

Evaluation der Tumormarker TKTL1, Apo10 und GD2 in Rhabdomyosarkom- und Neuroblastom-Tumoren

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

M.Sc. Matias Julian Stagno

La Plata, Argentinien

Tübingen

2020

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

30.07.2020

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Steven Warmann

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Olaf Rieß

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	III
1. Einleitung	1
1.1. Solide Tumore im Kindesalter.....	1
1.1.1. Rhabdomyosarkom.....	1
1.1.2. Neuroblastoma.....	7
1.2. Tumormarker.....	14
1.2.1. DNaseX: Ein Marker für eine defekte Apoptose.....	15
1.2.2. Disialgangliosid GD2: Marker für NB	17
1.2.3. Transketolase-like-1 (TKTL-1): Marker für einen umprogrammierten Metabolismus.....	19
1.3. Liquid Biopsy	22
1.3.1. Kategorisierung nach Materialtyp	24
1.3.2. Kategorisierung nach Analyseverfahren	25
1.4. Regulation der Expression durch DNA-Methylierung	27
1.5. Zielsetzung der Arbeit	32
2. Material und Methoden	33
2.1. Material	33
2.1.1. Verbrauchsmaterialien und Geräte	33
2.1.2. Zelllinien	34
2.2. Zellbiologische Methoden.....	36
2.2.1. (Sub)kultivierung.....	36
2.2.2. Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	37
2.2.3. Zellzahlbestimmung	39
2.2.4. Isolation von PBMCs aus Buffycoats.....	40
2.2.5. Makrophagen Differenzierung	42
2.2.6. Phagozytose-Assay.....	43

2.2.7.	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence-activated cell scanning</i> – FACS).....	46
2.2.7.1.	Tumormarker Expression auf Zelllinien (TKTL1, Apo10 und GD2)	48
2.2.7.2.	Epitop Detektion in Monozyten (EDIM).....	49
2.3.	Molekularbiologische Methoden.....	51
2.3.1.	RNA-Extraktion aus Zelllinien.....	51
2.3.2.	RNA Extraktion aus Gewebeproben	52
2.3.3.	Bestimmung der RNA-Konzentration	52
2.3.4.	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	53
2.3.5.	PCR (Polymerase-Kettenreaktion)	53
2.3.5.1.	PCR zu Sequenzierungszwecken	55
2.3.5.2.	Quantitative reverse Transkriptase PCR (qRT-PCR).....	56
2.3.5.3.	<i>Touchdown</i> -PCR (TD-PCR).....	60
2.3.6.	Agarose-Gelelektrophorese	62
2.3.6.1.	Präparative Agarose-Gelelektrophorese.....	63
2.3.7.	Bisulfit-Sequenzierung (BS-Sequenzierung)	64
2.3.8.	5-aza-2'-deoxycytidin Behandlung.....	66
2.4.	Patientenkollektiv	66
2.4.1.	Einschlusskriterien der Studie	67
2.4.2.	Ausschlusskriterien der Studie	67
2.4.3.	Rekrutierung.....	67
2.4.4.	Studienablauf.....	68
2.5.	<i>In silico</i> Recherchen zur Analyse des TKTL1-Promotors.....	68
2.6.	Semi-quantitative Methylierungs-Analyse	69
2.7.	Statistik.....	70
3.	Ergebnisse	71
3.1.	Expression der Tumormarker TKTL1, Apo10 und GD2 in Neuroblastom- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien	71

3.1.1.	Expression der Tumormarker TKTL1 und Apo10 in RMS Zelllinien	71
3.1.2.	Expression von TKTL1, Apo10 und GD2 in NB Zelllinien	73
3.1.3.	Expression von TKTL1 und Apo10 in Patientenmaterial	76
3.2.	EDIM-Test in Neuroblastom- und Rhabdomyosarkom-Patienten	78
3.2.1.	EDIM-scores bei Neuroblastom- und Rhabdomyosarkom-Patienten	78
3.2.2.	Korrelation der EDIM-scores mit klinischen Parametern	83
3.2.3.	EDIM-scores als Verlaufsparameter	85
3.2.4.	CD16-Expression in Monozyten von Rhabdomyosarkom- und Neuroblastom-Patienten	86
3.3.	<i>In vitro</i> -Analyse der Tumormarker in Makrophagen	87
3.3.1.	Expression der Tumormarker TKTL1, Apo10 und GD2 in MDMs	88
3.3.2.	Analysen zur Internalisation von Tumorpartikeln durch Makrophagen	91
3.4.	TKTL1-Expression und DNA-Hypomethylierung	95
3.4.1.	Ist die TKTL1-Expression abhängig vom Methylierungsgrad der DNA?	96
3.4.2.	<i>In silico</i> -Analyse des TKTL1-Promotors zur Identifikation von CpG-Inseln	98
3.4.3.	Bisulfit-Sequenzierung des TKTL1-Promotors in RMS- und NB-Gewebeproben	99
4.	Diskussion	104
4.1.	Expression der Tumormarker TKTL1, Apo10 und FD2 in Zelllinien und Tumoren	105
4.2.	Evaluierung der EDIM-Technologie bei Rhabdomyosarkom- und Neuroblastom-Patienten	109
4.3.	<i>In vitro</i> -Analyse der Tumormarker in Makrophagen	115
4.4.	Korrelation zwischen TKTL1-Promotor-Hypomethylierung und- Expression	119
5.	Zusammenfassungen	125
5.1.	Zusammenfassung	125
5.2.	Summary	127
6.	Literatur	129
7.	Anhang	138
7.1.	Sequenzinformationen zu den TKTL1-Methylierungsexperimenten	138
7.2.	Abbildungsverzeichnis	144

7.3. Tabellenverzeichnis.....	146
7.4. Abkürzungsverzeichnis	148
7.5. Danksagung	150

1. Einleitung

1.1. Solide Tumore im Kindesalter

1.1.1. Rhabdomyosarkom

Inzidenz

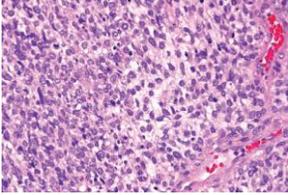
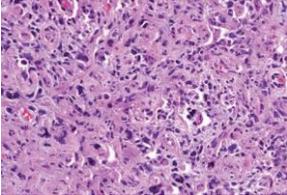
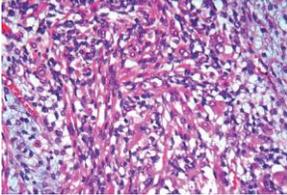
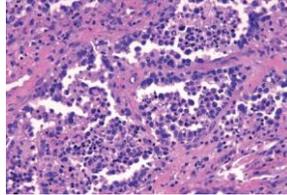
Weichteilsarkome machen etwa 5 % aller malignen pädiatrischen Tumorerkrankungen aus (vgl. Abb. 1). Dabei sind die Rhabdomyosarkome (RMS) mit 61 % die größte Gruppe der Weichteilsarkome [1]. RMS sind damit die dritthäufigste Gruppe extrakranieller solider Tumore bei Kindern nach dem Neuroblastom und den Wilmstumoren [2]. Die Inzidenz von RMS liegt bei 4,5 Fällen pro 1 Million Kindern und Jugendlichen im Jahr und zeigt zwei Spitzen in der Altersverteilung. Die Erste liegt zwischen dem ersten und dem siebten Lebensjahr und die Zweite zwischen Ende der Pubertät und der Adoleszenz. Mehr als die Hälfte der Fälle tritt während den ersten zehn Lebensjahren auf [3].

