primer wurde darauf geachtet, dass diese "Intron-überspannend" sind, das heißt die Primersequenzen sind in der genomischen DNA durch mindestens ein Intron getrennt. Dadurch wird eine unerwünschte Co-Amplifikation von genomischer DNA verhindert beziehungsweise ist nach Agarose-Gelelektrophorese als höhermolekulare Bande detektierbar.

PCR Ansatz (20 µl):

Aqua dest	13,1 μl
dNTPs (2 mM, Sigma)	2 µl
10x Polymerase Puffer (GE Healthcare)	2 µl
Sense Primer (10 µM)	0,4 µl
Antisense Primer (10 μM)	0,4 µl
Taq-Polymerase (GE Healthcare)	0,1 µl
cDNA	2 µl

Der Ansatz wurde in 0,2 ml Reaktionsgefäße (Safe lock, Eppendorf) pipettiert und in einen Thermocycler gegeben, der die Proben zyklisch erhitzt und abkühlt. Nach einer initialen Denaturierung (94 °C, 4 min) folgen 30-45 Zyklen mit:

Denaturierung	94 <i>°</i> C, 30 sek
Primer Annealing	55°C, 30 sek
Polymerisation	72°C, circa 1 min / kb (Kilobase)

Die Detektion und Größenbestimmung des PCR-Produktes erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese.

6.3 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese werden unterschiedlich große DNA Fragmente in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel entsteht durch die Verknüpfung von fadenförmigen Agarose-Polymeren, wobei die Vernetzung mit steigender Agarose-Konzentration engmaschiger wird. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA Fragmente, wird eine Agarose-Konzentration von 1% bis 2 % verwendet. Die pulverförmige Agarose (PeqLab) wird mit 1x TBE-Puffer* versetzt, aufgekocht und nach kurzem Abkühlen wahlweise mit Ethidiumbromid (0,6 µg/ml; Roth) oder Red safe Nucleic Staining Solution (0,6 µg/ml; HiSS Diagnostics) vermischt, um die DNA Banden im Ultravioletten-(UV-) Licht sichtbar zu machen. Das noch flüssige Gemisch wird in eine Elektrophorese-Kammer mit eingesetztem Kamm gegossen und härtet dort aus. Als Laufpuffer wird 1x TBE-Puffer* verwendet. Die DNA Proben werden im Verhältnis 5:1 mit Ladepuffer (6x DNA Loading Dye, Fermentas) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Zusätzlich wird eine Mischung von DNA Strängen bekannter Größe, der so genannte Längenstandard, aufgetragen. Es wurden ein 50 Basenpaar (bp) und 1 Kilobasen (kb) DNA Längenstandard (Gene Ruler DNA Ladder, Fermentas) verwendet. Bei einer Feldstärke von 5 Volt/cm Gel, wandert die negativ geladene DNA durch die Agarose zur Anode. Dabei wandern große DNA Fragmente langsamer als die kleineren Fragmente durch das Gel, da sie stärker vom Netzwerk der Agarose zurückgehalten werden. Die unterschiedlich großen DNA Stränge werden im elektrischen Feld aufgetrennt und können anhand des Längenstandards einer bestimmten Größe zugeordnet werden.

*1x TBE-Puffer: 89 mM Tris (Merck), 89 mM Borsäure (Merck), 2 mM EDTA (Sigma), in Aqua dest, pH 8 einstellen

6.4 Reverse Transkription

Zur Analyse der zellulären RNA durch die PCR muss diese zunächst in DNA umgeschrieben werden, in die so genannte cDNA (copy-DNA). Dies erfolgt durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, der Reversen Transkriptase. Die Erststrangsynthese wurde mit dem cDNA Kit von Fermentas (First Strand cDNA Synthesis Kit) durchgeführt. Die verwendete Polymerase war die M-MuLV-Reverse Transkriptase, welche aus dem *Moloney Murine Leukemia Virus* stammt. Eingesetzt wurden 1 µg isolierte Gesamt-RNA in einem Volumen von 10 µl DEPC-Wasser (Diethylpyrocarbonat behandeltes Wasser, Sigma).

Pro Probe wurde folgender Mix (10 μl) hinzugefügt:5x Reaktions Puffer4μl

	יאי
Oligo (dT) ₁₈ Primer	1µl
RNAse Inhibitor	1µl
10 mM dNTP Mix	2µl
Reverse Transkriptase	2µl

Die Erststrangansätze wurden eine Stunde bei 37 ℃ inkubiert und zur Inaktivierung der Transkriptase anschließend 5 min auf 70 ℃ erhitzt.

6.5 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Die Real-Time-PCR wird zur quantitativen Messung der Genexpressionsrate in Zellen und Geweben verwendet. Im Unterschied zu einer normalen PCR (Methodenbeschreibung: Seite 23), wird keine Endpunkt-Bestimmung der Amplifikatmenge durchgeführt. Die Menge an PCR Produkt wird stattdessen in jedem PCR-Zyklus durch eine Messung erfasst. Der Ablauf der PCR kann dadurch genau verfolgt und in drei Phasen gegliedert werden:

Während der ersten Phase ist noch wenig Template (DNA Vorlage) vorhanden und die Menge der amplifizierten DNA liegt unterhalb der Nachweisgrenze des Messsystems. Die Menge an zur Verfügung stehender Template-DNA nimmt dann mit steigender Zykluszahl immer weiter zu, daher kommt es in der zweiten Phase zu einem messbaren, exponentiellen Anstieg der Produktmenge. In dieser zweiten Phase der PCR ist es möglich, eine quantitative Aussage über die Expressionsrate eines Gens zu machen. In der anschließenden dritten Phase erreicht die Menge des PCR-Produktes ein Plateau, da einzelne Komponenten aufgebraucht sind beziehungsweise in suboptimalen Konzentrationen vorliegen (Eurogentec qPCR-Guide).

Für die Quantifizierung der Amplifikatmengen wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®] Green I (Qiagen) verwendet, der sich vor allem an doppelsträngige DNA anlagert und dadurch stärker fluoresziert. Die Fluoreszenzintensität ist demnach proportional zur Menge an doppelsträngiger DNA. Die Expressionsrate eines Gens kann durch den so genannten "Cycle-Treshold" (Ct-Wert) definiert werden. Das ist der PCR-Zyklus, in dem die sogenannte "exponentielle Phase" beginnt und die spezifische DNA Fluoreszenz einen definierten Schwellenwert übersteigt. Dabei gilt: Je mehr doppelsträngige DNA in der Probe, desto früher beginnt die "exponentielle Phase" und umso kleiner ist der Ct-Wert. Mit dem Ct-Wert allein kann aber noch keine guantitative Aussage über die Expressionsrate gemacht werden. Zum einen muss berücksichtigt werden, dass die Menge an messbarem Zielgen-Amplifikat von der initial eingesetzten cDNA Menge abhängt. Zum anderen muss auch berücksichtigt werden, dass die PCR eine annähernd 100%ige Effizienz haben müsste, um mit dem Ct-Wert die relative Expression eines Gens mit der so genannten ΔΔCt-Methode berechnen zu können (Eurogentec gPCR-Guide). Daher wurde in dieser Arbeit eine Quantifizierung der Genexpression unter Verwendung einer Standardkurve durchgeführt und die Ergebnisse der Zielgene CDH11 und TERF2IP durch gleichzeitige Analyse des Referenzgens GAPDH (Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) normalisiert ("Quantifizierung und Normalisierung", Seite 27).

Die Real-Time-PCR wurde mit den Reagenzien aus dem QuantiTect[®] SYBR[®] Green PCR Kit (Qiagen) angesetzt und die Messungen mit dem iQ5[®] (Bio-Rad) durchgeführt. In Tabelle 6-1 sind die verwendeten Primer (synthetisiert von Invitrogen) und ihre jeweiligen Gensequenzen aufgelistet. Sie wurden wie in Kapitel 6.2 (Seite 23) beschrieben, Intron-überspannend entwickelt und auf Funktionalität getestet.

Zielgen	Primer	Annealing- Temperatur	Sequenz (5'-3')	Produktgröße
CDH11	95-08 s	60 <i>°</i> C	GCATCGTCATTCTCCTGGTC	100 bp
	96-08 a	60 <i>°</i> C	TTCTCACGGACATCTTCTTCC	
TERF2IP	91-08 s	60 <i>°</i> C	AAGATGCTTGTGGAAGCCAC	109 bp
	92-08 a	60 <i>°</i> C	TTCTTCTTCCTCCTCATCAGG	
GAPDH	136-07 s	55℃	GAGTCCACTGGCGTCTTCA	190 bp
	137-07 a	55 <i>°</i> C	GGGGTGCTAAGCAGTTGGT	

Tabelle 6-1 Primer für die gRT-PCR (s = sense; a = antisense; bp = Basenpaare).

Am Ende der qRT-PCR wurde eine Schmelzpunkt Analyse durchgeführt. Da jeder DNA Doppelstrang bei einer für ihn spezifischen Temperatur aufgetrennt wird ("schmilzt"), werden Primer-Dimere oder unspezifische Amplifikate durch eine Abweichung in der Schmelzkurve sichtbar (Abbildung 6-1). Zusätzlich wurde eine Kontamination der cDNA mit genomischer DNA ausgeschlossen, indem auch die RNA der einzelnen Proben ohne vorherige reverse Transkription (Methodenbeschreibung: Seite 24) analysiert wurde.



Abbildung 6-1 Beispiel einer Schmelzkurve bei der qRT-PCR. Unerwünschte Primer-Dimere oder unspezifische Amplifikate werden durch weitere Peaks sichtbar gemacht (nicht dargestellt).

Versuchsablauf

Die qRT-PCR wurde für jede Probe im Doppelansatz durchgeführt. Für jeden Einfachansatz wurden 4 μl verdünnte cDNA (1:10) oder Positiv-Kontrolle (1:40; für die Standardkurve) verwendet. Die Positiv-Kontrolle wurde durch reverse Transkription eines Zelllinien-RNA-Mix hergestellt. Je 5 μg RNA der Tumor-Zelllinien HeLa, DTC-1, SK-N-MC, CADO-ES, SJ-SA-1, SA-OS, SK-BR-3, MCF-7, SW-48, CaCo2, SHEP und LAN-6 wurden mit dem Protokoll aus Kapitel 6.4 (Seite 24) umgeschrieben. Die Standardkurve wurde mit folgenden Konzentrationen der Positiv-Kontrolle erstellt: 100 %, 50 %, 25 %, 12,5 % und 6,25 %.

In einem Endvolumen von 20 µl wurden 10 µl QuantiTect[®] PCR Mix, je 0,5 µl sense- und antisense-Primer sowie 5 µl Aqua dest gemischt und anschließend die verdünnte cDNA hinzu gegeben. Die folgende Tabelle 6-2 zeigt die Temperaturänderungen im Thermocycler des iQ5[®].

Aktivierung der rekombinanten <i>Taq</i> DNA-Polymerase	95℃	15 min	
Denaturierung Primer Annealing	94 ℃ 55/60 ℃ *	20 sek 10 sek	45 Zyklen
Elongation	72℃	30 sek	
Schmelzkurve	72℃ - 95℃	30 sek	47 Zyklen

Fabelle 6-2	Temperatur	protokoll für	die c	RT-PCR.
-------------	------------	---------------	-------	---------

* je nach verwendetem Primer

Quantifizierung und Normalisierung

Die Expression der Gene in den cDNA Proben wurde durch eine Standardkurve ermittelt. Abbildung 6-2 zeigt exemplarisch eine solche Standardkurve. Sie wird erstellt durch das Auftragen des Logarithmus der Ausgangsmenge an cDNA ("Log Starting Quantity") gegen den Ct-Wert ("Threshold Cycle"). Der Mittelwert der Doppelbestimmung wurde ermittelt und zur anschließenden Normalisierung der Daten wurde die Expression der Zielgene *CDH11* beziehungsweise *TERF2IP* auf die Expression des Referenzgens *GAPDH* bezogen.



Abbildung 6-2 Beispiel für eine Standardkurve bei der qRT-PCR. Mit ihr kann die Zielgenexpression der cDNA Proben ("Unknowns") bestimmt werden.

6.6 Plasmid-Amplifikation und -Präparation

Die Klonierung der Zielgene *CDH11* und *TERF2IP* in den pT-Rex-DEST30 Vektor wurde durch die Firma ImaGenes durchgeführt. Tabelle 6-3 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren, einschließlich des pT-Rex-DEST30 Vektors ohne Zielgen (pT-Rex mock, Methodenbeschreibung: Seite 29).

Tabelle 6-3 Verwendete Vektoren (kb = Kilobase).				
Vektor	Größe des Zielgens	Gesamtgröße des Vektors		
pT-Rex-CDH11	2,4 kb	8,2 kb		
pT-Rex-TERF2IP	1,2 kb	7 kb		
pT-Rex mock	-	5,8 kb		

Abbildung 6-3 zeigt den Aufbau des pT-Rex-DEST30 Vektors. Die Zielgene *CDH11* und *TERF2IP* wurden zwischen die Rekombinationsstellen attR1 und attR2 kloniert. Die zur Verfügung gestellten *E. coli* (*Escherichia coli*) DH10B Kolonien mit den jeweiligen Zielgen Vektoren mussten zur weiteren Verwendung zunächst vermehrt und die Plasmide anschließend isoliert werden.



Abbildung 6-3 Aufbau des pT-Rex-DEST30 Vektors. Die Zielgene *CDH11* und *TERF2IP* wurden von ImaGenes zwischen attR1 und attR2 kloniert. *Xbal* = *Xanthomonas badrii* Restriktionsschnittstelle.

Plasmid-Amplifikation

Die *E. coli* DH10B Kolonien wurden zunächst durch Quadrantenausstrich auf LB-Amp Platten* (Luria-Bertani Agar-Platten mit Ampicillin als Selektionsmittel) bei 37 ℃ über Nacht vereinzelt. Eine Flüssig-Vorkultur aus LB Medium (Invitrogen) und Ampicillin (Roche; Endkonzentration 100 µg/ml) wurde mit einem einzelnen Klon angeimpft und 8 Stunden bei 37 ℃ auf einem Schüttler inkubiert. Dann wurde 1 ml der Bakteriensuspension 1:200 in einer LB-Ampicillin Hauptkultur verdünnt und bei 37 ℃ über Nacht weiter geschüttelt.

Plasmid-Extraktion

Zur Isolation der Plasmid DNA wurde das PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit und das entsprechende Protokoll von Invitrogen verwendet. Von der Hauptkultur wurden 100 ml Bakteriensuspension bei 6.000 U/min und 4°C, für 10 min in der Zentrifuge pelletiert. Zum Pellet wurden 10 ml Resuspensionspuffer (aus Kit) gegeben und die Zellen gut homogenisiert. Dann wurden 10 ml Lysepuffer (aus Kit) zum Ansatz hinzugefügt, durchmischt und für maximal 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lyse wurde durch 10 ml Präzipitierungspuffer (aus Kit) gestoppt und das Lysat auf eine HiPure Maxi Säule gegeben. Nach dem Binden der Plasmid DNA an die Säule wurde diese mit 50 ml Waschpuffer (aus Kit) gespült. Die Elution der DNA von der Säule erfolgte mit 15 ml Elutionspuffer (aus Kit). Mit 10,5 ml Isopropanol (Sigma-Aldrich) wurde die DNA in der Lösung präzipitiert und bei 11.000 U/min für 30 min bei 4℃ pelletiert. Zum Reinigen wurde das Pellet der DNA in 5 ml 70 % Ethanol resuspendiert und die Lösung bei 11.000 U/min für 5 min bei 4℃ zentrifugiert. Das DNA Pellet wurde circa 10 min getrocknet und anschließend in 200 µl TE-Puffer** gelöst. Die Menge und Qualität der isolierten DNA wurde bei 260 nm im Photometer bestimmt.

*LB-Amp Platten: 2 g LB Agar (Invitrogen) in 100 ml LB Medium lösen, autoklavieren, Ampicillin hinzufügen (100 μg/ml, Roche), in Petrischalen gießen und aushärten lassen

**TE-Puffer: 10 mM Tris (Merck), 1 mM EDTA (Sigma), pH 7,9 einstellen

6.7 Herstellung eines pT-Rex-DEST30 Vektors ohne Zielgen (pT-Rex mock Vektor)

Um mögliche Auswirkungen der Transfektionsmethode (Kapitel 8.4) auf die Physiologie der humanen ESFT Zelllinien messen zu können, wurde ein pT-Rex-DEST30 Vektor ohne Zielgen hergestellt. Er wird in dieser Arbeit als "pT-Rex mock Vektor" und die Zelllinien, die diesen Vektor tragen, als "mock transfiziert" bezeichnet.

Der pT-Rex mock Vektor wurde durch Doppelverdau mit *Xbal* und anschließender Re-Ligation des pT-Rex-*CDH11* Vektors generiert, wodurch das Zielgen aus dem Vektor entfernt wurde (Abbildung 6-3, Schnittpositionen: 660 + 2418). Nach der Re-Ligation wurde der Vektor in *E. coli* DH5α (Library Efficiency[®] DH5α[™] Competent Cells; Invitrogen) transformiert.

Restriktionsverdau

In einem Gesamtansatz von 20 µl wurden 4 µl 10x Tango[™] Puffer (Fermentas), 4 µg pT-Rex-*CDH11* Vektor und 1 µl *Xbal* Restriktionsenzym (aus *Xanthomonas badrii*; Fermentas) mit Aqua dest gemischt und die DNA bei 37 °C für zwei Stunden verdaut. Zur Inaktivierung des Restriktionsenzyms wurde der Ansatz 20 min auf 65 °C erhitzt.

DNA Ligation

Für die Re-Ligation wurden 5 µl Ligationspuffer und 4 µl T4 DNA Ligase (beides Fermentas) zum Ansatz hinzugefügt und 2 Stunden bei 24 ℃ inkubiert. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich die beiden Enden des Vektors miteinander verbinden (1x Ligation) ist dabei höher, als für eine Ligation des ausgeschnittenen DNA Stücks mit dem Vektor (2x Ligation). Der Erfolg der pT-Rex mock Vektor Herstellung wurde durch Gelelektrophorese überprüft.

Transformation in E. coli DH5α

Zur anschließenden Amplifikation wurde der pT-Rex mock Vektor in *E. coli* DH5α Bakterienzellen transformiert. Der Versuchsablauf wurde wie im Protokoll beschrieben durchgeführt (Invitrogen Manual von Oktober 2006):

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und für jeden Ansatz 100 µl verwendet. Der Ligationsansatz wurde 5-fach in TE-Puffer* verdünnt. Von dieser Verdünnung wurde 1 µl zu den kompetenten *E.coli* Bakterien gegeben. Zur Kontrolle der Transformationseffizienz wurden in einem weiteren Ansatz 50 pg pUC19 control DNA (10 pg/µl; Invitrogen) zu 100 µl kompetenten Zellen gegeben. Die Ansätze wurden für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend ein Hitzeschock für 45 Sekunden (sek) bei 42 °C im Wasserbad durchgeführt. Nach 2 min Inkubation auf Eis, wurden jeweils 900 µl S.O.C. Medium (Invitrogen) hinzugefügt. Die Ansätze wurden bei 37 °C und 225 U/min für eine Stunde geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde anschließend unverdünnt, 1:5 und 1:10 verdünnt auf LB-Amp Platten (Methodenbeschreibung: Seite 27) ausplattiert und diese über Nacht im 37 °C Brutschrank inkubiert.

Die Transformationseffizienz wurde durch Auszählen der Kolonien des pUC19 Kontrollansatzes mit der folgenden Formel ermittelt. Eine hohe Effizienz liegt bei etwa 1 x 10^8 Transformanten / µg pUC19 DNA vor.

 $\frac{\text{Transformanten}}{\mu g \text{ pUC19 DNA}} = \frac{\text{Anzahl Kolonien}}{50 \text{ pg pUC19}} \times \frac{1 \times 10^6 \text{ pg}}{\mu g} \times \frac{\text{Volumen des Ansatzes}}{\text{ausplattiertes Volumen}} \times \text{Verdünnungsfaktor}$

Mehrere einzelne Klone der pT-Rex mock Vektor Transformation wurden ausgewählt und mit einer sterilen Pipettenspitze jeweils eine Flüssig-Vorkultur angeimpft. Zusätzlich wurden die Klone auch auf einer weiteren LB-Amp Platte, der so genannten "Masterplatte", rasterförmig und nummeriert weiter kultiviert. Die Extraktion der Plasmid DNA erfolgte nach dem in Kapitel 6.6 (Seite 27) beschriebenen Protokoll.

*TE-Puffer: 10 mM Tris (Merck), 1 mM EDTA (Sigma), pH 7,9 einstellen

6.8 Sequenzierung

Die Abfolge von Nukleotiden in der DNA lässt sich mit der Kettenabbruchmethode beziehungsweise "didesoxy chain termination method" von Sanger bestimmen (Sanger et al. 1977). Ein kurzes, synthetisch hergestelltes DNA-Oligonukleotid ("Primer") wird durch eine DNA-Polymerase komplementär zu einem der DNA Stränge verlängert. Zusätzlich werden der Reaktion fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) zugesetzt. Dieser Variante der Nukleosidtriphosphate (dNTPs) fehlt die 3'-Hydroxygruppe. Werden statt der normalen dNTPs die ddNTPs an den synthetisierten Strang angefügt, kann die DNA-Polymerase kein weiteres Nukleotid anfügen. Dadurch entstehen unterschiedlich lange DNA Fragmente, deren Enden durch die ddNTPs fluoreszenzmarkiert sind. Durch unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe für die vier verschiedenen ddNTPs, lässt sich die genaue Sequenz der Nukleotide im DNA Strang bestimmen. Die Sequenzierungen wurden durch das Biologisch-Medizinische Forschungszentrum (BMFZ) der Universität Düsseldorf durchgeführt. Es wurden die korrekten Insertionen der Zielgene *CDH11* und *TERF2IP* in den pT-Rex-DEST30 Vektor überprüft. Tabelle 6-4 gibt einen Überblick über die verwendeten Primer für die Sequenzierung.

Plasmid	Primer	Sequenz (5'-3')
pT-Rex-CDH11	36-08 s	GTGCCTGAGAGGTCCAATGT
	96-08 a	TTCTCACGGACATCTTCTTCC
	96-09 s	ATCCACGCTGTTTTGACCTC
	97-09 a	ACGGCCAGTGCCTAGCTTAT
pT-Rex- <i>TERF2IP</i>	92-08 a	TTCTTCTTCCTCCTCATCAGG
	02-09 s	TCGGGTGATTTCATCTCCAC
	96-09 s	ATCCACGCTGTTTTGACCTC
	97-09 a	ACGGCCAGTGCCTAGCTTAT

Tabelle 6-4 Sequenzierungsprimer (s = sense; a = antisense).

Die Primer (synthetisiert von Invitrogen) wurden so zusammengestellt, dass die Sequenzen der Zielgene und die Übergangsstellen von Vektor zu Gen überprüft werden konnten.

6.9 Detektion von chromosomalen und genomischen Aberrationen

6.9.1 Array comparative genomic hybridization (aCGH)

Bei der vergleichenden genomischen Hybridisierung (comparative genomic hybridization, CGH) kann der Verlust oder Hinzugewinn von genetischem Material nachgewiesen werden. Dazu wird die zu testende DNA durch *in situ*-Hybridisierung an Metaphase-Chromosomen gesunder Spender (Referenz-DNA) gebunden. Test- und Referenz-DNA sind dabei mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, so dass es bei Vorliegen von Aberrationen zu einer Farbverschiebung des Fluoreszenzsignals kommt (Kallioniemi et al. 1992). Die Array basierte genomische Hybridisierung (aCGH) ist eine Weiterentwicklung der CGH, die eine höhere Auflösung und einen höheren Probendurchsatz ermöglicht (Albertson und Pinkel 2003).

Die aCGH Analysen an ESFT Zelllinien und Patienten wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Enrique de Alava am Centro de Investigación del Cáncer (Universität Salamanca, Spanien) durchgeführt. Die Test DNA wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 (Cyanine 5, rot) und die Referenz-DNA (Kontroll DNA von 40 gesunden Spendern; Amersham) mit Cy3 (Cyanine 3, grün) markiert. Es wurde ein 1 Mb "bacterial artificial chromosome" (BAC) Array verwendet und die Hybridisierung bei 42 °C für 48 Stunden durchgeführt. Die Arrays wurden eingescannt (Axon 4000b Scanner) und mit der GenePrix Software (Axon) analysiert. Mit dem Bioconductor Paket für die Programmiersprache R wurden die Daten weiter ausgewertet. Der Cut-off Wert für Deletionen und Amplifikationen wurde bei -0.4 beziehungsweise +0.4 gesetzt.

6.9.2 Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA®)

Die MLPA[®] basiert auf einer Weiterentwicklung der klassischen PCR und wurde 2002 von Schouten et al. entwickelt (Schouten et al. 2002). Abbildung 6-4 zeigt eine Übersicht über den Versuchsablauf. Zwei direkt nebeneinander liegende Oligonukleotid-Sonden hybridisieren an die Zielsequenz und werden durch eine Ligationsreaktion miteinander verbunden. Die Amplifikation erfolgt durch ein einziges Primerpaar, das die angefügten Sequenzen an jeder Oligonukleotid-Sonde erkennt. Durch unterschiedlich lange "Stuffer" Sequenzen entstehen je nach Zielgen unterschiedlich lange Fragmente, die mit Kapillargelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt werden können. Die Größe der Peak-Fläche der Amplifikate entspricht dabei der relativen Kopiezahl der Zielgensequenz.



Abbildung 6-4 Übersicht über den Ablauf der MLPA (verändert nach MRC-Holland).

In dieser Arbeit wurde die MLPA[®] verwendet, um Kopiezahländerungen von Genen zu analysieren. Es wurde sowohl das kommerziell erhältliche ME001B Tumor Suppressor Kit (MRC-Holland; Tabelle 6-5) als auch ein selbst entworfener Sonden-Mix mit den Zielsequenzen für *CDH11* und *TERF2IP* verwendet (Tabelle 6-6).

Gen	Chromosom	Länge (nt)	Gen	Chromosom	Länge (nt)
TP73	1p36	400	CD44	11p13	319
CASP8	2q33-q34	265	GSTP1	11q13	454
VHL	3p26-p25	355	ATM	11q22.3	184
RARB	3p24	193	IGSF4	11q23	427
MLH1	3p21.3	166	TNFRSF1A	12p13	175
MLH1	3p21.3	463	TNFRSF7	12p13	445
CTNNB1	3p22	472	CDKN1B	12p13.1	274
RASSF1	3p21.3	328	PAH	12q23	229
RASSF1	3p21.3	382	CHFR	12q24.33	238
FHIT	3p14.2	409	BRCA2	13q12	301
CASR	3q13.3-q21	481	BRCA2	13q12.3	418
APC	5q21	148	MLH3	14q24.3	202
ESR1	6q25.1	373	TSC2	16p13.3	283
PARK2	6q25.2-q27	154	CDH1	16q22.1	337
CDK6	7q21.3	310	CDH13	16q23.3	436
CDKN2A	9p21	160	HIC1	17p13.3	220
CDKN2B	9p21	211	BRCA1	17q21	247
DAPK1	9q34.1	346	BCL2	18q21.3	256
Al651963	10p14	364	KLK3	19q13	391
CREM	10p12.1	136	TIMP3	22q12.3	142
PTEN	10q23.31	292			

Tabelle 6-5 Untersuchte Gene im kommerziell erhältlichen ME001B Tumor Suppressor

 Kit von MRC-Holland (nt = Nukleotide; Länge = Größe der Amplifikate).

Für den Sonden-Mix wurden 0,8 μl von jedem Oligonukleotid (Konzentration 1 μM, LPO und RPO) in 600 μl TE-Puffer* verdünnt. Die Versuchsdurchführung erfolgte unter Verwendung des Protokolls von MRC-Holland (MLPA[®] DNA detection/quantification protocol; Version 19, 29-06-2007).

Tabelle 6-6 Selbst entworfene Oligonuk	leotid-Sonden für die MLPA.	Die Oligonukleotide wurden von Invitro-
gen synthetisiert (LPO = left probe oligo,	RPO = right probe oligo, nt =	Nukleotide).

Gen	Chromosom	Länge (nt)	Oligonukleotid	Hybridisierungssequenz (5'-3')
CDH11	16q22	110	LPO	CGTCGGAATTCATTGTCAAGGTCCA
			RPO	GGACATTAATGACAACCCTCCGGAGTTC
TERF2IP	16q23	115	LPO	AGAGAACTCCAGATTTGCCTGAAGAAGAGT
			RPO	ATGTGAAGGAAGAAATCCAGGAGAATGAAG

Es wurden jeweils 200 ng DNA in 5 µl TE-Puffer* verdünnt und die Proben für 5 min bei 98 ℃ denaturiert. Nach dem Abkühlen auf 25 ℃ wurde zu jeder Probe 1,5 µl Probemix und 1,5 µl Probemix Puffer aus dem Kit hinzugefügt. Für die Analysen der Zielsequenzen *CDH11* und *TERF2IP* wurden zusätzlich jeweils 0,5 µl des selbst entworfenen Sonden-Mix verwendet. Nach einer erneuten Denaturierung bei 95 ℃ für 1 min, erfolgte die Hybridisierung der Sonden für 16 bis 18 Stunden bei 60 °C. Für die Ligationsreaktion wurde folgender Mix pro Probe hinzu pipettiert und für 15 min bei 54 °C inkubiert:

Aqua dest	25 µl
Ligase-65 Puffer A	3 μΙ
Ligase-65 Puffer B	3 μΙ
Ligase-65	1 µl

Vom Ligationsansatz wurden 10 μ l in der PCR-Reaktion eingesetzt und mit dem folgenden Mix gemischt:

Aqua dest	15,75 μl
SALSA PCR-Puffer	2 µl
SALSA Enzym Puffer	1 µl
SALSA Primer	1 µl
SALSA Polymerase	0,25 µl

Für die Detektion in der Kapillarelektrophorese besitzt der SALSA Sense Primer eine 6-FAM (Phosphoramidit-Derivat des 6-Carboxyfluorescein) Fluoreszenzmarkierung. Die Amplifikation erfolgte in 40 Zyklen und einem finalen Elongationsschritt mit dem folgenden Temperaturprogramm:

Denaturierung	95℃	30 sek
Primer Annealing	0°℃	30 sek
Elongation	72 ° C	60 sek
Finale Elongation	72 ° C	20 min

Die PCR-Produkte wurden 1:10 in Aqua dest verdünnt und jeweils 1 µl der Verdünnung mit 12,5 µl HiDi Formamid und 0,5 µl GeneScan[™]-1000 ROX[™] Längenstandard (beides Applied Biosystems) versetzt. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 94 °C denaturiert. Die Fragmentanalyse wurde mit einem ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) durchgeführt und die Rohdaten mit der GeneMarker[®] Software (Version 1.7, SoftGenetics LLC) analysiert. Eine Normalisierung der Werte erfolgte mit sechs verschiedenen Kontrollproben von gesunden Spendern. Lediglich bei der Untersuchung zum Einfluss der Proben-Vorbehandlung auf die MLPA Ergebnisse (Kapitel 10.2.1, Seite 53) wurden nur zwei Kontrollen verwendet. Der komplette Verlust eines Peaks bedeutet eine homozygote Deletion des entsprechenden Gens (beide Genkopien sind deletiert). Der Cut-off Wert wurde, mit Hilfe der aCGH Ergebnisse, zur Bestimmung einer hemizygoten Deletion (eine Genkopie ist deletiert) bei 0,6 und zur Bestimmung einer Amplifikation bei 1,6 gesetzt.

*TE-Puffer: 10 mM Tris (Merck), 1 mM EDTA (Sigma), pH 7,9 einstellen

7. Proteinbiochemische Methoden

7.1 Herstellung von Proteinlysaten

Proteine wurden unter Verwendung eines speziellen Lysepuffers aus Zellkulturen isoliert. Durch Trypsin vom Boden gelöste Zellen (Methodenbeschreibung: Seite 40) wurden für 5 min bei 1.100 U/min zentrifugiert und anschließend das Medium entfernt. Die Zellpellets wurden mit 400 µl Lysepuffer* versetzt und durch Ultraschall (3 x 50 sek, 50%ige Leistung) aufgeschlossen. Nach Entfernung der Zelltrümmer durch Zentrifugation (10 min, 11.000 U/min), wurde die Konzentration der Lysate nach Bradford bestimmt (Kapitel 7.2).

*Lysepuffer (IEF-Puffer): 8 M Urea (Sigma), 1 % CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1propanesulfonate, Sigma), Bromphenolblau (Sigma), ad Aqua dest, 1x Complete Mini (Roche) vor Gebrauch hinzufügen

7.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentrationen der Proteinlysate wurden mit der Methode nach Bradford (Bradford 1976) mit dem Quick Start[™] Bradford Protein Assay (Biorad) gemessen. Bei diesem Assay bindet der rote Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 an vorhandene Proteine und wird dadurch in eine unprotonierte, blaue Form umgewandelt. Die Farbintensität ist proportional zur enthaltenen Proteinmenge und kann bei 595 nm im Elisa-Reader gemessen werden. Mit einer BSA (bovine serum albumin) Standardreihe wurden den gemessenen Extinktionen (optische Dichte, OD) die entsprechenden Proteinkonzentrationen zugewiesen (Abbildung 7-1). Es wurden BSA Konzentrationen von 1,25 µg/ml bis 20 µg/ml verwendet. Für eine Doppelbestimmung wurden 1 µl Proteinlysat oder die entsprechende Menge BSA (PAA Laboratories) in 400 µl Aqua dest verdünnt und mit 100 µl Bradford Reagenz versetzt. Nach 5 min Inkubation wurden jeweils 200 µl der Verdünnungen in eine Platte mit 96 Vertiefungen (96-Well Platte) pipettiert und die Extinktionen im Elisa-Reader bestimmt.



Abbildung 7-1 Beispiel einer BSA Standardkurve.

7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse von Proteinlysaten wurden die Proteine zunächst durch eine diskontinuierliche, denaturierende Gelelektrophorese (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) nach Lämmli aufgetrennt (Laemmli 1970). Anschließend wurden die Proteine auf eine Membran übertragen und die CDH11- und TERF2IP-Proteine über eine Immunreaktion detektiert (Kapitel 7.4).

Es wurde ein zweischichtiges Gel mit einer Stärke von 1,5 mm gegossen, wobei ein schmales Sammelgel das eigentliche Trenngel überschichtet. Durch das Sammelgel werden die Proteine aufkonzentriert, um anschließend im Trenngel scharfe, diskrete Banden zu erzeugen. Die Porengröße des Gels wird durch die Konzentration an Acrylamid bestimmt und im Trenngel je nach Molekulargewicht des zu analysierenden Proteins gewählt (Rehm 2002). Zur Analyse des CDH11und TERF2IP-Proteins wurde ein 8,5%iges Trenngel ausgewählt (Tabelle 7-1). Das Sammelgel wurde mit einer Standardkonzentration von 4,95% angesetzt.

	Trenngel (8,5 %; pH 8,8)	Sammelgel (4,95 %; pH 6,8)
Aqua dest	3.217 μl	1.380 μl
1 M Tris/HCI (Merck)	3.750 μl	250 μl
Acrylamid (Biozym)	2.833 μl	330 μl
10 % SDS (Sigma)	100 μl	20 μl
10 % APS (Merck)	100 μl	20 µl
Temed (Sigma)	6,67 μl	2 μΙ

Tabelle 7-1 Komponenten für die Gele der SDS-PAGE (APS = Ammoniumpersulfat).

Die Konzentration der Proteinlysate wurde mit IEF-Puffer (Methodenbeschreibung: Seite 35) auf 30 µg (15 µl Gesamtvolumen) eingestellt. Alle Proben wurden mit 5 µl 4x SDS-Ladepuffer* versetzt und 5 min bei 95 °C erhitzt. Dadurch werden die Proteine denaturiert und Quartärstrukturen sowie Wechselwirkungen zu anderen Proteinen unterbunden. Zusätzlich lagert sich das SDS an die Proteine an, so dass ein negativ geladener Komplex mit annähernd konstantem Ladungs-zu-Masse-Verhältnis entsteht (Rehm 2002). Die Proteine werden folglich nur nach ihrer Größe aufgetrennt. Um das Molekulargewicht der Proteinbanden bestimmen zu können, wurde die PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas) als Längenstandard verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in 1x Lämmli-Puffer** mit einer Mini-PROTEAN[®] 3 Cell Elektrophorese-Kammer (Bio-Rad). Nach dem Einlaufen der Proben bei 100 Volt für etwa 10 min, wurde die Spannung auf 130 Volt erhöht, bis die Proben das Ende des Trenngels erreicht hatten. Im Anschluss an die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte ein Western Blot mit anschließender Immundetektion (Kapitel 7.4)

*4x SDS-Ladepuffer: 5 ml Glycerin (87 %, Merck), 1,25 ml 1 M Tris pH 6,8 (Merck), 2 ml 10 % SDS (Sigma), 0,5 ml ß-Mercaptoethanol (Merck), 1,25 ml Aqua dest, Bromphenolblau (Sigma)

**1x Lämmli-Puffer: 3 g Tris (Merck), 14,4 g Glycin (Sigma), 1 g SDS (Sigma) ad 1 l Aqua dest

7.4 Western Blot und Immundetektion

Nach der Auftrennung in der SDS-PAGE (Kapitel 7.3) erfolgte das Übertragen ("Blotten") der Proteine auf eine Nitrocellulose Membran. Die Proteinbanden wurden durch eine angelegte Spannung aus dem Trenngel eluiert und auf die Membran transferiert. Anschließend erfolgte die Detektion der gewünschten Proteine durch Antikörper und Chemilumineszenz Reaktion.
Versuchsablauf Western Blot

Das Trenngel und eine Nitrocellulose Membran (0,2 µm, Schleicher und Schüll) wurden in einer Mini Trans Blot Kammer (Biorad) zwischen Whatman-Filterpapieren (Biorad) und Faservliespolstern fixiert und die Kammer mit Transfer Puffer* gefüllt. Die Übertragung der Proteine von dem Gel auf die Membran erfolgte bei 220 mA (Milliamper) für 120 min. Nach dem Blotten wurden die restlichen, noch freien Bindungsstellen der Membran für 60 min mit 1 % Blocking-Solution aus Milchpulver und BSA (bovine serum albumin)** abgesättigt.

Versuchsablauf Immundetektion

Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper (Tabelle 7-2) wurden in 0,5 % Blocking-Solution und 1x TBS*** verdünnt. Der Primärantikörper wurde bei 4 °C über Nacht inkubiert, gefolgt von Waschschritten mit 1x TBS (2x 5 min) und 1x TBST**** (2x 10 min). Nach einem weiteren Blockierungsschritt mit 1 % Blocking-Solution (30 min), wurde die Membran für 60 min mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Die Waschschritte mit 1x TBS und 1x TBST wurden anschließend wiederholt.

radish peroxidase	<u>]</u> .	
Protein	Primärantikörper	Sekundärantikörper
	Mouse-anti-CDH11 (110 kD)	Goat-anti-Mouse (HRP)
CDH11	(Artikelnr. 32-1700, Invitrogen)	(Pierce)
	Verdünnung: 1:300	Verdünnung: 1:5000
	Rabbit-anti-TERF2IP (60 kD)	Goat-anti-Rabbit (HRP)
TERF2IP	(Artikelnr. A300-306A, Bethyl)	(Pierce)
	Verdünnung: 1:500	Verdünnung: 1:5000
	Rabbit-anti-GAPDH (35 kD)	Goat-anti-Rabbit (HRP)
GAPDH	(Artikelnr. G9545, Sigma)	(Pierce)
	Verdünnung: 1:5000	Verdünnung: 1:5000

Tabelle 7-2 Antikörper für die Immundetektion beim Western Blot (kD = Kilodalton, HRP = horseradish peroxidase).

Die Detektion erfolgte mit dem "Lumi-Light Western Blotting Substrate" von Roche. Die im Kit enthaltene Lumi-Light Luminol/Enhancer Solution und die Lumi-Light Stable Peroxide Solution wurden 1:1 gemischt und für 5-10 min auf die Membran gegeben. Das Luminol wird durch die HRP (horseradish peroxidase), die an den sekundären Antikörper gekoppelt ist, oxidiert (Abbildung 7-2). Die Chemilumineszenz Reaktion wurde durch das Auflegen eines Röntgenfilms visualisiert. Nach dem Scannen des Röntgenfilms wurden die Banden mit dem Programm GelScape densitometrisch ausgewertet (Young et al. 2004).



Abbildung 7-2 Prinzip der Immundetektion. POD = Peroxidase (verändert nach Roche).