Entstehung

Man geht davon aus, dass das RMS aus Muskel-Vorläuferzellen entsteht [4]. Um genauer zu sein, liegt der Ursprung in dem embryonalen Mesenchym, wodurch das RMS so gut wie überall im Körper entstehen kann, sogar an Stellen, an denen sich normalerweise keine Muskulatur befindet. Am häufigsten ist das RMS in der Kopf- und Nackenregion lokalisiert (~40 %), dabei vorwiegend parameningeal (16 %) und in der Orbita (9 %) sowie in 10 % der Fälle an anderen Stellen in diesem Bereich. In 24 % der Fälle entsteht der Primärtumor im Urogenitaltrakt, zu 19 % an den Extremitäten und bei den restlichen 22 % befindet sich der Tumor in anderen nicht näher definierten Regionen des Körpers [5-8].

Nach der WHO (*World Health Organization*) Klassifizierung werden RMS in vier Subtypen unterteilt. Dabei erfolgt die Einteilung der Tumorentitäten nach Unterschieden in histologischen, genetischen und klinischen Merkmalen [9]. Bei den vier Subtypen handelt es sich um embryonale (eRMS), pleomorphe, spindelzellförmige und alveoläre RMS (aRMS). Die verschiedenen Merkmale der jeweiligen Subtypen sind in der Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: RMS-Subtypen klassifiziert nach histologischer Morphologie. Modifiziert nach [10].

Subtyp	Embryonal	Pleomorph	Spindelzell	Alveolär
Histologie				
	Kleine, rundliche bis längliche Zellen mit myxoidem Stroma	Große anaplastische Zellen mit vergrößerten, hyperchromatischen Nuclei	Relativ differenzierte Spindelzellen mit Merkmalen die an glatte Muskel-Neoplasmen erinnern	Unzusammenhängende primitive runde Zellen mit verwobenen fibrösen Septen
Lokalisierung	Kopf und Nacken, Urogenitaltrakt, Blase, Prostata Abdomen, Pelvis, Retroperitoneum	Extremitäten, Brust und Abdomen	Paratestikulär, Kopf und Nacken	Extremitäten, Kopf und Nacken, Brust, Genitalien, Abdomen und anale Areale
Alter (Jahren)	<10	60 – 80	<10	10 – 25
~ % aller RMS	60 %	10 %	10 %	20 %
Prognose	Günstig	Günstig	Günstig (Kinder) ungünstig (Erwachsene)	Ungünstig

Die dominierenden, klassischen Subtypen in der Pädiatrie sind eRMS und aRMS. Diese beiden Subtypen variieren nicht nur histologisch, sondern auch hinsichtlich ihres genetischen Profils.

Genetik

eRMS ist der häufigste Subtyp und entsteht in den meisten Fällen bei Kindern unter zehn Jahren. Genetisch sind eRMS sehr heterogen und mit der Aktivierung von verschiedenen Tumor-fördernden Signalwegen und dem Verlust der Kontrolle der Zellproliferation assoziiert. Molekulare Analysen von polymorphen Loci zeigten in den meisten eRMS den Verlust eines Allels in der Region 11p15 [11, 12]. Weitere Analysen deuten auf das Vorhandensein eines Tumorsuppressor Gens in dieser Region hin [13, 14]. Zusätzlich konnten Expressionsanalysen zeigen, dass einige Gene in dieser Region, wie *igf2*, *h19* und *cdkn1c* nur in einem der beiden Allele exprimiert werden, während sie in dem anderen Allel durch *imprinting* inaktiv gehalten werden [9]. Einige der Gene kodieren zentrale, regulatorische Proteine des Zellzyklus und des Zellwachstums, wie z.B. das väterlich exprimierte IGF-2 (*insulin-like growth factor 2*) und der mütterlich exprimierte Kinase-Inhibitor CDKN1C (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1C*), sodass

eine Dysregulation der Genexpression in dieser Region mit gesteigertem Wachstum und Tumor-Prädispositions-Syndromen (z.B. Beckwith-Wiedemann-Syndrom) in Zusammenhang gebracht wird [15, 16]. Man geht mittlerweile davon aus, dass es sich bei dem Verlust des Allels der 11p15 Region um das aktive Allel handelt und so nur das inaktive Allel erhalten bleibt. Andere Studien konnten außerdem strukturelle Unterschiede und extra Kopien der Chromosomen 2, 8 und 13 zeigen [17, 18]. Untersuchungen von bekannten Onkogenen und Tumorsuppressorgen konnten inaktivierende Mutationen in TP53 und CDKN2A und aktivierende Mutationen in RAS Familienmitgliedern in einer Reihe von eRMS Patienten zeigen [19-21]. Wie bereits erwähnt, zeigen diese Erkenntnisse, dass heterogene genetische Veränderungen, in denen unterschiedliche Signalwege und Ereignisse eine Rolle spielen, für die Tumorgenese von eRMS mitverantwortlich sind.

aRMS sind aggressive Tumore die häufiger bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen auftreten. Assoziiert werden diese Tumore mit den chromosomalen Translokationen t(2;13) (q35;q14) oder t(1;13)(p36;q14), welche 60 % bzw. 20 % der aRMS Fälle ausmachen. Beide Translokationen führen zu einer Fusion von PAX Genen (*pax3* auf Chromosom 2 oder *pax7* auf Chromosom 1) mit dem 3' Ende des FOXO1 Locus auf Chromosom 13, wodurch entweder das chimäre PAX3-FOXO1 oder PAX7-FOXO1 Onkoprotein exprimiert wird [22-24]. PAX3 und PAX7 gehören zu der Familie der *paired box* Transkriptionsfaktoren und FOXO1 ist ein Mitglied der *forkhead* Transkriptionsfaktoren. PAX3 und PAX7 sind außerdem wichtige Regulatoren der Myogenese. Dort ist PAX3 wichtig für die frühe Skelettmuskelbildung im Embryo und PAX7 spielt eine übergeordnete Rolle im post-natalen Wachstum und in der Muskelregeneration im Erwachsenenalter [25]. FOXO1 reguliert normalerweise die Transkription von Genen, welche die Gluconeogenese, die Glykogenolyse und Adipogenese kontrollieren [23, 26]. Die Aktivität von FOXO1 wird hauptsächlich durch seinen Phosphorylierungsstatus kontrolliert [27]. Die chimären Fusionsproteine besitzen die PAX3/PAX7-DNA-Bindedomäne und die FOXO1-Transkriptions-Aktivierungsdomäne und fungieren als potente Transkriptionsfaktoren [28, 29]. Die Translokationen verändern außerdem die Expression und die zelluläre Lokalisation von regulatorischen Signalwegen, sodass große Mengen des Fusionsproteins konstitutiv im Nukleus vorhanden sind [30, 31]. Dadurch können sie eine Reihe von transkriptionellen *downstream targets* aktivieren und ihre onkologischen Effekte ausüben, indem sie die Proliferation, Apoptose und Differenzierung verändern [32-35]. Des Weiteren sind in jüngster Zeit neue *pax3*

Fusionspartner identifiziert worden, bei denen die klinische Relevanz für die aRMS noch unklar ist [36-39]. Etwa 20 % der aRMS zeigen keine Translokationen und werden auch als fusions-negative RMS (fnRMS) bezeichnet [40]. Die fnRMS sind dabei weniger aggressiv als die fusions-positiven RMS (fpRMS). Bei dem klinischen Verlauf sowie den molekularen Mechanismen sind die fnRMS eher mit den eRMS vergleichbar [41]. Allerdings finden sich ebenso wie in eRMS nicht nur die genannten, spezifischen Mutationen, sondern weitere genetische Veränderungen, welche übliche Zielproteine wie z.B. p53 und das Retinoblastom-Protein betreffen und deren nachgeschaltete Signalwege beeinflussen [36].