*Transfer Puffer: 35 g Glycin (Sigma), 7,5 g Tris (Merck), 500 ml Methanol (Merck), ad 2 l Aqua dest

**1 % Blocking-Solution: 1 g BSA (PAA), 3 g Milchpulver (BioRad), ad 100 ml 1x TBS

***1x TBS: 6,1 g Tris (Merck), 8,8 g NaCl (Merck), ad 1000 ml Aqua dest, auf pH 7,5 einstellen

****1x TBST: 1x TBS, 0,1 % Tween 20 (Merck)

7.5 Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung wurde zum spezifischen Nachweis der CDH11 und TERF2IP Proteine in Zelllinienpräparaten und Gewebeschnitten verwendet. Als Detektionssystem wurde die Streptavidin-Biotin Methode angewendet (Abbildung 7-3).



Abbildung 7-3 Schematische Darstellung der Streptavidin-Biotin Methode (www.pathologie-online.de).

Hierbei erfolgt nach Bindung des Primärantikörpers an die antigene Determinante des Antigens die Anlagerung eines Biotin-konjugierten Sekundärantikörpers. Über die Biotinylierung kann sich im nächsten Schritt ein Streptavidin-Peroxidase-Komplex anlagern, der eine Chromogenlösung in braunen Farbstoff umwandelt.

Von den Formalin fixierten, in Paraffin eingebetteten Proben wurden an einem Mikrotom 2 µm dünne Schnitte angefertigt, diese auf einen Objektträger aufgezogen und für 10 min bei 100 °C getrocknet. Zur Entfernung des Paraffins wurden die Schnitte für 15 min mit Xylol (Merck) behandelt. In einer absteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte rehydriert und anschließend mit Leitungswasser gewaschen. Durch die Fixierung mit Formalin kommt es zu chemischen Quervernetzungen von Aminosäuren und dadurch zu einem Verlust der Immunreaktivität der Antigene (Antigenmaskierung). Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte für 15 min unter Druck (Schnellkochtopf) in Citratpuffer* gekocht. Endogene Peroxidase wurde für 10 min mit H₂O₂ (Wasserstoffperoxid) und endogen vorhandenes Biotin für 15 min mit Avidin-Lösung** blockiert. Anschließend wurden die noch freien Bindungsstellen des Avidins mit einer 0,02 % Biotin-Lösung*** für 15 min abgesättigt. Zur Zell-Permeabilisierung wurden die Schnitte vor jeder Antikörperreaktion und vor der Chromogen Zugabe mit einer Triton-X100-Lösung**** behandelt. Die Bindung der Primärantikörper (Tabelle 7-3) an die Proteine wurde bei 4 °C über Nacht durchgeführt. Anschließend erfolgten die sekundäre Antikörperreaktion und die Inkubation mit dem Streptavidin-Peroxidase-Komplex (ScyTek) für jeweils 15 min. Als Chromogen (Substrat) wurde 3'3-Diaminobenzidin (DAB, DCS Diagnostik) verwendet, welches für 10 min auf die Schnitte gegeben wurde. Zur Gegenfärbung der Zellkerne (blau) wurden die Schnitte für 7 min mit Hämalaun-Lösung***** behandelt. Nach der Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit anschließender Xylol Behandlung, wurden die Schnitte unter Deckgläsern eingedeckt und versiegelt.

Tabelle 7-3	Antikörper	für die	Immunhistochemie
	Antikorper	iui uic	initiation in the state of the

Protein	Primärantikörper
CDH11	Mouse-anti-Cadherin 11 (0.5 mg/ml; 32-1700, Invitrogen)
TERF2IP	Rabbit-anti-TERF2IP (1 mg/ml; A300-306A, Bethyl)

Die Auswertung erfolgte am Lichtmikroskop unter Verwendung des Immunreaktiven Scores (IRS) von Remmele und Stegner (Remmele und Stegner 1987). Der IRS berücksichtigt die Farbintensität und den Anteil der gefärbten, positiven Zellen und berechnet sich aus dem Produkt der Faktoren.

Für die Farbintensität wurde folgende Einteilung verwendet:

- 0 = negativ; keine Färbung der Zellen
- 1 = schwache Färbung der Zellen
- 2 = mäßige Färbung der Zellen
- 3 = starke Färbung der Zellen

Der Anteil an positiven Zellen wurde wie folgt unterteilt:

- 0 = negativ; keine positiven Zellen
- 1 = <10 % positive Zellen
- 2 = 10-50 % positive Zellen
- 3 = 51-80 % positive Zellen
- 4 = >80 % positive Zellen

Somit kann der IRS Werte von 0-12 annehmen, wobei 0 für keine Expression und 12 für eine sehr hohe Expression steht. Zusätzlich wurde auch der Ort der Färbung in der Zelle (nukleär, cytoplasmatisch, membranständig) erfasst.

*Citratpuffer (pH 6): 21 g Zitronensäure, 25 ml NaOH (Natriumhydroxid, Merck), ad 10 l Aqua dest

**Avidin-Lösung: 1 Hühnereiweiß in 100 ml Aqua dest

***Biotin-Lösung: 0,02 % d-Biotin (Sigma) in TBS-Puffer (0,5 M Tris (Merck), 1,5 M NaCl (Merck), pH 7.9)

****Triton-X100-Lösung: 0,03 % Triton X-100 (Merck) in Aqua dest

*****Hämalaun-Lösung: 2,5 g Hämatoxylin, 0,5 g Natriumjodat, 125 g Aluminiumkaliumsulfat, 2,5 l Aqua dest, 125 g Chloralhydrat, 2,5 g Zitronensäure

8. Zellbiologische Methoden

8.1 Zellkulturbedingungen

Alle verwendeten 14 Zelllinien sind in Tabelle 5-1 (Seite 20) aufgelistet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei gleich bleibenden Bedingungen von 37 °C und einem Kohlendioxid- (CO_2 -) Gehalt von 5 %. Die adhärent wachsenden Zellen wurden in 0,1 % Gelatine* beschichteten Kulturflaschen und RPMI 1640 Kulturmedium** vermehrt. Waren 70% bis 90 % der Kulturflasche mit Zellen bewachsen (= Konfluenz; Zellen sind konfluent), wurden sie mit 1x PBS (phosphatgepufferte Salzlösung, Gibco) gewaschen und mit der Protease Trypsin (Trypsin-EDTA, Invitrogen) vom Boden abgelöst. Die Lyse wurde durch Zugabe von Kulturmedium mit Serum (FCS) abgestoppt. Nach Zentrifugation (5 min, 1.100 U/min) und Entfernung des Überstandes, wurden die Zellen für weitere Versuche verwendet oder in neue Kulturflaschen vereinzelt (passagiert). Alle Zellen in Kultur wurden auf eine mögliche Kontamination mit Mykoplasmen getestet (Methodenbeschreibung: Seite 41).

Zur dauerhaften Lagerung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196°C eingefroren. Dazu wurden mit Trypsin abgelöste und zentrifugierte Zellpellets 1:1 mit Kulturmedium und Einfriermedium mit DMSO (Dimethylsulfoxid)*** versetzt. In speziellen Behältern (Kryotubes) wurden die Zellen zunächst 1-2 Nächte bei -80°C tiefgekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Rekultivierung wurden die Kryotubes aufgetaut und die Zellsuspension 1:10 in Kulturmedium aufgenommen. Nach Zentrifugation (5 min, 1.100 U/min) wurden die Zellpellets mit frischem Kulturmedium versetzt und in frische, Gelatine beschichtete Kulturflaschen ausgesät.

*0,1 % Gelatine: 0,1 g Gelatine (Sigma) ad 100 ml Aqua dest, aufkochen und autoklavieren

**Kulturmedium: RPMI 1640 (Invitrogen), 2 mM L-Glutamin (200 mM), 1 % Penicillin/Streptomycin (alles Invitrogen), 10 % FCS (Sigma)

***Einfriermedium: 1 ml RPMI 1640 ohne FCS (Invitrogen), 1 ml FCS (Sigma), 0,5 ml DMSO (Sigma)

8.2 Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellkonzentration von Zellsuspensionen wurde eine Neubauer-Zählkammer (Neubauer "improved", Welabo) verwendet. Dazu wurde mit leichtem Druck ein Deckglas auf die angefeuchtete Kammer geschoben. Bei korrektem Anbringen bilden sich die so genannten Newton'schen-Ringe und das Deckglas fällt beim Umdrehen der Kammer nicht mehr ab. Der Hohlraum in der Mitte der Kammer besitzt dann eine Höhe von 0,1 mm, in den durch Kapillarkräfte ein Tropfen der Zellsuspension gezogen wird. Unter dem Mikroskop wurden die Zellen innerhalb der vier Großquadrate ausgezählt. Der Mittelwert entspricht der Anzahl Zellen multipliziert mit 10⁴, je ml Medium.

8.3 Mykoplasmenkontrolle

Mykoplasmen sind parasitär lebende Prokaryonten, die Zellkulturen infizieren und damit in den Stoffwechsel ihrer Wirtszellen eingreifen können (Kotani und McGarrity 1985). Außerdem verursachen sie cytogenetische Schäden (Lang 1985) und können zum Zelltod führen (Birke et al. 1981). Somit verhindern Mykoplasmen aussagekräftige und reproduzierbare Tests mit den Zelllinien. Um Kontaminationen ausschließen zu können, wurde nach dem Auftauen der Zellen und häufig auch nach längerer Kultivierung ein Test auf Mykoplasmen durchgeführt. Hierfür wurde das Venor[®]GeM-Mykoplasmen-Detektionskit (Minerva Biolabs) verwendet. Es beruht auf einer PCR-Reaktion, bei der die hoch konservierte Region der 16s rRNA im Genom der Mykoplasmen amplifiziert wird. Eine Kontamination wird durch ein PCR-Produkt im Agarosegel sichtbar gemacht.

Der Test wurde nach den Angaben des Herstellers (Venor[®]GeM Manual Version 07-2008) durchgeführt. Vom Überstand der konfluenten Zellkulturen wurden 100 μl bei 95 °C für 5 min gekocht, um vorhandene Mykoplasmen zu lysieren und anschließend abzentrifugiert (5 min, 11.000 U/min), um Zelltrümmer zu entfernen. In die PCR wurden 2 μl des Überstandes eingesetzt. Die Amplifikate wurden auf ein 1,5 % Agarosegel aufgetragen (Methodenbeschreibung: Seite 24).

PCR Ansatz pro Probe (25 µl Gesamtvolumen):

PCR Wasser	15,3 μl
10x Reaction Buffer	2,5 µl
Primer/Nukleotid Mix	2,5 µl
Internal Control DNA	2,5 µl
Polymerase (5 Units/µl)	0,2 μl

PCR-Programm:

94℃	2 min	1x
94℃ 55℃ 72℃	30 sek 30 sek 30 sek	39x
4°C	8	1x

8.4 Transiente Transfektion

Bei der Transfektion wird zellfremdes genetisches Material in eukaryotische Zellen gebracht, um eine forcierte Überexpression oder den *Knockdown* eines Gens zu erzielen. Im Gegensatz zu einer stabilen Transfektion wird das Material nicht dauerhaft in das Genom integriert, sondern liegt episomal in der Zelle vor. Folglich ist die Wirkung auf die Zelle nur von relativ kurzer Dauer, da zell-fremde Nukleinsäuren abgebaut werden und auch durch Zellteilung langsam verloren gehen (Kim und Eberwine 2010). In dieser Arbeit wurde die Transfektion zur forcierten Überexpression der Gene *CDH11* und *TERF2IP* in ESFT Zelllinien verwendet. Vor der Herstellung von stabilen Transfektanten (Kapitel 8.5) wurden mit der transienten Transfektion die optimalen Versuchsbedingungen für die verwendete Lipofektion ausgetestet. So musste die geeignete Konzentration der eingesetzten DNA im Verhältnis zum Transfektionsreagenz und die Inkubationszeit optimiert werden. Die

verwendeten Transfektionsansätze und jeweiligen Zelllinien sind in Tabelle 8-1 aufgelistet. Es wurden sowohl die kommerziell erhältlichen pT-Rex-DEST30 Vektoren mit den Zielgenen *CDH11* und *TERF2IP* verwendet (Tabelle 6-3, Seite 28) als auch ein selbst hergestellter pT-Rex mock Vektor ohne Zielgen (Methodenbeschreibung: Seite 29). Der pT-Rex mock Vektor dient dabei als Negativkontrolle, mit der der Einfluss des Transfektionsereignisses auf die Zellphysiologie kontrolliert werden kann.

Transfektionsansatz	Gesamtgröße des Vektors	ESFT Zelllinie					
pT-Rex- <i>CDH11</i>	8,2 kb						
pT-Rex mock	5,8 kb	CHP-100					
K- (untransfiziert)	-						
pT-Rex- <i>TERF2IP</i>	7 kb						
pT-Rex mock	5,8 kb	VH-64					
K- (untransfiziert)	-						

 Fabelle 8-1
 Ansätze für die Transfektion der ESFT Zelllinien (kb = Kilobase)

Versuchsdurchführung

Für die liposomale Transfektion wurde das Lipofectamine[™] Reagenz von Invitrogen und das Protokoll des Herstellers (Version 09 Juli 2004) verwendet. Das Verfahren beruht auf einer Bindung der negativ geladenen Plasmid DNA an eine Mischung aus kationischen und neutralen Lipidvesikeln, die von den Zellen aufgenommen werden können (Abbildung 8-1).



Abbildung 8-1 Schematische Darstellung der Lipofektion.

Die Zelllinien (CHP-100 und VH-64) wurden in Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen (6-Well Platten) ausgesät und nach 24 Stunden bei einer Zelldichte von 50% bis 80 % transfiziert. Zur Optimierung der Transfektionseffizienz wurde sowohl ein 1:2 als auch ein 1:3 Verhältnis von DNA zu Lipofectamine[™] getestet. Dazu wurden 4 µg DNA und 8 µl beziehungsweise 12 µl Lipofectamine[™] Reagenz jeweils in 250 µl Kulturmedium ohne Serum (RPMI 1640, Invitrogen) verdünnt. Anschließend wurden DNA und Reagenz für 60 min miteinander vermischt, um die DNA an die Lipide zu binden. Für die Kontrollansätze (K-) wurden statt der DNA nur 250 µl Medium ohne Serum mit Lipofectamine[™] Reagenz inkubiert. Das Kulturmedium der Zellen in den 6-Well Platten wurde durch Medium ohne Serum ersetzt und das DNA - Lipofectamine[™] (beziehungsweise Medium - Lipofectamine[™]) Gemisch vorsichtig auf die Zellen getropft. Die Höhe der Expression wurde 18 und 24 Stunden nach Transfektion durch RNA Isolation, Reverser Transkription und qRT-PCR (Methodenbeschreibung: Seite 22, 24 und 25) sowie Protein Extraktion und SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot (Methodenbeschreibung: Seite 35) bestimmt. Bei Vorliegen einer erhöhten Zielgenexpression für die *CDH11-* und *TERF2IP-*Vektor transfizierten Zellen im Vergleich zu mock transfizierten und untransfizierten Wildtyp Zellen (K-), wurden im Anschluss stabile Transfektanten hergestellt.

8.5 Stabile Transfektion

Nach Optimierung der Lipofektion und dem Nachweis einer erhöhten Zielgenexpression für die *CDH11-* und *TERF2IP-*Vektor transfizierten Zellen durch die transiente Transfektion (Kapitel 8.4), wurden stabile Transfektanten hergestellt. Hierbei werden die transfizierten Zellen selektioniert, bei denen die DNA in das Zellgenom integriert wurde (Wahrscheinlichkeit: $< 10^{-4}$; Mülhardt 2009).

Die Selektion erfolgte mit dem Antibiotikum G418 (Geneticin, PAA Laboratories), wobei der Selektionsdruck über mehrere Zellteilungen (circa zwei Wochen) aufrechterhalten wurde. Es überlebten nur Zellen, die das *Neomycin*-Resistenzgen des pTRex-DEST30 Vektors (*Neo(R)*, Abbildung 6-3, Seite 28) besaßen und bei denen zusätzlich die DNA in das Genom integriert wurde. Denn episomal vorliegende DNA wird nach kurzer Zeit abgebaut oder geht nach einigen Zellteilungen verloren (Kim und Eberwine 2010). Im Vorfeld wurde dazu die optimale Konzentration von G418 an untransfizierten Wildtyp-Zellen ausgetestet. Dabei wurden die konfluenten Zellen 14 Tage lang mit G418 behandelt und dann die geringste Antibiotikakonzentration ausgewählt, bei der alle Zellen abgestorben waren. Für die CHP-100 und VH-64 Zelllinie war dies bei einer Konzentration von 400 µg/ml beziehungsweise 110 µg/ml gegeben. Kulturmedium* und Selektivum wurden alle 2 bis 3 Tage gewechselt.

Die Transfektion der Zellen erfolgte analog zum Protokoll der transienten Transfektion (Kapitel 8.4), wobei die Ergebnisse zum optimalen Verhältnis von DNA zu Lipofectamine[™] und die ideale Inkubationsdauer berücksichtigt wurden. Im Anschluss, wurden die Zellen in zwei verschiedene Ansätze überführt:

Ansatz mit Zellkultur-Petrischalen

Drei verschiedene Zellverdünnungen (1:5, 1:10 und 1:20) je Transfektionsansatz wurden in Petrischalen ausgesät. Mit Ausnahme der untransfizierten Kontrollen (K-) wurden die Zellen mit G418 in der vorher ermittelten Konzentration (siehe oben) behandelt. Nach etwa 14 Tagen konnten Einzelzell-Kolonien (Klone) isoliert werden. Dazu wurden Spitzen von 1.000 µl Pipettenspitzen abgeschnitten, so dass nur noch der obere Rand stehen blieb. Diese Kunststoffzylinder wurden über die Kolonien gestülpt, um ganz gezielt die einzelnen Klone von der Schale abzulösen (Abbildung 8-2) und in Platten mit 24 Vertiefungen (24-Well Platten) zu überführen. Unter anhaltendem Selektionsdruck wurden die Kolonien weiter kultiviert und jeweils bei Erreichen der Konfluenz zunächst in 6-Well Platten und zuletzt in T25-Kulturflaschen passagiert.



Abbildung 8-2 Isolierung von Zellklonen mit Kunststoffzylindern (Corning Life Sciences).

Ansatz mit Verdünnungsreihe in 96-Well Platten

Von jedem Transfektionsansatz (Tabelle 8-1, Seite 42) wurde eine Verdünnungsreihe in je einer Platte mit 96 Vertiefungen (96-Well Platte) angelegt. Abbildung 8-3 zeigt die Reihenfolge der 1:2 Verdünnungsschritte. Sind alle Wells auf diese Weise gefüllt, ist die höchste Zellkonzentration in Well A1, die geringste in Well H12.

Die Zellen wurden ebenso wie im Ansatz mit den Petrischalen (siehe oben), mit G418 behandelt (mit Ausnahme von K-) und so lange kultiviert, bis Einzelzell-Kolonien in den Wells sichtbar waren. Diese wuchsen jeweils bis zur Konfluenz und wurden zunächst in 24-Well Platten, dann in 6-Well Platten und zum Schluss in T25-Kulturflaschen überführt.



Abbildung 8-3 Verdünnungsreihe für die Isolierung von stabilen Transfektanten (Corning Life Sciences).

Mit den zwei verschiedenen Ansätzen wurde sichergestellt, dass nach dem mehrere Wochen langen Selektionsprozess ausreichend viele stabile Klone isoliert werden konnten. Je nach Zelllinie kann die Effizienz der beiden Methoden unterschiedlich hoch sein.

Alle Klone wurden mit qRT-PCR (Methodenbeschreibung: Seite 25) und Western Blot (Methodenbeschreibung: Seite 36) analysiert. Für die nachfolgenden funktionellen Analysen wurden die *CDH11-* und *TERF2IP-*Vektor transfizierten Klone mit der höchsten Expression im Vergleich zu den Kontrollen (pT-Rex mock und K-) ausgewählt.

*Kulturmedium: RPMI 1640 (Invitrogen), 2 mM L-Glutamin (200 mM), 1 % Penicillin/Streptomycin (alles Invitrogen), 10 % FCS (Sigma)

8.6 Funktionelle Analysen

Die nachfolgenden Untersuchungen wurden an den stabil transfizierten ESFT Zelllinien (pT-Rex-*CDH11 / -TERF2IP*, pT-Rex mock) und den untransfizierten Wildtyp-Zellen (K-) durchgeführt (Tabelle 8-1, Seite 42). Das Kulturmedium der stabil transfizierten Zellen wurde dabei immer mit der für die jeweilige Zelllinie ausgetesteten Konzentration an G418 (Kapitel 8.5) supplementiert, um den Selektionsdruck aufrecht zu erhalten.

8.6.1 Migrationsassay (Scratch Assay)

Das Migrationsverhalten der Zelllinien wurde mit dem so genannten "Scratch-Assay" analysiert. Die Zellen wurden im Doppelansatz in 6-Well Kulturplatten ausgebracht, so dass sie 24 Stunden später konfluent waren. Das Medium wurde entfernt und zwei schmale, sich kreuzende Kratzer ("Scratches") mittels Pipettenspitze in die konfluente Zelldecke eingebracht. Die Vertiefungen der Platten wurden dreimal mit 1x PBS (Gibco) gewaschen und dadurch die abgelösten Zellen entfernt. Um zu verhindern, dass die durch den Kratzer freigelegten Bereiche der Kulturplatte lediglich durch eine Proliferation der Zellen wieder geschlossen werden, wurden die Zellen in Medium ohne Serum (RPMI 1640, Invitrogen) weiterkultiviert. Es wurde ein "Tag 0" Foto der Kratzer aufgenommen und eine Neubesiedlung durch die Zellen in 24 Stunden Abständen dokumentiert.

8.6.2 Proliferationsassay (MTT-Test)

Um einen möglichen Einfluss der Zielgen Überexpression auf Zellteilung und -wachstum (Proliferation) zu dokumentieren, wurde ein MTT-Test durchgeführt. Er basiert auf der Spaltung des wasserlöslichen gelben Tetrazoliumsalzes MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) in wasserunlösliche blau-violette Formazankristalle durch mitochondriale Enzyme metabolisch aktiver Zellen. Die gemessene optische Dichte (OD) des gelösten Formazans korreliert dabei direkt mit der Anzahl an stoffwechselaktiven, vitalen Zellen (Mosmann 1983).

Die Zelllinien wurden jeweils in drei verschiedenen Konzentrationen (2.500, 5.000, 10.000 Zellen in 100 µl Kulturmedium) im Vierfachansatz in 96-Well Platten ausgesät. Für jede Messung im 24 Stunden Abstand wurde eine 96-Well Platte benötigt. Die erste Messung erfolgte 24 Stunden nach dem Ausbringen der Zellen. Dieser erste Messwert wurde als Referenz für alle weiteren Messungen verwendet, um Unterschiede in den initialen Zellkonzentrationen zu kompensieren. Der Referenzwert (Tag 0) wurde gleich 1 gesetzt und alle weiteren Messwerte darauf bezogen. Jeder dieser Messwerte wurde aus dem Median des Vierfachansatzes berechnet und berücksichtigte auch den Einfluss des reinen Kulturmediums auf die Farbentwicklung ("Blank"), indem die OD-Werte für reines Medium von den OD-Werten der Ansätze abgezogen wurden. Daneben wurden auch die Standardabweichungen des Vierfachansatzes berechnet. Der Proliferationsassay wurde über zwei unterschiedlich lange Zeiträume durchgeführt. In der Kurzzeitbeobachtung wurden die Zelllinien von Tag 0 bis Tag 3 beobachtet und zu einem Ergebnis zusammengefasst. In der Langzeitbeobachtung wurde die Proliferation der Zellen von Tag 3 bis Tag 7 dokumentiert. Alle Analysen wurden mindestens einmal wiederholt.

Versuchsdurchführung

Für jeden Tag der Messung und pro Vertiefung der Platte wurden 20 μl MTT-Lösung* mit 100 μl Kulturmedium gemischt und auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 4 Stunden bei 37°C, wurde die Mischung entfernt. Zum Lösen der Formazankristalle wurde in jede Vertiefung 200 μl DMSO (Dimethylsulfoxid, Sigma) gegeben. Im Elisa-Reader wurde die Farbentwicklung bei einer Wellenlänge von 570 nm, mit einem Referenzfilter von 655 nm, photometrisch quantifiziert.

*MTT-Lösung: 5mg/ml MTT (Sigma) in PBS (Gibco) gelöst, steril filtriert 0,22 µm Porendurchmesser

8.6.3 Invasionsassay

Mit dem auf einer Boyden-Kammer (Boyden 1962) basierten Matrigel-Invasionsassay konnte die Invasivität der Zelllinien überprüft werden. Als Boyden-Kammern wurden ThinCert[™] Zellkultureinsätze für 6-Well Platten (8 µm Porendurchmesser; Greiner Bio-One) verwendet. Die Kunststoffeinsätze besitzen eine dünne Membran, welche das obere und untere Kompartiment voneinander abtrennt. Die Membranen wurden mit 500 µl 1:2 in Serum-freiem Medium (RPMI 1640, Invitrogen) verdünnten Matrigel[™] Basement Membrane Matrix (BD Biosciences) bei 37°C für 90 min beschichtet. Auf das getrocknete Matrigel[™] wurden pro Vertiefung 400.000 Zellen in 2,5 ml Serumfreiem Medium pipettiert. In die untere Kammer wurde 3 ml konditioniertes Kulturmedium gegeben. Das konditionierte Medium wurde hergestellt, indem konfluente Zellen für 24 Stunden in Kulturmedium kultiviert wurden und das Medium dann filtriert wurde (Porengröße 2 µm). Abbildung 8-4 zeigt schematisch eine Kammer mit dem Matrigel beschichteten Einsatz, auf dem sich die Zellen befinden. Die 6-Well Platten wurden für 24 Stunden bei 37°C im Zellkulturbrutschrank inkubiert.



Abbildung 8-4 Schematische Darstellung des Invasionsassays.

Eine Invasion durch die extrazelluläre Matrix auf die Unterseite der Membran wurde durch Formaldehyd Fixierung und DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) -Färbung der Zellen dokumentiert. Dazu wurden zunächst das Matrigel und die Zellen auf der Oberseite der Einsätze entfernt. Vorhandene Zellen auf der Unterseite wurden für mindestens 10 min mit 3,7 % Formaldehyd (Merck) fixiert und anschließend mit 1x PBS (Gibco) gewaschen. Die Färbung mit DAPI (Abott) erfolgte für 5 min, gefolgt von einem Waschschritt mit 1x PBS. Die Membranen wurden mit einem Skalpell vorsichtig vom Kunststoff getrennt und mit der Unterseite nach oben kurz getrocknet. Mit einem Tropfen VectaShield (Vector Laboratories) wurden die Membranen auf einen Objektträger gebracht und mit einem weiteren Tropfen VectaShield unter einem Deckglas fixiert. Um ein Austrocknen und Verrutschen der Membranen zu verhindern, wurden die Deckgläser mit Fixo gum (Marabu) umrandet. Mit einem Fluoreszenzmikroskop wurde die Anzahl der Zellen gezählt und auf die Gesamtmenge der ausgebrachten Zellen bezogen.

8.6.4 Aggregationsassay (Hanging Drop Assay)

Im Aggregationsassay kann das Zusammenlagern von Einzelzellen zu Zellverbänden beobachtet werden. Diese Fähigkeit könnte ein kritischer Faktor für Invasion und Metastasierung von Tumorzellen sein. Die spezielle Form des Aggregationsassay im hängenden Tropfen (Hanging Drop Assay) basiert auf der Methode von Potter und Morris (Potter und Morris 1985).

Für jede Zelllinie wurden im Dreifachansatz jeweils 1.000 Zellen in einem 20 µl Kulturmediumtropfen* auf die Innenseite eines Petrischalendeckels pipettiert (Abbildung 8-5). In die Petrischale wurden 10 ml Kulturmedium gegeben, um eine Verdunstung der Tropfen zu verhindern. Der Deckel wurde wieder auf die Petrischale gesetzt und die Ansätze bei 37 ℃ im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Durch die Schwerkraft sammeln sich die Zellen an der Spitze des Tropfens und können dort Aggregate ausbilden. Dies wurde an einem Zellkulturmikroskop in 100-facher Vergrößerung nach 15 min (Tag 0) und 24 Stunden später (Tag 1) dokumentiert. Der Versuchsansatz wurde mindestens einmal wiederholt.



Abbildung 8-5 Schematische Darstellung des Hanging Drop Assays.

*Kulturmedium: RPMI 1640 (Invitrogen), 2 mM L-Glutamin (200 mM), 1 % Penicillin/Streptomycin (alles Invitrogen), 10 % FCS (Sigma)

9. Statistik

Zur wissenschaftlichen Überprüfung von Hypothesen und zum Nachweis von Unterschieden einer Stichprobe oder mehrerer Stichproben, werden Signifikanztests eingesetzt. Mit diesen Tests lässt sich ein beobachtetes Ergebnis statistisch vom Zufall abgrenzen, auch wenn dies nicht gleichbedeutend mit einer tatsächlichen klinischen Relevanz ist (Übersichtsartikel: Lange und Bender 2007). Es wird eine Nullhypothese und eine Alternativhypothese aufgestellt. Zusätzlich wird durch das Signifikanzniveau α festgelegt, ab wann die Nullhypothese abzulehnen ist und die Daten für die Richtigkeit der Alternativhypothese sprechen. In dieser Arbeit wurde ein Niveau von $\alpha = 0.05$ festgelegt. Im Anschluss daran erfolgen die Datenerhebung und ein statistischer Signifikanztest, dessen Ergebnis durch den so genannten p-Wert definiert wird. Ist der p-Wert kleiner als das fest-gelegte Signifikanzniveau, ist die Wahrscheinlichkeit sehr groß, dass die Nullhypothese falsch ist und es einen statistisch signifikanten Unterschied der Daten gibt. Diese Signifikanz gilt dann nicht nur für die gezogenen Stichproben, sondern mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von α (0.05 beziehungsweise 5 %) auch für die (hypothetisch) unendlich großen Grundgesamtheiten (Übersichtsartikel: Bender und Lange 2007).

Basierend auf dem Artikel von Bender et al. wurde je nach Fragestellung ein entsprechender Signifikanztest ausgewählt (Bender et al. 2007). Berücksichtigt wurden dabei die Anzahl der Stichproben (zwei oder mehr Proben), der Abhängigkeitsstatus (abhängig oder unabhängig) und das Messniveau (binär, nominal, stetig oder zensiert). Alle Tests wurden zweiseitig durchgeführt, das heißt für die Ablehnung der Nullhypothese wurden sowohl Abweichungen nach oben als auch nach unten berücksichtigt.

9.1 Student's t-Test

Mit dem t-Test lassen sich die Mittelwerte von bis zu zwei Stichproben analysieren, um die Proben auf Gleichheit (Nullhypothese) oder Verschiedenheit (Alternativhypothese) zu testen.

In dieser Arbeit wurde der t-Test verwendet, um zu überprüfen ob die statistischen Mittelwerte von zwei stetigen (intervallskalierten) Stichproben signifikant verschieden voneinander sind. Der entsprechende p-Wert wurde mit Hilfe des Programms Microsoft Excel 2010 sowohl für abhängige als auch unabhängige Stichproben berechnet. Die Nullhypothese wurde abgelehnt, wenn der p-Wert kleiner als das festgelegte Signifikanzniveau von 0.05 war.

Verwendet wurde die Formel TTEST(Matrix1;Matrix2;Seiten;Typ), wobei "Matrix" für die ermittelten Werte der Stichproben, "Seiten" für die einseitige oder zweiseitige Testdurchführung und "Typ" für den Abhängigkeitsstatus der Stichproben steht.

9.2 Korrelation nach Pearson

Anhand der Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson lassen sich lineare Zusammenhänge zwischen zwei stetigen Stichproben beziehungsweise Variablen nachweisen und mittels statistischen Tests auch die Signifikanz dieser Korrelationen testen. Der Korrelationskoeffizient kann dabei einen positiven oder negativen Wert annehmen und steht für die Richtung der Korrelation. Positive Werte bedeuten, dass die beiden Variablen positiv miteinander korrelieren, zum Beispiel treten hohe Werte der einen Variablen gleichzeitig mit hohen Werten der anderen Variablen auf. Eine negative Korrelation bei negativem Korrelationskoeffizienten bedeutet dazu analog, dass hohe Werte der einen Variablen mit niedrigen Werten der anderen Variablen einhergehen. Die Korrelation nach Pearson wurde in dieser Arbeit für den Vergleich der Gendosis- und Genexpressionsdaten der Kandidatengene verwendet. Der Korrelationskoeffizient wurde mit dem Programm SPSS[®] Statistics 19 (IBM[®] Corporation 2010) berechnet und gleichzeitig auch ein zweiseitiger Signifikanztest angefordert. Eine Korrelation irgendeiner Richtung (positiv oder negativ) wurde bei einem p-Wert ≤ 0.05 angenommen (Alternativhypothese).

9.3 Chi²-Test

Mit diesem statistischen Verfahren lässt sich der Zusammenhang zwischen mehreren verschiedenen binären und nominalen (kategorialen) Stichproben beziehungsweise Variablen testen, um daraus Rückschlüsse auf eine mögliche Korrelation der Daten zu ziehen. Die Nullhypothese ist dabei die Annahme, dass es keinen Zusammenhang zwischen den Variablen gibt. In dieser Arbeit wurde der Test verwendet, um die Expression der Kandidatengene bei den primären Tumorgeweben mit den klinischen Daten der Patienten zu korrelieren. Dazu wurden die stetigen Werte der Expression durch mediane Gruppenbildung (hohe / niedrige Expression) in ein nominales Messniveau überführt. Die Wahrscheinlichkeit, dass die Nullhypothese zutrifft, wurde mit dem Programm SPSS[®] Statistics 19 (IBM[®] Corporation 2010) berechnet. Bei einer Wahrscheinlichkeit von weniger als 5 % ($p \le 0.05$) wurde die Nullhypothese abgelehnt und eine signifikante Korrelation zwischen den Variablen angenommen.

9.4 Analyse von Überlebenszeiten mit Kaplan-Meier und Log-Rank-Test

Mit der Kaplan-Meier Methode kann die Wahrscheinlichkeit berechnet und dargestellt werden, dass Patienten eine bestimmte Zeit überleben. Dazu werden die berechneten Überlebenszeiten gegen die Überlebenswahrscheinlichkeiten aufgetragen (Abbildung 9-1). Anhand der Kurve lassen sich dann zum Beispiel 5-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeiten ablesen. Bei den untersuchten Daten handelt es sich dabei um zensierte Variablen, das heißt am Ende des Beobachtungszeitraums ist das Ereignis (zum Beispiel der tumorbedingte Tod) nicht eingetreten. Mit dem Log-Rank-Test kann zusätzlich die Überlebenszeitanalyse zwischen zwei oder mehr Gruppen statistisch verglichen werden, also ob das Mortalitätsrisiko unabhängig (Nullhypothese) oder abhängig (Alternativhypothese) von der Gruppenzugehörigkeit ist (Übersichtsartikel: Ziegler et al. 2007a, Ziegler et al. 2007b). In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden Verfahren verwendet, um die Überlebenswahrscheinlichkeiten von Patienten mit einer hohen oder niedrigen Kandidatengen Expression zu berechnen und zu überprüfen, ob es einen statistisch signifikanten Unterschied im Überleben zwischen den beiden Gruppen gibt. Beide Analysen wurden mit dem Programm SPSS[®] Statistics 19 (IBM[®] Corporation 2010) durchgeführt. Bei einem p-Wert kleiner 0.05 wurde die Nullhypothese abgelehnt und eine Korrelation der Expression mit dem Gesamtüberleben angenommen.



Abbildung 9-1 Beispiel für eine Kaplan-Meier Kurve. Dargestellt ist die Überlebenszeit von Zungenkrebspatienten (verändert nach Ziegler et al. 2007b).

D Ergebnisse

Bislang gibt es kaum validierte molekulare Prognosemarker in ESFTs (Ewing sarcoma family of tumors), die eine differenzierte Risikoabschätzung und entsprechend angepasste Therapie für die Patienten ermöglichen. Zusätzlich zu den charakteristischen chromosomalen *EWSR1-ETS* (*Ewing sarcoma region 1 - E-twenty six*) Translokationen gibt es jedoch häufig weitere, sekundäre chromosomale Veränderungen, deren prognostische Bedeutung noch wenig erforscht ist. Die Aufklärung der genetischen und physiologischen Auswirkungen dieser Aberrationen und der anschließende Einsatz als molekulare Marker in der Routineuntersuchung, sind daher ein grundlegendes Ziel der molekularen ESFT Forschung.

Dieses Kapitel zeigt, auf welche Weise zwei neue Kandidatengene für die molekulare Prognostik ausgewählt wurden und wie ihre Bedeutung für die ESFTs untersucht wurde. Die Ergebnisse lassen sich dabei in drei Bereiche gliedern (Abbildung D):



Abbildung D Aufteilung der Ergebnisse.

Das erste Unterkapitel stellt dar, wie geeignete Kandidatengene identifiziert wurden, die als potentielle prognostische Marker in ESFTs in Frage kamen. Dazu wurden durch Literaturrecherche und Vorarbeiten der Arbeitsgruppe sekundäre chromosomale Aberrationen ausgewählt, die häufig in ESFTs vorkommen. Zusätzlich wurde eine Methode zur Bestimmung von Kopiezahländerungen von Genen (auch bezeichnet als Gendosis) etabliert und validiert. Basierend auf den Ergebnissen dieser Analysen wurden die Kandidatengene für die weiteren Untersuchungen ausgewählt.

Im zweiten Unterkapitel werden die Kandidatengene in Bezug auf die ESFTs näher charakterisiert. Gendosis und Expression wurden sowohl für ESFT Zelllinien als auch primäre Tumoren bestimmt und miteinander verglichen. Die ermittelten molekularen Daten der ESFT Patienten wurden anschließend mit den entsprechenden klinischen Daten korreliert und statistisch ausgewertet.

Die *in vitro* Analysen aus Unterkapitel zwei werden in Unterkapitel drei durch weiterführende Analysen an Zelllinien ergänzt. Eine forcierte Überexpression der Kandidatengene in ESFT Zelllinien wurde zunächst durch transiente Transfektion ausgetestet und optimiert. Mit den optimierten Bedingungen wurden dann stabile Transfektanten hergestellt und durch funktionelle Analysen die Auswirkungen auf die Physiologie der Zellen untersucht.

10. Auswahl von Kandidatengenen und Methoden für die molekulare Prognostik der Ewing sarcoma family of tumors (ESFTs)

Die Auswahl der Kandidatengene erfolgte durch Literaturrecherche im Hinblick auf sekundäre chromosomale Aberrationen in ESFTs und mit Hilfe von Vorarbeiten der Arbeitsgruppe. Daneben wurde eine Methode zur *in vitro* Charakterisierung der Gene ausgewählt, die sich gleichzeitig auch für die Routine Diagnostik eignen sollte (Abbildung 10-1).



Abbildung 10-1 Aufteilung der Ergebnisse in Kapitel 10.

10.1 Literaturrecherche und Vorarbeiten der Arbeitsgruppe

Unter Verwendung der NCBI Datenbank "PubMed" (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) wurde eine Literaturrecherche zum Thema sekundäre chromosomale Veränderungen in ESFTs durchgeführt. Mehrere Publikationen belegen, dass neben den EWSR1-ETS Genfusionen, bei etwa 75 % bis 80 % der ESFT Primärtumore weitere sekundäre chromosomale Veränderungen vorkommen. So konnten Roberts et al. durch cytogenetische Analysen bei 80 % der untersuchten Fälle (Anzahl = 88) chromosomale Veränderungen nachweisen, wobei besonders häufig Trisomien der Chromosomen 2, 5, 8, 12, 20, Amplifikationen von 1q (q = langer Arm des Chromosoms) und Deletionen von 1p (p = kurzer Arm des Chromosoms), 9p, 16q sowie 17p gefunden wurden (Roberts et al. 2008). Etwas weniger Aberrationen wurden bei Tarkkanen et al. durch CGH Analysen (comparative genomic hybridization) dokumentiert: hier zeigten 75 % von 28 untersuchten Tumoren chromosomale Veränderungen, vor allem Amplifikationen von 1q, 6p, 7p sowie Chromosom 12 und Deletionen von 16q (Tarkkanen et al. 1999). Die mit am häufigsten publizierte strukturelle Aberration ist ein Verlust des langen Arms von Chromosom 16. Douglass et al. konnten bei 10 % der Ewing Sarkome (Anzahl = 20) und 29 % der PNET (peripheral neuroectodermal tumors; Anzahl = 7) einen Verlust von 16g nachweisen (Douglass et al. 1990). In zwei Publikationen belegen Hattinger et al. ebenfalls eine häufige Deletion von 16q bei etwa 20 % der untersuchten ESFT Patienten (Anzahl = 58 beziehungsweise 134), darüber hinaus aber auch eine signifikante Korrelation des 16q Verlusts mit einem fortgeschrittenen, disseminierten Tumorstatus bei Diagnose und einem verkürztem Gesamtüberleben (Hattinger et al. 1999, Hattinger et al. 2002). Eine weitere Publikation weist mit CGH Analysen einen 16q Verlust bei 21 % der ESFT Primärtumoren (Anzahl = 52) nach und zusätzlich in einer multivariaten statistischen Analyse, dass dieser Verlust ein unabhängiger prognostischer Faktor in ESFTs ist (Ozaki et al. 2001).