Die überwiegende Mehrheit der RMS tritt sporadisch auf, wobei bei etwa 1 – 2 % der Kinder ein Zusammenhang mit familiären genetischen Tumorsyndromen besteht [5, 42]. Eine Assoziation zu Tumorsyndromen zeigte sich bisher bei Neurofibromatose Typ 1 [43], beim Li-Fraumeni Syndrom [44], dem Beckwith-Wiedemann Syndrom [45], Costello Syndrom [46], Noonan-Syndrom [47] und dem Gorlin-Goltz-Syndrom [48].

Diagnose, Staging Prognose und Therapie

Das klinische Erscheinungsbild und die Symptome hängen stark von der Lokalisation und der Größe des Tumors ab. Meistens werden RMS durch schmerzlose Schwellungen klinisch auffällig und können je nach Lokalisation mit weiteren unspezifischen Symptomen auftreten. Beispielsweise können Patienten mit einem parameningealen RMS Lähmungen der Gehirnnerven aufweisen, während es bei Patienten mit intra-abdominalen Tumoren zu Darmverschlüssen kommen kann. Patienten mit Tumoren im urogenitalen Bereich können durch Bauchschmerzen, Hämaturie und Hodenschwellung auffallen, wohingegen sich Tumore der Extremitäten durch Schwellung manifestieren [1]. Schmerz ist nicht immer ein auftretendes Symptom, sondern wird meistens durch Größe und Druck des Tumors auf benachbarte neurale Strukturen ausgelöst.

Die Diagnostik mit apparativem Tumorstaging des Primärtumors erfolgt vor der Biopsie mit hochauflösender Schnittbilddiagnostik der gesamten Tumorregion vorzugsweise mit KM-MRT (Kontrastmittel-Magnetresonanztomographie), Skelettszintigraphie und PET-CT/MRT (PET=Positronenemissionstomographie), um Tumorgröße, -ausbreitung und -volumen, Beziehung zu Nachbarstrukturen (Gefäßen, Nerven, Knochen) und Gefäßversorgung des Tumors darzustellen. Im weiteren Verlauf erfolgt eine Biopsie für die konventionelle Pathomorphologie, Immunhistochemie, Zyto- und Molekulargenetik notwendig ist. Je nach Lokalisation des Tumors

erfolgen weitere Verfahren zum prätherapeutischen Staging, wie z.B. Liquorpunktion bei parameningealen Tumoren oder eine Knochenmarksbiopsie bei G3-Sarkomen [49]. Für die histopathologische Diagnostik wird die Morphologie des Tumors betrachtet und immunhistochemische Färbungen mit Markern, wie zum Beispiel Myogenin, MyoD1, Desmin, Vimentin, Myoglobin, Aktin, NSE, S-100, MIC2, welche für die Diagnose essentiell sind, durchgeführt [1]. Zusätzlich werden mittels zyto- und molekulargenetischer Analysen spezifische genetische Veränderungen (z.B. aRMS t(2;13)(q35;q14)) untersucht [49].

Um für eine systematische und lokale Kontrolle zu sorgen wird eine multimodale Therapie mithilfe von Chemotherapeutika, Chirurgie und Bestrahlung eingesetzt. Die Reihenfolge und Durchführung der einzelnen Therapien hängt unter anderem von der Tumorgröße, Lokalisation, Ausdehnung und des Alters der Patienten ab. Bei den RMS wird die Chemotherapie als Kombinationschemotherapie verabreicht, wobei folgende Medikamente zum Einsatz kommen: Vincristin, Dactinomycin, Anthrazykline (Doxorubicin, Epi-Doxorubicin) und Alkylanzien (Cyclophosphamid, Ifosfamid) [50]. In Hochrisikosituationen oder bei schlechtem Ansprechen der Medikamente werden auch VP-16 und Platin-Derivate verwendet. Eine primäre Tumorresektion wird nur dann eingesetzt, wenn die Wahrscheinlichkeit einer radikalen Tumorresektion ohne Verstümmelung hoch ist. Im Anschluss daran oder bei Inoperabilität wird direkt mit einer Chemotherapie begonnen. Strahlentherapie kann je nach Lokalisation und Resektionsausmaß des Primärtumors eingesetzt werden. Bei Patienten mit einer primär vollständigen R0-Resektion bei embryonalem RMS wird grundsätzlich keine Strahlentherapie eingesetzt, bei allen anderen Patienten mit RMS ist eine Strahlentherapie indiziert [1]. Die 5-Jahres-Überlebensrate für Kinder mit RMS haben sich von den 1970er bis zu den 1990er Jahren von etwa 25 % auf etwa 70 % erhöht. Diese guten Überlebensraten, vor allem bei Kindern, die anhand des Stagings als *low risk* klassifiziert werden, haben zur Durchführung von neuen Studien geführt, bei denen vor allem die Therapieintensität reduziert wird, um das Vorkommen von therapiebedingten Spätfolgen zu minimieren. Auf der anderen Seite sind die Überlebensraten bei jugendlichen und erwachsenen Patienten mit RMS schlechter als bei Kindern (21 % – 56 %), was zeigt, dass neue Ansätze gebraucht werden um das *outcome* zu steigern [42, 51, 52].

Zur Verlaufsdiagnostik und Nachsorge werden Untersuchungen des Tumors und der Tumorregion mithilfe von Schnittbildgebungsverfahren (MRT) der Primärtumor- und der

Metastasenregion(en), sowie bei Verdacht auf ein Rezidiv ebenfalls ein FDG-PET/CT oder FDG-PET/MRT durchgeführt (2-Fluor-2-desoxy-D-glucose). Die Untersuchungsintervalle werden dabei an die Risikogruppe und den zeitlichen Abständen zu Diagnosestellung und Therapieende angepasst. Zusätzlich erfolgen Spätfolgendagnostiken, um mögliche Folgen der multimodalen Therapien zu entdecken und ihnen so früh wie möglich entgegenzuwirken. Dabei werden die Patienten je nach Therapie auf nephrologische, kardiologische, hepatische, endokrinologische und funktionelle Defizite analysiert [1].