Da in der Literatur ein häufiger und prognostisch relevanter Verlust des langen Arms von Chromosom 16 beschrieben wird, basiert diese Arbeit auf der Hypothese, dass sich in diesem chromosomalen Bereich mindestens ein prognostisch relevantes Tumorsuppressorgen befindet.

In Analysen zum Verlust der Heterozygotie (loss of heterocygosity, LOH) von ESFT Zelllinien, wurde der deletierte Bereich auf Chromosom 16 weiter eingegrenzt. Der kleinste gemeinsame Bereich des Verlustes erstreckte sich dabei von Locus 16q22 bis 16q24 (Diplomarbeit Ottaviano 2006, unveröffentlicht). Es wurden daher Gene aus diesem Bereich zur weiteren Analyse ausgewählt (Kapitel 10.3, Seite 60).

10.2 Etablierung und Validierung der MLPA zur Detektion von Chromosomenveränderungen

Zur in vitro Charakterisierung der Kandidatengene sollte eine Methode etabliert werden mit der Gendosisveränderungen, wie Deletionen und Amplifikationen, bei mehreren Genen gleichzeitig detektiert werden können. Dabei sollte sich diese Methode auch für die Anwendung in der Routine Diagnostik eignen, also vor allem eine schnelle und kostengünstige Analyse ermöglichen. Die Methode der quantitativen Real-Time PCR (qRT-PCR; Methodenbeschreibung: Seite 25) ist einfach und günstig durchzuführen, für eine simultane Analyse vieler verschiedener Gene aber ungeeignet. Bei der Methode der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ist es zwar möglich, verschiedene Aberrationen gleichzeitig zu detektieren, aber Deletionen oder Amplifikationen, die weniger als 190 kb (Kilobasenpaare) groß sind, können dabei übersehen werden (Savola et al. 2007). Mit der Array basierten genomischen Hybridisierung (aCGH; Methodenbeschreibung: Seite 31) ist es möglich, sehr viele verschiedene Gene auf chromosomale Veränderungen zu untersuchen und auch kleinere Aberrationen zu detektieren, dafür ist sie aber sehr teuer und erfordert eine aufwendige Bio-Informatische Auswertung (Übersichtsartikel: Albertson und Pinkel 2003). Eine Alternative stellt die Methode der Multiplex Ligations-abhängigen Sonden Amplifikation (MLPA; Methodenbeschreibung: Seite 32) dar. Das PCR-basierte Verfahren wurde 2002 entwickelt und analysiert schnell und kostengünstig Kopiezahländerungen einer Vielzahl verschiedener Gene (Schouten et al. 2002). Die MLPA wurde in ESFT Zelllinien- und Patientenproben bisher lediglich zur Analyse des Zellzyklus Gens CDKN2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, kodiert die Proteine p16/p14^{ARF}) verwendet (Brownhill et al. 2007). Daher wurden die MLPA Daten in dieser Arbeit mit den Ergebnissen der gut etablierten Methode der aCGH verglichen. Gleichermaßen wie es bereits von Villamón et al. zur Identifizierung von Aberrationen in Neuroblastomen eingesetzt wurde (Villamón et al. 2008).

Die MLPA Analysen wurden mit dem kommerziell erhältlichen ME001B Tumor Suppressor Kit von MRC-Holland durchgeführt, mit dem 38 verschiedene Tumorsuppressorgene (Tabelle 6-5, Seite

33) analysiert werden können. Die Gene *MLH1*, *RASSF1* und *BRCA2* sind in dem Kit redundant vorhanden, das heißt sie werden durch jeweils zwei unterschiedliche Sonden detektiert. Es sind also insgesamt 41 verschiedene MLPA Sonden im ME001B Tumor Suppressor Kit enthalten. Die aCGH Analysen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Enrique de Alava am Centro de Investigación del Cáncer (Universität Salamanca, Spanien) durchgeführt.

Da in der Routine Diagnostik der größte Teil des klinisch präparierten Untersuchungsmaterials fixiert vorliegt (meist Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet), wurde zunächst der Einfluss dieser Gewebevorbehandlung auf die Ergebnisse der MLPA untersucht (Kapitel 10.2.1). Anschließend wurden die vorhandenen Aberrationen bei den 38 verschiedenen Tumorsuppressorgenen für 14 Zelllinien und 23 Patienten erfasst (Kapitel 10.2.2, Seite 55). Die Resultate der Aberrationsanalysen wurden danach auch zur Auswahl der Kandidatengene in Kapitel 10.3 (Seite 60) verwendet.

10.2.1 Einfluss der Gewebevorbehandlung auf die Ergebnisse der MLPA

Es wurden fünf verschiedene ESFT Zelllinien sowohl in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet (nachfolgend als "fixierte Zellen" bezeichnet) als auch frisch oder in gefrorenem Zustand (nachfolgend als "frische Zellen" bezeichnet) verwendet. Die DNA der fixierten und frischen Zellen wurde extrahiert und 200 ng für die MLPA verwendet. Die Normalisierung erfolgte mit zwei verschiedenen Kontrollen gesunder Spender (Methodenbeschreibung: Seite 20). Abbildung 10-2 zeigt exemplarisch die Auswertung der Rohdaten mit der GeneMarker[®] Software.



Abbildung 10-2 Exemplarische Darstellung der MLPA Rohdaten, hier für die Zelllinie RM82 (mit DNA aus frischen Zellen). Jeder Peak (blau) steht für ein untersuchtes Tumorsuppressorgen. Zum Vergleich stellen die zusätzlichen roten Peaks die relative Fluoreszenzstärke für die (kombinierten) Kontrollen dar. Deutlich zu sehen ist das Fehlen des blauen RM82 Peaks bei circa 290 Nukleotiden (dies entspricht dem Gen *PTEN*).

Für die aCGH Analyse wurde DNA aus frischen Zellen verwendet, da bereits nachgewiesen werden konnte, dass die Qualität der DNA entscheidend für die Resultate ist (Johnson et al. 2006, van Beers et al. 2006).

Abbildung 10-3 zeigt exemplarisch die Auswertung der aCGH Rohdaten mit der GenePrix Software (Methodenbeschreibung: Seite 31).



Abbildung 10-3 Exemplarische Darstellung der aCGH Rohdaten, hier für die Zelllinie RM82. Jeder Peak (blau) steht für die Kopiezahl eines definierten Chromosomenbereichs. Zusätzlich wird der Median für mehrere kombinierte Nukleotidbereiche als rote Linie angezeigt.

In Tabelle 10-1 sind die Ergebnisse der Analyse für die fünf ESFT Zelllinien und 38 verschiedenen Tumorsuppressorgene (beziehungsweise 41 verschiedenen MLPA Sonden) im Vergleich mit den aCGH Ergebnissen zusammengefasst. Die Genaberrationen werden unterteilt in hemizygote Deletionen (Verlust einer Genkopie), homozygote Deletionen (Verlust beider Genkopien) und Amplifikationen (mehr als zwei Genkopien sind vorhanden).

Tabelle 10-1 Einfluss der Gewebevorbehandlung auf die MLPA. Die Analyse wurde mit DNA aus fixierten (P) und frischen Zellen (F) im Einfachansatz durchgeführt (Rot = hemizygote Deletion, Rot mit zusätzlicher Schraffierung = homozygote Deletion, Grün = Amplifikation).

ESFT Zelllir	nie	A6	73	CHP	100		RM-8	2	STA-ET2.1		WE	·68
Gen und		MLPA	aCGH	MLPA	aCGH	MLF	PA	aCGH	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH
Lokalisation	1	ΡF		ΡF		ΡI	F		ΡF		ΡF	
TP73	1p36											
CASP8	2q33											
VHL	3p25											
RARB	3p24											
MLH1	3p22											
MLH1	3p22											
CTNNB1	3p22											
RASSF1	3p21											
RASSF1	3p21											
FHIT	3p14											
CASR	3q21											
APC	5q22											
ESR1	6q25											
PARK2	6q26											
CDK6	7q21											
CDKN2A	9p21											
CDKN2B	9p21											
DAPK1	9q22											
AI651963	10p14											
CREM	10p12											
PTEN	10q23						1111					
CD44	11p12											
GSTP1	11q13											
ATM	11q23											
IGSF4	11q23											
TNFRSF1A	12p13											
TNFRSF7	12p13											
CDKN1B	12p13											
PAH	12q23											
CHFR	12q24											
BRCA2	13q12											
BRCA2	13q12											
MLH3	14q24											
TSC2	16p13											
CDH1	16q22											
CDH13	16q23											
HIC1	17p13											
BRCA1	17q21											
BCL2	18q21											
KLK3	19q13											
TIMP3	22q12											

Alle homozygoten Deletionen der Gene *CDKN2A*, *CDKN2B* und *PTEN* wurden in der MLPA jeweils unabhängig von einer Fixierung der Zellen detektiert. Mit Ausnahme der Zelllinie STA-ET2.1 wurden diese Deletionen auch gleichzeitig in der aCGH Analyse gefunden. Durchschnittlich 77 % der MLPA Ergebnisse zum Aberrationsstatus der Gene stimmten bei den fixierten und frischen Zellen überein (Spanne von 66 % bis 88 % Übereinstimmung je Zelllinie). Dabei wurden aber mit durchschnittlich 12,2 Aberrationen pro Zelllinie etwas mehr Veränderungen bei den fixierten Zellen detektiert, als bei den frischen Zellen (durchschnittlich 8,2 Aberrationen pro Zelllinie). Die statistische Auswertung mit dem Student's t-Test (Methodenbeschreibung: Seite 48) ergab aber, dass dieser Unterschied nicht signifikant war (p = 0.17, zweiseitig). Die MLPA Ergebnisse der frischen Zellen wichen durchschnittlich weniger von den aCGH Ergebnissen ab (16 %), als die der fixierten Zellen (25 %; Student's t-Test, p = 0.10, zweiseitig).

Die Gendosen der redundant vorkommenden Gene *MLH1*, *RASSF1* und *BRCA2* wurden bei den fixierten Zellen teilweise unterschiedlich detektiert, wohingegen bei den frischen Zellen die Ergebnisse übereinstimmten. So wiesen beispielsweise die fixierten Zellen der Linie CHP-100 jeweils bei der ersten Gensonde für *MLH1* und *RASSF1* eine Deletion auf, während bei der zweiten Sonde eine normale Gendosis vorlag.

10.2.2 Aberrationsanalyse von 38 Tumorsuppressorgenen

Es wurden 14 frische oder gefrorene ESFT Zelllinien und gefrorenes Tumorgewebe von 23 ESFT Patienten auf Deletionen und Amplifikationen der 38 verschiedenen Tumorsuppressorgene untersucht. Anschließend wurden die Ergebnisse für die Zelllinien- und Patientenproben zusammengefasst. Neben der Verifizierung der MLPA durch den Abgleich mit den aCGH Ergebnissen, wurden die Resultate der Analyse auch für die Auswahl der Kandidatengene verwendet (Kapitel 10.3, Seite 60). Die Rohdaten der Untersuchungen wurden mit der GeneMarker[®] Software (Version 1.7, Soft-Genetics LLC) analysiert. Die Normalisierung der Daten erfolgte durch Kontrollproben gesunder Probanden (Anzahl = 6; Methodenbeschreibung: Seite 20). Um die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der MLPA Ergebnisse zwischen unabhängigen Analysen zu testen, wurden alle Ansätze drei bis viermal durchgeführt und anschließend der Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt. Abbildung 10-4 zeigt exemplarisch das Ergebnis der Messungen für die Zelllinie A673 (A) und den Patienten 335-05 (B).

Eingezeichnet als blauen Rahmen ist der Wertebereich, bei dem die Gene eine normale Gendosis, also zwei Genkopien, aufweisen. Die beiden horizontalen Linien zeigen damit auch die so genannten Cut-off Werte an, die beschreiben bei welchem Messergebnis ein Gen deletiert oder amplifiziert ist. Die Cut-off Werte wurden mit Hilfe des aCGH Vergleichs bei 0,6 und 1,6 gesetzt. Somit lag für ein Gen eine Deletion vor, wenn der Messwert \leq 0,6 war sowie eine homozygote Deletion bei einem Wert von 0 und eine Amplifikation, wenn der Messwert \geq 1,6 war.



Abbildung 10-4 Exemplarische Darstellung der MLPA Werte (Mittelwert aus drei bis vier unabhängigen Versuchen und Standardabweichung) für die Zelllinie A673 (**A**) und den Patienten 335-05 (**B**). Rot = Deletion; Grün = Amplifikation; Rahmen = Normale Gendosis

Die Ergebnisse der unabhängigen Läufe zeigten insgesamt eine hohe Übereinstimmung der Daten, mit relativen Standardabweichungen von durchschnittlich 10 % für die Kontrollen, 15 % für die Zelllinien und 13 % für die Patienten.

10.2.2.1 Ergebnisse für die ESFT Zelllinienproben

Tabelle 10-2 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der 14 Zelllinien und 38 verschiedenen Tumorsuppressorgene. Jeweils verglichen wurden die Werte der MLPA Läufe mit den Ergebnissen der aCGH Analysen.

Es konnte eine hohe Übereinstimmung von MLPA und aCGH nachgewiesen werden. Durchschnittlich zeigten 93 % der Daten die gleichen Kopiezahlangaben, wobei Datensätze ohne Veränderungen ebenfalls berücksichtigt wurden. Wurden nur die Datensätze einbezogen, die zumindest bei einer der beiden Methoden eine Aberration aufwiesen, zeigten durchschnittlich 65 % der Daten eine Übereinstimmung in MLPA und aCGH. Die MLPA wies dabei insgesamt häufiger Aberrationen nach, als die aCGH. So wurden durch die MLPA 97 Aberrationen (64 Deletionen, 33 Amplifikationen) und durch die aCGH 78 Aberrationen (59 Deletionen, 19 Amplifikationen) detektiert. Zur weiteren Auswertung wurden nur Aberrationen berücksichtigt, die sowohl in der MLPA als auch in der aCGH detektiert wurden. Generell wurden mehr Deletionen (Anzahl = 51), als Amplifikationen (Anzahl = 16) detektiert

ESFT Zelllini	e	02J	A0/3		CADO-ES		CHP-100	0711		EWO	EWS		2-72	RM-82		SK-FS1		SK-N-MC		STA-ET1		CTA FTO 1	31A-E12.1	TC74	101	11 64		00 EV	WE-08														
Gen und		۲d	Η	A	Η	A	βH	۲	Η	۲d	Η	۲d	ыH	A ⁿ		٩	Η	A	< ⊥		× ۲		∢ I		Η	٨	Η	٨	Η	٨	Н												
Lokalisation		MLF	S S	ΥΓΈ	S S	ALF	Ö	MLF	ő	MLF	ő	MLF	Ö	ALF	5	ALF	ő	MLF	ő	MLF	Ö	MLF	ő	MLF	ő	MLF	ő	MLF	0 0 0														
TP73	1p36			F								_			Ť	_ (
CASP8	2q33																																										
VHL	3p25																																										
RARB	3p24																																										
MLH1	3p22																																										
MLH1	3p22																																										
CTNNB1	3p22																																										
RASSF1	3p21																																										
RASSF1	3p21																																										
FHIT	3p14																																										
CASR	3q21																																										
APC	5q22																																										
ESR1	6q25																																										
PARK2	6q26														_																												
CDK6	7q21				_																		_																				
CDKN2A	9p21														_																												
CDKN2B	9p21			111	8										_					aan a						<i>uuu</i>																	
DAPK1	9q22														_				_		_																						
AI651963	10p14														_																												
CREM	10p12			_																																							
PTEN CD44	11-10													91111.	_																												
CD44	11#12					-									_																												
ATM	11022			-											-																												
	11/23			-											-												-																
	12012								_						_		-		_		_						-		_														
TNEDSE7	12013														-																												
CDKN1B	12p13																																										
PAH	12g23																																										
CHEB	12g24																																										
BBCA2	13012																				_																						
BRCA2	13a12																																										
MLH3	14a24																																										
TSC2	16p13																																										
CDH1	16a22																																										
CDH13	16q23					1																																					
HIC1	17p13			1		1																							_														
BRCA1	17q21					i –																																					
BCL2	18q21					İ 🗌																																					
KLK3	19q13																																										
TIMP3	22q12																																										

Tabelle 10-2 Vergleich der MLPA und aCGH Ergebnisse bei 14 ESFT Zelllinien (basierend auf drei bis vier unabhängigen MLPA Versuchen). Rot = hemizygote Deletion, Schraffiert = homozygote Deletion, Grün = Amplifikation

Mit Ausnahme der Zelllinie STA-ET2.1, wurden alle homozygoten Deletionen (*CDKN2A, CDKN2B, PTEN*), die durch MLPA detektiert wurden, auch bei der aCGH als Deletion nachgewiesen. Allerdings lag der aCGH Wert der Gene *CDKN2A* und *CDKN2B* bei der STA-ET2.1 Zelllinie nahe der Cut-off Grenze, bei -0,34. Von den 14 Zelllinien wiesen 93 % (Anzahl = 13) Kopiezahländerungen der Tumorsuppressorgene auf. Die durchschnittliche Anzahl an Aberrationen je Zelllinie lag bei 5, mit einer Spanne von 0 bis 11 Veränderungen. Die Zelllinie ET10 zeigte dabei als einzige weder Deletionen noch Amplifikationen bei den 38 Tumorsuppressorgenen. Die meisten Aberrationen wies die Zelllinie SK-NM-C auf, mit Deletionen in 11 verschiedenen Tumorsuppressorgenen.

Tabelle 10-3 listet die Tumorsuppressorgene in ESFT Zelllinien auf, die sowohl in der MLPA als auch aCGH Kopiezahländerungen zeigten. Am häufigsten deletiert waren die beiden Gene *CDKN2A* und *CDKN2B* (bei 50 % der Zelllinien), wobei diese dabei auch häufig eine homozygote Deletion aufwiesen (bei 29 % der Zelllinien). Ebenfalls häufig deletiert waren die Gene *FHIT* und *CDH13* bei jeweils 36 % sowie *CTNNB1* bei 29 % der Zelllinien. Die häufigste Amplifikation wies das Gen *CDKN1B* auf (bei 29 % der Zelllinien).

Deletionen											
Gen und		Zelllinien									
Lokalisation	1	Anzahl	Prozent								
CDKN2A	9p21	7	50 %								
CDKN2B	9p21	7	50 %								
FHIT	3p14	5	36 %								
CDH13	16q23	5	36 %								
CTNNB1	3p22	4	29 %								
RARB	3p24	2	14 %								
VHL	3p25	2	14 %								
ESR1	6q25	2	14 %								
CREM	10p12	2	14 %								
AI651963	10p14	2	14 %								
PTEN	10q23	2	14 %								
CDH1	16q22	2	14 %								
RASSF1	3p21	1	7%								
CASR	3q21	1	7%								
APC	5q22	1	7%								
BRCA2	13q12	1	7%								
HIC1	17p13	1	7%								
BRCA1	17q21	1	7%								
BCL2	18q21	1	7%								

Amplifikationen										
Gen und		Ze	lllinien							
Lokalisation	I	Anzahl	Prozent							
CDKN1B	12p13	4	29 %							
IGSF4	11q23	2	14 %							
VHL	3p25	1	7 %							
TP73	1p36	1	7 %							
CASP8	2q33	1	7 %							
DAPK1	9q22	1	7 %							
CD44	11p12	1	7 %							
ATM	11q23	1	7 %							
TNFRSF1A	12p13	1	7 %							
TNFRSF7	12p13	1	7 %							
BRCA2	13q12	1	7 %							
BCL2	18q21	1	7 %							

 Tabelle 10-3 Übersicht über die deletierten und amplifizierten Tumorsuppressorgene in ESFT Zelllinien

10.2.2.2 Ergebnisse für die ESFT Patientengewebe

Die Analysen wurden auch bei 23 ESFT Patientenproben durchgeführt. Tabelle 10-4 zeigt die Deletionen und Amplifikationen für die 38 Tumorsuppressorgene.

Ebenso wie bei den Zelllinien zeigte sich auch bei diesen Proben generell eine hohe Übereinstimmung von MLPA und aCGH bei durchschnittlich 96 % aller Daten. Wurden wiederum lediglich die Aberrationen betrachtet, die zumindest bei einer der beiden Methoden gefunden wurden, zeigte sich eine Übereinstimmung von 31 % der Daten. Im Gegensatz zu den ESFT Zelllinien wurden keine homozygoten Deletionen detektiert und insgesamt lagen bei den Patienten auch sehr viel weniger Veränderungen vor. So wiesen sechs Patienten (26 %) weder in der MLPA noch aCGH Kopiezahländerungen auf. Diese Proben (05-04, 322-04, 26-05, 28-07, 31-07 und 104-07) sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in Tabelle 10-4 aufgeführt. Wie bei den ESFT Zelllinien konnten auch bei den Patientenproben insgesamt häufiger Aberrationen durch die MLPA nachgewiesen werden, als durch die aCGH. So wurden durch die MLPA 42 Aberrationen (36 Deletionen, 6 Amplifikationen) und durch die aCGH 34 Aberrationen (28 Deletionen, 6 Amplifikationen) und durch die aCGH.

Wurden nur Datensätze mit übereinstimmenden Ergebnissen in MLPA und aCGH betrachtet, so wiesen alle Proben zusammen (Anzahl = 23) 17 Deletionen und 3 Amplifikationen auf. Somit hatten auch die ESFT Patienten deutlich mehr deletierte als amplifizierte Tumorsuppressorgene. Lediglich 8 Patienten (35 %) wiesen Abweichungen in der Gendosis auf, demnach konnten für die Patienten deutlich weniger Aberrationen gefunden werden, als in der Literatur angegeben wird (75 % bis 80 %, Kapitel 10.1, Seite 51). Die durchschnittliche Anzahl an Aberrationen je Patient lag bei 0,8 (Spanne: 0-5 Veränderungen pro Patient).

Ergebnisse

ESFT Patient	ten	5	SU-18	00 00	20-02		96-03	10.00	03-04	20	32-04	10,04	164-04	166-04	10-00-	167-04	+0-101	313-04	10-010	00 00	cn-sn	98-05		335-05		10 DE	00-21	20 0CF	00-071	105 07	10-001	164-07		173-07	22-22
Gen und		٩c	Ŧ	٩c	щ	A	Ц	٩c	щ	۲c	Ŧ	٩c	щ	٩c	Τ	٩c	ЯH	٩c	ΤË	٩c	ЯH	A ^c	ΤË	٩c	ЗH	٩c	Τ	٩c	Ξ	۲c	ЯH	٩c	Ξ	Ac	Ŧ
Lokalisation		MLF	õ	MLF	aC	ML	ő	ML	aC	ML	ő	MLF	gC	MLF	ä	MLF	aCC	MLF	ä	MLF	aCC	MLF	g	MLF	aCC	MLF	ő	MLF	ő	ML	aCC	MLF	ő	MLF	- Se
TP73	1p36																																		_
CASP8	2q33																																		
VHL	3p25																																		
RARB	3p24																																		
MLH1	3p22																																		
MLH1	3p22																																		
CTNNB1	3p22																																	_	
RASSF1	3p21																																		
RASSF1	3p21																																		
FHIT	3p14																																		
CASR	3q21																																		
APC	5q22																																		
ESR1	6q25																																		
PARK2	6q26																																		
CDK6	7q21																																		
CDKN2A	9p21																																		
CDKN2B	9p21																																		
DAPK1	9q22																																		
AI651963	10p14																																		
CREM	10p12																																		
PTEN	10q23																																_		
CD44	11p12																																		
GSTP1	11q13					_																											_		
	11023																																_		
TNEDCE1A	10=12																																_		
TNERSET	12013																																		
	12013		-																-				-								_		_		
DAH	12023																						-										-		
CHER	12024																						-										-		
BBCA2	13012		-						-				-								_		-								-		-		
BBCA2	13012																																		
MLH3	14a24		-						-				-																				_		
TSC2	16p13		-		_				-																								_		
CDH1	16a22		-						-				-																		_				-
CDH13	16g23					1		1																											
HIC1	17p13																																		
BRCA1	17q21																											1							
BCL2	18q21					1		1																											
KLK3	19q13					1		1																											
TIMP3	22a12																																		

Tabelle 10-4 Vergleich der MLPA und aCGH Ergebnisse bei 17 ESFT Patienten (basierend auf drei bis vier unabhängigen MLPA Versuchen). Rot = hemizygote Deletion, Grün = Amplifikation

Tabelle 10-5 zeigt die Zusammenstellung der ermittelten Aberrationen in ESFT Patienten. Bei Kombination von MLPA und aCGH Daten wiesen nur wenige der Tumorsuppressorgene Deletionen oder Amplifikationen auf. Mit einem Anteil von jeweils 13 % der Patienten, waren die beiden Gene *CREM* und *CDH1* am häufigsten deletiert. Mit jeweils 9 % folgten die Gene *Al651963*, *IGSF4* und *CDH13*. Das am häufigsten amplifizierte Gen in den Zelllinien, *CDKN1B*, war bei den Patienten zusammen mit den beiden Genen *TNFRSF1A* und *TNFRSF7*, bei 4 % der Patienten verändert.

Tabelle 10-5 Übersicht über die deletierten und amplifizierten Tumorsuppressorgene inESFT Patientengeweben

Deletione	n								
Gen und		Patienten							
Lokalisatior	ו	Anzahl	Prozent						
CREM	10p12	3	13%						
CDH1	16q22	3	13%						
AI651963	10p14	2	9%						
IGSF4	11q23	2	9%						
CDH13	16q23	2	9 %						
TP73	1p36	1	4 %						
CDKN2A	9p21	1	4 %						
CDKN2B	9p21	1	4 %						
PTEN	10q23	1	4 %						
ATM	11q23	1	4 %						

Amplifikationen											
Gen und		Patienten									
Lokalisation		Anzahl	Prozent								
CDKN1 B	12p13	1	4 %								
TNFRSF1A	12p13	1	4 %								
TNFRSF7	12p13	1	4 %								

10.2.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse für die Zelllinien- und Patientenproben

Wurden die Aberrationsdaten von Zelllinien- und Patientenproben kombiniert (Anzahl aller Proben = 37), so fanden sich einige Gene, die in beiden Gruppen verändert waren (Tabelle 10-6). Am häufigsten deletiert waren die Gene *CDKN2A* und *CDKN2B* (bei 22 % aller untersuchten Proben), wobei die beiden Gene deutlich häufiger bei den Zelllinien deletiert waren (bei 7 Zelllinien), als bei den Patienten (bei einem Patient). Ebenfalls häufig waren die beiden Chromosom 16q Gene *CDH13* (19 %) und *CDH1* (14 %) sowie das Chromosom 10 Gen *CREM* (14 %) deletiert. Dabei zeigten die beiden Gene *CDH1* und *CREM* bei ähnlich vielen Proben in Zelllinien (jeweils bei 14 %) und Patienten (jeweils bei 12 %) eine Deletion. Bei den deutlich selteneren Amplifikationen war das Gen *CDKN1B* am häufigsten betroffen (14 % aller Proben).

Tabelle 10-6 Übersicht über die Tumorsuppressorgene, die sowohl in Zelllinien- als auch Patientenproben Kopiezahländerungen aufwiesen.

Deletionen										
Gen und		An	Prozent aller							
Lokalisatio	n	Zelllinien	Patienten	Proben (Anzahl = 37)						
CDKN2A	9p21	7	1	22 %						
CDKN2B	9p21	7	1	22 %						
CDH13	16q23	5	2	19 %						
CDH1	16q22	2	3	14 %						
CREM	10p12	2	3	14 %						
Al651963	10p14	2	2	11 %						
PTEN	10g23	2	1	8 %						

Amplifikationen											
Gen und		Anz	Prozent aller								
Lokalisation		Zelllinien	Patienten	Proben (Anzahl = 37)							
CDKN1B	12p13	4	1	14 %							
TNFRSF1A	12p13	1	1	5 %							
TNFRSF7	12p13	1	1	5 %							

10.3 Wahl der Kandidatengene

In Kapitel 10.1 (Seite 51) wurde anhand von Literaturrecherchen ein häufiger und auch prognostisch signifikanter Verlust des langen Arms von Chromosom 16 bei ESFTs beschrieben. Weiterhin wurde durch LOH-Analysen der chromosomale Bereich auf Locus 16q22 bis 16q24 eingegrenzt. Die Ergebnisse aus Kapitel 10.2 (Seite 52) bestätigten zudem eine häufige Deletion im Bereich 16q22 (*CDH1*) und 16q23 (*CDH13*) bei Zelllinien und Patienten zumindest für die beiden untersuchten 16q Gene.

Das Gen *CDH1* (*Cadherin 1*) kodiert für ein Zelladhäsionsprotein, welches vor allem in epithelialen Zellen vorkommt. In verschiedenen Tumorentitäten wurde es als Tumorsuppressorgen klassifiziert (Übersichtsartikel: Semb und Christofori 1998). Dagegen scheint *CDH1* in ESFTs eine onkogene Funktion zu haben. So zeigten Tirado et al., dass ein Verlust von CDH1 zu einer Wachstumsinhibition sowohl bei ESFT Zelllinien als auch bei Tumor Xenotransplantaten in Nacktmäusen führt (Tirado et al. 2006). Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von CDH1 in ESFT Zelllinien zu einer verminderten Apoptose der Zellen in Suspension führt (Kang et al. 2007). Da diese Arbeit auf der Hypothese beruht, dass sich zumindest ein Tumorsuppressorgen auf Chromosom 16q befinden sollte, wurde *Cadherin 1* nicht für eine weitere Analyse in Betracht gezogen.

Bei dem zweiten Gen, *CDH13*, handelt es sich ebenfalls um ein Cadherin, wobei dem Protein aber sowohl Transmembran- als auch Cytoplasmatische Domäne fehlt, die normalerweise bei den klassischen Cadherinen vorhanden sind (Ranscht und Dours-Zimmermann 1991). Dennoch ist auch Cadherin 13 in der Lage, eine Adhäsion von Zellen zu vermitteln (Vestal und Ranscht 1992). In den

meisten Tumorentitäten wird CDH13 wenig exprimiert und eine Überexpression wurde in endothelialen Zellen mit Tumor-progressiven Eigenschaften korreliert (Übersichtsartikel: Andreeva und Kutuzov 2010). Eine Funktionsanalyse von CDH13 in ESFTs wurde durch unseren Kooperationspartner, dem Centro de Investigación del Cáncer (Universität Salamanca, Spanien), unter Leitung von Dr. de Álava durchgeführt. Es konnten jedoch keine signifikanten Korrelationen zwischen der CDH13 Expression, einer veränderten Zellphysiologie oder der Prognose von ESFT Patienten nachgewiesen werden (de Alava, unveröffentlichte Ergebnisse).



Abbildung 10-5 Schematische Darstellung des Chromosom 16, mit Lokalisation der Kandidatengene *CDH11* und *TERF2IP*. Schwarzer Balken: Kleinster Bereich der LOH bei ESFT Zelllinien (Kapitel 10.1). Chromosomendarstellung verändert nach NCBI Map Viewer (www.ncbi.nlm.nih.gov; Version 37.1).

Unter Verwendung des NCBI Map Viewer (www.ncbi.nlm.nih.gov; Version 37.1), wurden weitere Gene gesucht, die sich auf Chromosom 16, im Bereich 16q22 bis 16q24 befinden und die für eine Untersuchung in ESFTs in Frage kamen. Dabei wurde ein weiteres Cadherin in direkter Nachbarschaft zu *CDH1* entdeckt und ausgewählt, das *CDH11* (Abbildung 10-5). In der Nähe von *CDH13* wurde das Gen *TERF2IP* für die weitere Analyse ausgewählt.

10.3.1 CDH11 (Cadherin 11)

Das am Locus 16q22 gelegenen Gen kodiert für ein Zelladhäsionsprotein, welches unter anderem eine wichtige Funktion in der Entwicklung von Knochen bildenden Zellen, den Osteoblasten, besitzt (Kawaguchi et al. 2001; Kapitel 4.1, Seite 14). Für die Suche nach neuen Kandidatengenen im Knochentumor ESFT, kam dieses Gen daher besonders in Betracht.

Es konnte bereits ein möglicher Einfluss von CDH11 auf die Entwicklung von Knochenmetastasen bei Prostata- und Mammakarzinom gezeigt werden (Chu et al. 2008, Huang et al. 2010, Tamura et al. 2008). Die Zuordnung des Gens zur Kategorie der Tumorsuppressorgene oder Onkogene scheint aber abhängig zu sein von der Tumorentität. So korreliert eine erhöhte Expression von CDH11 mit dem Vorliegen von aggressiveren Stadien beim Mammakarzinom (Pishvaian et al. 1999), wohingegen das Ausschalten von *CDH11* im Mausmodell des Retinoblastoms, zu einem schnelleren Tumorwachstum und weniger Zellsterben führt (Marchong et al. 2010). Bei dem häufigsten primären, malignen Knochentumor, dem Osteosarkom, ist eine Funktion von *CDH11* als Tumorsuppressor wahrscheinlich. Zum einen vermindert eine Überexpression von CDH11 in Osteosarkom Zelllinien deren Migrationsfähigkeit und führt *in vivo* zu weniger Lungenmetastasen (Kashima et al. 2003), zum anderen konnte eine verringerte Expression signifikant mit einer zu-nehmenden Malignität und einem verkürzten Überleben von Osteosarkom Patienten korreliert werden (Nakajima et al. 2008). In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die Rolle von CDH11 in ESFTs untersucht.

10.3.2 TERF2IP (Telomeric repeat binding factor 2 interacting protein)

Bei jeder DNA Replikation verkürzen sich die Enden der Chromosomen (Telomere), bis die Zellen in die so genannte zelluläre Seneszenz übergehen, wodurch sich normale Zellen nicht mehr weiter teilen können (Allsopp et al. 1992). In Tumorzellen werden dagegen Mechanismen aktiviert, die zur Erhaltung der Telomerlänge führen und damit auch die Teilungsfähigkeit von Zellen begünstigen (Übersichtartikel: Shay et al. 2001). Das bei 16q23 liegende Gen TERF2IP kodiert für ein Protein, welches indirekt an der Regulation der Telomerlänge beteiligt ist (Li et al. 2000; Kapitel 4.2, Seite 16). Es handelt sich dabei um einen negativen Regulator, der wahrscheinlich das Anlagern des Telomerkomplexes und damit eine Verlängerung der Telomere verhindert (O'Connor et al. 2004). Umehara et al. konnten bei verschiedenen Knochen- und Weichgewebe Tumoren (115 Tumorproben, darunter 19 Osteosarkome und 7 ESFTs) eine Korrelation von aktivem Telomerasekomplex und aggressiverem Tumor zeigen (Umehara et al. 2004). Diese Ergebnisse lassen eine Funktion von TERF2IP als Tumorsuppressor vermuten. Allerdings konnten Avigad et al. nachweisen, dass 63 % der ESFT Patienten kurze Telomere aufweisen und dies signifikant mit einer negativen Prognose korreliert, wahrscheinlich durch eine Instabilität der verkürzten Chromosomen (Avigad et al. 2007). Aufgrund des Hinweises auf eine Tumor-repressive Funktion, wurde die Rolle von TERF2IP in ESFTs in dieser Arbeit weiter erforscht.

11. In vitro Charakterisierung der Kandidatengene CDH11 und TERF2IP

Basierend auf der Hypothese, dass sich auf dem langen Arm von Chromosom 16 (16q) ein Tumorsuppressorgen befinden sollte, wurden die ausgewählten Kandidatengene eingehender in ESFT Zelllinien und primärem Tumorgewebe charakterisiert. Für *TERF2IP* konnte bereits eine mögliche Tumor-repressive Funktion in Knochentumoren nachgewiesen werden. Dagegen wurde die Funktion von *CDH11* in dieser Arbeit zum ersten Mal bei ESFT Zelllinien und Patienten untersucht. Die Analysen sollten zeigen, ob diese beiden Gene als neue potentielle Prognosemarker in Betracht kommen und wurden als Vorversuche vor den funktionellen Studien in Kapitel 12 durchgeführt. Abbildung 11-1 zeigt die Gliederung der Ergebnisse in Kapitel 11.



Abbildung 11-1 Aufteilung der Ergebnisse in Kapitel 11.

Zunächst wurde die Kopiezahl der Gene (Gendosis) mit MLPA und aCGH in ESFT Zelllinien und Patientengeweben bestimmt. Anschließend wurde die Expression sowohl auf RNA als auch Protein Ebene bestimmt. Im Anschluss wurden die gewonnenen Gendosis- und Expressionsdaten miteinander korreliert, um zu sehen ob das Vorliegen von genomischen Aberrationen (Deletionen oder Amplifikationen) einen Einfluss auf die Expression hat. Ob es einen statistischen Zusammenhang zwischen den molekularen und den klinischen Daten der Patienten gab, ist in Kapitel 11.4 erfasst.

11.1 Gendosisbestimmung in ESFT Zelllinien und -Patienten

Die Gendosis beschreibt die Anzahl an Kopien eines Gens in einer Zelle. Normalerweise sind in humanen Zellen (mit Ausnahme der Geschlechtszellen und DNA-freien Zellen) zwei Kopien eines Gens (= diploid) beziehungsweise zwei Allele im Genom vorhanden (Alberts 2004). Kommt es zu einer Amplifikation der Gene oder ganzer Chromosomenbereiche, liegen mehr als zwei Kopien vor (zum Beispiel drei Gene = triploid). Bei Deletionen unterscheidet man zwischen hemizygoten Deletionen, bei denen nur ein Allel des Gens betroffen ist und homozygoten Deletionen, bei denen beide Genkopien deletiert sind.

Basierend auf den Ergebnissen von Kapitel 10.2 (Etablierung und Validierung der MLPA, Seite 52), wurde für die Gendosisbestimmung sowohl die Methode der MLPA als auch die Methode der aCGH verwendet und die Ergebnisse miteinander verglichen. Außerdem wurde nur DNA aus gefrorenen oder frischen, unfixierten Zellen für die Analysen verwendet. Es wurden die 14 ESFT Zelllinienproben und primären Tumorgewebe von 23 ESFT Patienten eingesetzt, die auch schon in Kapitel 10 (Seite 51) verwendet wurden. Analog zu diesem Kapitel wurden die Rohdaten mit der GeneMarker[®] Software (Version 1.7, SoftGenetics LLC) analysiert und mit 6 Kontrollproben gesunder Probanden normalisiert. Da in Kapitel 10.2 eine geringe Standardabweichung zwischen den unabhängigen MLPA Analysen (etwa 10 % bis 15 %) belegt werden konnte, wurde ein einziger MLPA Ansatz durchgeführt. Um dennoch die Reproduzierbarkeit der Daten zu überprüfen, wurden die beiden selbst entwickelten Sonden für die Gene *CDH11* und *TERF2IP* (Tabelle 6-6, Seite 33) zu den Sonden des ME001B Tumor Suppressor Kit von MRC-Holland (Tabelle 6-5, Seite 33) hinzugefügt und die Ergebnisse für die kommerziellen Sonden mit den Ergebnissen aus Kapitel 10.2.2 (Seite 55) verglichen. Der Vergleich der Daten für die kommerziellen Sonden (Anzahl = 41) ergab eine hohe Übereinstimmung der Ergebnisse von 94 % für die Zelllinien und 95 % für die Patienten (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurden wieder die homozygoten Deletionen eindeutig bestimmt, so dass davon ausgegangen wurde, dass die Ergebnisse aus der MLPA reproduzierbar waren. Für den Patienten 104-07 konnte keine vollständige Gendosisbestimmung durchgeführt werden, da in der MLPA keine Ergebnisse erzielt wurden. Der Grund hierfür konnte nicht festgestellt werden, aber es wurde darauf verzichtet die gesamte Analyse für einen einzigen Patienten zu wiederholen. Der Patient wurde für die Analyse der Gendosis nicht berücksichtigt. Der Vergleich der MLPA mit der aCGH ist in Tabelle 11-1 gezeigt. Keine der Zelllinien- oder Patientenprobe wies eine Amplifikation der Kandidatengene auf und es konnten keine homozygoten Deletionen durch die MLPA detektiert werden. Bei dem Gen CDH11 wurden geringfügig häufiger Deletionen durch die aCGH gefunden, als durch die MLPA. So wurden durch aCGH Deletionen bei 3 Zelllinien (21 %) und 5 Patienten (23 %) detektiert, während die MLPA ebenfalls bei 3 Zelllinien (21 %), aber nur bei 2 Patienten (9 %) Deletionen von CDH11 nachweisen konnte. Für das Gen TERF2IP war es umgekehrt, denn durch die aCGH wurden für 2 Zelllinien (14 %), aber keinen der Patienten (0 %) Deletionen detektiert, dagegen wiesen bei der MLPA 4 Zelllinien (29 %) und 2 Patienten (9 %) eine Deletion auf. Übereinstimmende Ergebnisse von MLPA und aCGH lagen bei den Zelllinien für 93 % und bei den Patienten für 89 % der Daten vor. Wurden nur Aberrationen betrachtet, die sowohl in der MLPA als auch aCGH detektiert wurden, so wies das Gen CDH11 bei 21 % der Zelllinien (SK-ES1, SK-NM-C, VH-64) sowie 9 % der Patienten (313-04, 03-05) eine Deletion auf. Das Gen TERF2IP war bei 14 % der Zelllinien (SK-NM-C, VH64), aber keinen der Patienten deletiert.

Tabelle 11-1 Übersicht über die Aberrationen der Kandidatengene CDH11 und TERF2IP bei 14 Ze	əll-
linien (A) und 23 Patienten (B). Einfacher MLPA-Ansatz. Rot = hemizygote Deletion \ = keine Erge	b-
nisse vorhanden	

ESFT Zelllinie	4670	A0/3		CAUU-ES			ET10		EWO	EWS	97.00	ки-ео	CO MO	20-IVI U	57 EC+	ON-FOI			CTA ET1	01A-E11	FULL VLO	01A-E12.1	10.74		עם כע	VII-04	07 E0	WE-00
Gen und Lokalisation	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH
CDH11 16q22																												
TERF2IP 16q23																												

в

ESFT Patienten	50.50	91-03		93-03	00.00	90-US	01.04	10-CU	10 03	03-04	10.00	92-04	101.21	104-04	10 33 1	100-04	10201	to/-04	10 010	313-04	10 000	322-04	00.05	cn-cn	76 DE	c0-07	30 00	80-03
Gen und Lokalisation	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH
CDH11 16q22																												
TERF2IP 16q23																												
ESFT Patienten	100	GN-G22		90-21	0000	00-021	50	10-97	24 03	10-10	20 707	104-01	105.07	10-001	164.07	104-01	10 01 1	10-01										
Gen und Lokalisation	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH										
CDH11 16q22																												
TERE21P 16a23											\sim																	

Zusammenfassend konnten Gendosisveränderungen sowohl von *CDH11* als auch *TERF2IP* nachgewiesen werden. Bei Kombination von MLPA und aCGH Ergebnissen, lag bei 21 % (*CDH11*) beziehungsweise 14 % (*TERF2IP*) der untersuchten Zelllinien eine Deletion vor. Bei den ESFT Patientengeweben war nur das Gen *CDH11* sowohl bei MLPA als auch aCGH deletiert (9 % der primären Tumorgewebe), dagegen konnten für das Gen *TERF2IP* nur Deletionen mittels MLPA (9 % der Patientenproben) nachgewiesen werden.

11.2 Genexpression in ESFT Zelllinien und -Patienten

Bei der Expression wird die genetische Information der (Protein-) kodierenden Gene über die RNA als "molekulare Zwischenstufe" (so genannte mRNA) an die Proteine weitergegeben. Die Genexpression kann dabei auf jeder der drei Ebenen DNA - RNA - Protein reguliert werden, zum Beispiel durch eine Kontrolle der Transkription (DNA - RNA) oder der Translation (RNA - Protein, Alberts 2004). Anhand von Aberrationsanalysen lassen sich daher nur wenig Aussagen über die Menge an RNA oder Proteinen einer Zelle machen. Es wurde daher auch die Expression der Kandidatengene auf RNA- und Protein Ebene untersucht.

11.2.1 Quantitative Analyse der RNA Expression

Für die Analyse der Expression von CDH11 und TERF2IP auf RNA Ebene wurde die Methode der quantitativen Real-Time-PCR (gRT-PCR; Methodenbeschreibung: Seite 25) verwendet. Die benötigte cDNA (copy-DNA) der zu analysierenden Proben war zum größten Teil bereits am Institut vorhanden. Fehlende Proben der Zelllinien wurden durch RNA Isolation aus gefrorenen Zellen mit anschließender Reverser Transkription (Methodenbeschreibung: Seite 22 und Seite 24) neu hergestellt. Es wurden die gleichen 14 ESFT Zelllinien verwendet, für die auch schon die Gendosisbestimmung (Kapitel 11.1) durchgeführt wurde. Von den bis dahin analysierten 23 Patientengeweben waren dagegen 4 Proben (91-03, 96-03, 63-04, 120-06) nicht mehr verfügbar. Um ein ausreichend großes Patientenkollektiv analysieren zu können, wurden zusätzlich 14 weitere primäre Tumorgewebe untersucht (Gesamtanzahl untersuchter Patientengewebe = 33). Tabelle 6-1 (Seite 26) listet die verwendeten Primer für die analysierten Gene auf. Neben den Kandidatengenen CDH11 und TERF2IP wurde auch das Gen GAPDH analysiert, welches zur Normalisierung der Daten verwendet wurde (Methodenbeschreibung: Seite 27). Alle Ansätze erfolgten in Doppelbestimmung. Die normalisierte, relative Expression (bezogen auf GAPDH) der beiden Kandidatengene CDH11 und TERF2IP ist in Abbildung 11-2 für die 14 ESFT Zelllinien und in Abbildung 11-3 für die 33 ESFT Patienten zusammengefasst.

Bei den Zelllinien zeigte sich eine heterogene RNA Expression von *CDH11*. Die relative Expression nahm Werte von 0,0 (CHP-100, \pm 0,02 Standardabweichung) bis 7,8 (STA-ET2.1, \pm 2,5) an und die mittlere Expression betrug 1,8. Die mit Abstand höchste *CDH11* Expression zeigte die Zelllinie STA-ET2.1, mit einer fast 8-fach höheren Expression als CHP-100 und einer fast doppelt so hohen Expression im Vergleich zu ET10.

Ergebnisse

Dagegen zeigte sich bei der Analyse von *TERF2IP* eine deutlich homogenere RNA Expression, als bei *CDH11*. Die relativen Expressionswerte lagen zwischen 0,4 (SK-ES1, \pm 0,15 Standardabweichung) und 2,2 (RD-ES, \pm 0,56). Lediglich die Zelllinie TC71 wies mit einer relativen Expression von 41 (\pm 7,6), eine mehr als 10-fach höhere Expression als der Mittelwert auf.



Abbildung 11-2 Relative und mittlere RNA Expression von *CDH11* (**A**) und *TERF2IP* (**B**) in ESFT Zelllinien (bezogen auf *GAPDH*). Mittelwerte der Doppelbestimmung und Standardabweichungen. Logarithmische Darstellung.

Auch bei den Patienten (Abbildung 11-3) zeigte sich für *CDH11* eine sehr heterogene Expression, mit Werten von 0,4 (162-08, \pm 0,02 Standardabweichung) bis 11,6 (24-09, \pm 0,02). Die relative Expression von *CDH11* war im Durchschnitt für die Patienten signifikant höher (4,8), als für die Zelllinien (1,8; Student's t-Test, p < 0.01, zweiseitig).

Bei der Untersuchung von *TERF2IP* wurde auch wieder eine deutlich homogenere Expression gefunden, als bei *CDH11*. Hier nahm die relative Expression Werte von 0,2 (24-09, \pm 0,06 Standardabweichung) bis 3,3 (29-09, \pm 0,42) an, mit einer mittleren Expression von 1,0. Die relative Expression von *TERF2IP* war im Durchschnitt für die Patienten (1,0) und für die Zelllinien (4,0) nicht signifikant verschieden (Student's t-Test, p = 0.11, zweiseitig).

Es konnte also für fast alle Zelllinien und alle Patientengewebe eine Expression von *CDH11* und *TERF2IP* nachgewiesen werden. Lediglich die Zelllinie CHP-100 zeigte keine *CDH11* Expression. Für *CDH11* konnte zusätzlich eine signifikant höhere Expression bei den Patienten belegt werden.



Abbildung 11-3 Relative RNA Expression und mittlere Expression (Mittelwert) von *CDH11* (**A**) und *TERF2IP* (**B**) in ESFT Patienten (bezogen auf *GAPDH*). Mittelwerte der Doppelbestimmung und Standardabweichungen.

11.2.2 Immunologische Untersuchung der Protein Expression

Die Protein Expression wurde sowohl immunhistochemisch an Zelllinienpräparaten und Patienten Tissue-Microarrays (TMAs) als auch mit SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) und anschließendem Western Blot an Zelllinienproteinen bestimmt.

11.2.2.1 Immunhistochemie an Zelllinienpräparaten und Patienten Tissue-Microarrays

Die Immunhistochemie wurde an Präparaten durchgeführt, bei denen sich verschiedene Zellen oder Gewebestücke auf einem einzigen Objektträger befinden. Sie werden hergestellt, indem 0,6 - 2 mm kleine Proben aus den in Paraffin eingebetteten Zellen oder Geweben ausgestanzt und rasterförmig nebeneinander in einem neuen Paraffinblock angeordnet werden. Dieser kann dann mittels Mikrotom in 2 - 5 µm dünne Schichten geschnitten und anschließend auf Objektträgern festgehalten werden (Battifora 1986). Alle verwendeten Zelllinienpräparate und Tissue-Microarrays (TMAs) waren bereits am Institut vorhanden.

Die Zelllinienpräparate umfassten die bereits analysierten 14 Zelllinien. Bei den TMAs waren dagegen nur Patientengewebe vertreten, die bislang noch nicht im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden (Anzahl = 30). Für die Korrelation von Gendosis und Genexpression (Kapitel 11.3) konnten daher nur die Ergebnisse der Zelllinien verwendet werden. Die Daten zur Protein Expression der ESFT Patientengewebe wurden in Kapitel 11.4 mit den klinischen Daten der Patienten korreliert. Die verwendeten Antikörper für CDH11 und TERF2IP sind in Tabelle 7-3 (Seite 39) aufgelistet. Die Auswertung erfolgte am Lichtmikroskop unter Verwendung des Immunreaktiven Scores (IRS), der

Ergebnisse

die Farbintensität und den Anteil der gefärbten, positiven Zellen berücksichtigt (Remmele und Stegner 1987; Methodenbeschreibung: Seite 39). Der IRS kann Werte zwischen 0 - 12 annehmen, wobei 0 für keine Expression und 12 für eine sehr hohe Expression steht.

Abbildung 11-4 zeigt exemplarisch die immunhistochemische Färbung der Zelllinienpräparate mit den Antikörpern für CDH11 (A + B) und TERF2IP (C + D). Ähnlich zu den Ergebnissen der RNA Expression (Kapitel 11.2.1, Seite 65) konnte auch für die Proteine eine heterogene Expression von CDH11 und eine eher homogene Expression von TERF2IP festgestellt werden. Deutlich zu erkennen war eine unterschiedliche Lokalisation der Proteine in den Zellen. So zeigte sich bei Verwendung des CDH11 Antikörpers vor allem eine membranständige und teilweise auch cytoplasmatische braune Anfärbung, während der TERF2IP Antikörper ausschließlich nukleäre Proteine detektierte.



Abbildung 11-4 Exemplarische Darstellung der Immunhistochemie an Zelllinienpräparaten. Zur immunhistochemischen Färbung der Zellen wurde ein CDH11 (A + B) und ein TERF2IP Antikörper (C + D) verwendet. Es sind jeweils zwei Beispiele für eine schwache (A + C) und eine starke Anfärbung (B + D) der Zellen dargestellt. 1000-fache Vergrößerung.

Die Auswertung der Zelllinienpräparate nach IRS ist in Abbildung 11-5 dargestellt. Bei der Analyse zur CDH11 Expression (A) konnte die Linie RD-ES nicht ausgewertet werden, da sich die Zellen vom Objektträger abgelöst hatten. Die restlichen 13 ESFT Zelllinien wiesen eine heterogene Protein Expression von CDH11 auf, mit einem mittleren IRS von 4,9. Für die Zelllinie CHP-100 konnte keine Expression (IRS = 0) nachgewiesen werden, während sich bei den Zelllinien ET10 und SK-NM-C eine sehr hohe Expression (IRS = 12) zeigte.

Die TERF2IP Protein Expression war wenig differenziert, mit einem mittleren IRS von 6,3. Von den untersuchten 14 Zelllinien zeigten 6 (43 %) einen IRS von 4, während die restlichen 8 Zelllinien (57 %) einen IRS von 8 aufwiesen. Insofern zeigte sich für die TERF2IP Protein Expression eine eher geringe bis mittlere Expression (IRS 1-8), aber keine der untersuchten Zelllinien hatte eine hohe Expression (IRS 9-12).



Abbildung 11-5 Auswertung der Protein Expression von CDH11 (A) und TERF2IP (B) in Zelllinienpräparaten (im Einfachansatz) durch immunhistochemische Analyse und Verwendung des Immunreaktiven Scores (IRS).

Abbildung 11-6 zeigt exemplarisch die immunhistochemische Färbung der Patienten TMAs mit den Antikörpern für CDH11 (A + B) und TERF2IP (C + D). Auch für die Patientengewebe wurde eine heterogene Expression der CDH11 Proteine vor allem in Membran und Cytoplasma der Zellen gefunden, während die TERF2IP Proteine deutlich homogener im Zellkern exprimiert waren.



Abbildung 11-6 Exemplarische Darstellung der Immunhistochemie an Patientengeweben (TMAs). Zur immunhistochemischen Färbung der Zellen wurde ein CDH11 (**A + B**) und ein TERF2IP Antikörper (**C + D**) verwendet. Es sind jeweils zwei Beispiele für eine schwache (A + C) und eine starke Anfärbung (B + D) der Zellen dargestellt. 1000-fache Vergrößerung.

Abbildung 11-7 zeigt die korrespondierende Auswertung zur Immunhistologie der Patientengewebe unter Verwendung des IRS. Da sich teilweise das Gewebe von den Objektträgern abgelöst hatte, konnten bei der Analyse zur CDH11 Expression lediglich 24 der 30 und bei der TERF2IP Expressionsauswertung 28 der 30 unterschiedlichen Patientengewebe ausgewertet werden.

Alle der 24 auswertbaren Tumorgewebe zeigten eine Protein Expression von CDH11, mit einem mittleren IRS von 9 (Abbildung 11-7 A). Zwei Patienten (242-04 und 252-04) wiesen eine eher geringe Expression auf (8 %; IRS 2 und 3), während die restlichen Proben einen IRS von mindestens

8 hatten. Von den 24 Geweben zeigten 10 (42 %) eine sehr hohe CDH11 Expression mit einem IRS von 12.

Bei den Tumorgeweben konnte eine geringe Expression von TERF2IP festgestellt werden (Mittlerer IRS von 4; Abbildung 11-7 B). Von den 28 auswertbaren Proben zeigten 8 (29 %) gar keine TERF2IP Expression (IRS = 0) und 13 Gewebe (46 %) wiesen eine eher geringe Expression auf (IRS 3-4). Nur ein Viertel der Patientenproben (25 %) zeigte eine etwas höhere Expression mit einem IRS von 6 bis 9, aber keines der Gewebe hatte einen IRS von 10 bis 12.



Abbildung 11-7 Auswertung der Protein Expression von CDH11 (**A**) und TERF2IP (**B**) in Patienten TMAs (im Einfachansatz) durch immunhistochemische Analyse und Verwendung des Immunreaktiven Scores (IRS).

11.2.2.2 SDS-PAGE, Western Blot und Immundetektion mit Proteinen aus Zelllinien

Die verwendeten Proteinlysate der 14 ESFT Zelllinien waren zum größten Teil bereits am Institut vorhanden. Fehlende Lysate wurden unter Verwendung des Protokolls aus Kapitel 7.1 (Seite 35) neu hergestellt. Es wurde eine Gesamtproteinkonzentration von 30 µg in die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) eingesetzt (Methodenbeschreibung: Seite 35) und die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine von dem Gel auf eine Nitrocellu-lose Membran übertragen und durch eine Immunreaktion mit Antikörpern detektiert (Methodenbeschreibung: Seite 36). Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in Tabelle 7-2 (Seite 37) aufgelistet. Zusätzlich zu den CDH11 und TERF2IP Primärantikörpern wurde auch ein Antikörper gegen GAPDH zur Normalisierung verwendet. Die Proteinbanden des Röntgenfilms wurden eingescannt und mit dem Programm GelScape densitometrisch ausgewertet (Young et al. 2004). Die Stärke der Banden verhält sich dabei proportional zur Menge an CDH11 beziehungsweise TERF2IP Protein.

Abbildung 11-8 (A) zeigt die Western Blot Banden für das CDH11 Protein, die eine Masse von 110 Kilodalton (kD) sowie die Banden für das GAPDH Protein, die eine Masse von 35 kD aufwiesen. Darunter zeigt Abbildung 11-8 (B) die densitometrische Auswertung der Banden, bei der die Bandenstärke für CDH11 bereits auf die für GAPDH bezogen wurde. Die Protein Expression von CDH11 war in den Zelllinien sehr heterogen. So wiesen die Zelllinien A673 und STA-ET2.1 im Verhältnis zu den anderen Zelllinien eine sehr starke Expression auf (relative Bandenstärke 1,9 und 1,3), während bei den Zelllinien CHP-100 und SK-ES1 keine, beziehungsweise nur eine sehr geringe Protein Expression nachzuweisen war (Bandenstärke 0,0 und 0,01). Der Mittelwert der relativen Bandenstärke für CDH11 lag bei 0,9.



Abbildung 11-8 Protein Expression von CDH11 in 14 ESFT Zelllinien. (**A**) CDH11 (110 kD) und GAPDH (35 kD) Proteinbanden im Western Blot. (**B**) Relative densitometrische Auswertung der CDH11 Banden (normalisiert mit GAPDH Werten).

Abbildung 11-9 zeigt die relative Proteinquantifizierung von TERF2IP bei den ESFT Zelllinien. Die Banden (A) wiesen eine Masse von 60 kD auf, die in diesem Ansatz ebenfalls detektierte Bande für das GAPDH Protein eine Masse von 35 kD. Die relative Quantifizierung der TERF2IP Banden (B; bezogen auf GAPDH) ergab zwischen den Zelllinien wenige Unterschiede. So zeigten die meisten Zelllinien (64 %) eine relative Bandenstärke nahe der mittleren Bandenstärke von 0,67. Eine geringfügig höhere Expression (relative Bandenstärke 1,01) wies die Zelllinie STA-ET2.1 auf, eine deutlich niedrigere die Zelllinien VH-64 und SK-NM-C (0,29 beziehungsweise 0,25).



Abbildung 11-9 Protein Expression von TERF2IP in 14 ESFT Zelllinien. TERF2IP (60 kD) und GAPDH (35 kD) Proteinbanden im Western Blot (**A**). Relative densitometrische Auswertung der TERF2IP Banden (**B**; normalisiert mit GAPDH).

11.3 Korrelation von Gendosis und Genexpression

Um die Ergebnisse zur Deletion und Expression der Kandidatengene *CDH11* und *TERF2IP* miteinander zu korrelieren, wurde das Programm SPSS[®] Statistics 19 (IBM[®] Corporation 2010) verwendet. Es wurde dabei untersucht, ob die Gendosis mit der Genexpression und die RNA- mit der Protein Expression korreliert. Tabelle 11-2 listet die Ergebnisse für die Gendosis und Genexpression der Zelllinien noch einmal für CDH11 (A) und TERF2IP (B) auf.

Der erste Überblick über die Ergebnisse ergab, dass es sowohl bei der Untersuchung von CDH11 als auch TERF2IP bei den ESFT Zelllinien Übereinstimmungen zwischen der Gendosis und Genexpression, beziehungsweise von RNA- und Protein Expression gab. So wies die Zelllinie SK-ES1 eine Deletion von *CDH11* auf und zeigte gleichzeitig eine niedrige CDH11 RNA- und Protein Expression. Bei der Zelllinie CHP-100 konnte, trotz einer fehlenden Deletion des Gens, weder eine RNA-, noch eine Protein Expression von CDH11 nachgewiesen werden und ähnliche Ergebnisse zeigte auch die Zelllinie EW3.

Bei der Untersuchung von TERF2IP konnte für die beiden Zelllinien SK-N-MC und VH-64 ebenfalls bei einer Deletion des Gens, auch eine korrespondierende niedrige Expression festgestellt werden. Des Weiteren zeigte sich bei der Linie STA-ET1 nicht nur auf RNA- sondern auch auf Protein Ebene eine niedrige TERF2IP Expression.

Sowohl bei der Analyse von CDH11 als auch TERF2IP konnten für jeweils 6 der 14 untersuchten Zelllinien (43 %, in Tabelle 11-2 blau hinterlegt) zumindest im Vergleich der RNA- und Protein Expression übereinstimmende Ergebnisse gefunden werden.

Tabelle 11-2 Überblick über die Ergebnisse der Gendosis- und Expressionsanalysen von CDH11 (A) und
TERF2IP (B) in ESFT Zelllinien. IHC = Immunhistochemie, WB = Western Blot, \ = Daten nicht verfügba
(Zellen haben sich abgelöst). Rot = Deletion, Blau = übereinstimmende RNA- und Protein Expression

В

1	
	-
-	

EGET	Geno	dosis	E	pression					
Zolllinion	200H		RNA	Protein Expression					
Zennnen	acon	WLFA	Expression	IHC	WB				
A673			1,1	8	1,9				
CADO-ES			0,4	2	0,9				
CHP-100			0,0	0	0,0				
ET10			4,1	12	1,2				
EW3			0,2	2	0,7				
RD-ES			1,3		0,8				
RM-82			2,7	3	1,2				
SK-ES1			0,3	3	0,01				
SK-N-MC			3,3	12	1,0				
STA-ET1			0,5	3	0,7				
STA-ET2.1			7,8	8	1,3				
TC71			0,8	3	1,0				
VH-64			2,2	4	0,9				
WE-68			0,6	4	0,8				

IGET	Geno	dosis	E	pression				
Zolllinion			RNA	Protein Expression				
Lemmen	acon		Expression	IHC	WB			
4673			0,9	8	0,7			
CADO-ES			1,0	8	0,8			
CHP-100			0,9	4	0,8			
ET10			1,9	8	0,9			
EW3			1,5	8	0,7			
RD-ES			2,2	8	0,8			
RM-82			0,9	4	0,8			
SK-ES1			0,4	8	0,5			
SK-N-MC			1,1	4	0,3			
STA-ET1			0,4	4	0,6			
STA-ET2.1			2,1	8	1,0			
FC71			41,0	4	0,7			
/H-64			0,5	4	0,3			
NE-68			1,5	8	0,5			

Die statistische Korrelation der Daten nach Pearson (Methodenbeschreibung: Seite 48) konnte für die Analyse von CDH11 bei den ESFT Zelllinien keine signifikante Korrelation von Gendosis und Genexpression belegen (p > 0.05, zweiseitig). Es wurde aber eine signifikante positive Übereinstimmung von RNA- und (Immunhistochemie, IHC) Protein Expression (p = 0.015, zweiseitig) so-
wie von IHC- und Western Blot (WB) Protein Expression (p = 0.045, zweiseitig) gefunden (Tabelle 11-3).

Für die Analyse der TERF2IP Daten konnte dagegen eine signifikante negative Korrelation von Gendosis und (WB) Protein Expression (p = 0.002, zweiseitig) nachgewiesen werden.

Tabelle 11-3 Signifikante Korrelationen von Gendosis und Genexpression bei den ESFT Zeillinien.						
Korrelation	Korrelationskoeffizient*	Signifikanz**				
CDH11						
RNA Expression / (IHC) Protein Expression	+ 0,66	0.015				
(IHC) Protein Expression / (WB) Protein Expression	+ 0,56	0.045				
TERF2IP						
Gendosis / (WB) Protein Expression	- 0.75	0.002				

* Nach Pearson, zweiseitig ** Werte ≤ 0.05 wurden als statistisch signifikant bewertet

Tabelle 11-4 listet die Ergebnisse für die Gendosis und RNA Expression der ESFT Patienten, für CDH11 (A) und TERF2IP (B) auf. Hier konnten keine signifikanten Korrelationen zwischen der CDH11 Gendosis und RNA Expression festgestellt werden (Pearson Korrelation, p > 0.05, zweiseitig). Die beiden Patienten mit einer Deletion von CDH11 (313-04 und 03-05) zeigten sowohl eine niedrige (1,8) als auch hohe RNA Expression (8,1).

Da keiner der Patienten eine Deletion von TERF2IP sowohl bei der aCGH als auch MLPA zeigte, konnte hier keine Korrelationsanalyse erfolgen. Die beiden Patienten, für die in der MLPA eine Deletion von TERF2/P nachgewiesen werden konnte (313-04 und 98-05), wiesen aber interessanterweise beide eine sehr niedrige RNA Expression (0,2 und 0,3) auf.





Tabelle 11-4 Überblick über die Ergebnisse der Gendosis- und Expressionsanalysen	von
CDH11 (A) und TERF2IP (B) in ESFT Patienten. \ = Daten nicht verfügbar. Rot = Del	etion

11.4 Statistische Signifikanz der molekularen Daten im Vergleich zu den klinischen Daten der ESFT Patienten

Nach der molekularbiologischen Charakterisierung der beiden Kandidatengene *CDH11* und *TERF2IP* (Kapitel 11.1 bis 11.3), wurden die gewonnenen Ergebnisse anschließend statistisch mit den klinischen Daten der ESFT Patienten korreliert. Diese so genannten Follow-up Daten der Patienten geben dabei sowohl Auskunft über die Untersuchungsergebnisse zum Zeitpunkt der Diagnose als auch über den Verlauf der Erkrankung, wie das Auftreten von späteren, sekundären Tumoren (Rezidiven) oder dem Eintritt des Todes aufgrund der Erkrankung. Die Korrelationen sollten zeigen, ob durch die Expressionshöhe der Kandidatengene auch auf die klinischen Daten und hier vor allem auf den Verlauf der Erkrankung geschlossen werden kann.

Für die Korrelationen wurden zum einen die RNA Expressionsdaten der 19 ESFT Patienten aus Kapitel 11.2.1 (Seite 65) und zum anderen die Protein Expressionsdaten der 24 (CDH11) beziehungsweise 28 (TERF2IP) ESFT Patienten aus Kapitel 11.2.2 (Seite 67) berücksichtigt. Für die Analyse der RNA Expression musste ein Patient und für die Protein Expression zwei Patienten ausgeschlossen werden, da hier jeweils das Datum der letzten ärztlichen Kontrolle fehlte. Die Expressionswerte wurden jeweils mittels Median in eine Gruppe mit hoher und eine Gruppe mit niedriger Expression aufgetrennt. Die Korrelation mit den klinischen Daten erfolgte dabei unter Verwendung des Chi²-Tests (Methodenbeschreibung: Seite 48) und zusätzlich wurde eine Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier mit zusätzlichem Log-Rank-Test durchgeführt (Methodenbeschreibung: Seite 49). Alle statistischen Auswertungen erfolgten mit dem Programm SPSS[®] Statistics 19 (IBM[®] Corporation 2010).

Für den Chi²-Test wurde die RNA- und Protein Expression von CDH11 und TERF2IP mit den folgenden klinischen Variablen verglichen:

Alter bei Diagnose (> / ≤ 12 Jahre) Geschlecht (weiblich / männlich) Lokalisation des Primärtumors (im Knochen (ossär) / nicht im Knochen (extraossär)) Metastasen bei Diagnose (Ja / Nein) Tumorvolumen bei Diagnose (< / ≥ 200 ml) Auftreten eines Rezidivs (Ja / Nein)

Die RNA Expression der 18 ESFT Patienten konnte zusätzlich mit der Variablen Knochenmetastasen bei Diagnose (Ja / Nein) verglichen werden, die für die anderen 22 beziehungsweise 26 ESFT Patienten (Protein Expression) aber nicht verfügbar war. Tabelle 11-5 zeigt die Ergebnisse der Korrelation von Expression und klinischen Daten.

Tabelle	11-5 S	Statistische	Korrelatior	n der RNA	 und Prot 	ein Expressior	1 (Hoch / Nie	drig) von Cl	DH11
(A) und	TERF2	2IP (B) mit	klinischen	Variablen.	Angabe d	er statistische	n Signifikanz	(zweiseitig)	nach
Chi ² . We	erte ≤ 0	.05 wurder	n als statisti	sch signifik	ant bewer	tet.			

A	Klinische Variable	RNA Expression	Protein Expression	В	Klinische Variable	RNA Expression	Protein Expression	
	Alter (> / < 12 Jahre)	0.49	0.25		Alter (> / < 12 Jahre)	0.81	0.26	
	Geschlecht (weiblich / männlich)	0.88	0.59		Geschlecht (weiblich / männlich)	0.89	0.12	
	Tumorlokalisation (ossär / extraossär)	0.59	0.35		Tumorlokalisation (ossär / extraossär)	0.47	0.06	
	Metastasen bei Diagnose (Ja / Nein)	0.70	0.01*		Metastasen bei Diagnose (Ja / Nein)	0.70	0.78	
	Tumorvolumen (< / > 200 ml)	0.76	0.11		Tumorvolumen (< / > 200 ml)	0.52	0.96	
	Rezidiv (Ja / Nein)	0.12	0.60		Rezidiv (Ja / Nein)	0.30	0.01*	
	Knochenmetastasen (Ja / Nein)	0.07	-		Knochenmetastasen (Ja / Nein)	0.07	-	

* statistisch signifikanter Wert – Nicht verfügbar (Angaben zu Knochenmetastasen fehlten)

Eine statistisch signifikante Korrelation konnte für CDH11 (A) nur zwischen der klinischen Variablen Metastasen bei Diagnose und der Protein Expression nachgewiesen werden (Chi²-Test, p = 0.01, zweiseitig). Hier hatten alle ESFT Patienten mit Metastasen (8/22) gleichzeitig eine hohe CDH11 Protein Expression, während die Patienten ohne Metastasen (14/22) sowohl eine hohe (50 %) als auch niedrige (50 %) CDH11 Expression aufwiesen (Abbildung 11-10 A).

Für TERF2IP (B) konnte ebenfalls nur eine einzige statistisch signifikante Korrelation gefunden werden (Chi^2 -Test, p = 0.01, zweiseitig). So zeigte sich bei 70 % der Patienten mit einem Rezidiv (10/26) zugleich auch eine niedrige TERF2IP Protein Expression, wohingegen 81 % der Patienten ohne Rezidiv (16/26) eine hohe Expression besaßen (Abbildung 11-10 B).



Abbildung 11-10 Signifikante Korrelationen der CDH11 (A) und TERF2IP (B) Protein Expression mit den klinischen Daten der ESFT Patienten. Ein p-Wert ≤ 0.05 wurde als statistisch signifikant bewertet.

Abbildung 11-11 zeigt die Kaplan-Meier Analyse zur Korrelation der CDH11 RNA- (A) und Protein Expression (B) mit dem Gesamtüberleben der Patienten. Ob das Mortalitätsrisiko bei einer niedrigen oder hohen Expression signifikant verschieden war, wurde durch den Log-Rank-Test ermittelt. Bei beiden Überlebensanalysen trat bei weniger als der Hälfte der Patienten der Tod innerhalb des Beobachtungszeitraumes ein (RNA Expression: 44 %, Protein Expression: 32 %), daher wurde die Mehrheit der Patienten bei der Berechnung der Überlebenszeiten zensiert.



Abbildung 11-11 Statistische Korrelation der CDH11 RNA- (**A**) und Protein Expression (**B**) mit dem Gesamtüberleben der Patienten mittels Kaplan-Meier Analyse und Log-Rank-Test. Ein p-Wert \leq 0.05 wurde als statistisch signifikant bewertet. + = zensierter Patient (Tod ist im Beobachtungszeitraum nicht eingetreten).

Die Wahrscheinlichkeit, fünf Jahre nach der Diagnose (1820 Tage) noch zu leben, lag für die ESFT Patienten mit einer hohen CDH11 RNA Expression bei etwa 35 % und mit einer niedrigen CDH11 RNA Expression bei etwa 72 %. Dieser Unterschied im Überleben der ESFT Patienten war aber statistisch nicht relevant (Log-Rank-Test, p > 0.05, zweiseitig). Für die CDH11 Protein Expression konnte bei den Patienten eine 5-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit von 72 % (niedrige Expression) beziehungsweise 66 % (hohe Expression) berechnet werden. Das Überleben in den zwei Gruppen war ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich (Log-Rank-Test, p > 0.05, zweiseitig).

Abbildung 11-12 zeigt die Kaplan-Meier Analyse zur Korrelation des Gesamtüberlebens der Patienten mit der TERF2IP RNA- (A) und Protein Expression (B). Auch hier wurde die statistische Signifikanz einer niedrigen oder hohen Expression auf das Mortalitätsrisiko der Patienten durch den Log-Rank-Test ermittelt. Wie bei den Überlebensanalysen zur CDH11 Expression starben auch bei der TERF2IP Analyse weniger als die Hälfte der Patienten innerhalb des Beobachtungszeitraumes (RNA Expression: 44 %, Protein Expression: 31 %), weshalb die Mehrheit der Patienten bei der Berechnung der Überlebenszeiten zensiert wurde. Die 5-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit (1820 Tage) lag bei einer hohen TERF2IP RNA Expression bei circa 16 % und bei einer niedrigen RNA Expression bei etwa 87 %. Demnach hatten die Patienten mit einer niedrigen TERF2IP RNA Expression eine signifikant höhere Überlebensrate nach 5 Jahren, als Patienten mit einer hohen Expression (Log-Rank-Test, p < 0.05, zweiseitig). Dagegen zeigte sich für eine niedrige TERF2IP Protein Expression eine signifikant niedrigere 5-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten (50 %), als bei den Patienten mit einer hohen TERF2IP Protein Expression (82 %; Log-Rank-Test, p < 0.05, zweiseitig).



Abbildung 11-12 Statistische Korrelation der TERF2IP RNA- (**A**) und Protein Expression (**B**) mit dem Gesamtüberleben der Patienten mittels Kaplan-Meier Analyse und Log-Rank-Test. Ein p-Wert \leq 0.05 wurde als statistisch signifikant bewertet. + = zensierter Patient (Tod ist im Beobachtungszeitraum nicht eingetreten).

12. Funktionelle Studien nach forcierter Überexpression von *CDH11* und *TERF2IP* in ESFT Zelllinien

Um mögliche Auswirkungen einer veränderten Expression der beiden Kandidatengene auf die Zellphysiologie zu testen, wurden funktionelle Studien durchgeführt. Die Zelllinien in Kultur dienen dabei als Modellorganismus zur Untersuchung dieser Veränderungen, da eine hohe Wahrscheinlichkeit besteht, dass die Ergebnisse dieser Analysen auch auf die physiologischen Vorgänge in humanem Gewebe übertragbar sind. Ross et al. konnten nachweisen, dass kultivierte Zellen das Expressionsmuster des Tumorgewebes, aus dem sie stammen, weitgehend behalten (Ross et al. 2000).

Um die Expression von CDH11 und TERF2IP in ESFT Zelllinien zu verändern, wurde die Methode der forcierten Überexpression durch Transfektion ausgewählt, bei der zellfremdes genetisches Material in die Zelllinien eingebracht wird. Ziel war es, sowohl eine verstärkte RNA- als auch Protein Expression der Kandidatengene in den Zellen zu erreichen, die dann möglicherweise einen Einfluss auf die Zellphysiologie haben könnte. Abbildung 12-1 zeigt die Gliederung der Ergebnisse.



Abbildung 12-1 Übersicht über die Ergebnisse in Kapitel 12.

Zunächst wurden die optimalen Bedingungen der Überexpression durch die Methode der transienten Transfektion, also des zeitlich begrenzten Einbringens von genetischem Material, ausgetestet (Methodenbeschreibung: Seite 41). Die zellfremden Nukleinsäuren liegen dabei episomal (nicht im Genom integriert) vor und werden von der Zelle abgebaut oder gehen durch Zellteilung langsam verloren (Übersichtsartikel: Kim und Eberwine 2010). Anschließend wurden diese Vorversuchsdaten genutzt, um stabile Transfektanten zu entwickeln, bei denen das genetische Material in das Genom integriert ist (Methodenbeschreibung: Seite 43). Die Entwicklung von stabilen Transfektanten ist dabei ungleich aufwendiger und zeitintensiver als die Methode der transienten Transfektion, denn die Zellen die die eingebrachte DNA zufällig (Wahrscheinlichkeit: < 10⁻⁴; Mülhardt 2009) in ihr Genom integriert haben, müssen entsprechend selektioniert werden. Der Vorteil der stabilen Transfektion ist, dass die eingebrachte DNA dauerhaft von den Zelllinien exprimiert werden kann. Die stabilen Transfektanten wurden für funktionelle Studien verwendet (Kapitel 12.3).

12.1 Austestung der forcierten Überexpression durch transiente Transfektion

Vor der Herstellung von stabilen Transfektanten wurden die optimalen Versuchsbedingungen für die verwendete Transfektionsmethode, die Lipofektion (Methodenbeschreibung: Seite 41) ausgetestet. Optimiert wurden die Konzentration der eingesetzten DNA im Verhältnis zum Transfektionsreagenz und die Zeit, für die der Transfektionsansatz (DNA, Lipofectamine[™] und Kulturmedium) auf den Zellen verbleibt, bevor das Kulturmedium ersetzt wird. Die verwendeten Transfektionsansätze und jeweiligen Zelllinien sind in Tabelle 8-1 (Seite 42) aufgelistet. Es wurden pT-Rex-DEST30 Vektoren mit dem Gen *CDH11* oder *TERF2IP* und ein pT-Rex mock Vektor ohne Zielgen verwendet. Der pT-Rex mock Vektor diente dabei als Negativkontrolle, mit der der Einfluss des Transfektionsereignisses auf die Zellphysiologie kontrolliert werden konnte. Als weitere Negativkontrolle wurden untransfizierte Zelllinien verwendet, die lediglich mit dem Transfektionsreagenz, aber ohne DNA behandelt wurden. Die korrekten Insertionen der Zielgene *CDH11* und *TERF2IP* in den pT-Rex-DEST30 Vektor wurden durch Sequenzierung überprüft (Methodenbeschreibung: Seite 30). Abbildung 10-2 und Abbildung 10-3 zeigen exemplarisch die Rohdaten der Sequenzierungen. Für beide Zielgene konnten die korrekten Insertionen bestätigt werden.

Basierend auf den Ergebnissen von Kapitel 11 (Seite 62), zur *in vitro* Charakterisierung der Kandidatengene, wurden ESFT Zelllinien ausgesucht, die im initialen, unbehandelten Zustand eine geringe Expression von CDH11 beziehungsweise TERF2IP aufwiesen. Dadurch sollte ein möglichst großer Unterschied in der Expression zwischen den das Zielgen exprimierenden Zellen und den Negativkontrollen erreicht werden. Für die Überexpression von CDH11 wurde die Zelllinie CHP-100 ausgewählt, da diese weder eine RNA- noch eine Protein Expression von CDH11 aufwies (Tabelle 11-2 A, Seite 72). Für die Analyse der Überexpression von TERF2IP wurde die Zelllinie VH-64 ausgewählt, da sie neben der Deletion des Gens auch eine niedrige RNA- und Protein Expression von TERF2IP zeigte (Tabelle 11-2 B, Seite 72). Die Höhe der Expression von CDH11 und TERF2IP wurde durch qRT-PCR (für die RNA Expression) und zusätzlich durch SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot (für die Protein Expression) ermittelt.



Abbildung 12-3 Exemplarische Darstellung der Sequenzierungsdaten für pT-Rex-TERF2IP.

12.1.1 Optimale Verdünnung der Vektor DNA im Verhältnis zum Transfektionsreagenz

Verwendet wurde ein 1:2 und ein 1:3 Verhältnis von DNA zu Lipofectamine[™] Reagenz und die RNA der Zellen wurde jeweils 18 und 24 Stunden nach der Transfektion aufgereinigt (Methodenbeschreibung: Seite 22). Die Auswertung erfolgte durch qRT-PCR mit den Primern, die in Tabelle 6-1 (Seite 26) aufgelistet sind.

Abbildung 12-4 zeigt das Ergebnis der relativen CDH11 Expression (im Verhältnis zu GAPDH) für die CHP-100 Zellen, die mit dem pT-Rex-*CDH11* Vektor ("CDH11"), dem pT-Rex mock Vektor ("mock") oder ohne DNA (untransfiziert, "K-") transfiziert wurden sowie für die unterschiedlichen

Verdünnungen und Inkubationszeiten. Die qRT-PCR wurde für alle Proben im Doppelansatz durchgeführt und der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet.



Abbildung 12-4 Relative RNA Expression von *CDH11* nach transienter Transfektion der CHP-100 Zelllinie mit den Vektoren pT-Rex-*CDH11* und pT-Rex mock (Mittelwerte der Doppelbestimmung und Standardabweichungen). K- = untransfizierte Kontrolle. Es wurde ein DNA zu Lipofectamine Verhältnis von 1:2 und 1:3 sowie eine Inkubation von 18 und 24 Stunden getestet. Logarithmische Darstellung.