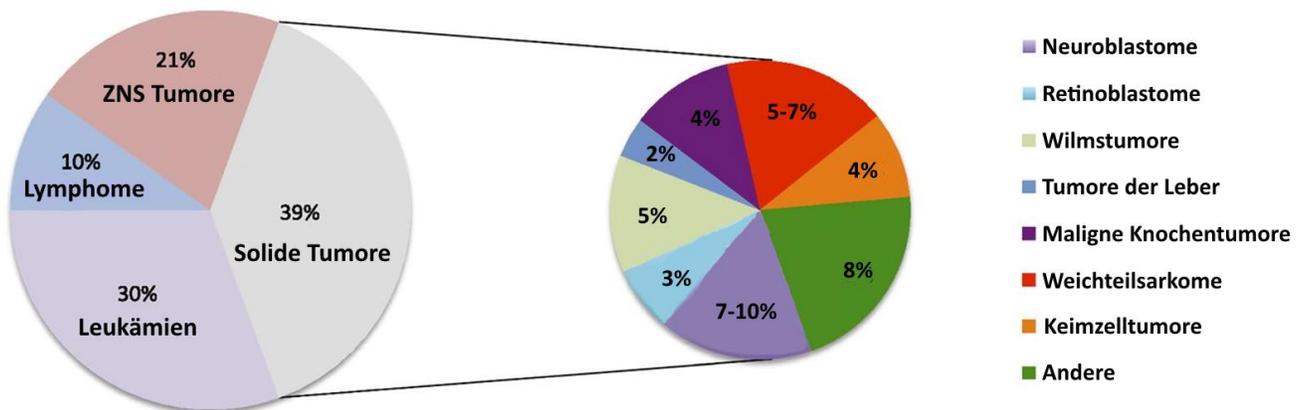


Abbildung 1: Verteilung von pädiatrischen Krebserkrankungen.

Prozentuale Verteilung der pädiatrischen Krebserkrankungen (links) und der soliden Tumoren (rechts) in Kindern von 0 bis 14 Jahren. Modifiziert nach [221].

1.1.2. Neuroblastoma

Inzidenz

Neuroblastoma (NB) sind die häufigsten extrakranialen, soliden Tumoren im Kindesalter und haben ihren Ursprung im sympathischen Nervensystem [53]. Sie gehören in die Gruppe der embryonalen Tumore, weshalb sie überwiegend in Kleinkindern vorkommen. Die Inzidenz in Nordamerika und Europa liegt bei 10,5 Fällen pro einer Millionen Kinder unter 15 Jahren. Ethnische und geographische Faktoren spielen bei der Inzidenz nur eine minimale Rolle [3, 54-56]. Etwa 40 % der Kinder erkranken bereits im ersten Lebensjahr, wobei die Inzidenz mit zunehmendem Alter abnimmt. Das NB macht etwa 10 % aller pädiatrischen Tumorerkrankungen aus (vgl. Abb. 1) und ist für ungefähr 15 % der krebsbedingten Todesfälle im Kindesalter verantwortlich [57]. Die Diagnose bei der Mehrheit der Kinder erfolgt vor dem fünften Lebensjahr mit einem medianen Alter von 19 Monaten. Fast 90 % der Patienten sind unter sechs Jahre alt und die Inzidenz in männlichen Patienten ist etwas höher als in weiblichen Patienten. Nach dem zehnten Lebensjahr kommen NB nur noch sehr selten vor [54].

Entstehung

NB entstehen aus Vorläuferzellen sympatho-adrenaler Herkunft der Neuralleiste [58]. Während der Embryonalentwicklung migrieren Zellen der Neuralleiste in dorsaler/ventraler oder kaudaler/kranialer Richtung, um sich zu verschiedenen Zelltypen zu differenzieren und dabei unter anderem Strukturen, wie das sympathische Nervensystem zu bilden. Durch das Auftreten von malignen Mutationen in der Embryonalentwicklung kann es zu Fehlern in der Migration, Reifung und Differenzierung dieser Zellen kommen, wodurch sie die Fähigkeit verlieren zu Nervenzellen oder adrenalen medullären Zellen auszureifen [58]. Eine unkontrollierte Proliferation dieser Zellen führt dann zu einer Entwicklung eines NB. Aus diesem Grund können NB überall dort entstehen, wo das sympathische Nervensystem lokalisiert ist. Die Mehrheit der Tumore tritt jedoch im Abdomen auf (65 %), vor allem in den Nebennieren. NB können aber auch in zervikalen, thorakalen und abdominellen Grenzsträngen und Paraganglien vorkommen, nicht aber im Gehirn. Mehr als 50 % der NB Patienten weisen Metastasen auf, welche häufig in regionalen Lymphknoten, Knochenmark, Knochen, Leber und Haut lokalisiert sind [59].

Ein weiteres Merkmal beim NB ist die klinische und biologische Heterogenität der Tumore. Einige Patienten haben Tumore, welche vollständig regredieren oder ohne Behandlung spontan ausdifferenzieren, während andere Patienten mit Metastasen trotz multimodaler Therapieansätze eine schlechte Prognose zeigen [60].

Genetik

Obwohl bekannt ist, dass NB auf eine veränderte Entwicklung der Neuralleistenzellen zurückgehen, ist auch nach DNA und RNA Sequenzierungen von über 1000 Fällen keine spezifische genetische oder epigenetische Veränderungen gefunden worden, welche ausschlaggebend für die Entstehung eines NB ist [61]. Auch Untersuchungen nach strukturellen und genomischen Unterschieden bei Patienten mit NB, wiesen nur wenige Veränderungen auf, welche mit der Tumorgenese von NB in Verbindung gebracht werden konnten. Die 1p Deletion, die *n-myc* Amplifikation oder der *gain* von 17q treten häufig bei Subtypen von NB auf und haben einen negativen Einfluss auf das Überleben der Patienten [62, 63]. Bisher gibt es jedoch keine spezifische genomische Veränderung, Verlust der Heterozygotie (LOH) oder der genetischen Translokation, welchen allen NB zugrunde liegt. Diese Heterogenität ist ein Grund für die klinische Herausforderung, bei der Tumore, welche phänotypisch und morphologisch sehr ähnlich sind, beträchtliche Unterschiede in der Behandlung aufweisen. Deshalb beschäftigen sich einige Forschungsgruppen mit der Charakterisierung des Transkriptoms und der Signalwege, welche bei den aggressivsten und fatalen Subtypen aktiv sind [64-66]. Neben der Aufschlüsselung der genetischen und epigenetischen Ursachen, versucht man mit Hilfe der erhaltenen Daten aus den Hochdurchsatzanalysen potentielle therapeutische *targets* zu identifizieren.