Bei drei Ansätzen (1, 2 und 4) war nur eine sehr schwache oder gar keine höhere *CDH11* Expression bei den CDH11 Transfektanten im Vergleich mit den jeweiligen mock transfizierten oder untransfizierten Kontrollzellen zu erkennen. Lediglich Ansatz 3 zeigte mit einer relativen Expression von 2,38 (\pm 1,9 Standardabweichung) eine etwa 4-fach erhöhte RNA Expression bei den pT-Rex-*CDH11* Vektor transfizierten Zellen im Verhältnis zu den beiden Kontrollen (relative Expression = 0,59 \pm 0,06 und 0,56 \pm 0,02). Trotz der hohen Standardabweichung wurde für die nachfolgende Austestung eine Verdünnung von 1:3 für die Transfektion verwendet.

Die Ergebnisse der relativen RNA Expression von TERF2IP nach transienter Transfektion sind in Abbildung 12-5 dargestellt. Zwei der Proben konnten in der qRT-PCR nicht ausgewertet werden, daher fehlen die Ergebnisse für die untransfizierten VH-64 Zellen bei dem 1:2 Verdünnungsansatz und einer Inkubation von 18 Stunden sowie für die mock transfizierten Zellen bei dem 1:3 Verdünnungsansatz und einer Inkubation von 24 Stunden. Dies lag möglicherweise an einer schlechten Qualität der RNA und dadurch unzureichenden Umschreibung in cDNA.

Nach der transienten Transfektion konnte für jeden der vier Ansätze eine eindeutige Überexpression der TERF2IP RNA bei den pT-Rex-*TERF2IP* Vektor transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Bei Ansatz 1 und 4 konnte eine mehr als 1.000-fach (Mittelwert 232 \pm 11,9 Standardabweichung sowie 635,2 \pm 94,3), für Ansatz 2 eine mehr als 900-fach (Mittelwert 183,6 \pm 18,2) und für Ansatz 3 eine fast 300-fach (Mittelwert 88,7 \pm 7,4) stärkere RNA Expression der *TERF2IP* Vektor transfizierten Zellen im Vergleich mit den Kontrollen belegt werden. Bei einer 1:2 Verdünnung von DNA zu Transfektionsreagenz (Ansatz 1 und 2) konnte demnach sowohl nach 18 als auch nach 24 Stunden eine erhöhte TERF2IP Expression nachgewiesen werden, daher wurde diese Verdünnung für die weitere Optimierung verwendet.



Abbildung 12-5 Relative RNA Expression von TERF2IP nach transienter Transfektion der VH-64 Zelllinie mit den Vektoren pT-Rex-*TERF2IP* und pT-Rex mock (Mittelwerte der Doppelbestimmung und Standardabweichungen). K- = untransfizierte Kontrolle. Es wurde ein DNA zu Lipofectamine Verhältnis von 1:2 und 1:3 sowie eine Inkubation von 18 und 24 Stunden getestet. Logarithmische Darstellung.

12.1.2 Austestung der Inkubationszeit

Unter Verwendung der zuvor ermittelten Verdünnung von Vektor DNA und Transfektionsreagenz, wurden die optimalen Bedingungen für die Transfektion in einem zweiten Ansatz weiter ausgetestet. Hierbei wurde die optimale Zeit ermittelt, die der Transfektionsansatz (DNA, Lipofectamine und Kulturmedium) auf den Zellen verbleibt, bevor das Kulturmedium ausgetauscht wird. Neben der RNA Extraktion wurden auch zusätzlich die Proteine aufgereinigt und durch SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot die TERF2IP Protein Expression ermittelt. Bei beiden Methoden erfolgte die Normalisierung durch die zusätzliche Analyse von GAPDH. Die verwendeten Primer für die qRT-PCR sind in Tabelle 6-1 (Seite 26) und die Antikörper für den Western Blot in Tabelle 7-2 (Seite 37) aufgelistet.

In Abbildung 12-6 sind die Ergebnisse der Analysen für die Transfektion mit dem pT-Rex-*CDH11* Vektor im Vergleich mit den jeweiligen Kontrollen (pT-Rex mock und K-) dargestellt. Das oberste Diagramm (A) zeigt die relative CDH11 RNA Expression im Verhältnis zur Expression von GAPDH. Darunter sind die Proteinbanden von CDH11 und GAPDH im Western Blot (B) und die densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten von CDH11 (C), normalisiert durch die GAPDH Bandenstärken, zu sehen.

Im Vergleich zu den Kontrollen konnte bei den *CDH11* Vektor transfizierten Zellen nach einer Inkubation von 18 Stunden eine 6-fach (relative Expression 0,59 ± 0,03 Standardabweichung) und nach 24 Stunden Inkubation eine mehr als 340-fach (relative Expression 31,2 ± 5,3) erhöhte RNA Expression von *CDH11* nachgewiesen werden (A). Die Untersuchung der Protein Expression (B und C) zeigte dagegen keine eindeutige Überexpression. Lediglich nach 24 Stunden war eine leichte Erhöhung (circa 1,3-fach) der Protein Expression bei den *CDH11* transfizierten Zellen zu erkennen. Es konnte in diesem Ansatz also eine deutlich erhöhte RNA Expression und eine geringfügige Zunahme der Protein Expression von CDH11 nach Transfektion mit dem pT-Rex-*CDH11*

Vektor belegt werden. Für die Entwicklung von stabilen CDH11 Transfektanten wurde daher eine Inkubationsdauer von 24 Stunden verwendet.



Abbildung 12-6 Austestung der idealen Inkubationszeit der Transfektionsansätze auf den CHP-100 Zellen. (A) Relative RNA Expression von CDH11 (Mittelwerte der Doppelbestimmung und Standardabweichungen). Logarithmische Darstellung. (B) CDH11 und GAPDH Protein Banden im Western Blot. (C) Densitometrische Auswertung der CDH11 Bandenstärken im Western Blot (jeweils relativ zur GAPDH Bandenstärke).

Abbildung 12-7 zeigt die Ergebnisse der optimalen Inkubationszeit für die TERF2IP Transfektion. In Diagramm A ist die relative TERF2IP RNA Expression dargestellt. Abbildung B zeigt die Protein Banden von TERF2IP (oben) sowie GAPDH (unten) im Western Blot und in Diagramm C ist die densitometrische Auswertung der relativen Bandenstärken von TERF2IP bezogen auf GAPDH dargestellt.

Eine Überexpression bei den *TERF2IP* Vektor transfizierten Zellen im Vergleich mit den Kontrollen (pT-Rex mock und K-) konnte sowohl auf RNA- (A) als auch Protein Ebene (B und C) nachgewiesen werden. So war die relative RNA Expression von TERF2IP nach 18 Stunden Inkubation mehr als 100-fach (relative Expression 53,5 ± 27,2 Standardabweichung) und nach 24 Stunden Inkubation mehr als 260-fach (relative Expression 71,0 ± 9,8) in den pT-Rex-*TERF2IP* Transfektanten erhöht. Bei der Protein Expression zeigte sich eine etwa 1,2-fach (18 Stunden) und 1,5-fach (24 Stunden) erhöhte Expression bei den TERF2IP Transfektanten. Für die Herstellung der stabilen TERF2IP Transfektanten wurde eine Inkubationsdauer von 24 Stunden verwendet, da nach dieser Zeit offensichtlich bereits eine erhöhte RNA- und auch Protein Expression in den Zellen vorlag.



Abbildung 12-7 Austestung der idealen Inkubationszeit der Transfektionsansätze auf den VH-64 Zellen. (A) Relative RNA Expression von TERF2IP (Mittelwerte der Doppelbestimmung und Standardabweichungen). Logarithmische Darstellung. (B) TERF2IP und GAPDH Protein Banden im Western Blot. (C) Densitometrische Auswertung der TERF2IP Bandenstärken im Western Blot (jeweils relativ zur GAPDH Bandenstärke).

12.2 Herstellung stabiler Transfektanten

Die Entwicklung stabiler CDH11 und TERF2IP Transfektanten erfolgte analog zur transienten Transfektion, wobei im Anschluss an die Inkubation die Zellen selektioniert wurden, die zufällig (Wahrscheinlichkeit: < 10⁻⁴; Mülhardt 2009) die pT-Rex Vektoren in ihr Genom integriert hatten (Methodenbeschreibung: Seite 43). In den Vorversuchen zur forcierten Überexpression der Kandidatengene durch transiente Transfektion (Kapitel 12.1), konnte eine Überexpression von CDH11 und TERF2IP vor allem auf RNA- und teilweise auch auf Protein Ebene nachgewiesen werden. Demnach sollte auch für die stabilen Transfektanten eine deutlich höhere Expression der Zielgene im Vergleich zu den Kontrollen (pT-Rex mock und K-) erreicht werden.

Die Ergebnisse der Austestungen aus Kapitel 12.1 wurden berücksichtigt. Demnach wurde für die Transfektion der CHP-100 Zellen (CDH11) ein 1:3 und der VH-64 Zellen (TERF2IP) ein 1:2 Verhältnis von Vektor DNA zu Lipofectamine verwendet. Außerdem wurden die Transfektionsansätze für 24 Stunden auf den Zellen inkubiert. Die Selektion auf Zellen mit Neomycin-Resistenzgen erfolgte mit dem Antibiotikum G418 (Geneticin), wobei der Selektionsdruck über mehrere Zellteilungen (circa zwei Wochen) aufrechterhalten wurde (Methodenbeschreibung: Seite 43). Anschließend wurden zwei verschiedene Ansätze zur Vereinzelung der Zellen verwendet (Ansatz mit Zellkultur-Petrischalen und mit Verdünnungsreihe in 96-Well Platten), um nach dem langen Selektionsprozess auch ausreichend viele stabile Einzelzell-Kolonien isolieren zu können.

12.2.1 CDH11 Transfektanten

Bei der Selektion von CHP-100 Zellen, die das Neomycin-Resistenzgen des pT-Rex-DEST30 Vektors (pT-Rex-*CDH11* oder pT-Rex mock Vektor) aufwiesen, konnten fast ausschließlich mit den Zellkultur-Petrischalen Einzelzell-Kolonien gewonnen werden. Verschiedene dieser Kolonien (Gesamtanzahl = 20) wurden von den Petrischalen in 96-Well Platten (Platten mit 96 Vertiefungen) vereinzelt. Davon wurden sieben CDH11- und zwei mock transfizierte Kolonien soweit vermehrt, dass sowohl die RNA als auch die Proteine isoliert werden konnten. Die untransfizierte CHP-100 Wildtyp Zelllinie (K-) wurde parallel zu den Transfektanten ohne Selektionsdruck kultiviert und RNA sowie Proteine extrahiert. Die Auswertung der CDH11 Expression erfolgte mit qRT-PCR (für die RNA Expression) und SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot (für die Protein Expression). In Abbildung 12-8 sind die Ergebnisse für die neun pT-Rex Transfektanten und die untransfizierte CHP-100 Zelllinie dargestellt. Das obere Diagramm zeigt die relative CDH11 RNA Expression (Mittelwerte der Doppelbestimmung und Standardabweichungen, normalisiert durch GAPDH) und die untere Abbildung die CDH11 sowie GAPDH Proteinbanden im Western Blot.



Abbildung 12-8 Etablierung stabiler CDH11 Transfektanten (CHP-100 Zellen). **Oben**: Relative RNA Expression (bezogen auf die GAPDH Expression) von CDH11 bei sieben CDH11 Transfektanten (1-7), zwei Leervektor Transfektanten (8-9) und einer untransfizierten Kontrolle (10; Mittelwerte der Doppelbestimmung und Standardabweichungen). Logarithmische Darstellung. **Unten**: CDH11 und GAPDH Proteinbanden im Western Blot.

Es zeigte sich eine äußerst unterschiedliche Expression von CDH11 bei den verschiedenen Transfektanten und der untransfizierten Kontrolle, sowohl auf RNA- als auch Protein Ebene. Die Kontrollen (Nummer 8-10) wiesen eine durchschnittliche relative RNA Expression von 0,4 auf, während die pT-Rex-*CDH11* transfizierten Zellen (Nummer 1-7) eine durchschnittliche Expression von 3,1 zeigten, also eine etwa 8-fach höhere Expression (Student's t-Test, p = 0.53). Dabei zeigten fünf der sieben CDH11 Transfektanten (71 %) eine ähnliche oder niedrigere RNA Expression als die Kontrollen. Nur Transfektante 4 (mehr als 2-fach erhöht) und Transfektante 6 (mehr als 30-fach erhöht) wiesen eine höhere RNA Expression im Vergleich zu der untransfizierten Kontrolle (K-) auf. Diese Ergebnisse wurden durch die Analyse der CDH11 Protein Expression bestätigt. Auch hier zeigte sich im Vergleich zu den Kontrollen eine deutlich größere Proteinbande bei den pT-Rex-*CDH11* Transfektanten Nummer 4 und Nummer 6. Um die Auswirkungen einer forcierten Überexpression von CDH11 durch funktionelle Analysen zu untersuchen, wurde daher die CDH11 Transfektante Nummer 6 und die Leervektor Transfektante Nummer 8 ausgewählt.

Um die differentielle CDH11 Expression bei den ausgewählten Transfektanten zusätzlich zu bestätigen, wurden die Zellen in Paraffin fixiert und eine Immunhistochemie entsprechend dem Protokoll aus Kapitel 7.5 (Seite 38) durchgeführt. Abbildung 12-9 zeigt die Färbung der Zellen durch Verwendung eines CDH11 Primärantikörpers (Tabelle 7-3, Seite 39).



Abbildung 12-9 Immunhistochemische Färbung der pT-Rex-*CDH11* Transfektante 6, der pT-Rex mock Transfektante 8 und der untransfizierten Zellen (K-) mit dem CDH11 Primärantikörper. Verdünnung 1:100. 400-fache Vergrößerung.

Die Ergebnisse der Immunhistochemie bestätigten die Daten der Western Blot Analysen (Abbildung 12-8, Seite 84). So wiesen die pT-Rex-*CDH11* Vektor transfizierten Zellen eine sehr starke CDH11 Expression auf, erkennbar an der braunen Färbung, während die Kontrollen nur eine sehr schwache und kaum erkennbare Färbung der Zellen zeigten. Weiterhin wurde ein verändertes Aussehen der CDH11 Transfektante beobachtet, bei dem die Zellen größer und ungeordneter erschienen. Dieser Unterschied wurde zuvor auch bei der Kultivierung der Zellen bemerkt. Hier wies die pT-Rex-*CDH11* Transfektante ebenfalls eine andere Zellmorphologie auf, als die pT-Rex mock und K- Kontrolle (Abbildung 12-10).

Bei Vorliegen einer Überexpression von CDH11 zeigten die Zellen ein deutlich runderes Aussehen, als die spindelförmig geformten Kontrollen. Zusätzlich wurde ein späteres Ablösen der pT-Rex-*CDH11* transfizierten CHP-100 Zellen von der Oberfläche der Kulturfläche bei der Trypsinierung (Methodenbeschreibung: Seite 40) beobachtet. Während sich die Zellen der pT-Rex mock und K-Kontrolle bereits nach etwa 2 Minuten Inkubation mit Trypsin-EDTA vollständig vom Boden gelöst hatten, benötigten die Zellen der CDH11 Transfektante mindestens 1 weitere Minute zum Ablösen.

Es konnte demnach eine stabile CDH11 Transfektante selektioniert werden, die im Vergleich mit den Kontrollen sowohl eine differentielle Expression als auch eine veränderte Morphologie und ein verändertes Ablöseverhalten in Kultur aufwies.



Abbildung 12-10 Morphologie der stabilen pT-Rex-*CDH11* Transfektante, im Vergleich zu den Kontrollen pT-Rex mock und K-. 100-fache und 200-fache Vergrößerung (Ausschnitt).

12.2.2 TERF2IP Transfektanten

Bei der Selektion der VH-64 Zellen, die den pT-Rex-*TERF2IP* oder pT-Rex mock Vektor in ihr Genom integrieren konnten, wurden ausschließlich mit der Verdünnungsreihe in 96-Well Platten (Methodenbeschreibung: Seite 44) Einzelzellkolonien erzielt. Von den wenigen Vertiefungen der 96-Well Platte, die nur eine einzige Zellkolonie aufwiesen, konnten vier TERF2IP Transfektanten und drei mock Transfektanten soweit vermehrt werden, dass sowohl die RNA als auch die Proteine isoliert werden konnten. Die untransfizierte VH-64 Wildtyp Zelllinie (K-) wurde parallel zu den Transfektanten ohne Selektionsdruck kultiviert und ebenfalls die RNA und Proteine isoliert. Die Auswertung der TERF2IP Expression erfolgte analog zu den CDH11 Transfektanten, mit qRT-PCR (RNA) und SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot (Proteine). In Abbildung 12-11 sind die Ergebnisse für die relative TERF2IP RNA Expression (oberes Diagramm) und die TERF2IP sowie GAPDH Proteinbanden im Western Blot (untere Abbildung) dargestellt.

Bei den pT-Rex-*TERF2IP* transfizierten Zellen (Nummer 1-4) wurde eine 3,5-fach erhöhte durchschnittliche RNA Expression (1,4), im Vergleich zu den Kontrollen (Nummer 5-8; relative durchschnittliche Expression von 0,4) gefunden (Student's t-Test, p = 0.09). Dabei wiesen vor allem die Transfektanten Nummer 2 und Nummer 3 (relative Expression von 1,4 ± 0,01 Standardabweichung beziehungsweise 2,9 ± 1,1) eine erhöhte RNA Expression auf. Die Western Blot Analyse zeigte dagegen eine nahezu uniforme TERF2IP Protein Expression zwischen den Ansätzen. Lediglich bei der pT-Rex-*TERF2IP* Transfektante Nummer 2 war eine stärkere Protein Expression zu erkennen, während die pT-Rex mock Transfektante Nummer 6 eine deutlich schwächere Proteinbande aufwies. Zusätzlich zu der untransfizierten VH-64 Kontrollzelllinie wurden daher diese beiden Transfektanten für die weiteren Analysen ausgewählt.



Abbildung 12-11 Etablierung stabiler TERF2IP Transfektanten (VH-64 Zellen). **Oben**: Relative RNA Expression von TERF2IP (bezogen auf GAPDH Expression) bei vier TERF2IP Transfektanten (1-4), drei Leervektor Transfektanten (5-7) und einer untransfizierten Kontrolle (8; Mittelwerte der Doppelbestimmung und Standardabweichungen). Logarithmische Darstellung. **Unten**: TERF2IP und GAPDH Proteinbanden im Western Blot.

Auch bei den TERF2IP Transfektanten wurde im Anschluss die differentielle TERF2IP Expression durch Immunhistochemie überprüft. Abbildung 12-12 zeigt die Färbung der Zellen unter Verwendung eines TERF2IP Primärantikörpers (Tabelle 7-3, Seite 39). Sowohl die mock transfizierte als auch die untransfizierte Kontrolle zeigten keine Anfärbung der Zellen und folglich keine oder nur eine sehr geringe TERF2IP Protein Expression. Bei den pT-Rex-*TERF2IP* transfizierten VH-64 Zellen wiesen einige wenige Zellen (circa 10 %) eine TERF2IP Expression auf. Die Mehrheit der Zellen (circa 90 %) zeigte dagegen keine Anfärbung. Dieses Ergebnis korreliert mit den Western Blot Ergebnissen (Abbildung 12-11), bei denen nur ein geringer Unterschied in der Protein Expression von TERF2IP zwischen den Ansätzen nachgewiesen werden konnte.



Abbildung 12-12 Immunhistochemische Färbung der pT-Rex-*TERF2IP* Transfektante Nummer 2, der pT-Rex mock Transfektante Nummer 6 und der untransfizierten Zellen (K-) mit einem TERF2IP Primärantikörper. Verdünnung 1:400. 400-fache Vergrößerung.

Im Gegensatz zu den Veränderungen, die bei der CDH11 Transfektante beobachtet werden konnten, zeigte die TERF2IP Transfektante weder eine veränderte Zellmorphologie (Abbildung 12-13), noch ein unterschiedliches Ablöseverhalten bei der Trypsinierung.



Abbildung 12-13 Morphologie der pT-Rex-*TERF2IP* Transfektante sowie der Kontrollen pT-Rex mock und K-. 100-fache und 200-fache Vergrößerung (Ausschnitt).

Es konnte also eine stabile pT-Rex-*TERF2IP* Transfektante selektioniert werden, die eine 3-fach höhere RNA Expression im Vergleich zu den Kontrollen aufwies. Allerdings zeigten die Ergebnisse der Immunhistochemie, dass nur ein Anteil von etwa 10 % der Zellen das TERF2IP Protein exprimierten. Es wurden aber dennoch funktionelle Analysen mit dieser Transfektante durchgeführt.

12.3 Funktionelle Analysen an stabilen Transfektanten

Viele verschiedene Veränderungen in der Zellphysiologie können zu einer fortschreitenden Entartung von Zellen (Tumorgenese) führen. Dazu gehören unter anderem ein übermäßiges Wachstum (Proliferation), das Eindringen in andere Gewebe (Invasion) und die Ausbildung von sekundären Tumoren (Metastasierung) an anderen Stellen des Körpers (Hanahan und Weinberg 2000). In dieser Arbeit wurde ein möglicher Einfluss der Überexpression von CDH11 oder TERF2IP auf diese Faktoren analysiert. Zunächst wurde die Fähigkeit von Zellen sich fortzubewegen (Migration) untersucht sowie Unterschiede in der Zellproliferation analysiert. Anschließend wurde ein Invasionsassay durchgeführt und die Ergebnisse durch Untersuchungen zur Zellaggregation ergänzt.

12.3.1 Bedeutung der Kandidatengen-Überexpression für die Zellmigration

Die Migration (Fortbewegung) von Zellen ist, zusammen mit der Invasivität, eine grundlegende Eigenschaft, damit Tumorzellen sich vom Primärtumor lösen und in andere Gewebe oder auch in Blut- und Lymphgefäße eindringen können (Alberts 2004). Eine verstärke Migrationsfähigkeit könnte also die Tumorentstehung und -progression begünstigen. Mit einem einfach durchzuführenden Zellrasen-Verletzungsexperiment ("Scratch-Assay") wurde die Migration der Zellen untersucht (Methodenbeschreibung: Seite 45). Dazu wurden mittels Pipettenspitze zwei schmale, sich kreuzende Kratzer ("Scratches") in die konfluente Zelldecke eingebracht. Um zu verhindern, dass die durch den Kratzer freigelegten Bereiche der Kulturplatte lediglich durch eine Proliferation der Zellen wieder geschlossen werden, wurden die Zellen in Medium ohne Serum kultiviert. Dadurch standen keine Wachstumsfaktoren mehr im Medium zur Verfügung, die von den meisten Zellen für die Proliferation benötigt werden. Direkt nach dem Einbringen der Kratzer wurde ein Foto gemacht (Tag 0) und die Migration der Zellen in 24 Stunden Abständen dokumentiert. Die Analysen wurden im Doppelansatz durchgeführt und zusätzlich einmal wiederholt.

Abbildung 12-14 zeigt die freigelegten Zellbereiche bei der CDH11 Transfektante im Vergleich mit den Kontrollen, direkt nach Anfertigung der Kratzer (Tag 0) und 48 Stunden danach (Tag 2). Die Abbildung des Scratch Assays steht dabei repräsentativ für alle Ergebnisse, die bei den zwei unabhängigen Versuchen und jeweils im Doppelansatz gefunden wurden. Die Ergebnisse waren in jedem Ansatz reproduzierbar.



Abbildung 12-14 Repräsentative Ergebnisse des Migrationsassays (zwei unabhängige Versuche und jeweils Doppelansatz) mit den pT-Rex-*CDH11* transfizierten Zellen und jeweiligen Kontrollen, direkt nach Anfertigung der Kratzer (Tag 0) und 48 Stunden danach (Tag 2). 400-fache und 1000-fache Vergrößerung.

Nach 48 Stunden war die Kulturplatte der pT-Rex-*CDH11* Transfektante fast vollständig mit Zellen ausgefüllt, während bei den beiden Kontrollen die Kratzer noch deutlich erkennbar waren. Die

Ergebnisse

pT-Rex mock und K- Zellen wiesen dabei nicht mehr das dichte, konfluente Aussehen vom ersten Tag auf, sondern verteilten sich stattdessen auf der Kulturplatte und auch in den freigelegten Bereich. Dagegen war bei der CDH11 Transfektante keine Verteilung der Zellen zu erkennen, sondern weiterhin ein konfluentes Wachstum, welches die Kratzer schnell ausfüllte. Da die freigelegten Bereiche der Kulturplatte bei der pT-Rex-*CDH11* Transfektante wahrscheinlich nur durch Proliferation ausgefüllt wurden, konnten Unterschiede im Migrationsverhalten der Zellen nicht erfasst werden. Dass die CDH11 Transfektante möglicherweise auch ohne die Zugabe von Serum wachsen kann, wurde bei der nachfolgenden Analyse berücksichtigt (Kapitel 12.3.2).

Das repräsentative Ergebnis der Migrationsanalyse der TERF2IP Transfektante im Vergleich mit der pT-Rex mock und untransfizierten Kontrolle (K-) ist in Abbildung 12-15 dargestellt. Die Ergebnisse waren auch hier bei allen Ansätzen (zwei unabhängige Versuche und jeweils Doppelansatz) reproduzierbar. Am zweiten Tag der Kultivierung war es nicht mehr möglich ein Foto anzufertigen, da sich die Mehrheit der Zellen (circa 70 % bis 90 %) vom Boden der Kulturplatte gelöst hatte. Daher konnte eine Auswertung nur 24 Stunden nach Anfertigung der Kratzer erfolgen.



Abbildung 12-15 Repräsentative Ergebnisse des Migrationsassays (zwei unabhängige Versuche und jeweils Doppelansatz) mit den pT-Rex-*TERF2IP* transfizierten Zellen und den Kontrollen, an Tag 0 und Tag 1. 400-fache und 1000-fache Vergrößerung.

Nach 24 Stunden waren die Kratzer bei allen Ansätzen noch gut zu erkennen, aber schon mit einigen Zellen besiedelt. Zu diesem Zeitpunkt zeigten die Zellen ein dichtes, konfluentes Aussehen, während sie sich nach 48 Stunden nahezu vollständig ablösten. Damit konnte auch bei der TERF2IP Transfektante die Fähigkeit zur Migration nicht unabhängig von einer Proliferation der Zellen erfasst werden. Ein Unterschied zwischen der TERF2IP Transfektante und den beiden Kontrollen wurde nicht beobachtet.

12.3.2 Auswirkungen auf die Proliferation der Zellen

Tumorzellen sind in der Lage sich unkontrolliert zu vermehren und durch den Verlust der Kontakt-Inhibition in umliegendes Gewebe einzudringen (Invasion) oder es zu verdrängen (Knippers 2001). Damit ist neben der Migration auch die Fähigkeit der Zellen zu verstärkter Proliferation ein Faktor, der zum Phänotyp von entarteten Zellen beiträgt. Daher wurde auch der Einfluss der Überexpression von CDH11 und TERF2IP auf die Proliferation der Zellen untersucht.

Im vorherigen Kapitel (12.3.1) konnte für die CDH11 Transfektante gezeigt werden, dass die Zellen möglicherweise in der Lage sind, auch ohne die Wachstumsfaktoren aus dem Serum zu wachsen. Daher wurde die Proliferationsanalyse mit den stabil transfizierten CDH11 Zellen sowohl mit Serum-enthaltendem Medium als auch mit Medium ohne Serum durchgeführt. Die TERF2IP Transfektante löste sich dagegen bereits nach 48 Stunden Inkubation mit Serum-freiem Medium von der Zellkulturoberfläche ab, weshalb hier nur die Proliferationsanalyse mit Serum-enthaltendem Medium durchgeführt wurde.

Die Proliferationsrate der Zellen wurde mit einem MTT-Test (3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5diphenyltetrazoliumbromid) ermittelt, bei dem metabolisch aktive Zellen gelbes Tetrazoliumsalz in wasserunlösliche blau-violette Formazankristalle umwandeln (Methodenbeschreibung: Seite 45). Die gemessene optische Dichte (OD) korreliert dabei mit der Anzahl an vitalen Zellen und damit indirekt auch mit der Proliferationsrate der Zellen. Es wurden drei verschiedene Zellkonzentrationen im Vierfachansatz in 96-Well Platten ausgebracht und sowohl eine Analyse über drei Tage als auch über sieben Tage durchgeführt. Jeder Ansatz wurde dann noch einmal wiederholt. Als Referenz wurde 24 Stunden nach dem Aussiedeln der Zellen eine Messung durchgeführt (Tag 0), die Ergebnisse gleich 1 gesetzt und alle weiteren Messungen auf diese Referenzwerte bezogen.

Abbildung 12-16 zeigt die repräsentativen Ergebnisse für die Anzahl vitaler Zellen (gemessen durch die OD) von pT-Rex-*CDH11* im Vergleich mit pT-Rex mock und K- bei zwei der drei verschiedenen Zellkonzentrationen (5.000 und 10.000 Zellen), bei Verwendung von Medium mit Serum und bei Beobachtung von drei Tagen (A) sowie sieben Tagen (B). Die Untersuchungen bei einer Zellkonzentration von 2.500 Zellen und die jeweiligen Wiederholungen zeigten vergleichbare Ergebnisse.

Bei allen Ansätzen zeigte sich eine fortwährende Zunahme der Zellen während der Beobachtungszeit und damit auch eine konstante Proliferation der Zellen. Der Zuwachs an Zellen hing dabei von der initial ausgebrachten Anzahl an Zellen pro Vertiefung ab. So zeigten 5.000 Zellen pro Vertiefung eine deutlich schnellere Vermehrung, als 10.000 Zellen pro Vertiefung. Weder in der Kurzzeit-(A), noch in der Langzeitanalyse (B) konnten zwischen der CDH11 Transfektante und den beiden Kontrollen signifikante Unterschiede in der Zunahme an vitalen Zellen nachgewiesen werden (Student's t-Test, p > 0.05, zweiseitig).



Abbildung 12-16 Repräsentative Ergebnisse des Proliferationsassays (Mittelwert des Vierfachansatzes und Standardabweichungen) unter Verwendung von Kulturmedium mit Serum. Zunahme an vitalen Zellen bei der pT-Rex-*CDH11* Transfektante und den Kontrollen. Beobachtung von 3 Tagen (**A**) und 7 Tagen (**B**). OD = optische Dichte

Im Anschluss wurden, basierend auf den Ergebnissen von Kapitel 3.3.1, die Analysen mit Medium ohne Serum durchgeführt (Abbildung 12-17).



Abbildung 12-17 Repräsentative Ergebnisse des Proliferationsassays (Mittelwert des Vierfachansatzes und Standardabweichungen) unter Verwendung von Kulturmedium ohne Serum. Zunahme an vitalen Zellen bei der pT-Rex-*CDH11* Transfektante und den Kontrollen. Beobachtung von 3 Tagen (**A**) und 7 Tagen (**B**). OD = optische Dichte

Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen der beiden Kontrollen pT-Rex mock und K- lediglich einen Tag nach der Zugabe des Serum-freien Mediums (T1) noch in der Lage waren, sich zu vermehren. Anschließend stellten sie ihre Proliferation ein und spätestens am vierten Tag (T4) begannen sie rasch abzusterben, so dass am fünften Tag nur noch wenige oder gar keine Zellen mehr im Ansatz vorhanden waren. Dagegen wiesen die pT-Rex-*CDH11* transfizierten Zellen vor allem in den ersten drei Tagen eine deutlich verstärkte Proliferation auf. Das Wachstum dieser Zellen ohne die Notwendigkeit von Serum, das auch schon im Migrationsassay beobachtet wurde, konnte demnach in dieser Untersuchung bestätigt werden. Der beobachtete Unterschied in der Steigerung an vitalen Zellen zwischen der CDH11 Transfektante und den beiden Kontrollen erwies sich dabei als signifikant (Student's t-Test, p < 0.01, zweiseitig). Lediglich bei der Langzeitanalyse mit 2.500 Zellen pro Vertiefung (Daten nicht gezeigt) konnte keine Signifikanz nachgewiesen werden (Student's t-Test, p = 0.07, zweiseitig).

Die Ergebnisse für die TERF2IP Transfektante im Vergleich mit den Kontrollen und unter Verwendung von Medium mit Serum zeigt Abbildung 12-18. Die Durchführung erfolgte analog zu der Vorgehensweise bei der CDH11 Transfektante.



Abbildung 12-18 Repräsentative Ergebnisse des Proliferationsassays (Mittelwert des Vierfachansatzes und Standardabweichungen) unter Verwendung von Kulturmedium mit Serum. Zunahme an vitalen Zellen bei der pT-Rex-*TERF2IP* Transfektante und den Kontrollen. Beobachtung von 3 Tagen (**A**) und 7 Tagen (**B**). OD = optische Dichte

Fast alle Ansätze zeigten eine konstante Proliferation der Zellen während des Beobachtungszeitraums von drei (A), beziehungsweise sieben Tagen (B). Lediglich bei dem Ansatz mit 10.000 Zellen pro Vertiefung zeigte sich in der Langzeitbeobachtung ein Absterben von Zellen nach dem fünften Tag (T5). Weder in der Kurzzeit-, noch in der Langzeitbeobachtung konnte ein signifikanter Unterschied in der Anzahl vitaler Zellen zwischen der pT-Rex-*TERF2IP* Transfektante und den beiden Kontrollen nachgewiesen werden (Student's t-Test, p > 0.05, zweiseitig). In der Wiederholung zeigte nur der Ansatz mit 5.000 Zellen pro Vertiefung nach sieben Tagen einen signifikanten Unterschied in der Zellanzahl (Student's t-Test, p = 0.005, zweiseitig), wobei die pT-Rex-*TERF2IP* transfizierten Zellen am stärksten proliferierten (Daten nicht gezeigt).

12.3.3 Invasivität der Zellen nach forcierter Überexpression

Ein Zellverband aus unaufhörlich proliferierenden Zellen wird zunächst einmal als gutartig (benigne) bezeichnet. Erwerben die Zellen jedoch die Fähigkeit in umliegendes Gewebe einzudringen und sich über die Blut- und Lymphbahnen im Körper auszubreiten, wird ein Tumor als bösartig (maligne) bezeichnet (Alberts 2004).

Die Fähigkeit der Zellen eine extrazelluläre Membran (ECM) zu durchdringen wurde mit ThinCert[™] Zellkultureinsätzen untersucht. Die Vertiefungen der Zellkulturplatten werden dabei durch eine Membran in zwei Kompartimente auftrennt (Methodenbeschreibung: Seite 46). Die Membran wurde mit verdünntem Matrigel[™] als ECM Ersatz beschichtet. Die in Serum-freiem Medium verdünnten Zellen (400.000) wurden in dem oberen Kompartiment auf die Membran gegeben und das untere Kompartiment mit konditioniertem Medium (Medium in dem konfluente Zellen 24 Stunden kultiviert wurden) gefüllt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen, die durch die ECM auf die Unterseite der Membran gewandert waren, fixiert sowie fluoreszenzmarkiert und anschließend unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Die Anzahl an gezählten Zellen wurde auf die Gesamtzahl an eingesetzten Zellen bezogen und von zwei unabhängigen Versuchen der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

Abbildung 12-19 zeigt die Prozentzahl an Zellen, die sich auf der Unterseite der Membran befanden (Mittelwert aus zwei unabhängigen Versuchen und Standardabweichung), jeweils für die pT-Rex-*CDH11* (A) und pT-Rex-*TERF2IP* (B) transfizierten Zellen sowie jeweiligen Kontrollen. Zusätzlich ist jeweils ein Beispielbild der fluoreszenzmarkierten Zellen abgebildet.



Abbildung 12-19 Anzahl invasiver Zellen (Prozent) nach 24 Stunden Inkubation (Mittelwert aus zwei unabhängigen Versuchen und Standardabweichung). (A) pT-Rex-*CDH11* transfizierte Zellen und Kontrollen. (B) pT-Rex-*TERF2IP* transfizierte Zellen und Kontrollen. Logarithmische Darstellung des Diagramms. 1.000-fache Vergrößerung der Zellen.

Bei Ansatz A (CDH11) befanden sich 3,5-mal, beziehungsweise 7-mal mehr untransfizierte CHP-100 Zellen (K-) auf der Unterseite der Membran (0,7 % der eingesetzten Zellen ± 0,6 % Standardabweichung), als mock transfizierte (0,2 % \pm 0,3 %) oder CDH11 transfizierte Zellen (0,1 % \pm 0,04 %). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant (Student's t-Test, p > 0.05, zweiseitig).

Bei Ansatz B (TERF2IP) wurden von den eingesetzten Zellen 0,13 % (± 0,1 % Standardabweichung) der mock transfizierten, 0,12 % (± 0,1 %) der TERF2IP transfizierten Zellen und 0,11 % (± 0,1 %) der untransfizierten VH-64 Zellen auf der Unterseite der Membran gezählt. Damit konnte kein Unterschied zwischen den TERF2IP Transfektanten und den Kontrollen festgestellt werden (Student's t-Test, p > 0.05, zweiseitig). Damit waren weniger als 1 % der Zellen in der Lage, innerhalb von 24 Stunden durch die ECM auf die Unterseite der Membran zu gelangen. Es muss dabei allerdings berücksichtigt werden, dass die Standardabweichungen zwischen den Zählungen in beiden Ansätzen sehr hoch war.

12.3.4 Aggregationsverhalten von Einzelzellen

Die Fähigkeit von Zellen sich zusammenzulagern (Aggregation) und Verbindungen von Zelle zu Zelle herzustellen, sind wichtige Eigenschaften um Gewebe auszubilden, Zellen mechanisch zu verbinden und wichtig für die Zellkommunikation durch chemische oder elektrische Signale (Alberts 2004). Eine gestörte Aggregationsfähigkeit könnte demnach ebenfalls zum Phänotyp von entarteten Zellen beitragen. Nach der Analyse von Migration, Proliferation und Invasion in den vorherigen Untersuchungen, sollte die Analyse zur Zellaggregation die bisherigen Ergebnisse weiter vervollständigen. Der Aggregationsassay wurde im hängenden Tropfen (Hanging Drop Assay; Potter und Morris 1985) durchgeführt, bei dem Zellen in einem Tropfen auf die Innenseite eines Petrischalendeckels pipettiert werden (Methodenbeschreibung: Seite 47). Durch die Schwerkraft sammeln sich die Zellen am tiefsten Punkt des Tropfens und können sich dann miteinander verbinden. Die Ausbildung von dreidimensionalen Zellverbänden ist dabei ein Maß für die Fähigkeit zur Aggregation.

Abbildung 12-20 zeigt die CDH11-, mock- und untransfizierten CHP-100 Zellen 15 Minuten nach dem Ausbringen des Tropfens (Tag 0) und nach 24 Stunden (Tag 1). Es handelt sich dabei um eine repräsentative Darstellung der Ergebnisse, die im Dreifachansatz und mit einer Wiederholung der Analyse reproduzierbar waren.

Nach dem Ausbringen des Tropfens (Tag 0) war eine gleichmäßige Verteilung der pT-Rex-*CDH11* transfizierten Zellen zu erkennen, während bei den beiden Kontrollen (pT-Rex mock und K-) die Zellen ungleichmäßig, auf einer Seite des Tropfens und in kleineren Verbänden zusammengelagert waren. Die veränderte Morphologie der CDH11 Transfektante, die nach der stabilen Transfektion dokumentiert wurde (Abbildung 12-10, Seite 86), war auch hier gut erkennbar. Am nächsten Tag (Tag 1) zeigte sich bei den pT-Rex mock und K- Ansätzen eine Konzentration der Zellen in der Mitte des Tropfens. Einige der Zellen wiesen dabei eine dreidimensionale Aggregation auf. Im Gegensatz dazu, waren die pT-Rex-*CDH11* transfizierten Zellen weiterhin gleichmäßig im Tropfen verteilt und zeigten statt der Einzelzellen vom Vortag klar ausgebildete, im Vergleich zu den Kontrollzellen jedoch deutlich kleinere Aggregate. Dieser Unterschied im Verhalten der CDH11 überexprimierenden Zellen ist allerdings auf Grund des Designs des verwendeten Assays nicht quantifizierbar.



Abbildung 12-20 Repräsentative Ergebnisse des Aggregationsverhaltens von pT-Rex-*CDH11*, pT-Rex mock und untransfizierten CHP-100 Zellen im Hanging Drop Assay. 100-fache Vergrößerung.

Abbildung 12-21 zeigt die Ergebnisse für die TERF2IP-, mock- und untransfizierten VH-64 Zellen, ebenfalls 15 Minuten nach dem Ausbringen des Tropfens (Tag 0) und 24 Stunden danach (Tag 1). Hier handelt es sich ebenso um die repräsentative Darstellung der Ergebnisse, die im Dreifachansatz und mit einer Wiederholung reproduzierbar waren.



Abbildung 12-21 Repräsentative Ergebnisse des Aggregationsverhaltens von pT-Rex-*TERF2IP*, pT-Rex mock und untransfizierten VH-64 Zellen im Hanging Drop Assay. 100-fache Vergrößerung.

Am ersten Tag (Tag 0) waren alle Einzelzellen gleichmäßig im Tropfen verteilt und es konnten keine Unterschiede zwischen den Ansätzen festgestellt werden. Am zweiten Tag (Tag 1) sammelten sich die Zellen deutlich sichtbar in der Mitte des Tropfens an und bildeten große Zellaggregate aus. Hier vereinigten sich nach 24 Stunden also fast alle Zellen zu einem gemeinsamen Verband aus Zellen. Ein Unterschied zwischen den drei Ansätzen konnte nicht belegt werden.

E Diskussion

Tumoren der Ewing Sarkom Familie (ESFTs, Ewing sarcoma family of tumors) gehören neben den Osteosarkomen und Chondrosarkomen zu den häufigsten malignen Knochenerkrankungen bei Kindern und Jugendlichen. Die Inzidenz in Deutschland lag zwischen 2003 und 2007 bei 0,3 Erkrankungen pro 100.000 Kindern unter 15 Jahren, was einem Anteil von etwa 2 % aller malignen Tumoren entsprach (Deutsches Kinderkrebsregister 2003 - 2007). Trotz der Verbesserung von Behandlungsprotokollen (derzeit EURO-E.W.I.N.G. 99 Studie) liegt die Wahrscheinlichkeit des rezidivfreien Überlebens bei Patienten mit lokalisiertem Ewing Sarkom bei 60 % und bei klinisch manifesten Metastasen lediglich bei 30 % (Cotterill et al. 2000). Folglich ist das Vorliegen von Metastasen zum Zeitpunkt der Diagnose ein wichtiger negativer klinischer Prognosefaktor in ESFTs, ebenso wie ein Volumen des lokalen Tumors von mehr als 100 ml, die Lokalisation des malignen Gewebes nahe der Zentralachse des Körpers und ein schlechtes histologisches Ansprechen auf die initiale Chemotherapie (Jürgens et al. 1988, Rud et al. 1989, Koscielniak et al. 1992, Terrier et al. 1996).

Für die Risikoabschätzung eines an ESFT erkrankten Patienten werden bislang lediglich die klinischen Prognosemarker berücksichtigt. Eine differenzierte Prognose aufgrund molekularer Marker ist dagegen noch nicht routinemäßig möglich, da bislang nur wenige molekulare Prognosemarker identifiziert wurden. Die für ESFTs charakteristischen EWSR1-ETS (Ewing sarcoma region 1 - Etwenty six; t(11;22)) Translokationen wurden bei lokal begrenztem Tumor und einer Typ 1 Genfusion (EWSR1 Exon 7 / FLI-1 Exon 6 (Friend leukemia integration 1)) mit einer deutlich besseren Prognose korreliert (de Alava et al. 1998, Zoubek et al. 1996). Diese Ergebnisse, die auf retrospektiven Studien basierten, wurden allerdings erst kürzlich durch prospektive Studien widerlegt, wonach Patienten mit EWSR1-FLI-1 Typ 1 Translokationen keine signifikant erhöhte Überlebenschance haben (Le Deley et al. 2010, van Doorninck et al. 2010). Eine schlechtere Prognose für ESFT Patienten wurde aber bei Vorliegen von Deletionen des Tumorsuppressorgens CDKN2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, kodiert für p16/p14 ARF) gezeigt (Tsuchiya et al. 2000, Wei et al. 2000, Huang et al. 2005), die bei etwa 17 % bis 26 % der primären Tumoren vorliegen (Kovar et al. 1997, Brownhill et al. 2007, Savola et al. 2007). Im Gegensatz zu anderen Tumorentitäten sind Mutationen im TP53 Gen dagegen eher selten (etwa bei 5 % bis 10 % der primären Tumoren; Kovar et al. 1993, de Alava et al. 2000, Huang et al. 2005, Alldinger et al. 2007), ebenso wie Amplifikationen des p53 Inhibitors MDM2 (Kovar et al. 1993, Ladanyi et al. 1995). Die wenigen genetischen Aberrationen, die sich bislang als prognostisch bedeutsam erwiesen haben, sind also auch nur für einen Bruchteil der ESFT Patienten relevant. Daher ist die Identifikation neuer molekularer Marker sehr wichtig, um auch für die restlichen Patienten eine differenzierte Risikoabschätzung zu ermöglichen.

Bei 50 % bis 90 % der ESFT Primärtumore wurden neben den *EWSR1-ETS* Translokationen weitere sekundäre chromosomale Veränderungen detektiert, deren prognostische Bedeutung bislang nur teilweise geklärt werden konnte (Sandberg und Bridge 2001, Roberts et al. 2008, Savola et al. 2009). Die Analyse dieser sekundären chromosomalen Aberrationen könnte möglicherweise neue molekulare Prognosemarker in ESFTs identifizieren.

Zusätzlich wird aber auch klar, dass für die Routineuntersuchung von ESFT Patienten in Zukunft vermutlich mehrere verschiedene Prognosemarker analysiert werden müssen. Für diese Analysen wird daher eine Methode benötigt, die mehrere Gene gleichzeitig untersuchen kann, dabei aber auch schnell und kostengünstig ist.

Basierend auf den bisher bekannten molekulargenetischen Erkenntnissen, war das Ziel dieser Arbeit daher die Etablierung einer Methode zur Untersuchung von verschiedenen chromosomalen Aberrationen sowie die Identifizierung und Charakterisierung neuer Kandidatengene für die differenzierte molekulare Prognose mit entsprechend angepasster Therapie von ESFT Patienten. Abbildung E zeigt noch einmal die Gliederung der Ergebnisse, die im Folgenden diskutiert werden.



Abbildung E Gliederung der Ergebnisse.

13. Auswahl von Kandidatengenen und Methoden für die molekulare Prognostik der Ewing sarcoma family of tumors (ESFTs)

13.1 Etablierung und Validierung der MLPA zur Detektion von Chromosomenveränderungen

Aufgrund ihrer einfachen und kostengünstigen Durchführbarkeit wurde die Methode der MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification; Methodenbeschreibung: Seite 32) im Labor etabliert. Da diese Methode in ESFT Zelllinien und Patienten bisher lediglich zur Analyse des Zellzyklus Gens *CDKN2A* verwendet wurde (Brownhill et al. 2007), war unklar, wie verlässlich die Ergebnisse der MLPA, insbesondere bei Verwendung von Paraffin eingebettetem Untersuchungsmaterial, tatsächlich sind. Aus diesem Grund war es notwendig, die Daten der MLPA mit den Ergebnissen einer gut validierten Methode zu vergleichen. Villamón et al. verwendeten zu diesem Zweck unter anderem die Methode der aCGH (array comparative genomic hybridization; Methodenbeschreibung: Seite 31). Um chromosomale Veränderungen in Neuroblastomen zu identifizieren, verglichen sie die jeweiligen Aberrationen, die durch MLPA und aCGH detektiert wurden und konnten zeigen, dass eine hohe Übereinstimmung der Ergebnisse besteht (Villamón et al. 2008). Daher wurden alle MLPA Ergebnisse in dieser Arbeit mit den entsprechenden Ergebnissen der aCGH verglichen.

Für die Methodenetablierung wurde zunächst der Einfluss von Vorbehandlungen des Patientengewebes auf die Ergebnisse der MLPA untersucht. Denn obwohl mittlerweile auch häufiger in Stickstoff eingefrorenes und damit unfixiertes Tumormaterial von Patienten zur Verfügung steht, wird doch der größte Teil des klinisch präparierten Untersuchungsmaterials fixiert (häufig durch Formalinfixierung mit anschließender Paraffineinbettung). Für die Methode der aCGH konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Qualität der DNA einen großen Einfluss auf die Ergebnisse der aCGH hat (Johnson et al. 2006, van Beers et al. 2006), weshalb nur frisches, unfixiertes Tumormaterial für die DNA Extraktion verwendet wird. Dagegen wurden in der Literatur bislang unterschiedliche Angaben zur Verwendung von fixierten Proben in der MLPA gemacht. So konnten van Dijk et al. zeigen, dass auch Formalin fixierte Melanomgewebe zuverlässige Ergebnisse in der MLPA zeigen (van Dijk et al. 2005). Im Gegensatz dazu ergaben die Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Brownhill, dass für die Analyse von ESFTs statt paraffiniertes, nur gefrorenes Tumormaterial verwendet werden sollte (Brownhill et al. 2007). Das Protokoll des in dieser Arbeit verwendeten ME001B Tumor Suppressor Kits von MRC-Holland gibt diesbezüglich an, dass eine Vorbehandlung von Geweben keinen signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse der MLPA haben sollte (www.mrc-holland.com).

Die MLPA Analyse an fünf verschiedenen ESFT Zelllinien die jeweils einmal unfixiert (gefroren oder frisch) und einmal fixiert (mit Formalin und Paraffin) vorlagen, ergab, dass alle homozygoten Deletionen unabhängig von einer Fixierung der Zellen detektiert wurden (Tabelle 10-1, Seite 54). Dagegen konnten bei den fixierten Zellen 20 % mehr Aberrationen als bei den unfixierten Zellen nachgewiesen werden (durchschnittlich 12,2 beziehungsweise 8,2 Aberrationen pro Zelllinie) und die MLPA Ergebnisse der fixierten Zellen wichen auch häufiger von den aCGH Ergebnissen ab (25 %), als bei den unfixierten Zellen (16 %). Die beobachteten Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant (Student's t-Test, p > 0.05, zweiseitig), möglicherweise durch die geringe Datenbasis. Zusätzlich gab es bei den fixierten Zellen Abweichungen bei der ermittelten Gendosis der redundant, also mit unterschiedlichen Sonden, gemessenen Gene. Diese Ergebnisse ließen darauf schließen, dass die Fixierung wahrscheinlich keine Rolle bei der Detektion von homozygoten Deletionen spielt, da diese immer eindeutig detektiert wurden. Dies ist ein wichtiges Ergebnis, da die Deletion beider Kopien eines Gens auch zu einem kompletten Verlust der Genfunktion und damit weit reichenden Konsequenzen für einen Organismus führen kann. Für die Analyse von hemizygoten Deletionen und Amplifikationen zeigten sich in der MLPA bei Verwendung der unfixierten Zellen offenbar zuverlässigere Ergebnisse, denn diese wiesen weniger Abweichungen zu den Daten der aCGH auf und lieferten identische Resultate bei den redundanten Gensonden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung entsprachen demnach den Erkenntnissen von Brownhill et al., dass mit DNA aus unfixierten Zellen verlässlichere Ergebnisse erzielt werden können (Brownhill et al. 2007). Für die weiteren MLPA Analysen wurde daher nur DNA aus frischen beziehungsweise gefrorenen, unfixierten Zellen verwendet.

Zur weiteren Validierung der Methode wurden 14 ESFT Zelllinien und 23 ESFT Patientenproben auf Aberrationen bei 38 verschiedenen Tumorsuppressorgenen untersucht, wozu auch das eingangs erwähnte Gen CDKN2A gehörte. Für die erste MLPA Austestung bezogen auf die Gewebevorbehandlung wurden zwei Kontrollproben verwendet. In dieser Analyse wurden dagegen sechs Kontrollproben verwendet, um die Reproduzierbarkeit der Daten weiter zu erhöhen. Die Auswertung der MLPA Ergebnisse von drei bis vier unabhängigen Läufen zeigte insgesamt eine hohe Übereinstimmung der Daten mit relativen Standardabweichungen von durchschnittlich 10 % für die Kontrollen, 15 % für die Zelllinien und 13 % für die Patienten. Abweichungen in den Ergebnissen sind dabei unter anderem auf PCR Inhibitoren, wie zum Beispiel Phenol, zurückzuführen (Schouten et al. 2002). Es konnte also eine hohe Reproduzierbarkeit der MLPA nachgewiesen werden. Die Aussagekraft der MLPA Daten in Bezug auf die Gendosis wurde durch den Vergleich mit den Ergebnissen der aCGH untersucht (Tabelle 10-2, Seite 57 und Tabelle 10-4, Seite 59). Übereinstimmende Gendosisangaben wurden für durchschnittlich 93 % der Zelllinien und 96 % der Patienten erzielt. Im Vergleich zu der ersten MLPA Analyse an fünf ESFT Zelllinien und mit zwei Kontrollproben (identische Gendosisangaben bei durchschnittlich 84 %), wurde in dieser Analyse also eine höhere Übereinstimmung der MLPA und aCGH Daten gezeigt. Möglicherweise könnte dies mit der erhöhten Anzahl an Kontrollproben zusammenhängen, was auch die leicht unterschiedlichen Gendosisangaben für die in beiden Analysen untersuchten Zelllinien erklären würde. Es muss allerdings auch berücksichtigt werden, dass Datensätze ohne Aberrationen ebenfalls in die Auswertungen einbezogen wurden und diese einen Großteil der Gesamtdaten darstellten (etwa 80 % bei den Zelllinien und 90 % bei den Patienten). Wurden nur die Daten miteinander verglichen, die zumindest bei einer der beiden Methoden eine Veränderung aufwiesen, zeigten durchschnittlich 65 % der Zelllinien- und 31 % der Patientengewebe Daten eine Übereinstimmung in MLPA und aCGH. Dabei wurden jeweils etwa 1,2-mal mehr Aberrationen durch die MLPA gefunden, als durch die aCGH (Abbildung 13-1).



Abbildung 13-1 Anzahl an Aberrationen (Deletionen und Amplifikationen) die durch MLPA und aCGH bei den ESFT Zelllinien (**A**) und ESFT Patientengeweben (**B**) gefunden wurden.

Ob die gefundenen Abweichungen zwischen den beiden Methoden auf ein höheres Auflösungsvermögen der MLPA zurückzuführen sind, kann aus den hier gewonnenen Ergebnissen nicht abgeleitet werden. Immerhin ist es bei der MLPA durch kurze Hybridisierungssequenzen von 50-70 Nukleotiden möglich, auch kleinere Genaberrationen bis hin zum SNP (single nucleotide polymorphism) zu detektieren, während die aCGH lediglich ein Auflösungsvermögen von 1 Megabase hat. Die kurzen Sequenzen könnten aber ebenso zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Ähnlich unterschiedliche Ergebnisse von MLPA und CGH wurden auch schon bei der Analyse von Melanomen gefunden. Van Dijk et al. erwogen dabei ebenfalls die Möglichkeit, dass es durch das erhöhte Auflösungsvermögen der MLPA auch zu falsch-positiven Ergebnissen kommen kann (van Dijk et al. 2005). Im Einzelfall müsste durch die Verwendung einer unabhängigen dritten Methode (zum Beispiel durch die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung oder die quantitative Real-Time PCR) eine potentielle Aberration verifiziert werden. In Bezug auf eine zukünftige Verwendung der MLPA für die Analyse von ESFT Prognosemarkern sollten für eine zuverlässige Normalisierung der Daten mehrere Kontrollproben verwendet und auf eine geringe Standardabweichung geachtet werden. Zusätzlich könnte die Zuverlässigkeit der MLPA Ergebnisse durch die Verwendung von mehreren redundanten Sonden für jedes Gen weiter erhöht werden. Solche Zusammenstellungen von verschiedenen Sonden sind bereits für einige Gene kommerziell bei MRC-Holland erhältlich, zum Beispiel für das Tumorsuppressorgen PTEN (www.mrc-holland.com). In dieser Arbeit wurden für die Auswertung der Ergebnisse aufgrund der möglichen falsch-positiven Daten, nur die Aberrationen berücksichtigt, die sowohl bei der MLPA als auch der aCGH gefunden wurden.

Bei den Zelllinien wurden mehr als dreimal so viele Aberrationen (sowohl in MLPA als auch aCGH) nachgewiesen, wie bei den Patientengeweben (Gesamtanzahl an Aberrationen = 67 beziehungsweise 20). Dabei wiesen 13 der 14 Zelllinien (93 %) zumindest eine Veränderung auf (durchschnittliche Anzahl an Aberrationen pro Zelllinie = 5), während nur 8 der 23 untersuchten Patientengewebe (35 %) Gendosisveränderungen zeigten (durchschnittliche Anzahl an Aberrationen pro Patient = 0,8). Diese Ergebnisse entsprechen Studien anderer Arbeitsgruppen, die in Zelllinien ebenfalls häufiger Genaberrationen detektieren konnten, als bei den entsprechenden Patientengeweben. So wurden zum Beispiel Mutationen im TP53 Gen bei 50 % der untersuchten ESFT Zelllinien (Anzahl = 19), aber nur bei 5 % der analysierten primären ESFT Tumore (Anzahl = 37) nachgewiesen (Kovar et al. 1993). Eine bedeutende Rolle bei diesen Beobachtungen könnte die Etablierung der Zelllinien aus primärem Tumorgewebe spielen, da bei der in vitro Kultivierung selbst benigne Primärzellen grundlegende Veränderungen in ihrer Zellphysiologie erfahren können (Wright et al. 1989, Hanahan und Weinberg 2000). Somit können Zelllinien auch Abweichungen in Bezug zu ihrem Ursprungsgewebe aufweisen. In diesem Zusammenhang war damit unklar, in wie weit sich Erkenntnisse bei den ESFT Zelllinien, auch auf die malignen Gewebe übertragen lassen. Unbestritten ist aber, dass auch vergleichsweise selten auftretende Aberrationen in primären ESFTs unabhängige Prognosemarker darstellen können, so wie die Mutationen im TP53 Gen (Huang et al. 2005).

Von den untersuchten 38 Tumorsuppressorgenen war das in der Literatur häufig studierte Gen *CDKN2A* bei 22 % der insgesamt 37 untersuchten DNA Proben deletiert (Tabelle 10-6, Seite 60). Dabei zeigten vor allem die ESFT Zelllinien eine häufige Deletion des Gens bei der Hälfte der untersuchten Proben (7 / 14). Damit wurden bei der Kombination von MLPA und aCGH etwas weniger Deletionen von *CDKN2A* gefunden, als in der Literatur für die einzelnen Methoden gezeigt

werden konnte. So wiesen Brownhill et al. mittels MLPA eine Deletion von *CDKN2A* bei 67 % der untersuchten Proben (6/9) nach (Brownhill et al. 2007) und die aCGH Studie von Savola et al. belegte eine Deletion bei 73 % der Zelllinien (8/11; Savola et al. 2007).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen für die ESFT Zelllinien, konnten für die primären Patientengewebe deutlich weniger CDKN2A Deletionen nachgewiesen werden, als in der Literatur angegeben. Lediglich 4 % der untersuchten Gewebe (1/23) zeigten eine hemizygote Deletion von CDKN2A. Dagegen konnten Brownhill et al. mittels MLPA Analyse bei 17 % der Patientenproben (7/42; Brownhill et al. 2007) und Savola et al. mittels aCGH sogar bei 23 % der untersuchten Gewebe (6/26; Savola et al. 2007) Deletionen nachweisen. Für die Richtigkeit und Zuverlässigkeit der Ergebnisse bei einer Kombination von MLPA und aCGH spricht aber, dass sowohl bei den Zelllinien als auch primären Tumorgeweben das direkt benachbarte Gen zu CDKN2A, CDKN2B, in allen Fällen den gleichen Aberrationsstatus aufwies (Tabelle 10-2, Seite 57 und Tabelle 10-4, Seite 59). Dies war auch der Fall für die Proben die nur in der MLPA eine Deletion aufwiesen aber wegen des fehlenden Nachweises in der aCGH als nicht deletiert gewertet wurden (dies war bei den Zelllinien bei drei und bei den Geweben bei einer Probe der Fall). Selbst eine hemizygote oder homozygote Deletion wurde für CDKN2A und CDKN2B trotz unterschiedlicher Sonden immer übereinstimmend in der MLPA erkannt. Daraus ergibt sich, dass die Kombination der beiden Methoden MLPA und aCGH wahrscheinlich die Spezifität bei der Kopiezahlanalyse erhöht, aber durch die bereits erwähnte unterschiedliche Auflösung dadurch vielleicht auch einige Aberrationen nicht berücksichtigt werden, das heißt die Sensitivität zum Teil reduziert wird. Die Verwendung von unterschiedlichen Methoden ist womöglich auch der Grund, warum die bisherigen Studien zu unterschiedlichen Ergebnissen für die untersuchten ESFT Zelllinien geführt haben. Beispielsweise wurde bei Kovar et al. unter Verwendung des Southern Blots eine unveränderte Gendosis von CDKN2A bei der RD-ES Zelllinie postuliert (Kovar et al. 1997), während die hier schon angeführte aCGH Studie von Savola et al. eine homozygote Deletion bei dieser Zelllinie nachweisen konnte (Savola et al. 2007). Dagegen wurde in der vorliegenden Arbeit eine hemizygote Deletion von CDKN2A bei der RD-ES Zelllinie belegt. Diese Ergebnisse sprechen also auch wieder dafür, die Daten mit mehreren Kontrollproben zu normalisieren und zusätzlich die Gene mehrfach zu analysieren, zum Beispiel durch verschiedene MLPA Sonden für jedes Gen.

13.2 Wahl der Kandidatengene

Die mit am häufigsten publizierte sekundäre chromosomale Veränderung bei ESFTs ist ein Verlust des langen Arms von Chromosom 16 (16q). Diese strukturelle Aberration wurde bei mindestens 15 % der primären Tumoren nachgewiesen und als unabhängiger prognostischer Faktor in ESFTs bestätigt (Hattinger et al. 1999, Ozaki et al. 2001, Hattinger et al. 2002). Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnten an ESFT Zelllinien zusätzlich den kleinsten gemeinsam deletierten Bereich auf Locus 16q22 bis 16q24 eingrenzen (Diplomarbeit Ottaviano 2006, unveröffentlicht). Interessant im Hinblick auf diese Ergebnisse war, dass sich unter den in der MLPA analysierten 38 Genen (Kapitel 10.2, Seite 52) auch zwei 16q Tumorsuppressorgene befanden, die häufig in ESFT Zelllinien und Patienten deletiert waren. So war *CDH13* (16q23) bei 36 % der Zelllinien sowie 9 % der Patienten deletiert und *CDH1* (16q22) bei 14 % der Zelllinien sowie 13 % der Patienten (Tabelle 10-3, Seite 58 und Tabelle 10-5, Seite 59). Von den 23 untersuchten ESFT Patientengeweben hatten dabei 17 % entweder eine *CDH1* oder *CDH13* Deletion. Obwohl hier lediglich zwei Gene von Chromosom 16q untersucht wurden, wurde somit bereits eine ähnlich hohe Prozentzahl an Patienten mit einer 16q Deletion gefunden, wie sie bisher in der Literatur angegeben wurde.

Trotz der relativ häufigen Deletionen im Gen *CDH1* zeigten Literaturrecherchen eine mögliche Tumor-progressive beziehungsweise onkogene Funktion bei ESFT Zelllinien und auch Tumor Xenotransplantaten in Nacktmäusen (Tirado et al. 2006, Kang et al. 2007), weshalb das Gen für die Auswahl der Kandidatengene nicht in Betracht gezogen wurde. Für das Gen *CDH13* konnten durch unseren Kooperationspartner, dem Centro de Investigación del Cáncer (Universität Salamanca, Spanien), keine signifikanten Korrelationen zwischen der CDH13 Expression, einer veränderten Zellphysiologie oder der Prognose von ESFT Patienten nachgewiesen werden (de Alava, unveröffentlichte Ergebnisse). Für die Auswahl der Kandidatengene wurden deshalb mittels NCBI Map Viewer (www.ncbi.nlm.nih.gov; Version 37.1) weitere Gene im Bereich 16q22 bis 16q24 gesucht. Aufgrund seiner Tumor-repressiven Funktion im nahe verwandten Osteosarkom wurde das Gen *CDH11* (16q22) für die weiteren Analysen ausgewählt (Kashima et al. 2003, Nakajima et al. 2008). Zusätzlich wurde das Gen *TERF2IP* (16q23) ausgesucht, da in der Literatur ebenfalls eine Tumorrepressive Funktion bei Knochentumoren postuliert wurde (Umehara et al. 2004).

14. In vitro Charakterisierung der Kandidatengene CDH11 und TERF2IP

Durch Inaktivierung (zum Beispiel durch Deletionen) oder veränderte Regulation (zum Beispiel durch eine veränderte Genexpression) können Tumorsuppressorgene zu einer Entartung von Zellen beitragen (Vogelstein und Kinzler 2004). Zum Beispiel führt die Mutation von *TP53* dazu, dass das vom Gen kodierte Protein p53 seine Funktion als Transkriptionsfaktor nicht mehr ausüben kann, so dass es zu einem unkontrolliertem Zellzyklus und einer verminderten Apoptose kommen kann (Levine 1997). Dagegen führt eine Hypermethylierung des Promotors von *CDH13* zu einer verminderten Expression des Gens in Lungenkrebs Zelllinien (Sato et al. 1998).

Nach der Auswahl von *CDH11* und *TERF2IP* wurden die beiden Kandidatengene daher auf Deletionen (Gendosis) und eine differentielle Genexpression bei ESFT Zelllinien und Patientengeweben untersucht. Die Daten wurden dann sowohl miteinander verglichen als auch mit den klinischen Daten der ESFT Patienten korreliert. Zum einen sollten diese Untersuchungen eine Funktion der Gene als Tumorsuppressoren und als potentielle Prognosemarker bei ESFTs belegen. Zum anderen sollten die Ergebnisse zur Auswahl geeigneter ESFT Zelllinien für die funktionellen Analysen verwendet werden.

14.1 Gendosis und Genexpression in ESFT Zelllinien und -Patienten

Dass die Gendosis vermutlich ein wichtiger prognostischer Faktor für ESFTs ist, konnte bereits durch eine Korrelation von chromosomalen Aberrationen und dem klinischen Erkrankungsverlauf von Patienten belegt werden. So wiesen Roberts et al. mit cytogenetischen Analysen nach, dass eine hohe Anzahl an Chromosomenveränderungen (> 5) bei ESFT Patienten zu einem verschlechterten klinischen Verlauf führt (Roberts et al. 2008). Eine signifikant schlechtere Prognose in Bezug

auf das ereignisfreie Überleben (event-free survival, EFS) und Gesamtüberleben (overall survival, OAS) wurde ebenfalls bei ESFT Patienten mit mehr als drei verschiedenen Kopiezahländerungen gezeigt (Savola et al. 2009). Auch speziell der Verlust des langen Arms von Chromosom 16 ist in ESFTs prognostisch bedeutsam (Hattinger et al. 1999, Ozaki et al. 2001, Hattinger et al. 2002; Kapitel 10.1, Seite 51).

Bei der MLPA Gendosis Analyse der 14 ESFT Zellinien und 23 primären ESFT Tumorgewebe konnten hemizygote Deletionen von *CDH11* bei 21 % der Zellinien sowie 9 % der Gewebe nachgewiesen werden. Die Anzahl der nachgewiesenen Deletionen bei den Patientenproben entsprach dabei in etwa den Literaturangaben für Verluste des langen Arms von Chromosom 16 (10 % bis 20 % der untersuchten ESFT Patienten; Douglass et al. 1990, Hattinger et al. 1999, Hattinger et al. 2002, Ozaki et al. 2001).

Bei der Gendosisanalyse von *TERF2IP* wurden bei 14 % der Zelllinien hemizygote Deletionen gefunden. Dagegen wies keiner der Patienten eine Aberration von *TERF2IP* auf. Aufgrund der geringen Anzahl an Tumorproben konnte nicht endgültig bewiesen werden, dass *TERF2IP* in primären ESFT Geweben nie deletiert vorliegt. Allerdings wurden auch in anderen Knochentumoren, wie dem Osteosarkom, keine *TERF2IP* Genmutationen bei Zelllinien gefunden (Savage et al. 2005).

Damit wurden auch bei dieser MLPA Untersuchung wieder häufiger Deletion bei den Zelllinien, als bei den Patientengeweben gefunden. Wie bereits in Kapitel 13.1 diskutiert, könnte dies an der Etablierung der Zelllinien aus primärem Tumorgewebe liegen (Wright et al. 1989, Hanahan und Weinberg 2000). Es wurden aber keine homozygoten Deletionen und auch keinerlei Amplifikationen der beiden Kandidatengene gefunden (Tabelle 11-1, Seite 64). Das keine Amplifikationen gefunden wurden könnte möglicherweise darauf hinweisen, dass die beiden Gene tatsächlich eine Tumor-repressive Funktion in ESFTs aufweisen, denn chromosomale Deletionen sind eher bei Tumorsuppressorgenen zu finden. Vor allem die Tatsache, dass es sich bei den Aberrationen lediglich um hemizygote Deletionen handelte, ließ allerdings keine Rückschlüsse auf die tatsächlichen Auswirkungen der Deletionen auf die Zellphysiologie und die Bedeutung als Prognosemarker in ESFTs zu. So kann das zweite, verbliebene Allel die Genexpression des deletierten Allels ausgleichen oder die Expression kann durch Regulation der mRNA- und Protein Expression vollständig inhibiert sein (Knudson 1971, Alberts 2004). Ein Beispiel hierfür ist das E-Cadherin, ein Tumorsuppressor in epithelialen Geweben, in denen das Gen häufig nicht mutiert vorliegt, sondern lediglich die Expression runterreguliert ist (Wheelock und Johnson 2003). Daher wurde in weiteren Untersuchungen auch die RNA- und Protein Expression von CDH11 und TERF2IP in ESFT Zelllinien und Patientengeweben analysiert und mit der Gendosis verglichen.

Es konnte eine CDH11 Expression bei 13 von 14 (93 %) der ESFT Zelllinien sowohl auf RNA- als auch auf Protein Ebene nachgewiesen werden (Tabelle 11-2 A, Seite 72). Lediglich die Zelllinie CHP-100 wies in allen Untersuchungen keine CDH11 Expression auf. Bei den ESFT Tumorgeweben zeigte sich für alle Proben eine RNA- und Protein Expression von CDH11 (Abbildung 11-3 A, Seite 67 und Abbildung 11-7 A, Seite 70). Die Expression von CDH11 war dabei sehr heterogen,

das heißt die relative Expression der Proben war sehr unterschiedlich und reichte über einen sehr breiten Wertebereich von sehr schwach zu sehr stark exprimierten Proben. Zum Beispiel wies das primäre Tumorgewebe von Patient 24-09 eine 29-fach höhere RNA Expression auf (relative Expression 11,6 \pm 0,02 Standardabweichung), als von Patient 162-08 (0,4 \pm 0,02; Abbildung 11-3 A, Seite 67). Durch den großen Unterschied zwischen Geweben mit niedriger und mit hoher Expression stellt die differentielle Expression eine gute Möglichkeit dar, die Höhe der Expression mit der Malignität (zum Beispiel dem Vorliegen von Metastasen oder der Überlebenswahrscheinlichkeit) zu korrelieren. Im Osteosarkom wurde bei zunehmender Malignität der untersuchten Proben eine sinkende CDH11 Expression nachgewiesen (Nakajima et al. 2008). Ob es einen Zusammenhang zwischen der Expressionshöhe und den klinischen Daten der ESFT Patienten gab, wurde daher ebenfalls untersucht (Kapitel 14.2).

Bei dem Vergleich der CDH11 Gendosis und Genexpression konnte für die drei in MLPA und aCGH deletierten Zelllinien (SK-ES1, SK-N-MC, VH-64) lediglich für SK-ES1 eine korrespondierende niedrige RNA- und Protein Expression festgestellt werden (Tabelle 11-2 A, Seite 72). Bei den ESFT Patienten wies nur eines der zwei deletierten primären Tumorgewebe auch eine korrespondierende niedrige RNA Expression auf (113-04), das andere Gewebe zeigte eine hohe RNA Expression (03-05; Tabelle 11-4 A, Seite 73). So ergab die statistische Auswertung nach Pearson dann auch weder für die ESFT Zelllinien noch für die Patientengewebe eine signifikante Korrelation von Gendosis und Genexpression (Pearson Korrelation, p > 0.05, zweiseitig). Somit konnte aufgrund der Gendosis nicht auf die Expression von CDH11 in den ESFT Zelllinien und Geweben geschlossen werden. Dies könnte sowohl auf Regulationsmechanismen bei der Genexpression zurückzuführen sein als auch darauf, dass lediglich hemizygote Deletionen vorlagen.

Der Vergleich von RNA- und Protein Expression ergab bei 43 % der untersuchten Zelllinien Übereinstimmungen in der Höhe der CDH11 Expression (Tabelle 11-2 A, Seite 72). Signifikante positive Übereinstimmungen wurden von RNA- und (Immunhistochemie, IHC) Protein Expression (Pearson Korrelation, p = 0.015, zweiseitig) sowie von IHC- und Western Blot (WB) Protein Expression (p = 0.045, zweiseitig) gefunden (Tabelle 11-3, Seite 73). Demnach war es möglich, von der CDH11 RNA- auf die Protein Expression der Zelllinien zu schließen. Die tatsächliche Relevanz dieser Korrelationen konnte nicht abschließend bewertet werden. Denn es muss berücksichtigt werden, dass eine quantitative Methode (qRT-PCR) mit semi-quantitativen Methoden (Immunhistochemie und Western Blot) verglichen wurde und dass nicht untersucht werden konnte, ob die Korrelationen auch bei den ESFT Patientengeweben vorhanden sind.

Für TERF2IP wurde in allen 14 ESFT Zelllinien eine RNA- und Protein Expression nachgewiesen (Tabelle 11-2 B, Seite 72). Ebenso zeigte sich bei allen untersuchten Patientengeweben (Anzahl = 33) eine RNA Expression von TERF2IP (Abbildung 11-3 B, Seite 67). Lediglich bei der Analyse der Protein Expression wiesen 8 von 28 (29 %) untersuchten ESFT Tumorgeweben keine TERF2IP Expression auf (Abbildung 11-7 B, Seite 70). Die Expression von TERF2IP war dabei eher homogen, das heißt die relativen Expressionen der Proben waren sehr ähnlich zueinander und in einem eher schmalen Wertebereich. So wies das primäre Tumorgewebe von Patient 29-09 lediglich eine etwa 16-fach höhere RNA Expression auf (relative Expression $3,3 \pm 0,42$ Standardabweichung),

als von Patient 24-09 (0,2 \pm 0,06) und fast 1/3 der untersuchten Patientengewebe hatten eine Expression nahe der mittleren Expression (1,0; Abbildung 11-3 B, Seite 67). Eine Ausnahme war lediglich die Untersuchung der RNA Expression bei den ESFT Zelllinien. Bedingt durch die äußerst hohe TERF2IP Expression der Zelllinie TC71, wurde ein breiterer Wertebereich der TERF2IP Expression (0,4 - 41) gefunden. Das TERF2IP weder häufig deletiert noch differentiell exprimiert wird, konnte schon im Mammakarzinom gezeigt werden (van Wezel et al. 2005). Dennoch gibt es Tumoren, bei denen die TERF2IP Expression mit dem Überleben der Patienten korreliert – zum Beispiel bei den Lungenkarzinomen (Lin et al. 2006). Trotz einer eher homogenen Expression von TERF2IP, wurde daher die Expressionshöhe mit den klinischen Daten der Patienten verglichen (Kapitel 14.2).

Der Vergleich der TERF2IP Gendosis und Genexpression konnte aufgrund fehlender Deletionen bei den ESFT Tumorgeweben (Tabelle 11-4 B, Seite 73) lediglich für die ESFT Zelllinien durchgeführt werden. Hier konnte für die beiden in MLPA und aCGH deletierten Zelllinien (SK-N-MC und VH-64) eine korrespondierende niedrige RNA- und Protein Expression festgestellt werden (Tabelle 11-2 B, Seite 72). Die statistische Auswertung nach Pearson ergab eine signifikante negative Korrelation von Gendosis und (WB) Protein Expression (p = 0.002, zweiseitig). Demnach gab es bei den ESFT Zelllinien einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer TERF2IP Deletion und einer niedrigen Expression.

Zusammenfassend wurden also nur sehr wenige oder gar keine (CDH11: 9 %, TERF2IP: 0 %) hemizygote Deletionen der Kandidatengene bei den analysierten primären ESFT Geweben gefunden. Diese korrelierten, im Fall von CDH11, auch nicht signifikant mit der RNA- und Protein Expression. Ein direkter Einfluss der hemizygoten Deletionen auf die Höhe der Expression konnte für die ESFT Patienten also nicht belegt werden und durch die geringe Anzahl an identifizierten Aberrationen dürften sich die beiden Kandidatengene wohl auch nicht für eine zukünftige Routine MLPA Analyse eignen. Eine Bedeutung der Gendosis als Prognosemarker für einen kleinen Teil der ESFT Patienten konnte aber nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden, da eine statistische Korrelation mit den klinischen Daten aufgrund der wenigen Deletionsdaten nicht durchgeführt wurde. Stattdessen wurden aber die RNA- und Protein Expressionsdaten mit den klinischen Daten der ESFT Patienten verglichen.

14.2 Statistische Signifikanz der molekularen Daten im Vergleich zu den klinischen Daten der ESFT Patienten

Zu den etablierten, klinischen Prognosemarkern bei ESFTs gehört das Vorliegen von Metastasen bei Diagnose (Jürgens et al. 1988; Terrier et al. 1996; Cotterill et al. 2000), die Tumorgröße (Ahrens et al. 1999), Tumorlokalisation, das Patientenalter (Cotterill et al. 2000) und das Ansprechen auf die initiale Chemotherapie (Rosito et al. 1999). Molekulare Prognosemarker werden dagegen bislang nicht in der Routineuntersuchung von ESFTs eingesetzt (Kapitel 3.3, Seite 13). Basierend auf den Ergebnissen der RNA- und Protein Expression wurden die molekularen Daten der beiden Kandidatengene mit den klinischen Daten der ESFT Patienten verglichen. Die Ergebnisse dieser statistischen Analyse sollten zeigen, ob die Expression von CDH11 und TERF2IP mit klinischen

Variablen wie zum Beispiel dem Vorliegen von Metastasen bei Diagnose oder der Tumorgröße und dem Überleben der Patienten korreliert. Ein kausaler Zusammenhang kann dadurch zwar nicht belegt werden, aber es wäre ein Hinweis, dass eine veränderte Expression der beiden Kandidatengene zu einer Veränderung in der Zellphysiologie und möglicherweise auch zu einer Entartung von Zellen führen könnte. Somit könnte die Expressionsanalyse der beiden Gene zukünftig wichtige Hinweise für den Verlauf der Krankheit und auch für mögliche Therapieziele geben.

Für die Analyse von CDH11 konnte für alle untersuchten ESFT Patienten die Metastasen aufwiesen, gleichzeitig auch eine hohe Protein Expression nachgewiesen werden. Patienten ohne Metastasen wiesen dagegen jeweils zur Hälfte eine hohe und niedrige CDH11 Protein Expression auf (Abbildung 11-10 A, Seite 75). Die statistische Analyse mittels Chi²-Test ergab für CDH11 eine signifikante Korrelation der Protein Expression mit dem Vorliegen von Metastasen (Tabelle 11-5 A, Seite 75; p = 0.01, zweiseitig). Entgegen der Hypothese, dass es sich bei den Kandidatengenen um Tumorsuppressorgene handeln sollte, wurde demnach in dieser Analyse stattdessen der Hinweis auf eine Tumor-progressive Funktion von CDH11 gefunden. Die Überlebensanalysen mittels Kaplan-Meier und Log-Rank-Test konnten diesen Hinweis zwar nicht signifikant festigen (Abbildung 11-11, Seite 76, p > 0.05, zweiseitig), aber interessanterweise war die Wahrscheinlichkeit, fünf Jahre nach der Diagnose noch zu leben für Patienten mit einer hohen CDH11 RNA Expression deutlich geringer (35 %), als für Patienten mit niedriger Expression (72 %; p > 0.05, zweiseitig). Auch bei der CDH11 Protein Expression wurde eine etwas geringere, wenn auch statistisch nicht relevante Wahrscheinlichkeit des Überlebens bei einer hohen (66 %) im Vergleich zu einer niedrigen Expression (72 %) gefunden. Diese Ergebnisse sind zwar nur ein Hinweis auf die mögliche Funktion von CDH11 in ESFTs, aber ähneln Erkenntnissen in verschiedenen anderen Tumorentitäten, in denen eine Tumor-progressive Funktion von CDH11 belegt wurde. Beispiele sind die primären aneurysmatischen Knochenzysten (primary aneurysmal bone cyst (ABC)) sowie Brustund Prostatakarzinome (Pishvaian et al. 1999, Tomita et al. 2000, Oliveira et al. 2004, Chu et al. 2008), bei denen die Überexpression von CDH11 zusätzlich zu Knochenmetastasen führt (Tamura et al. 2008, Huang et al. 2010; Lee et al. 2010).