Aufgrund der Heterogenität der Erkrankung werden im folgenden Abschnitt beispielhaft das *n-myc* Onkogen sowie epigenetische Faktoren und nichtkodierende RNAs als onkologische Ursachen vorgestellt.

n-myc

n-myc ist ein Proto-Onkogen, dessen Produkt - das Protein N-Myc - die natürlichen zellulären Wachstums- und Proliferationsprozesse unterstützt. Durch die genetische Veränderung und die Amplifikation von *n-myc*, wird N-Myc überexprimiert was zu einem unkontrolliertem Wachstum der Zellen führt. Durch genetische Veränderungen wird aus *n-myc* ein Onkogen [65]. Das *n-myc* Onkogen spielt eine wichtige Rolle in der NB Tumorgenese. Etwa 20 % aller Fälle beim NB zeigen eine Amplifikation dieses Onkogens (<10 Kopien). Diese Amplifikation führt zu sehr aggressiven Tumoren, was sich in einer schlechten Prognose widerspiegelt [67]. Mausversuche konnten zeigen, dass eine Deregulierung der *n-myc* Expression in der Neuralleiste ausreichend ist, um Tumore entstehen zu lassen [67, 68]. N-Myc ist ein Transkriptionsfaktor, welcher durch direkte DNA-Bindung, aber auch über indirekte Protein-Protein Interaktionen verschiedene genetische Ziele reguliert [69-72]. Unter den Zielen von N-Myc sind unter anderem auch Gene, deren Produkte essentiell für die Regulation der Tumor-Proliferation, Angiogenese aber auch des Zellzykluses sind [73]. Somit stellen die gezielte Steuerung von *n-myc* und weiterer nachgeschalteter Signalwege mögliche Therapieziele für die Behandlung der NB dar. Allerdings zeigen viele Hoch-Risiko Patienten nur eine geringe *n-myc* Expression, was auf weitere *n-myc* unabhängige Mechanismen der Tumorgenese hindeutet. Außerdem korreliert die Amplifikation von *n-myc* nicht immer mit der mRNA Expression. Einige Patienten weisen eine geringe *n-myc* Amplifikation aber eine starke N-Myc Expression auf, und andere eine hohe Amplifikation aber eine geringe Expression. Es besteht weiterhin ein großer Aufklärungsbedarf auch in Bezug auf die Signaltransduktionswege von N-Myc und dessen Rolle als mögliches Angriffsziel in der NB Therapie [74].

RNAs

MicroRNAs (miRNA) sind endogene etwa 20 bp große nicht-kodierende RNA Moleküle, die dazu in der Lage sind, sequenzspezifisch an mRNA zu binden und deren Genexpression postranskriptionell zu regulieren. Es ist bekannt, dass die Deregulierung der miRNA Expression eine große Rolle bei der Tumorgenese von unterschiedlichsten Tumorentitäten spielen [75]. Auch bei aggressiven NB wurde eine Deregulierung von verschiedene miRNAs beobachtet, welche Entwicklung, Stammzellbiologie und die Differenzierung der Neuralleiste steuern, was

konsekutiv zu einer erhöhten Proliferation und zu Metastasen führt [70, 76]. Die miRNAs miR-9, miR-17-92a und das miR-25-106b Cluster aber auch viele andere haben einen Einfluss auf die Tumorgenese, das Differenzierungsverhalten und die Metastasenbildung in NB [77, 78]. Bei NB kann man durch Unterschiede in miRNA Profilen verschiedene NB-Subtypen nachweisen. Diese Klassifizierungen lassen sogar Risiko-Stratifizierungen zu. Es konnte gezeigt werden, dass N-Myc wiederum an der Regulation der miRNA beteiligt ist [79].

Methylierung

Epigenetische Veränderungen im Sinne einer Hyper-Methylierung der DNA führen zu einem Gen-*silencing*, also zur Verhinderung der Transkription verschiedener Gene. In der Onkologie spielt das insbesondere bei der Expression von Tumorsuppressorgenen oder Apoptose-Genen (z.B. Caspase-8) eine wichtige Rolle. Mittlerweile können verschiedene NB-Subtypen ebenfalls anhand des spezifischen Methylierungsmusters klassifiziert werden [79].

Chromosomenalterationen

Über die Hälfte der untersuchten Neuroblastome weisen einen veränderten, zum Teil auch in sich inhomogenen Chromosomensatz auf. Di- und tetraploide Chromosomensätze sind oft mit einer schlechteren Prognose verbunden und hyperdiploide und fast-triploide Chromosomensätze sind häufig mit einer guten Prognose und geringen strukturellen Veränderungen der Chromosomen (Chromosomenaberrationen) assoziiert [79].

Ein weiterer Faktor, welcher für eine ungünstige Prognose steht, ist die Deletion des kurzen Armes von Chromosom 1 (del1p). Diese Deletion kommt in etwa 30 % der Patienten mit einem NB vor und tritt häufig in Kombination mit einer *n-myc* Amplifikation auf. Da die Deletion von 1p zu einer Tumorgenese beiträgt, wird vermutet, dass ein oder mehrere Tumorsuppressorgene hier lokalisiert sind. Auch auf dem kurzen Arm von Chromosom 3 vermutet man kodierende Sequenzen von Tumorsuppressorgenen. Eine Deletion von 3p kommt in etwa 20 % der diagnostizierten Fälle vor und gilt ebenfalls als ungünstiger prognostischer Faktor. Eine weitere bei NB Patienten auftretende chromosomale Veränderung ist die 11q Deletion, welche fast immer bei Patienten mit metastasierten Tumoren assoziiert ist und auch für eine schlechte Prognose steht [79].

NB durch Vererbung

Die meisten Mutationen, welche zu einem Neuroblastom führen treten spontan auf. Nur etwa 1 – 2 % der Fälle zeigen einen familiären Hintergrund, mit autosomal dominanter Vererbung und unvollständiger Penetranz [80]. In diesen Fällen sind vor allem Mutationen in den Genen die *PHOX2B* und *ALK* (Anaplastische Lymphomkinase) kodieren nachgewiesen worden. Der vererbte Verlust des *PHOX2B* Gens konnte in Studien außerdem mit dem Auftreten von NB in Zusammenhang mit Neurokristopathien wie, der Hirschsprung-Krankheit, Neurofibromatose und das kongenitale zentrale Hypoventilationssyndrom in Verbindung gebracht werden [81]. Genomweite Analysen identifizierten Mutationen im 2p23-p24 Lokus von *ALK* in etwa 50 % der familiären NB. Aus diesen Gründen wird in Betracht gezogen Kinder, bei denen in der Familie bereits ein NB diagnostiziert wurde, genetisch auf Mutationen in *ALK* und *PHOX2B* zu untersuchen.

Diagnostik und Prognose

Für die Diagnose kommen Labor- und Knochenmarksdiagnostik sowie eine bildgebende und histopathologische Diagnostik zum Einsatz. In der Labordiagnostik werden die Katecholamin-Metabolite Homovanillinmandelsäure (HMA) und Vanillinmandelsäure (VMA) im Serum und im Urin sowie die neuronspezifische Enolase (NSE) als Tumormarker analysiert [82]. Auch unspezifische Erhöhungen von Ferritin und LDH können bei einigen Patienten beobachtet werden und dienen deshalb der Diagnosestellung. Da bei über 80 % der metastasierten NB das Knochenmark befallen ist, ist dessen Untersuchung bei jedem Patienten nötig. Das Knochenmark wird dabei zusätzlich in morphologischen Untersuchungen mit immunhistochemischen Färbungen und neuroblastomspezifischer, quantitativer *real-time* PCR (qPCR) analysiert. In der bildgebenden Diagnostik werden Sonographie, Kernspintomographie und Magnetresonanztomographie verwendet um Primärtumor, Lymphknotenbefall und Metastasen darzustellen. Zur Spezifizierung der Diagnose wird eine Szintigraphie mit Metajodbenzylguanidin (mIBG) eingesetzt, bei der sich das mIBG spezifisch in Tumorzellen mit Katecholaminrezeptoren anreichert (in etwa 90 % der Fälle). Eine Biopsie mit ausreichender Gewebebegewinnung ist für die terminale Diagnose eines NB durch einen erfahrenen Pathologen unerlässlich [83]. Die Tumore werden dabei gemäß der INPC (International Neuroblastoma

Pathology Classification) als günstig und ungünstig eingestuft. In Deutschland erfolgt zusätzlich ein *grading* nach dem Hughes System [84]. NB Tumore zeigen sich histopathologisch als kleine, blaue, uniforme Zellen mit dichtem hyperchromatischem Nukleus und geringem Cytoplasma.

Wie bereits erwähnt, dienen molekularbiologische Analysen zur Abschätzung der Prognose aber auch zur Therapie- und Risikostratifizierung (Bspw. *n-myc*, diverse chromosomale Veränderungen). Aber auch andere Faktoren wie die Stadieneinteilung und das Alter der Patienten werden für die Prognose miteinbezogen. Für alle NB Patienten liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei 80 % und die 15-Jahre-Überlebensrate bei 76 % [85]. Die Heterogenität der NB spiegelt sich ebenfalls in der Überlebensrate wider. Hierbei weisen Niedrig-Risiko-Patienten nach 5 Jahren eine Überlebensrate von mehr als 95 % auf, wohingegen Hoch-Risiko-Patienten lediglich eine Überlebensrate von 30 – 40 % zeigen [85].

NB werden seit 1988 nach den Vorgaben des INSS (International Neuroblastoma Staging System) in fünf Stadien unterteilt (vgl. Tab. 2). Hierfür werden das Ausmaß der Resektion, die lokale Ausdehnung des Tumors und das Vorhandensein von Metastasen mit einbezogen [86]. Zur zusätzlichen Therapie- und Risikostratifizierung werden Patienten gemäß des Stadiensystems der INRG (International Neuroblastoma Risk Group) eingestuft [87].

Tabelle 2: Stadieneinteilung von Neuroblastomen nach Vorgaben des INSS.

Stadium	Kriterium
I	Tumor lokalisiert, makroskopisch komplett entfernt
IIa	Tumor lokalisiert, inkomplett entfernt, kein Lymphknotenbefall
IIb	Tumor lokalisiert, inkomplett entfernt, ipsilateraler Lymphknotenbefall
III	Tumor überschreitet Mittellinie, nicht resektabel, kontralateraler Lymphknotenbefall
IV	Tumor metastasiert in andere Organe und entfernte Lymphknoten
IVS	Tumor lokalisiert, Patient <1 Jahr, Metastasen in Leber, Haut oder Knochenmark, keine Skelettmetastasen

Therapie

Für die Behandlung von NB wird eine multimodale Therapie eingesetzt, welche stadienabhängig und risikoadaptiert erfolgt. Die Therapie umfasst Chirurgie, Chemotherapie, Radiotherapie, myoablative Chemotherapie mit anschließendem Stammzell-*rescue* und Immuntherapien. Das Ziel der Therapie ist neben der Heilung des Patienten, chirurgische Komplikationen zu minimieren und vor allem für Patienten mit einer günstigen Prognose die Toxizität der Chemotherapie zu reduzieren.

Patienten mit einem sehr niedrigen Risiko, bei denen die Chance besteht, dass der Tumor spontan regrediert oder ausdifferenziert, werden keiner chirurgischen oder medizinischen Therapie unterzogen. Diese Patienten werden regelmäßig mit Sonografie und Labordiagnostik (VMA/HMA) genau beobachtet. Bei Progression der Erkrankung wird die Beobachtung abgebrochen, die Patienten einer neuen Risiko-Stratifizierung unterzogen und danach therapiert [88].

Niedrig- und intermediär-Risiko Patienten werden mit einer Kombination aus Chirurgie und Chemotherapie behandelt. Für die Chemotherapie werden Carboplatin, Cyclophosphamid, Doxorubicin und Etoposid eingesetzt. Das Ziel bei diesen Risikogruppen besteht in einer kompletten Tumorresektion und zukünftig in einer Reduktion der chemotherapeutischen Toxizität mithilfe der Risiko-Stratifizierungen [89, 90].

Das Überleben der Hoch-Risiko Patienten ist trotz aggressiver Chirurgie, Radiotherapie und Chemotherapie sehr gering. Um eine optimale Behandlung dieser Patienten zu erreichen werden sie zuerst biopsiert. Das Biopsat wird unter anderem auf die oben genannten ungünstigen biologischen Faktoren untersucht (*n-myc* Amplifikation, chromosomale Veränderungen, Ploidität) und die Therapie daran angepasst. Meistens erfolgen dann eine Chemotherapie (Cisplatin, Cyclophosphamid, Vincristin, Doxorubicin und Etoposid), eine chirurgische Resektion und eine myeloablative Therapie mit anschließendem Stammzell-*rescue* [91].

Beim Hoch-Risiko Neuroblastom werden auch biologische Therapien als Standard eingesetzt. Die dafür eingesetzten Therapeutika sind z.B. Retinoide wie das Isotretinoin (cis-RA), welches eine neuronale Differenzierung begünstigt [92]. Aber auch der Einsatz von monoklonalen Antikörpern (AK), die das Disialgangliosid GD2 erkennen, haben die Überlebensraten verbessert [93]. Zusätzliche Therapiemöglichkeiten bieten auch Immuntherapien mit

T-Zell-CARs (Chimäre Antigen Rezeptoren) an, welche ebenfalls das GD2-Antigen auf den Tumorzellen binden [94].

Verlaufsdagnostik, Nachsorge und Früherkennung

Bis heute verläuft die Verlaufsdagnostik bei NB anhand der Beurteilung der Tumor-*response*. Dabei werden die initial eingesetzten, bildgebenden und labordiagnostischen Untersuchungen wiederholt und ein Remissionsgrad bestimmt. Auch in der Nachsorge werden dieselben Untersuchungen durchgeführt, um Rezidive auszuschließen. Diese Kontrolluntersuchungen dauern bis zu zehn Jahre nach der Therapie an, um Rezidive aber auch Spätfolgen der Therapie rechtzeitig zu erkennen.

Da die Katecholaminmetabolite im Urin nachweisbar sind, untersuchte eine Studie die Möglichkeit diese Metabolite für eine Früherkennung von NB zu nutzen. Die Ergebnisse der Studie konnten keinen Nutzen dieser Methode für die Früherkennung nachweisen. Zudem konnten die Analysen weder zu einer Senkung der Mortalität noch zu einer Vermeidung von metastasierenden Erkrankungen beitragen [95].