Bei der Untersuchung von TERF2IP wurde bei der Mehrheit der untersuchten ESFT Patientenproben mit einem Rezidiv (70 %) gleichzeitig eine niedrige Protein Expression gefunden. Dagegen wiesen die meisten Patienten ohne Rezidiv (81 %) eine hohe TERF2IP Protein Expression auf (Abbildung 11-10 B, Seite 75). Damit konnte auch für TERF2IP mittels Chi²-Test eine signifikante Korrelation von Expressionshöhe und einer klinischen Variablen gefunden werden (Tabelle 11-5 B, Seite 75; p = 0.01, zweiseitig). Zusätzlich konnte bei der Überlebensanalyse mittels Kaplan-Meier und Log-Rank-Test eine niedrigere 5-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit signifikant mit einer niedrigen TERF2IP Protein Expression korreliert werden (Abbildung 11-12 B, Seite 77). Allerdings zeigte sich bei dem Vergleich der TERF2IP RNA Expression mit dem Überleben der Patienten eine entgegengesetzte Korrelation, da hier bei niedriger Expression signifikant höhere Überlebensraten nach 5 Jahren vorhanden waren (Abbildung 11-12 A). Die Aussagekraft der Überlebensanalyse konnte demnach nicht endgültig bewertet werden. Die Ergebnisse des Chi²-Tests könnten für eine Tumor-repressive Funktion von TERF2IP bei ESFTs sprechen.

Bei dem Vergleich der Kandidatengen Expression mit den klinischen Daten der ESFT Patienten wurden demnach erste Hinweise gefunden, nach denen eine veränderte Expression einen Einfluss auf die Prognose der Patienten haben könnte. Während die von Umehara et al. postulierte Funktion von *TERF2IP* als Tumorsuppressorgen in ESFTs weiter gefestigt werden konnte (Umehara et al. 2004), zeigte sich dagegen für *CDH11* eine mögliche Tumor-progressive Funktion. Dies widerspricht der Anfangs aufgestellten Hypothese, dass es sich bei *CDH11* um ein Tumorsuppressorgen in ESFTs handeln könnte. Ob tatsächlich ein funktioneller Zusammenhang zwischen der Expression der beiden Kandidatengene und einer Veränderung in der Zellphysiologie besteht, wurde nachfolgend durch funktionelle Studien nach forcierter Überexpression untersucht.

15. Funktionelle Studien nach forcierter Überexpression von CDH11 und TERF2IP in ESFT Zelllinien

Für die funktionellen Analysen wurden anhand der Expressionsergebnisse aus Kapitel 11.2 Zelllinien ausgesucht, die von sich aus eine niedrige Expression von CDH11 oder TERF2IP aufwiesen. Da sie jeweils eine geringe oder auch gar keine Expression der Gene aufwiesen (Tabelle 11-2, Seite 72), wurde für die Analyse von CDH11 die Zelllinie CHP-100 und für die Analyse von TERF2IP die Zelllinie VH-64 ausgewählt.

15.1 Etablierung stabiler CDH11 und TERF2IP Transfektanten

Durch die Methode der transienten Transfektion (Methodenbeschreibung: Seite 41) wurden zunächst die optimalen Versuchsbedingungen ausgetestet. Dabei konnte für CDH11 eine mehr als 340-fache mRNA- und eine etwa 1,3-fach erhöhte Protein Expression der pT-Rex-*CDH11* transfizierten CHP-100 Zellen im Vergleich zu den CHP-100 Kontrollen erzielt werden (Abbildung 12-6, Seite 82). Für TERF2IP konnte eine mehr als 260-fache mRNA- und eine etwa 1,5-fach erhöhte Protein Expression der pT-Rex-*TERF2IP* transfizierten VH-64 Zellen im Vergleich zu den VH-64 Kontrollen erreicht werden (Abbildung 12-7, Seite 83). Bei beiden Ansätzen war die RNA- und Protein Expression jeweils nach 24 Stunden am höchsten. Somit konnten die Zelllinien erfolgreich mit den Kandidatengen Vektoren transfiziert werden. Die Transfektion mit dem pT-Rex-*CDH11* beziehungsweise pT-Rex-*TERF2IP* Vektor konnte sowohl eine RNA- als auch Protein Expression induzieren und es konnte dabei keine letale Wirkung auf die Zellen festgestellt werden.

Im Anschluss an die Versuchsoptimierung wurden stabile CDH11 und TERF2IP Transfektanten hergestellt (Methodenbeschreibung: Seite 43). Für die funktionellen Analysen wurden jeweils diejenigen stabilen Transfektanten ausgewählt, welche im Vergleich zu den Kontrollen die höchste RNA- und Protein Expression aufwiesen.
Von den pT-Rex-CDH11 transfizierten CHP-100 Zellen wurde eine Transfektante ausgesucht, für die eine mehr als 30-fach erhöhte CDH11 RNA- und eine im Western Blot sichtbar erhöhte Protein Expression gefunden wurde (Abbildung 12-8, Seite 84). Die erhöhte Protein Expression konnte bei einem Großteil der CDH11 transfizierten Zellen (etwa 80 % bis 90 %) durch immunhistochemische Färbung bestätigt werden (Abbildung 12-9, Seite 85). Hier konnten auch erste Anzeichen einer veränderten Zellmorphologie der CDH11 Transfektante festgestellt werden. So zeigten die Zellen mit einer CDH11 Überexpression ein deutlich runderes Aussehen, als die spindelförmig geformten Kontrollen (Abbildung 12-10, Seite 86). Zusätzlich lösten sich diese Zellen bei der Trypsinierung später von der Kulturoberfläche ab. Dass eine aberrante Expression von CDH11 zu einer veränderten Zellmorphologie führen kann, wurde auch schon von anderen Arbeitsgruppen beobachtet. So konnten Kawaguchi et al. nach der Transfektion von CDH11 in eine Maus Fibroblasten Zelllinie (so genannte L-Zellen) ein deutlich vernetzteres Aussehen der Zellen im Vergleich zu den Kontrollen feststellen (Kawaguchi et al. 1999). Ein Grund für die veränderte Morphologie und verstärkte Adhäsion an der Kulturfläche könnte die Ausbildung von zusätzlichen Zell-Zell und Zell-Kulturfläche Verbindungen durch mehr CDH11 Adhäsionsproteine an der Zelloberfläche sein. Dieses Argument wurde durch den Aggregationsassay (Kapitel 15.2.4) untersucht.

Von den pT-Rex-*TERF2IP* transfizierten VH-64 Zellen wurde eine Transfektante mit einer 3,5-fach erhöhten RNA- aber einer im Western Blot kaum sichtbar erhöhten Protein Expression ausgewählt (Abbildung 12-11, Seite 87). Bei der immunhistochemischen Färbung zeigte sich auch lediglich bei einem Anteil von etwa 10 % der *TERF2IP* transfizierten Zellen eine Protein Expression (Abbildung 12-12, Seite 87). Die niedrige Expression dieser stabilen im Vergleich zu den transienten TERF2IP Transfektanten der Versuchsoptimierung, könnte durch die Integration des DNA Vektors in das Genom der Zellen bedingt sein. Die Expression von *TERF2IP* könnte dadurch teilweise oder ganz inhibiert worden sein. Das Zielgen könnte ebenso während des Selektionsprozesses gänzlich verloren gegangen sein, während die Zellen weiterhin das Neomycin-Resistenzgen des pTRex-DEST30 Vektors aufwiesen. Trotz der geringen Expression wurde die TERF2IP Transfektante für die funktionellen Analysen verwendet.

15.2 Funktionelle Analysen an stabilen Transfektanten

Mit verschiedenen Methoden wurden mehrere Faktoren des Zellstoffwechsels und der Zellphysiologie analysiert, die durch die aberrante Expression von CDH11 beziehungsweise TERF2IP möglicherweise beeinflusst werden. So wurde die Migrations- und Aggregationsfähigkeit untersucht, die wichtige Faktoren für die Invasion und Metastasierung von Zellen darstellen. Außerdem wurde auch die Fähigkeit zur Invasion selber und die Proliferationsrate der Zellen gemessen.

15.2.1 Migration

Untersuchungen an Osteosarkom Zelllinien konnten bei einer Überexpression von CDH11 eine verminderte Zellmigration nachweisen (Kashima et al. 2003). Die Expression von TERF2IP wurde dagegen noch nicht mit der Migration von Zellen korreliert. In dieser Arbeit wurde damit zum ersten

Mal die Expression von CDH11 und TERF2IP mit der Zellmigration von ESFT Zelllinien korreliert. Allerdings konnte die Migration der Zellen unter Verwendung des Scratch Assays nicht unabhängig von einer Proliferation erfasst werden. Während erwartet wurde, dass die Zellen durch einen Entzug von Serum im Medium ihr Wachstum einstellen, proliferierten die meisten Zellen dennoch weiter. Bei den CHP-100 Zellen reduzierten lediglich die beiden Kontrollen (pT-Rex mock und K⁻) ihr Wachstum, während die *CDH11* transfizierten CHP-100 Zellen weiter proliferierten, erkennbar an dem dichten konfluenten Aussehen der Zellen nach 48 Stunden (Abbildung 12-14, Seite 89). Die VH-64 Zellen zeigten sogar alle (*TERF2IP* transfizierte Zellen und Kontrollen) eine unverminderte Proliferation bis zu ihrem Ablösen nach weniger als 48 Stunden (Abbildung 12-15, Seite 90). Damit konnte die Bedeutung einer Überexpression von CDH11 oder TERF2IP für die Zellmigration mit dieser Untersuchung nicht beurteilt werden. Es wurde jedoch der Hinweis auf einen Wachstumsvorteil der *CDH11* transfizierten CHP-100 Zellen in Serum-freiem Medium gefunden, der für die Analyse der Zellproliferation berücksichtigt wurde.

15.2.2 Proliferation

Basierend auf den Ergebnissen der Migration wurden die Analysen zur Proliferation der CHP-100 Zelllinien (CDH11 Transfektante und Kontrollen) sowohl mit Serum als auch ohne Serum im Medium durchgeführt. Die Proliferation der TERF2IP Transfektante und der entsprechenden Kontrollen wurde dagegen nur mit Serum-enthaltendem Medium untersucht, da sie sich bei Verwendung von Serum-freiem Medium innerhalb von 48 Stunden von der Kulturfläche ablösten.

Bei Verwendung des Mediums ohne Serum konnte eine signifikant höhere Proliferation der CDH11 Transfektante im Vergleich zu den Kontrollen nachgewiesen werden (Student's t-Test, p < 0.01, zweiseitig; Abbildung 12-17, Seite 92). Dies war vor allem darauf zurückzuführen, dass die Kontrollen ihre Proliferation einstellten und spätestens am vierten Tag abstarben, während die CDH11 Transfektante weiter proliferierte. Die Proliferationsanalyse unter Verwendung von Medium mit Serum zeigte dagegen keinen Unterschied im Wachstum der Zellen (Student's t-Test, p > 0.05, zweiseitig; Abbildung 12-16, Seite 92). Damit konnte der in der Migrationsanalyse beobachtete Wachstumsvorteil der CDH11 Transfektante bei Entzug von Wachstumsfaktoren bestätigt werden. Darüber hinaus wurde der Hinweis aus Kapitel 14, dass CDH11 möglicherweise eine Tumorprogressive Funktion in ESFTs haben könnte, weiter gefestigt. Dass die CHP-100 Zellen durch die verstärkte Expression von CDH11 in der Lage waren ohne Wachstumsfaktoren zu überleben, könnte durch eine bereits in der Literatur beschriebene Proteolyse von Cadherinen verursacht werden. Demnach können sich Cadherinproteine in einen extra- und intrazellulären Teil spalten und jeweils mit anderen Proteinen interagieren. Beispielsweise wurde bereits nachgewiesen, dass die intrazellulären, C-terminalen Fragmente von CDH1 und CDH2 einen Einfluss auf Zellproliferation und -migration haben (Übersichtsartikel: McCusker und Alfandari 2009). Ob der Entzug der Wachstumsfaktoren zu einer Proteolyse von CDH11 führen kann, konnte im Rahmen dieser Arbeit aber nicht nachgewiesen werden.

Die Untersuchungen zur Proliferation der *TERF2IP* transfizierten Zellen konnten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich mit den jeweiligen Kontrollen nachweisen (Student's t-Test, p > 0.05, zweiseitig). In allen Ansätzen zeigten die Zellen eine ähnliche, konstante Proliferationsrate bis zum Absterben der Zellen nach etwa 5 Tagen Kultivierung (Abbildung 12-18, Seite 93). Demnach führte die verstärkte Expression von TERF2IP zu keinem Unterschied in der Proliferation der VH-64 Zellen.

15.2.3 Invasion

Maligne Tumoren sind in der Lage in umliegendes Gewebe sowie Blut- und Lymphbahnen einzudringen und sich dadurch im Körper auszubreiten (Alberts 2004). Für *CDH11* konnte bereits eine erhöhte Expression des Gens mit einem erhöhten Invasionspotential beim Prostatakarzinom korreliert werden (Huang et al. 2010). Die Fähigkeit zur Invasion von ESFT Zellen mit erhöhter CDH11 oder TERF2IP Expression, wurde dagegen noch nicht untersucht.

Die Invasionsfähigkeit der CDH11 und TERF2IP Transfektante sowie den jeweiligen Kontrollen wurde in dieser Arbeit mit ThinCert[™] Zellkultureinsätzen sowie Matrigel[™] als künstlicher extrazellulärer Membran (ECM) studiert. Als chemisches Attraktanz (Lockstoff) wurde in das untere Kompartiment konditioniertes Medium der CDH11 Transfektante beziehungsweise TERF2IP Transfektante gegeben und die Zellen im oberen Kompartiment in Serum-freiem Medium ausgebracht (Methodenbeschreibung: Seite 46). Um eine Verfälschung der Daten durch die erhöhte Proliferation der CDH11 Transfektante bei Serum Entzug zu verhindern, wurde der Versuchsansatz bereits nach 24 Stunden ausgewertet.

Von den eingesetzten 400.000 Zellen der CDH11 Transfektante waren im Durchschnitt lediglich 0,1 % (± 0,04 % Standardabweichung) der Zellen nach 24 Stunden in der Lage, durch die ECM zu wandern (Abbildung 12-19 A, Seite 94). Bei den beiden Kontrollen konnten nur geringfügig mehr Zellen (0,7 % ± 0,6 % beziehungsweise 0,2 % ± 0,3 %) auf der Unterseite der Membran gefunden werden (Student's t-Test, p > 0.05, zweiseitig).

Von der TERF2IP Transfektante wurden im Durchschnitt 0,12 % (± 0,1 % Standardabweichung) der eingesetzten Zellen auf der Unterseite der Membran gezählt (Abbildung 12-19 B, Seite 94). Fast annähernd so viele Zellen der Kontrollen waren nach 24 Stunden durch die ECM gewandert (0,11 % ± 0,1 % beziehungsweise 0,13 % ± 0,1 %). Es gab also keinen signifikanten Unterschied zwischen den Zellen (Student's t-Test, p > 0.05, zweiseitig).

Somit waren sowohl bei den Analysen zu CDH11 als auch zu TERF2IP weniger als 1 % der untersuchten Zellen nach 24 Stunden in der Lage auf die Unterseite der Membran zu gelangen. Diese geringe Invasionsfähigkeit der Zellen könnte an der kurzen Zeit von lediglich 24 Stunden liegen. In jedem Fall war die Standardabweichung zwischen den zwei unabhängigen Zählungen so hoch, dass eine endgültige Beurteilung der Invasionsfähigkeit in Bezug auf die CDH11 beziehungsweise TERF2IP Expression nicht erfolgen konnte.

15.2.4 Aggregation

Die Aggregation spielt eine wichtige Rolle bei der Invasion und Metastasierung von Zellen, da sich für diese malignen Vorgänge Zellen anlagern und miteinander verbinden müssen (Alberts 2004). Im Vordergrund der Analysen stand vor allem die Untersuchung der CDH11 Transfektante, da bei der Etablierung dieser Zellen ein späteres Ablösen von der Kulturfläche bei Trypsinierung beobachtet wurde (Kapitel 12.2.1, Seite 84).

Das Zusammenlagern der Zellen wurde nach dem Vorbild von Potter und Morris im so genannten hängenden Tropfen beobachtet (Potter und Morris 1985; Methodenbeschreibung: Seite 47). In Suspension können sich die Zellen an der Spitze des Tropfens zu dreidimensionalen Zellverbänden zusammenlagern, die sich bei der Kultivierung der Zellen als adhärente Monolayer nicht bilden könnten. Die Anzahl an Zellverbänden ist dabei einerseits ein Maß für die Fähigkeit der Zellen zur Aggregation und Adhäsion, aber wahrscheinlich auch für die Malignität der Zellen. Denn während die meisten benignen adhärenten Zellen in Suspension zugrunde gehen, formen viele Tumorzellen so genannte Sphäroide (kugelförmige Zellaggregate) und überleben ohne die Anheftung an eine Oberfläche (Bates et al. 2000, Frisch und Screaton 2001). Für ESFT Zelllinien konnte bereits die Ausbildung von Sphäroiden in Suspension nachgewiesen werden, unter anderem auch für die in dieser Arbeit verwendete VH-64 Zelllinie (Lawlor et al. 2002, Wahl et al. 2010).

Die pT-Rex-*CDH11* transfizierten Zellen lagen bei Versuchsbeginn gleichmäßig als Einzelzellen im Tropfen vor und bildeten nach 24 Stunden kleine, über den Tropfen verteilte Aggregate. Dagegen verteilten sich die beiden Kontrollansätze nach dem Ausbringen des Tropfens nicht als Einzelzellen, sondern lagen als Zellverbände an einer Seite des Tropfens vor. Diese Zellverbände sammelten sich nach 24 Stunden in der Mitte des Tropfens, wobei sich auch ein paar dreidimensionale Aggregate ausbildeten (Abbildung 12-20, Seite 96). Ein Vorliegen von Sphäroiden konnte in keinem der Ansätze eindeutig belegt werden. Somit wurden deutlich sichtbare Unterschiede zwischen der CDH11 Transfektante und den Kontrollen gefunden, die aber nicht quantifizierbar waren. Die Überexpression von CDH11 führte zu einer Veränderung der Zellverteilung im Tropfen, aber es konnte keine abschließende Aussage über eine Veränderung der Aggregationsfähigkeit dieser Zellen getroffen werden. Unbestritten ist aber, dass CDH11 für die Zell-Zell-Adhäsion verantwortlich ist (Kiener et al. 2006) und somit ein Einfluss der Überexpression auf diesen Prozess nicht ausgeschlossen werden kann.

Bei der Untersuchung der Aggregationsfähigkeit der TERF2IP Transfektante und den entsprechenden Kontrollen verteilten sich bei Versuchsbeginn alle Einzelzellen gleichmäßig im Tropfen und bildeten nach 24 Stunden dreidimensionale Aggregate an der Spitze des Tropfens aus (Abbildung 12-21, Seite 96). Ob es sich bei diesen Aggregaten um die erwähnten Sphäroide handelte, konnte nicht festgestellt werden. Es wurde aber weder an Tag 0, noch an Tag 1 ein sichtbarer Unterschied zwischen den Ansätzen festgestellt. Die erhöhte TERF2IP Expression führte also zu keiner sichtbaren Veränderung in der Aggregationsfähigkeit der VH-64 Zelllinie.

F Zusammenfassung

Die Diagnose eines am Ewing sarcoma family of tumors (ESFTs) erkrankten Patienten erfolgt heutzutage neben der Gewebehistologie auch mit molekularen Markern, vor allem durch den Nachweis einer partiellen Translokation des langen Arms von Chromosom 22 (22q12). Eine Prognoseeinschätzung wird dagegen bisher nur anhand von klinischen Prognosemarkern, wie dem Vorliegen von Metastasen bei Diagnose oder dem Ansprechen auf die initiale Chemotherapie getroffen. Prognostisch bedeutsame molekulare Marker wurden bislang erst wenige und auch nur bei einem Teil der ESFT Patienten entdeckt. Dementsprechend war ein Ziel dieser Arbeit, zusätzliche molekulare Prognosemarker in ESFTs zu identifizieren. Da in Zukunft vermutlich nicht nur ein einziger molekularer Marker routinemäßig bei den ESFT Tumorgeweben untersucht werden muss, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit eine Methode zu finden und zu etablieren, die verschiedenste chromosomale Veränderungen erfasst und die sich zusätzlich auch für eine Routineuntersuchung eignet.

Als geeignete Methode für die Routineuntersuchung von primären ESFT Tumorproben wurde die MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) ausgewählt, da sie schnell und günstig durchzuführen ist. Bei der Etablierung der Methode wurde durch mehrere Wiederholungen der Analyse nachgewiesen, dass die MLPA reproduzierbar Aberrationen bei ESFT Zelllinien und Tumorgeweben identifiziert. Dabei war es wichtig, frisches oder gefrorenes Untersuchungsmaterial und mehrere Kontrollproben zu verwenden. Im Vergleich mit der gut etablierten Methode der aCGH (Array comparative genomic hybridization) wurden durch die MLPA jeweils etwa 1,2-mal mehr Aberrationen bei den Zelllinien und Patientenproben gefunden. Ursache könnte das höhere Auflösungsvermögen der MLPA sein, aber ebenso könnte es sich um falsch-positive Ergebnisse handeln. In dieser Arbeit wurden daher nur Aberrationen bei Routineuntersuchungen sollten für die MLPA mehrere redundante Sonden für jedes Gen verwendet und im Einzelfall potentielle Aberrationen durch die Verwendung einer unabhängigen Methode verifiziert werden.

Für die Suche nach neuen Kandidatengenen wurde die prognostisch bedeutsame und mit am häufigsten publizierte strukturelle Aberration in ESFTs, der Verlust des langen Arms von Chromosom 16 (16q) ausgewählt. Durch Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde der chromosomale Bereich weiter auf Locus 16q22 bis 16q24 eingegrenzt. Da ein chromosomaler Verlust kennzeichnend für das Vorliegen von Tumorsuppressorgenen sein kann, wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich in diesem Bereich mindestens ein prognostisch relevantes Tumorsuppressorgen befinden sollte. Als potentielle Tumorsuppressorgene beziehungsweise Prognosemarker in ESFTs wurden die Gene *CDH11* (16q22) und *TERF2IP* (16q23) ausgewählt. Cadherin 11 ist ein Zelladhäsionsprotein, welches unter anderem eine wichtige Funktion bei der Entwicklung von Knochen bildenden Zellen (Osteoblasten) hat. Das Telomeric repeat binding factor 2 interacting protein (TERF2IP) ist ein indirekter, negativer Regulator der Länge von Telomeren. Für beide Gene wurden bei dem häufigsten primären malignen Knochentumor, dem Osteosarkom, Hinweise auf eine Tumor-repressive Wirkung gefunden. Die Eigenschaften der Gene in ESFTs wurden durch diese Arbeit zum ersten Mal untersucht.

Die Charakterisierung der beiden potentiellen Prognosemarker anhand ihrer Gendosis zeigte, dass eine Aberration der Gene nur selten in primärem ESFT Tumorgewebe vorkommt. Hemizygote Deletionen von *CDH11* wurden in Kombination von MLPA und aCGH bei 21 % der untersuchten Zelllinien, aber nur 9 % der Patientengewebe nachgewiesen. Für *TERF2IP* konnten hemizygote Deletionen bei 14 % der Zelllinien, jedoch bei keiner der untersuchten Tumorproben festgestellt werden. Eine Korrelation der Gendosis mit dem Krankheitsverlauf der ESFT Patienten konnte durch die selten auftretenden Aberrationen nicht durchgeführt werden. Somit konnte nicht geklärt werden, ob sich die Analyse der Gendosis von *CDH11* oder *TERF2IP* für eine Prognoseabschätzung bei ESFT Patienten eignet.

Weitergehende Untersuchungen zur Genexpression der Kandidatengene ergaben dagegen erste Hinweise darauf, dass die Höhe der Expression von CDH11 beziehungsweise TERF2IP mit dem Krankheitsverlauf der Patienten korrelieren könnte. So wurde das Vorliegen von Metastasen signifikant mit einer hohen CDH11 Protein Expression korreliert. Untersuchungen zur Überlebenszeit der ESFT Patienten bei hoher oder niedriger CDH11 Expression ergaben allerdings keinen signifikanten Unterschied. Bei den Patienten mit hoher CDH11 Expression war die 5-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit trotzdem etwas schlechter (6 % bei der Analyse der Protein Expression und 37 % bei der Analyse der RNA Expression). Für CDH11 wurde demnach eher der Hinweis auf eine Tumor-progressive Wirkung, als auf eine Tumor-repressive Wirkung gefunden. Für TERF2IP konnte das Auftreten von Rezidiven signifikant mit einer niedrigen Protein Expression korreliert werden. Die Analyse zur 5-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit konnte dagegen nicht abschließend bewertet werden, da sie einerseits bei einer hohen RNA Expression andererseits bei einer niedrigen Protein Expression von TERF2IP signifikant schlechter war. Somit wurde für TERF2IP eher ein Hinweis auf eine Tumor-repressive Wirkung bei ESFTs gefunden.

Durch funktionelle Studien nach forcierter Überexpression wurden mögliche Auswirkungen einer veränderten Expression von CDH11 und TERF2IP auf die Physiologie von ESFT Zelllinien in Kultur untersucht. Bei einer CDH11 Überexpression wies die Zelllinie CHP-100 eine deutlich veränderte Morphologie und ein späteres Ablösen der Zellen bei der Kultivierung auf. Zusätzlich konnte ein Wachstumsvorteil der CDH11 Transfektante in Serum-freiem Medium nachgewiesen werden. Untersuchungen zur Aggregationsfähigkeit der Zellen ergaben ebenfalls einen sichtbaren Unterschied zwischen den *CDH11* transfizierten Zellen und den Kontrollen, der aber nicht quantifizierbar war. Bei einer TERF2IP Überexpression konnten bei der Zelllinie VH-64 keine Veränderungen in der Morphologie, der Proliferation oder Aggregation festgestellt werden. Dass der Anteil an TERF2IP exprimierenden Zellen zu gering war, um quantifizierbare Veränderungen der Zellen auszulösen, konnte dabei nicht ausgeschlossen werden.

Die Untersuchungen dieser Arbeit haben gezeigt, dass die Methode der MLPA durch die hohe Reproduzierbarkeit und einfache Untersuchung vieler verschiedener Gene für Routineuntersuchungen bei ESFT Patientengeweben geeignet ist. In Zukunft wäre es also möglich eine Vielzahl von molekularen Markern mit der MLPA auf Gendosisveränderungen zu untersuchen und damit dazu beizutragen Diagnose, Prognose und Therapie der ESFT Patienten zu verbessern. Für die beiden Kandidatengene *CDH11* und *TERF2IP* konnte eine Eignung als molekulare Marker für die MLPA nicht abschließend nachgewiesen werden. Allerdings wurden durch Analysen zur Genexpression für CDH11 Hinweise auf eine Tumor-progressive Wirkung und für TERF2IP Hinweise auf eine Tumor-repressive Wirkung bei ESFT Patienten gefunden. Zusätzlich wurden bei Überexpression von CDH11 Veränderungen der Morphologie, Proliferation und Aggregation von CHP-100 Zellen gefunden. Damit qualifiziert sich CDH11 als potentieller Prognosemarker in ESFTs, der in zusätzlichen Untersuchungen weiter analysiert werden sollte.

Summary

Diagnosis of patients suffering from Ewing sarcoma family of tumors (ESFTs) nowadays relies on the tissue histology and also on molecular markers, primarily by the detection of a partial translocation of the long arm of chromosome 22 (22q12). Reliable predictions of prognosis, however, are based only on clinical prognostic markers, such as the presence of metastases at diagnosis or the response to initial chemotherapy. Only few molecular markers with a prognostic significance have been discovered so far and only for a subset of ESFT patients. Accordingly, one objective of this study was to identify additional prognostically relevant molecular markers in ESFTs. Since it could be necessary in the future to examine not only a single molecular marker routinely in the ESFT tumor tissues, a further goal of this work was to find and establish a method for the detection of various chromosomal changes, which in addition should be also suitable for a routine examination.

The MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) was selected as a suitable method to screen primary ESFT tumor samples routinely, because it can be performed quick and cost effective. By several repetitions of the analysis it could be demonstrated that the MLPA reproducibly identified aberrations in ESFT cell lines and tumor tissues. It was important to use fresh or frozen material for the analyses and several control samples. In comparison with the well-established aCGH (Array comparative genomic hybridization) MLPA detected about 1.2 times more aberrations each in the cell lines and patient samples. The reason could be of course the higher resolution of the MLPA, but equally there could be false-positive results either. Therefore, only aberrations that were identified in both MLPA and aCGH were included in this work. For the application of MLPA in routine examinations, several redundant probes for each gene should be used and potential aberrations should be verified in case of doubt by the use of an independent method.

For the search of new candidate genes the prognostically significant and most often published structural aberration in ESFTs was selected, a loss of the long arm of chromosome 16 (16q). The chromosomal region was further narrowed to locus 16q22 to 16q24 by preliminary work of the working group. Since a chromosomal loss may be characteristic for the existence of tumor sup-

pressor genes, it was hypothesized that there should be at least one prognostically relevant tumor suppressor gene in this area. As potential tumor suppressor genes or prognostic markers in ESFTs the genes *CDH11* (16q22) and *TERF2IP* (16q23) were selected. Cadherin 11 is a cell adhesion protein, which has an important role in the development of bone-forming cells (osteoblasts). The Telomeric repeat binding factor interacting protein 2 (TERF2IP) is an indirect negative regulator of the telomere length. For both genes the evidence of a tumor-repressive effect was found in osteosarcoma, the most common primary malignant bone tumor. This work examined for the first time the characteristics of these genes in ESFTs.

The characterization of the two potential prognostic markers based on their gene dosage showed that an aberration of the genes was rarely found in primary ESFT tumor tissue. By combination of MLPA and aCGH, hemizygous deletions of *CDH11* were detected for 21 % of the examined cell lines, but only for 9 % of the patient tissues. Hemizygous deletions of *TERF2IP* could be found for 14 % of the cell lines, but couldn't be detected in any of the examined tumor samples. A correlation of gene dosage with the progression of ESFT patients could not be performed because of the rare occurrence of aberrations. Therefore it could not be determined whether the analysis of gene dosage of *CDH11* or *TERF2IP* was suitable for the prognosis in ESFT patients.

Further analyses on candidate gene expression provided first indications for a correlation of CDH11 or TERF2IP expression levels with the disease course of patients. Thus, the presence of metastases was significantly correlated with a high CDH11 protein expression. Studies on the survival of ESFT patients at high or low expression of CDH11, however, showed no significant differences. Nevertheless, patients with high expression of CDH11 had a poorer 5-year survival (6 % for the analysis of protein expression and 37 % for the analysis of RNA expression). Therefore it was more likely that CDH11 showed a tumor-progressive effect, than a tumor-repressive effect. The occurrence of relapses could be significantly correlated with a low protein expression of TERF2IP. The analysis of the 5-year survival could not be definitively evaluated, since it was simultaneously significantly worse at high RNA and low protein expression. Thus, for TERF2IP rather an indication of a tumor-repressive effect on ESFTs was found.

Possible effects of an altered expression of CDH11 or TERF2IP for the physiology of ESFT cell lines in culture were examined by functional studies. CHP-100 cells with an over expression of CDH11 showed an obviously altered morphology and a subsequent detachment of cells during culture. In addition, a positive growth advantage of the CDH11 transfectants was detected in serum-free medium. Studies on the aggregation ability of the cells also showed a visible difference between the *CDH11* transfected cells and the controls, but this was not quantifiable. VH-64 cells with an over expression of TERF2IP showed no changes in morphology, proliferation or aggregation. It could not be excluded that the proportion of cells expressing TERF2IP was too low to produce quantifiable changes in the cells.

This study was able to show that the MLPA is suitable for routine examinations in ESFT patient tissues because of its high reproducibility and simple analysis of many different genes. Thus, in the future it would be possible to examine a variety of molecular markers with MLPA and thereby help to improve diagnosis, prognosis and therapy of ESFT patients. The suitability of the two candidate genes *CDH11* and *TERF2IP* as molecular markers for MLPA could not been proven at the end. However, gene expression analyses showed some evidence that CDH11 has a tumor-progressive effect and that TERF2IP has a tumor-repressive effect on ESFT patients. In addition, over expression of CDH11 led to modifications of the morphology, proliferation and aggregation of CHP-100 cells. Thus CDH11 qualifies itself as a potential prognostic marker in ESFTs, which should be further analyzed.

LITERATURVERZEICHNIS

Deutsches Kinderkrebsregister (2003 - 2007).

Interdisziplinäre Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft und der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (2009).

Ahrens, S; Hoffmann, C; Jabar, S.; Braun-Munzinger, G.; Paulussen, M; Dunst, J. et al. (1999): 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. In: Med. Pediatr. Oncol 32 (3), S. 186–195.

Alava, E. de; Antonescu, C. R.; Panizo, A.; Leung, D.; Meyers, P. A.; Huvos, A. G. et al. (2000): Prognostic impact of P53 status in Ewing sarcoma. In: Cancer 89 (4), S. 783–792.

Alava, E. de; Kawai, A.; Healey, J. H.; Fligman, I.; Meyers, P. A.; Huvos, A. G. et al. (1998): EWS-FLI1 fusion transcript structure is an independent determinant of prognosis in Ewing's sarcoma. In: J. Clin. Oncol. 16 (4), S. 1248–1255.

Alberts, Bruce (2004): Molekularbiologie der Zelle. 4. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH.

Albertson, Donna G.; Pinkel, Daniel (2003): Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. In: Hum. Mol. Genet. 12 Spec No 2, S. R145-52. Online verfügbar unter doi:10.1093/hmg/ddg261.

Alldinger, I.; Schaefer, K L; Goedde, D.; Ottaviano, L.; Dirksen, U.; Ranft, A. et al. (2007): Microsatellite instability in Ewing tumor is not associated with loss of mismatch repair protein expression. In: J. Cancer Res. Clin. Oncol 133 (10), S. 749–759.

Allsopp, R. C.; Vaziri, H.; Patterson, C.; Goldstein, S.; Younglai, E. V.; Futcher, A. B. et al. (1992): Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. In: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89 (21), S. 10114–10118.

Ambros, I. M.; Ambros, P. F.; Strehl, S.; Kovar, H.; Gadner, H.; Salzer-Kuntschik, M. (1991): 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. In: Cancer 67 (7), S. 1886–1893.

Andreeva, Alexandra V.; Kutuzov, Mikhail A. (2010): Cadherin 13 in cancer. In: Genes Chromosomes Cancer 49 (9), S. 775–790. Online verfügbar unter doi:10.1002/gcc.20787.

Armengol, G.; Tarkkanen, M.; Virolainen, M.; Forus, A.; Valle, J.; Böhling, T. et al. (1997): Recurrent gains of 1q, 8 and 12 in the Ewing family of tumours by comparative genomic hybridization. In: Br. J. Cancer 75 (10), S. 1403–1409.

Arvand, A.; Denny, C. T. (2001): Biology of EWS/ETS fusions in Ewing's family tumors. In: Oncogene 20 (40), S. 5747–5754. Online verfügbar unter doi:10.1038/sj.onc.1204598.

Avigad, Smadar; Naumov, Inna; Ohali, Anat; Jeison, Marta; Berco, Gili Halevy; Mardoukh, Jacques et al. (2007): Short telomeres: a novel potential predictor of relapse in Ewing sarcoma. In: Clin. Cancer Res. 13 (19), S. 5777–5783. Online verfügbar unter doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-0308.

Baer, Claudia; Nees, Mattias; Breit, Stephen; Selle, Barbara; Kulozik, Andreas E.; Schaefer, Karl-Ludwig et al. (2004): Profiling and functional annotation of mRNA gene expression in pediatric rhabdomyosarcoma and Ewing's sarcoma. In: Int. J. Cancer 110 (5), S. 687–694. Online verfügbar unter doi:10.1002/ijc.20171.

Bates, R. C.; Edwards, N. S.; Yates, J. D. (2000): Spheroids and cell survival. In: Crit. Rev. Oncol. Hematol. 36 (2-3), S. 61–74.

Battifora, H. (1986): The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. In: Lab. Invest 55 (2), S. 244–248.

Bender, R.; Lange, S. (2007): Was ist der p-Wert? In: Dtsch. Med. Wochenschr 132 Suppl 1, S. e15-6.

Bender, R.; Lange, S.; Ziegler, A. (2007): Wichtige Signifikanztests. In: Dtsch. Med. Wochenschr 132 Suppl 1, S. e24-5.

Birke, C.; Peter, H. H.; Langenberg, U.; Müller-Hermes, W. J.; Peters, J. H.; Heitmann, J. et al. (1981): Mycoplasma contamination in human tumor cell lines: effect on interferon induction and susceptibility to natural killing. In: J. Immunol 127 (1), S. 94–98.

Bovée, Judith V. M. G.; Hogendoorn, Pancras C. W. (2010): Molecular pathology of sarcomas: concepts and clinical implications. In: Virchows Arch. 456 (2), S. 193–199. Online verfügbar unter doi:10.1007/s00428-009-0828-5.

Boyden, S. (1962): The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. In: J. Exp. Med 115, S. 453–466.

Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: Anal. Biochem 72, S. 248–254.

Brownhill, S. C.; Taylor, C.; Burchill, S. A. (2007): Chromosome 9p21 gene copy number and prognostic significance of p16 in ESFT. In: Br. J. Cancer 96 (12), S. 1914–1923. Online verfügbar unter doi:10.1038/sj. bjc.6603819.

Bryan, T. M.; Cech, T. R. (1999): Telomerase and the maintenance of chromosome ends. In: Curr. Opin. Cell Biol. 11 (3), S. 318–324. Online verfügbar unter doi:10.1016/S0955-0674(99)80043-X.

Buchman, A. R.; Lue, N. F.; Kornberg, R. D. (1988): Connections between transcriptional activators, silencers, and telomeres as revealed by functional analysis of a yeast DNA-binding protein. In: Mol. Cell. Biol. 8 (12), S. 5086–5099.

Burchill, Susan; Picton, Susan; Wheeldon, John; Kinsey, Sally; Lashford, Linda; Lewis, Ian (2003): Reduced tumor load in peripheral blood after treatment with G-CSF and chemotherapy in children with tumors of the

Ewing sarcoma family but not neuroblastoma. In: Blood 102 (9), S. 3459-3460. Online verfügbar unter doi:10.1182/blood-2003-08-2775.

Cech, Thomas R. (2004): Beginning to understand the end of the chromosome. In: Cell 116 (2), S. 273-279.

Cheng, S. L.; Lecanda, F.; Davidson, M. K.; Warlow, P. M.; Zhang, S. F.; Zhang, L. et al. (1998): Human osteoblasts express a repertoire of cadherins, which are critical for BMP-2-induced osteogenic differentiation. In: J. Bone Miner. Res. 13 (4), S. 633–644. Online verfügbar unter doi:10.1359/jbmr.1998.13.4.633.

Chomczynski, P.; Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. In: Anal. Biochem 162 (1), S. 156–159.

Chu, Khoi; Cheng, Chien-Jui; Ye, Xiangcang; Lee, Yu-Chen; Zurita, Amado J.; Chen, Dung-Tsa et al. (2008): Cadherin-11 promotes the metastasis of prostate cancer cells to bone. In: Mol. Cancer Res. 6 (8), S. 1259– 1267. Online verfügbar unter doi:10.1158/1541-7786.MCR-08-0077.

Cooper, Geoffrey M.; Hausman, Robert E. (2004): The Cell. A Molecular Approach: Palgrave Macmillan.

Cotterill, S. J.; Ahrens, S; Paulussen, M; Jürgens, H. F.; Voûte, P. A.; Gadner, H.; Craft, A. W. (2000): Prognostic factors in Ewing's tumor of bone: analysis of 975 patients from the European Intergroup Cooperative Ewing's Sarcoma Study Group. In: J. Clin. Oncol. 18 (17), S. 3108–3114.

Delattre, O.; Zucman, J.; Melot, T.; Garau, X. S.; Zucker, J. M.; Lenoir, G. M. et al. (1994): The Ewing family of tumors--a subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts. In: N. Engl. J. Med. 331 (5), S. 294–299. Online verfügbar unter doi:10.1056/NEJM199408043310503.

Delattre, O.; Zucman, J.; Plougastel, B.; Desmaze, C.; Melot, T.; Peter, M. et al. (1992): Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. In: Nature 359 (6391), S. 162–165. Online verfügbar unter doi:10.1038/359162a0.

Devaney, K.; Abbondanzo, S. L.; Shekitka, K. M.; Wolov, R. B.; Sweet, D. E. (1995): MIC2 detection in tumors of bone and adjacent soft tissues. In: Clin. Orthop. Relat. Res. (310), S. 176–187.