1.2. Tumormarker

Als Tumormarker werden Moleküle bezeichnet, welche entweder nur bei einer Krebserkrankung vorkommen oder durch die Erkrankung eine höhere Abundanz aufweisen als bei gesunden Menschen. Diese Moleküle können zum Beispiel Peptide, Proteine, Lipide, Hormone und Nukleinsäuren sein [96]. Aber auch die Amplifikation spezifischer Gene kann für die Detektion von Tumoren genutzt werden. Demnach können sie nicht nur Bestandteile von Krebszellen, sondern auch krebstypische Stoffwechselprodukte, mutierte Gene sein oder Veränderung der Genexpression bedeuten. Einige von diesen Molekülen können von Tumorzellen produziert und sezerniert werden, weshalb Tumormarker im Blut, Urin, Gewebe oder in anderen Körperflüssigkeiten vorkommen können [97]. Heutzutage ist man dazu in der Lage diese Moleküle mithilfe von unterschiedlichen Methoden nachzuweisen und damit Informationen über eine Krebserkrankung zu erhalten. Eingesetzt werden sie unter anderem zur Früherkennung von Krebserkrankungen, zum *Monitoring* einer Erkrankung, zur Rezidiv-Früherkennung und zur

Anpassung einer Therapie an den jeweiligen Tumor. Allerdings sind nicht für alle Tumorentitäten Marker bekannt, weshalb es ein Schwerpunkt der jetzigen Forschung ist, möglichst viele aussagekräftige Marker zu entdecken. Zudem sind viele Tumormarker nicht sensitiv oder spezifisch genug, um sie für das *Screening* oder die Diagnose einzusetzen, weshalb viele von ihnen eher zur Verlaufskontrolle geeignet sind [97].

Universelle Biomarker zur Detektion aller Tumorentitäten zu finden ist problematisch, da die Entstehung von Tumoren ein mehrstufiger, hochkomplexer Prozess ist, in dem bei jeder Entität unterschiedliche Vorläuferzellen eine Rolle spielen. Auf der Suche nach solch einem Biomarker, wurden deshalb fundamentale biophysikalische Mechanismen untersucht, welche in allen Malignitäten (im Vergleich zu den gesunden Zellen) verändert sind.

1.2.1. DNaseX: Ein Marker für eine defekte Apoptose

Ein Mechanismus, der in allen Tumorzellen verändert ist, ist der programmierte Zelltod (Apoptose). Ist dieser Prozess gestört oder inhibiert, können Tumore entstehen. Auch ist die Apoptose ein sehr komplexer Prozess, welcher durch viele Signalkaskaden induziert werden kann. Viele Faktoren spielen bei der Kontrolle der Apoptose eine wichtige Rolle, weshalb man einen universellen Biomarker am Ende dieser Kaskaden erwarten würde [98]. Einer der letzten und irreversiblen Schritte während der Apoptose ist die Fragmentierung der chromosomalen DNA in etwa 180 bp (und Vielfache davon) große Fragmente. Diese Fragmentierung wird durch DNasen durchgeführt, welche durch pro-apoptotische Signalkaskaden aktiviert werden. In mehr als 60 humanen und tierischen Tumoren konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von DNasen gestört ist [99]. Diese Defekte der DNasen, treten meistens in sehr frühen Stadien der Karzinogenese auf, bevor die Zellen entarten [100]. Das wiederum zeigt, dass defekte DNasen eine wichtige Rolle bei der malignen Transformation spielen. Bisherige Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die Inzidenz von spontanen malignen Tumoren in Menschen invers proportional zu der DNase-Aktivität in Normalgewebe und Zellen ist, aus denen Tumore entstehen können. Das bedeutet, dass Zellen, die eine geringere oder defekte DNase-Aktivität aufweisen, einfacher entarten können und Zellen, die eine höhere Aktivität oder Abundanz an DNasen aufweisen, weniger entarten. Ein Beispiel für einen gegenteiligen Mechanismus zeigt die DNaseX. Bei

dieser DNase kann man eine höhere Proteinexpression in malignen Zellen beobachten [101]. Obwohl der Mechanismus noch nicht ganz geklärt ist, geht man davon aus, dass Tumorzellen die DNaseX-Aktivität inhibieren, indem sie Inhibitoren bilden [98, 99]. Diese Inhibitoren verhindern die Fragmentierung der DNA, obwohl eine erhöhte DNaseX Konzentration vorliegt (vgl. Abb. 2).

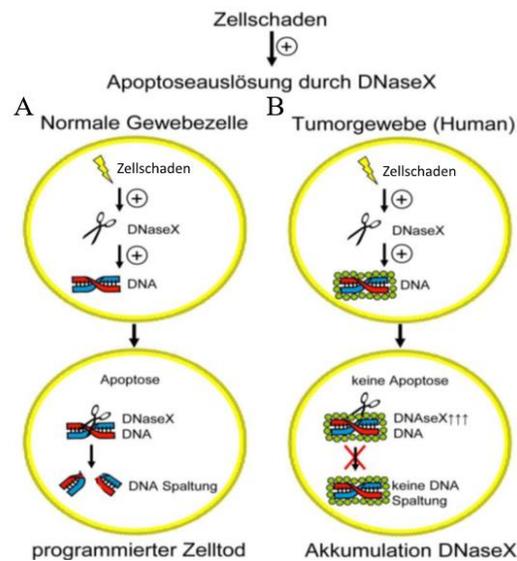


Abbildung 2: Schematische Darstellung der DNaseX Funktion.

A. In Normalgewebe führen irreparable Zellschäden zur Auslösung der Apoptose durch DNaseX. B. Bei Tumorzellen ist durch eine Blockierung der DNaseX-Funktion eine Akkumulation von DNaseX zu beobachten. Diese Akkumulation weist auf eine Apotoseresistenz dieser Zellen hin und kann für diagnostische Zwecke genutzt werden. Modifiziert nach [222].

DNaseX (DNaseI-like 1) gehört zu der DNaseI-Protein Familie, zu welcher zusätzlich noch DNaseI, DNaseI-like 2 und DNaseI-like 3 gehören. Die Nuklease ist 35 kDa groß, ist zu 39 % identisch zu DNaseI und ist ebenfalls dazu in der Lage nach Translokation in den Nukleus, DNA zu fragmentieren [102]. Die DNaseX wird gewebespezifisch überwiegend in Skelett- und Herzmuskelzellen exprimiert, aber auch verschiedenste Tumorzelllinien zeigen eine DNaseX Expression [102]. Im Gegenzug dazu weisen gesunde Zellen und vor allem Hämatopoetische Zellen keine DNaseX Expression auf. Zusätzlich sollen noch bis zu 25 weitere Tumorentitäten eine Expression von DNaseX zeigen [103]. Die erhöhte Abundanz der DNase ist auf die

Akkumulation der blockierten DNaseX im Nukleus zurückzuführen und ist vor allem dann zu beobachten, wenn das sogenannte Apo10 Protein-Epitop auf der DNaseX für die Detektion genutzt wird. Das Apo10 Epitop ist zusätzlich auch in neoplastischen Zellen zu finden, unter anderem bei Karzinomen, Sarkomen, Glioblastomen, Lymphome und Leukämien [101]. Bei der Entstehung maligner Zellen aufgrund der Inhibierung der Apoptose, kann eine Akkumulation von DNaseX als Tumormarker für die Diagnose genutzt werden.