Douglass, E. C.; Rowe, S. T.; Valentine, M.; Parham, D.; Meyer, W. H.; Thompson, E. I. (1990): A second nonrandom translocation, der(16)t(1;16)(q21;q13), in Ewing sarcoma and peripheral neuroectodermal tumor. In: Cytogenet. Cell Genet. 53 (2-3), S. 87–90.

Eurogentec: qPCR-Guide.

Evan, G.; Littlewood, T. (1998): A matter of life and cell death. In: Science 281 (5381), S. 1317–1322.

Ewing, James (1921): Diffuse endothelioma of bone. In: Proc NY Pathol Soc (21), S. 17-24.

Fellinger, E. J.; Garin-Chesa, P.; Triche, T. J.; Huvos, A. G.; Rettig, W. J. (1991): Immunohistochemical analysis of Ewing's sarcoma cell surface antigen p30/32MIC2. In: Am. J. Pathol. 139 (2), S. 317–325.

Frisch, S. M.; Screaton, R. A. (2001): Anoikis mechanisms. In: Curr. Opin. Cell Biol. 13 (5), S. 555–562.

Goomer, R. S.; Maris, T.; Amiel, D. (1998): Age-related changes in the expression of cadherin-11, the mesenchyme specific calcium-dependent cell adhesion molecule. In: Calcif. Tissue Int. 62 (6), S. 532–537.

Greider, C. W.; Blackburn, E. H. (1985): Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. In: Cell 43 (2 Pt 1), S. 405–413.

Greider, C. W.; Blackburn, E. H. (1989): A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. In: Nature 337 (6205), S. 331–337. Online verfügbar unter doi:10.1038/337331a0.

Hanahan, D.; Weinberg, R. A. (2000): The hallmarks of cancer. In: Cell 100 (1), S. 57-70.

Harris, C. C. (1996): p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic--an abridged historical perspective. In: Carcinogenesis 17 (6), S. 1187–1198.

Hattinger, C. M.; Pötschger, U.; Tarkkanen, M.; Squire, J.; Zielenska, M.; Kiuru-Kuhlefelt, S. et al. (2002): Prognostic impact of chromosomal aberrations in Ewing tumours. In: Br. J. Cancer 86 (11), S. 1763–1769. Online verfügbar unter doi:10.1038/sj.bjc.6600332.

Hattinger, C. M.; Rumpler, S.; Strehl, S.; Ambros, I. M.; Zoubek, A.; Pötschger, U. et al. (1999): Prognostic impact of deletions at 1p36 and numerical aberrations in Ewing tumors. In: Genes Chromosomes Cancer 24 (3), S. 243–254.

Hoffmann, I.; Balling, R. (1995): Cloning and expression analysis of a novel mesodermally expressed cadherin. In: Dev. Biol. 169 (1), S. 337–346. Online verfügbar unter doi:10.1006/dbio.1995.1148.

Höglund, Mattias; Gisselsson, David; Mandahl, Nils; Mitelman, Felix (2005): Ewing tumours and synovial sarcomas have critical features of karyotype evolution in common with epithelial tumours. In: Int J Cancer 116 (3), S. 401–406. Online verfügbar unter doi:10.1002/ijc.21021.

Honoki, Kanya; Stojanovski, Elizabeth; McEvoy, Mark; Fujii, Hiromasa; Tsujiuchi, Toshifumi; Kido, Akira et al. (2007): Prognostic significance of p16 INK4a alteration for Ewing sarcoma: a meta-analysis. In: Cancer 110 (6), S. 1351–1360. Online verfügbar unter doi:10.1002/cncr.22908.

Huang, Chih-Fen; Lira, Cristina; Chu, Khoi; Bilen, Mehmet Asim; Lee, Yu-Chen; Ye, Xiangcang et al. (2010): Cadherin-11 increases migration and invasion of prostate cancer cells and enhances their interaction with osteoblasts. In: Cancer Res. 70 (11), S. 4580–4589. Online verfügbar unter doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3016.

Huang, Hsuan-Ying; Illei, Peter B.; Zhao, Zhiquan; Mazumdar, Madhu; Huvos, Andrew G.; Healey, John H. et al. (2005): Ewing sarcomas with p53 mutation or p16/p14ARF homozygous deletion: a highly lethal subset associated with poor chemoresponse. In: J. Clin. Oncol. 23 (3), S. 548–558. Online verfügbar unter doi:10.1200/JCO.2005.02.081.

Jeon, I. S.; Davis, J. N.; Braun, B. S.; Sublett, J. E.; Roussel, M. F.; Denny, C. T.; Shapiro, D. N. (1995): A variant Ewing's sarcoma translocation (7;22) fuses the EWS gene to the ETS gene ETV1. In: Oncogene 10 (6), S. 1229–1234.

Johnson, Nicola A.; Hamoudi, Rifat A.; Ichimura, Koichi; Liu, Lu; Pearson, Danita M.; Collins, V. Peter; Du, Ming-Qing (2006): Application of array CGH on archival formalin-fixed paraffin-embedded tissues including small numbers of microdissected cells. In: Lab. Invest. 86 (9), S. 968–978. Online verfügbar unter doi:10.1038/labinvest.3700441.

Jürgens, H.; Exner, U.; Gadner, H.; Harms, D.; Michaelis, J.; Sauer, R. et al. (1988): Multidisciplinary treatment of primary Ewing's sarcoma of bone. A 6-year experience of a European Cooperative Trial. In: Cancer 61 (1), S. 23–32.

Kallioniemi, A.; Kallioniemi, O. P.; Sudar, D.; Rutovitz, D.; Gray, J. W.; Waldman, F.; Pinkel, D. (1992): Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. In: Science 258 (5083), S. 818–821.

Kaneko, Y.; Yoshida, K.; Handa, M.; Toyoda, Y.; Nishihira, H.; Tanaka, Y. et al. (1996): Fusion of an ETSfamily gene, EIAF, to EWS by t(17;22)(q12;q12) chromosome translocation in an undifferentiated sarcoma of infancy. In: Genes Chromosomes Cancer 15 (2), S. 115–121. Online verfügbar unter doi:10.1002/(SICI)1098-2264(199602)15:2<115::AID-GCC6>3.0.CO;2-6.

Kang, Hyung-Gyoo; Jenabi, Jasmine M.; Zhang, Jingsong; Keshelava, Nino; Shimada, Hiroyuki; May, William A. et al. (2007): E-cadherin cell-cell adhesion in ewing tumor cells mediates suppression of anoikis through activation of the ErbB4 tyrosine kinase. In: Cancer Res. 67 (7), S. 3094–3105. Online verfügbar unter doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3259.

Kashima, Takeshi; Nakamura, Kazuya; Kawaguchi, Jitsutaro; Takanashi, Masakatsu; Ishida, Tsuyoshi; Aburatani, Hiroyuki et al. (2003): Overexpression of cadherins suppresses pulmonary metastasis of osteosarcoma in vivo. In: Int. J. Cancer 104 (2), S. 147–154. Online verfügbar unter doi:10.1002/ijc.10931.

Kawaguchi, J.; Kii, I.; Sugiyama, Y.; Takeshita, S.; Kudo, A. (2001): The transition of cadherin expression in osteoblast differentiation from mesenchymal cells: consistent expression of cadherin-11 in osteoblast lineage. In: J. Bone Miner. Res. 16 (2), S. 260–269. Online verfügbar unter doi:10.1359/jbmr.2001.16.2.260.

Kawaguchi, J.; Takeshita, S.; Kashima, T.; Imai, T.; Machinami, R.; Kudo, A. (1999): Expression and function of the splice variant of the human cadherin-11 gene in subordination to intact cadherin-11. In: J. Bone Miner. Res. 14 (5), S. 764–775.

Khoury, Joseph D. (2005): Ewing sarcoma family of tumors. In: Adv Anat Pathol 12 (4), S. 212-220.

Kiener, Hans P.; Brenner, Michael B. (2005): Building the synovium: cadherin-11 mediates fibroblast-like synoviocyte cell-to-cell adhesion. In: Arthritis Res. Ther. 7 (2), S. 49–54. Online verfügbar unter doi:10.1186/ar1495.

Kiener, Hans P.; Stipp, Christopher S.; Allen, Philip G.; Higgins, Jonathan M. G.; Brenner, Michael B. (2006): The cadherin-11 cytoplasmic juxtamembrane domain promotes alpha-catenin turnover at adherens junctions and intercellular motility. In: Mol. Biol. Cell 17 (5), S. 2366–2376. Online verfügbar unter doi:10.1091/mbc.E05-08-0745.

Kim, Tae Kyung; Eberwine, James H. (2010): Mammalian cell transfection: the present and the future. In: Anal Bioanal Chem 397 (8), S. 3173–3178. Online verfügbar unter doi:10.1007/s00216-010-3821-6.

Lang, Klaus (1985): Mykoplasmen und Zellkulturen. In: Biologie in unserer Zeit 15, S. 52-61.

Knippers, Rolf (2001): Molekulare Genetik. 66 Tabellen. 8., neubearb. Stuttgart [u.a.]: Thieme.

Knudson, A. G. (1971): Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. In: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 68 (4), S. 820–823.

Koscielniak, E.; Jürgens, H.; Winkler, K.; Bürger, D.; Herbst, M.; Keim, M. et al. (1992): Treatment of soft tissue sarcoma in childhood and adolescence. A report of the German Cooperative Soft Tissue Sarcoma Study. In: Cancer 70 (10), S. 2557–2567.

Kotani, H.; McGarrity, G. J. (1985): Rapid and simple identification of mycoplasmas by immunobinding. In: J. Immunol. Methods 85 (2), S. 257–267.

Kovar, H.; Auinger, A.; Jug, G.; Aryee, D.; Zoubek, A.; Salzer-Kuntschik, M.; Gadner, H. (1993): Narrow spectrum of infrequent p53 mutations and absence of MDM2 amplification in Ewing tumours. In: Oncogene 8 (10), S. 2683–2690.

Kovar, H.; Dworzak, M.; Strehl, S.; Schnell, E.; Ambros, I. M.; Ambros, P. F.; Gadner, H. (1990): Overexpression of the pseudoautosomal gene MIC2 in Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumor. In: Oncogene 5 (7), S. 1067–1070.

Kovar, H.; Jug, G.; Aryee, D. N.; Zoubek, A.; Ambros, P.; Gruber, B. et al. (1997): Among genes involved in the RB dependent cell cycle regulatory cascade, the p16 tumor suppressor gene is frequently lost in the Ewing family of tumors. In: Oncogene 15 (18), S. 2225–2232. Online verfügbar unter doi:10.1038/sj.onc.1201397.

Kullendorff, C. M.; Mertens, F.; Donnér, M.; Wiebe, T.; Akerman, M.; Mandahl, N. (1999): Cytogenetic aberrations in Ewing sarcoma: are secondary changes associated with clinical outcome? In: Med. Pediatr. Oncol. 32 (2), S. 79–83.

Ladanyi, M.; Lewis, R.; Jhanwar, S. C.; Gerald, W.; Huvos, A. G.; Healey, J. H. (1995): MDM2 and CDK4 gene amplification in Ewing's sarcoma. In: J. Pathol 175 (2), S. 211–217.

Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: Nature 227 (5259), S. 680–685.

Lange, S.; Bender, R. (2007): Was ist ein Signifikanztest? Allgemeine Aspekte. In: Dtsch. Med. Wochenschr 132 Suppl 1, S. e19-21.

Lawes, D. A.; Pearson, T.; Sengupta, S.; Boulos, P. B. (2005): The role of MLH1, MSH2 and MSH6 in the development of multiple colorectal cancers. In: Br. J. Cancer 93 (4), S. 472–477.

Lawlor, Elizabeth R.; Scheel, Christina; Irving, Julia; Sorensen, Poul H. B. (2002): Anchorage-independent multi-cellular spheroids as an in vitro model of growth signaling in Ewing tumors. In: Oncogene 21 (2), S. 307–318. Online verfügbar unter doi:10.1038/sj.onc.1205053.

Le Deley, Marie-Cecile; Delattre, Olivier; Schaefer, Karl-Ludwig; Burchill, Sue A.; Koehler, Gabriele; Hogendoorn, Pancras C. W. et al. (2010): Impact of EWS-ETS fusion type on disease progression in Ewing's sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumor: prospective results from the cooperative Euro-E.W.I.N.G. 99 trial. In: J. Clin. Oncol. 28 (12), S. 1982–1988. Online verfügbar unter doi:10.1200/JCO.2009.23.3585.

Lee, Yu-Chen; Cheng, Chien-Jui; Huang, Miao; Bilen, Mehmet A.; Ye, Xiangcang; Navone, Nora M. et al. (2010): Androgen depletion up-regulates cadherin-11 expression in prostate cancer. In: J. Pathol. 221 (1), S. 68–76. Online verfügbar unter doi:10.1002/path.2687.

Levine, A. J. (1997): p53, the cellular gatekeeper for growth and division. In: Cell 88 (3), S. 323–331.

Li, B.; Oestreich, S.; Lange, T. de (2000): Identification of human Rap1: implications for telomere evolution. In: Cell 101 (5), S. 471–483.

Li, Shaoying; Siegal, Gene P. (2010): Small cell tumors of bone. In: Adv Anat Pathol 17 (1), S. 1–11. Online verfügbar unter doi:10.1097/PAP.0b013e3181bb6b9c.

Lin, Xin; Gu, Jian; Lu, Charles; Spitz, Margaret R.; Wu, Xifeng (2006): Expression of telomere-associated genes as prognostic markers for overall survival in patients with non-small cell lung cancer. In: Clin. Cancer Res 12 (19), S. 5720–5725.

Maitra, A.; Roberts, H.; Weinberg, A. G.; Geradts, J. (2001): Aberrant expression of tumor suppressor proteins in the Ewing family of tumors. In: Arch. Pathol. Lab. Med. 125 (9), S. 1207–1212.

Marchong, Mellone N.; Yurkowski, Christine; Ma, Clement; Spencer, Clarellen; Pajovic, Sanja; Gallie, Brenda L. (2010): Cdh11 acts as a tumor suppressor in a murine retinoblastoma model by facilitating tumor cell death. In: PLoS Genet. 6 (4), S. e1000923. Online verfügbar unter doi:10.1371/journal.pgen.1000923.

Martinez, Paula; Thanasoula, Maria; Carlos, Ana R.; Gómez-López, Gonzalo; Tejera, Agueda M.; Schoeftner, Stefan et al. (2010): Mammalian Rap1 controls telomere function and gene expression through binding to telomeric and extratelomeric sites. In: Nat. Cell Biol. 12 (8), S. 768–780. Online verfügbar unter doi:10.1038/ncb2081.

May, W. A.; Lessnick, S. L.; Braun, B. S.; Klemsz, M.; Lewis, B. C.; Lunsford, L. B. et al. (1993): The Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene encodes a more potent transcriptional activator and is a more powerful transforming gene than FLI-1. In: Mol. Cell. Biol. 13 (12), S. 7393–7398.

McCusker, Catherine D.; Alfandari, Dominique (2009): Life after proteolysis: Exploring the signaling capabilities of classical cadherin cleavage fragments. In: Commun Integr Biol 2 (2), S. 155–157. Mosmann, T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. In: J. Immunol. Methods 65 (1-2), S. 55–63.

Mülhardt, Cornel (2009): Der Experimentator: Molekularbiologie, Genomics. 6. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl (Der Experimentator). Online verfügbar unter http://deposit.d-nb.de/cgi-bin/dokserv?id=3146924 &prov=M&dok_var=1&dok_ext=htm.

Mullis, K.B (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In: Methods in Enzymology.

Murata, Hiroaki; Khattar, Nada H.; Gu, Liya; Li, Guo-Min (2005): Roles of mismatch repair proteins hMSH2 and hMLH1 in the development of sporadic breast cancer. In: Cancer Lett 223 (1), S. 143–150.

Nakajima, Go; Patino-Garcia, Ana; Bruheim, Skjalg; Xi, Yaguang; San Julian, Mikel; Lecanda, Fernando et al. (2008): CDH11 expression is associated with survival in patients with osteosarcoma. In: Cancer Genomics Proteomics 5 (1), S. 37–42.

O'Connor, Matthew S.; Safari, Amin; Liu, Dan; Qin, Jun; Songyang, Zhou (2004): The human Rap1 protein complex and modulation of telomere length. In: J. Biol. Chem. 279 (27), S. 28585–28591. Online verfügbar unter doi:10.1074/jbc.M312913200.

Ohali, A.; Avigad, S.; Cohen, I. J.; Meller, I.; Kollender, Y.; Issakov, J. et al. (2003): Association between telomerase activity and outcome in patients with nonmetastatic Ewing family of tumors. In: J. Clin. Oncol. 21 (20), S. 3836–3843. Online verfügbar unter doi:10.1200/JCO.2003.05.059.

Ohno, T.; Rao, V. N.; Reddy, E. S. (1993): EWS/Fli-1 chimeric protein is a transcriptional activator. In: Cancer Res. 53 (24), S. 5859–5863.

Okazaki, M.; Takeshita, S.; Kawai, S.; Kikuno, R.; Tsujimura, A.; Kudo, A.; Amann, E. (1994): Molecular cloning and characterization of OB-cadherin, a new member of cadherin family expressed in osteoblasts. In: J. Biol. Chem. 269 (16), S. 12092–12098.

Oliveira, Andre M.; Perez-Atayde, Antonio R.; Inwards, Carrie Y.; Medeiros, Fabiola; Derr, Victoria; Hsi, Bae-Li et al. (2004): USP6 and CDH11 oncogenes identify the neoplastic cell in primary aneurysmal bone cysts and are absent in so-called secondary aneurysmal bone cysts. In: Am. J. Pathol. 165 (5), S. 1773–1780.

Ottaviano, Laura; Schaefer, Karl-Ludwig; Gajewski, Melanie; Huckenbeck, Wolfgang; Baldus, Stefan; Rogel, Uwe et al. (2010): Molecular characterization of commonly used cell lines for bone tumor research: a trans-European EuroBoNet effort. In: Genes Chromosomes Cancer 49 (1), S. 40–51. Online verfügbar unter doi:10.1002/gcc.20717.

Ozaki, T; Paulussen, M; Poremba, C; Brinkschmidt, C; Rerin, J; Ahrens, S et al. (2001): Genetic imbalances revealed by comparative genomic hybridization in Ewing tumors. In: Genes Chromosomes Cancer 32 (2), S. 164–171.

Palm, Wilhelm; Lange, Titia de (2008): How shelterin protects mammalian telomeres. In: Annu. Rev. Genet. 42, S. 301–334. Online verfügbar unter doi:10.1146/annurev.genet.41.110306.130350.

Peter, M.; Couturier, J.; Pacquement, H.; Michon, J.; Thomas, G.; Magdelenat, H.; Delattre, O. (1997): A new member of the ETS family fused to EWS in Ewing tumors. In: Oncogene 14 (10), S. 1159–1164. Online verfügbar unter doi:10.1038/sj.onc.1200933.

Pishvaian, M. J.; Feltes, C. M.; Thompson, P.; Bussemakers, M. J.; Schalken, J. A.; Byers, S. W. (1999): Cadherin-11 is expressed in invasive breast cancer cell lines. In: Cancer Res. 59 (4), S. 947–952.

Potter, S. W.; Morris, J. E. (1985): Development of mouse embryos in hanging drop culture. In: Anat. Rec 211 (1), S. 48–56.

Ranscht, B.; Dours-Zimmermann, M. T. (1991): T-cadherin, a novel cadherin cell adhesion molecule in the nervous system lacks the conserved cytoplasmic region. In: Neuron 7 (3), S. 391–402.

Rehm, Hubert (2002): Der Experimentator: Proteinbiochemie, Proteomics. 4., überarb. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.

Remmele, W.; Stegner, H. E. (1987): Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Ostrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe. In: Pathologe 8 (3), S. 138–140.

Robert Koch Institut (2010): Krebs in Deutschland 2005/2006 (7. Auflage).

Roberts, Paul; Burchill, Susan A.; Brownhill, Samantha; Cullinane, Catherine J.; Johnston, Colin; Griffiths, Mike J. et al. (2008): Ploidy and karyotype complexity are powerful prognostic indicators in the Ewing's sarcoma family of tumors: a study by the United Kingdom Cancer Cytogenetics and the Children's Cancer and Leukaemia Group. In: Genes Chromosomes Cancer 47 (3), S. 207–220. Online verfügbar unter doi: 10.1002 /gcc.20523.

Rosito, P.; Mancini, A. F.; Rondelli, R.; Abate, M. E.; Pession, A.; Bedei, L. et al. (1999): Italian Cooperative Study for the treatment of children and young adults with localized Ewing sarcoma of bone: a preliminary report of 6 years of experience. In: Cancer 86 (3), S. 421–428.

Ross, D. T.; Scherf, U.; Eisen, M. B.; Perou, C. M.; Rees, C.; Spellman, P. et al. (2000): Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. In: Nat. Genet 24 (3), S. 227–235.

Rud, N. P.; Reiman, H. M.; Pritchard, D. J.; Frassica, F. J.; Smithson, W. A. (1989): Extraosseous Ewing's sarcoma. A study of 42 cases. In: Cancer 64 (7), S. 1548–1553.

Samassekou, Oumar; Gadji, Macoura; Drouin, Régen; Yan, Ju (2010): Sizing the ends: normal length of human telomeres. In: Ann. Anat. 192 (5), S. 284–291. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.aanat.2010.07.005.

Sandberg, A A; Bridge, J A (2001): Updates on cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: Ewing sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. In: Cancer Genet Cytogenet 123 (1), S. 1–26.

Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 74 (12), S. 5463–5467.

Sato, M.; Mori, Y.; Sakurada, A.; Fujimura, S.; Horii, A. (1998): The H-cadherin (CDH13) gene is inactivated in human lung cancer. In: Hum. Genet. 103 (1), S. 96–101.

Savage, Sharon A.; Stewart, Brian J.; Liao, Jason S.; Helman, Lee J.; Chanock, Stephen J. (2005): Telomere stability genes are not mutated in osteosarcoma cell lines. In: Cancer Genet. Cytogenet 160 (1), S. 79–81.

Savola, S.; Nardi, F.; Scotlandi, K.; Picci, P.; Knuutila, S. (2007): Microdeletions in 9p21.3 induce false negative results in CDKN2A FISH analysis of Ewing sarcoma. In: Cytogenet. Genome Res. 119 (1-2), S. 21–26. Online verfügbar unter doi:10.1159/000109614.

Savola, Suvi; Klami, Arto; Tripathi, Abhishek; Niini, Tarja; Serra, Massimo; Picci, Piero et al. (2009): Combined use of expression and CGH arrays pinpoints novel candidate genes in Ewing sarcoma family of tumors. In: BMC Cancer 9, S. 17. Online verfügbar unter doi:10.1186/1471-2407-9-17.

Schouten, Jan P.; McElgunn, Cathal J.; Waaijer, Raymond; Zwijnenburg, Danny; Diepvens, Filip; Pals, Gerard (2002): Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. In: Nucleic Acids Res. 30 (12), S. e57.

Semb, H.; Christofori, G. (1998): The tumor-suppressor function of E-cadherin. In: Am. J. Hum. Genet. 63 (6), S. 1588–1593. Online verfügbar unter doi:10.1086/302173.

Shankar, A. G.; Ashley, S.; Craft, A. W.; Pinkerton, C. R. (2003): Outcome after relapse in an unselected cohort of children and adolescents with Ewing sarcoma. In: Med. Pediatr. Oncol. 40 (3), S. 141–147. Online verfügbar unter doi:10.1002/mpo.10248.

Shay, J. W.; Bacchetti, S. (1997): A survey of telomerase activity in human cancer. In: Eur. J. Cancer 33 (5), S. 787–791. Online verfügbar unter doi:10.1016/S0959-8049(97)00062-2.

Shay, J. W.; Zou, Y.; Hiyama, E.; Wright, W. E. (2001): Telomerase and cancer. In: Hum. Mol. Genet. 10 (7), S. 677–685.

Simonneau, L.; Kitagawa, M.; Suzuki, S.; Thiery, J. P. (1995): Cadherin 11 expression marks the mesenchymal phenotype: towards new functions for cadherins? In: Cell Adhes. Commun. 3 (2), S. 115–130.

Smogorzewska, A.; van Steensel, B.; Bianchi, A.; Oelmann, S.; Schaefer, M. R.; Schnapp, G.; Lange, T. de (2000): Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. In: Mol. Cell. Biol. 20 (5), S. 1659–1668.

Sorensen, P. H.; Liu, X. F.; Delattre, O.; Rowland, J. M.; Biggs, C. A.; Thomas, G.; Triche, T. J. (1993): Reverse transcriptase PCR amplification of EWS/FLI-1 fusion transcripts as a diagnostic test for peripheral primitive neuroectodermal tumors of childhood. In: Diagn. Mol. Pathol. 2 (3), S. 147–157.

Stemmler, Marc P. (2008): Cadherins in development and cancer. In: Mol Biosyst 4 (8), S. 835–850. Online verfügbar unter doi:10.1039/b719215k.

Stout, Arthur Purdy (1918): A tumor of the ulnar nerve. In: Proc NY Pathol Soc (12), S. 2-12.

Takeichi, M. (1991): Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. In: Science 251 (5000), S. 1451–1455.

Tamura, Daisuke; Hiraga, Toru; Myoui, Akira; Yoshikawa, Hideki; Yoneda, Toshiyuki (2008): Cadherin-11mediated interactions with bone marrow stromal/osteoblastic cells support selective colonization of breast cancer cells in bone. In: Int. J. Oncol. 33 (1), S. 17–24.

Tanihara, H.; Sano, K.; Heimark, R. L.; St John, T.; Suzuki, S. (1994): Cloning of five human cadherins clarifies characteristic features of cadherin extracellular domain and provides further evidence for two structurally different types of cadherin. In: Cell Adhes. Commun. 2 (1), S. 15–26.

Tarkkanen, M.; Kiuru-Kuhlefelt, S.; Blomqvist, C.; Armengol, G.; Böhling, T.; Ekfors, T. et al. (1999): Clinical correlations of genetic changes by comparative genomic hybridization in Ewing sarcoma and related tumors. In: Cancer Genet. Cytogenet. 114 (1), S. 35–41.

Terrier, P.; Llombart-Bosch, A.; Contesso, G. (1996): Small round blue cell tumors in bone: prognostic factors correlated to Ewing's sarcoma and neuroectodermal tumors. In: Semin Diagn Pathol 13 (3), S. 250–257.

Tirado, Oscar M.; Mateo-Lozano, Silvia; Villar, Joaquín; Dettin, Luis E.; Llort, Anna; Gallego, Soledad et al. (2006): Caveolin-1 (CAV1) is a target of EWS/FLI-1 and a key determinant of the oncogenic phenotype and tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells. In: Cancer Res. 66 (20), S. 9937–9947. Online verfügbar unter doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0927.

Tomita, K.; van Bokhoven, A.; van Leenders, G. J.; Ruijter, E. T.; Jansen, C. F.; Bussemakers, M. J.; Schalken, J. A. (2000): Cadherin switching in human prostate cancer progression. In: Cancer Res. 60 (13), S. 3650–3654.

Tsuchiya, T.; Sekine, K.; Hinohara, S.; Namiki, T.; Nobori, T.; Kaneko, Y. (2000): Analysis of the p16INK4, p14ARF, p15, TP53, and MDM2 genes and their prognostic implications in osteosarcoma and Ewing sarcoma. In: Cancer Genet. Cytogenet. 120 (2), S. 91–98.

Turc-Carel, C.; Philip, I.; Berger, M. P.; Philip, T.; Lenoir, G. (1983): [Chromosomal translocation (11; 22) in cell lines of Ewing's sarcoma]. In: C R Seances Acad Sci III 296 (23), S. 1101–1103.

Ulaner, G. A.; Hu, J. F.; Vu, T. H.; Giudice, L. C.; Hoffman, A. R. (1998): Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts. In: Cancer Res. 58 (18), S. 4168–4172. Umehara, Norifumi; Ozaki, Toshifumi; Sugihara, Shinsuke; Kunisada, Toshiyuki; Morimoto, Yuki; Kawai, Akira et al. (2004): Influence of telomerase activity on bone and soft tissue tumors. In: J. Cancer Res. Clin. Oncol. 130 (7), S. 411–416. Online verfügbar unter doi:10.1007/s00432-004-0553-z.

Urano, F.; Umezawa, A.; Hong, W.; Kikuchi, H.; Hata, J. (1996): A novel chimera gene between EWS and E1A-F, encoding the adenovirus E1A enhancer-binding protein, in extraosseous Ewing's sarcoma. In: Biochem. Biophys. Res. Commun. 219 (2), S. 608–612.

van Beers, E. H.; Joosse, S. A.; Ligtenberg, M. J.; Fles, R.; Hogervorst, F. B. L.; Verhoef, S.; Nederlof, P. M. (2006): A multiplex PCR predictor for aCGH success of FFPE samples. In: Br. J. Cancer 94 (2), S. 333–337. Online verfügbar unter doi:10.1038/sj.bjc.6602889.

van Dijk, Marcory C.; Rombout, Paul D.; Boots-Sprenger, Sandra H.; Straatman, Huub; Bernsen, Monique R.; Ruiter, Dirk J.; Jeuken, Judith W. (2005): Multiplex ligation-dependent probe amplification for the detection of chromosomal gains and losses in formalin-fixed tissue. In: Diagn. Mol. Pathol. 14 (1), S. 9–16.

van Doorninck, John A.; Ji, Lingyun; Schaub, Betty; Shimada, Hiroyuki; Wing, Michele R.; Krailo, Mark D. et al. (2010): Current treatment protocols have eliminated the prognostic advantage of type 1 fusions in Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. In: J. Clin. Oncol. 28 (12), S. 1989–1994. Online verfügbar unter doi:10.1200/JCO.2009.24.5845.

van Wezel, Tom; Lombaerts, Marcel; van Roon, Eddy H.; Philippo, Katja; Baelde, Hans J.; Szuhai, Karoly et al. (2005): Expression analysis of candidate breast tumour suppressor genes on chromosome 16q. In: Breast Cancer Res. 7 (6), S. R998-1004. Online verfügbar unter doi:10.1186/bcr1337.

Vestal, D. J.; Ranscht, B. (1992): Glycosyl phosphatidylinositol--anchored T-cadherin mediates calciumdependent, homophilic cell adhesion. In: J. Cell Biol. 119 (2), S. 451–461.

Villamón, Eva; Piqueras, Marta; Mackintosh, Carlos; Alonso, Javier; Alava, Enrique de; Navarro, Samuel; Noguera, Rosa (2008): Comparison of different techniques for the detection of genetic risk-identifying chromosomal gains and losses in neuroblastoma. In: Virchows Arch. 453 (1), S. 47–55. Online verfügbar unter doi:10.1007/s00428-008-0633-6.

Vogelstein, Bert; Kinzler, Kenneth W. (2004): Cancer genes and the pathways they control. In: Nat. Med 10 (8), S. 789–799.

Wahl, Joachim; Bogatyreva, Liubov; Boukamp, Petra; Rojewski, Markus; van Valen, Frans; Fiedler, Jörg et al. (2010): Ewing's sarcoma cells with CD57-associated increase of tumorigenicity and with neural crest-like differentiation capacity. In: Int. J. Cancer 127 (6), S. 1295–1307. Online verfügbar unter doi:10.1002/ijc.25163.

Wei, G.; Antonescu, C. R.; Alava, E. de; Leung, D.; Huvos, A. G.; Meyers, P. A. et al. (2000): Prognostic impact of INK4A deletion in Ewing sarcoma. In: Cancer 89 (4), S. 793–799.

Weinberg, R. A. (1995): The retinoblastoma protein and cell cycle control. In: Cell 81 (3), S. 323–330.

Wheelock, Margaret J.; Johnson, Keith R. (2003): Cadherins as modulators of cellular phenotype. In: Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 19, S. 207–235. Online verfügbar unter doi:10.1146/annurev.cellbio.19.011102.111135.

Widhe, B.; Widhe, T. (2000): Initial symptoms and clinical features in osteosarcoma and Ewing sarcoma. In: J Bone Joint Surg Am 82 (5), S. 667–674.

Wittekind, Christian; Compton, Carolyn C.; Greene, Frederick L.; Sobin, Leslie H. (2002): TNM residual tumor classification revisited. In: Cancer 94 (9), S. 2511–2516. Online verfügbar unter doi:10.1002/cncr.10492.

Wright, W. E.; Pereira-Smith, O. M.; Shay, J. W. (1989): Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. In: Mol. Cell. Biol 9 (7), S. 3088–3092.

Wright, W. E.; Piatyszek, M. A.; Rainey, W. E.; Byrd, W.; Shay, J. W. (1996): Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. In: Dev. Genet. 18 (2), S. 173–179. Online verfügbar unter doi:10.1002/(SICI)1520-6408(1996)18:2<173::AID-DVG10>3.0.CO;2-3.

Young, Nelson; Chang, Zhan; Wishart, David S. (2004): GelScape: a web-based server for interactively annotating, manipulating, comparing and archiving 1D and 2D gel images. In: Bioinformatics 20 (6), S. 976–978.

Ziegler, A.; Lange, S.; Bender, R. (2007a): Uberlebenszeitanalyse: Der Log-Rang-Test. In: Dtsch. Med. Wochenschr 132 Suppl 1, S. e39-41.

Ziegler, A.; Lange, S.; Bender, R. (2007b): Uberlebenszeitanalyse: Eigenschaften und Kaplan-Meier Methode. In: Dtsch. Med. Wochenschr 132 Suppl 1, S. e36-8.

Zielenska, M.; Zhang, Z. M.; Ng, K.; Marrano, P.; Bayani, J.; Ramirez, O. C. et al. (2001): Acquisition of secondary structural chromosomal changes in pediatric ewing sarcoma is a probable prognostic factor for tumor response and clinical outcome. In: Cancer 91 (11), S. 2156–2164.

Zoubek, A.; Dockhorn-Dworniczak, B; Delattre, O.; Christiansen, H.; Niggli, F.; Gatterer-Menz, I. et al. (1996): Does expression of different EWS chimeric transcripts define clinically distinct risk groups of Ewing tumor patients? In: J. Clin. Oncol. 14 (4), S. 1245–1251.

Zucman, J.; Melot, T.; Desmaze, C.; Ghysdael, J.; Plougastel, B.; Peter, M. et al. (1993): Combinatorial generation of variable fusion proteins in the Ewing family of tumours. In: EMBO J. 12 (12), S. 4481–4487.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
<	kleiner (als)
>	größer (als)
℃	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μΙ	Mikroliter
μm	Mikrometer
6-FAM	Phosphoramidit-Derivat des 6-Carboxyfluorescein
ABC	primary aneurysmal bone cyst
aCGH	array comparative genomic hybridization
Amp	Ampicillin
BAC	bacterial artificial chromosome
bp	Basenpaar
BRCT	breast cancer gene 1 C terminus
BSA	bovine serum albumin
Ca ²⁺	Kalzium-lonen
CaCl ₂	Calciumchlorid
CD99	Cluster of Differentiation 99
CDH11	Cadherin 11
CDKN2A	cvclin-dependent kinase inhibitor 2A
	conv-DNA
CGH	comparative genomic hybridization
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propagesulfonate
cm	
CO ₂	Kohlendioxid
Ct	Cycle-Treshold
CT	Computertomographie
Cv3/5	
	3'3-Diaminobenzidin
	1' 6-Diamidin-2-nbenylindel
	Didesovynukloosidtrinbosphat
	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digovigenin
DMSO	Dimethylsulfovid
	deovyribonucleic acid: Desovyribonukleinsäure
	Nukleatidtrinboshat
E coli	
	ete verient 4
ECM	ets valialit 4
EFS	event-free survival
	Eusing Serker
ES COLT	
ESFI	
	E-twenty SIX
	ets variant 1
EURU-E.W.I.IN.G. 99	EUNOpean Ewing lumour working initiative of National Groups
	Ewing Sarcoma region i
	Intales Nalberserum
FEV	mun ewing variant

FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FLI-1	Friend leukemia integration 1
g	Gramm
G418	Geneticin
GAPDH	Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
hRAP	human repressor activator protein 1
HRP	horseradish peroxidase
hTERT	human telomerase reverse transcriptase
IHC	Immunhistochemie
IRS	Immunreaktiver Score
К-	Kontrolle
kb	Kilobase
kD	Kilodalton
I	Liter
LB-Amp-Platten	Luria-Bertani Agar-Platten mit Ampicillin als Selektionsmittel
LOH	loss of heterocygosity
LPO	left probe oligo
Μ	Molar
mA	Milliamper
Mb	Megabasenpaar
min	Minuten
ml	Milliliter
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
mM	Millimolar
mm	Millimeter
M-MuLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mRNA	messenger ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomographie
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
Myb	Myb-related Helix-Turn-Helix motif
MYK	myelocytomatosis
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
Neo	Neomycin
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
OAS	overall survival
OD	optische Dichte
p	kurzer Arm eines Chromosoms
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase Kettenreaktion
pg	Pikogramm
pH	potentia hydrogenium
PNET	primitive neuroektodermale Tumoren
Primer	DNA-Oligonukleotid
q	langer Arm eines Chromosoms
gRT-PCR	quantitative Real-Time Polymerase chain reaction
Ras	Rat sarcoma
Rb	Retinoblastoma
RCT	Rap1p C terminus
RKI	Robert Koch Institut
RNA	Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

RPO	right probe oligo
rRNA	ribosomale RNA
RT-PCR	Real-Time Polymerase chain reaction
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
sek	Sekunden
SNP	single nucleotide polymorphism
Т	Tage
Таq	Thermus aquaticus
TERF2	telomeric repeat binding factor 2
TERF2IP	telomeric repeat binding factor 2 interacting protein
ТМА	Tissue-Microarray
TP53	tumor protein 53
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
WB	Western Blot
Xba	Xanthomonas badrii

DANKSAGUNG

Ein herzlicher Dank geht an **Herrn PD Dr. Karl Ludwig Schäfer** für die Themenstellung und die freundliche und engagierte Betreuung meiner Arbeit. Ich habe gerne zu der Erforschung von Tumoren der Ewing Sarkom Familie beigetragen.

Vielen Dank auch an Herrn Prof. Dr. Martin Beye für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie danke ich für die Unterstützung meiner Arbeit durch Materialien und Fachwissen. Ein Dank geht hier vor allem an Marianne Niermann-Kaiser, Laura Ottaviano und Sandra Tränkner die stets offen für meine Fragen und mir oft weitergeholfen haben.

Ein herzlicher Dank geht auch an **Frau Feldhoff** und **Frau Schneeloch** für die Bearbeitung meiner immunhistochemischen Schnitte.

Dem Ärzteteam Inga Boeck, Frank Jankowiak, Silvia Jankowiak, Jeannine Meinrath, Sibylle Peter, Yarub Salaheddin, Martin Schoppe und Max Urban danke ich für die netten Mensa Pausen.

Ein großer Dank geht auch an Simone Zander für das geduldige Korrekturlesen dieser Arbeit.

Danke auch an **meine Eltern** und **meine Familie**, die an mich glauben und mir immer wieder zeigen wie stolz sie auf mich sind.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann **Frank Hoffmann**, der mir immer zur Seite steht und mich mit aller Kraft unterstützt. Du bist das Beste was mir je passiert ist!

LEBENSLAUF

Name:	Melanie Hoffmann geb. Gajewski
Anschrift:	Lavesumerstr. 36, 45721 Haltern am See
Geburtsdatum / -ort:	03.05.1981, Düsseldorf
Familienstand:	verheiratet
Berufliche Tätigkeiten:	
	Seit 09/2007 Promotion am Universitätsklinikum Düsseldorf
	02/2011 – 07/2011 Wissenschaftliche Beraterin, Medical Vision Essen
	06/2007 – 08/2007 Wissenschaftliche Angestellte, Universitätsklinikum Aachen
Studium und Schullaufbahn:	
	10/2001 – 04/2007 Diplom-Biologie Studium, RWTH-Aachen
	06/2000 – 10/2001 Mediendesign Praktika zur fachlichen Orientierung
	08/1997 – 06/2000 Allgemeine Hochschulreife, Mataré-Gymnasium Meerbusch
Studienbegleitende Tätigkeiten:	
	01/2005 – 06/2006 Mitarbeit in der studentischen "Space Research Group", RWTH-Aachen
	05/2005 – 08/2005 Forschungspraktikum am Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Aachen
	08/2004 – 03/2005 Studentische Hilfskraft am Institut für Biochemie, Universitätsklinikum Aachen
	07/2003 – 03/2004 Aushilfe im Labor einer internistischen Praxis, Aachen

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und lediglich unter Verwendung der angegebenen Quellen angefertigt habe. Die Arbeit wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch nicht eingereicht. Außerdem gab es keinen vorherigen erfolglosen Promotionsversuch.

Düsseldorf, November 2011

Melanie Hoffmann