1.2.2. Disialgangliosid GD2: Marker für NB

Glycolipide bestehen aus einem oder mehreren Kohlenhydratresten, welche mit Lipiden über eine glycosidische Bindung verbunden sind. Wenn Sphingoide oder Ceramide als Lipide eingebaut werden, spricht man von Glycosphingolipiden (GSL). GSL weisen sehr heterogene Molekularstrukturen sowohl in den Kohlenhydratketten als auch in den Lipidanteilen auf. Aus diesem Grund werden sie anhand des Kohlenhydratgrundgerüsts in folgende Serien klassifiziert: Ganglio-, Isoganglio-, Lacto-, Neolacto-, Lactoganglio-, Globo-, Isoglobo-, Muco-, Gala-, Neogala-, Mollu-, Arthro-, Schisto- und Spirometo-Serie. Saure GSL mit einem oder mehreren Sialinsäureresten an ihren Kohlenhydratketten, werden speziell als Ganglioside bezeichnet [104]. In Abbildung 3 ist das Gangliosid GD2 abgebildet, welches in Zellen aus neuroektodermaler Herkunft zu finden ist. GSL und damit auch die Ganglioside werden im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und dann im Golgi-Apparat über aufeinanderfolgende Addition von Kohlenhydratresten an das bereits bestehende Lipidakzeptormolekül weiter modifiziert. Diese Reaktionen werden von einer Reihe an spezifischen Glycosyltransferasen katalysiert.

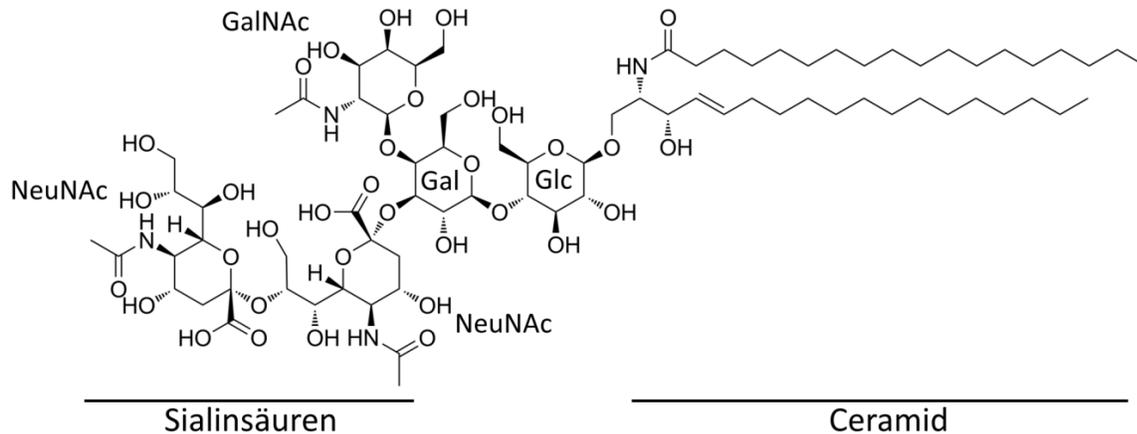


Abbildung 3: Molekularstruktur von Disialodialogangliosid GD2.

Glc: Glucose; Gal: Galactose; GalNAc: N-Acetylgalactosamin; NeuNAc: N-Acetylneuraminsäure.

Ganglioside sind ubiquitär in Geweben und Körperflüssigkeiten vorhanden, zeigen aber eine höhere Abundanz im Nervensystem. Interessanterweise befinden sich in normalem Gewebe überwiegend einfache Ganglioside, wohingegen die Komplexeren auf das Nervensystem beschränkt sind.

In den Zellen sind sie größtenteils auf der Zellmembran in Caveolae, *lipid rafts* oder Glycosphingolipid-Mikrodomänen lokalisiert, wo sie eine wichtige Rolle bei Signaltransduktion, Adhäsion und Zell-Zell Erkennungen spielen. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass Ganglioside zusätzlich in den nukleären Membranen zu finden sind und sich dort an der Aufrechterhaltung der Calcium Homöostase beteiligen [105].

Mehrere Ganglioside wie GD2, GM2, GD3, NGcGM3 und OAcGD2 sind in hoher Abundanz in einigen Tumoren aus neuroektodermaler Herkunft (NB, Melanoma, Glioma), aber auch in Lymphoma, kleinzelligem Lungenkrebs und Brustkrebs vorhanden, weshalb sie eine immer wichtigere Rolle in der anti-Tumor Therapie und in der Tumordiagnostik finden [106].

Verglichen mit den anderen Gangliosiden weist GD2 sowohl in der Tumordiagnostik als auch in der Krebstherapie diverse Vorteile gegenüber anderen Tumor-assoziierten Gangliosiden auf. Zum einen ist die Expression von GD2 in Tumorzellen sehr hoch, zum anderen wird es in normalen Zellen nur schwach exprimiert. In Normalgewebe ist GD2 nur in Neuronen, Haut-Melanocyten und peripheren Nerven vorhanden. Auf den restlichen Zellen gehört GD2 zu einer Minderheit, wo es nur 1 – 2 % aller Ganglioside ausmacht [106].

Aufgrund der auf maligne Zellen beschränkten Expression und guten Zugänglichkeit von GD2 an der Zelloberfläche, wird GD2 als Tumor-assoziiertes Antigen bezeichnet und ist ein vielversprechendes *target* für die Tumordiagnose und die Tumor-Immuntherapie. Bei der Krebs-Immuntherapie werden Patienten mit monoklonalen Antikörpern gegen GD2 behandelt [107]. Auch in klinischen Studien werden verschiedene anti-GD2 Antikörper (AK) eingesetzt. Bisher konnte gezeigt werden, dass die antikanzerogene Wirkung der AK größtenteils auf die Bindung an den Krebszellen, der Aktivierung des Komplementsystems und/oder der Antikörper-vermittelten zellulären Zytotoxizität zurückzuführen ist [108]. Beobachtet wurde in einigen Zelllinien aber auch eine direkte Induktion der Apoptose durch die anti-GD2 AK [106]. In der Tumordiagnostik wird GD2 vor allem bei Gewebsschnitten von NB-Patienten eingesetzt, da die Differentialdiagnose bei NB problematischer ist als bei Melanomen und Glioblastomen. Die Problematik beruht darauf, dass NB histopathologisch schwer von anderen Rundzelltumoren bei Kindern zu unterscheiden sind [109].

1.2.3. Transketolase-like-1 (TKTL-1): Marker für einen umprogrammierten Metabolismus

Eine erhöhte Proliferation, Störungen in Signaltransduktions-Kaskaden und Veränderungen in Onkogenen sind unter anderem für die Entstehung von Krebs verantwortlich. Neuerdings wurde aber auch erkannt, dass eine metabolische Neuprogrammierung der Zellen an der Entstehung von Krebs beteiligt sein kann. Diese Neuprogrammierungen der Tumorzellen sind essentiell, um das abnormale Wachstum, welches mit maligner Transformation einhergeht, aufrechtzuerhalten. Aus diesem Grund werden metabolische Gene als (Proto)-Onkogene in Betracht gezogen.

1924 stellte Warburg ein neues Tumorgenese-Modell vor, in dem es hauptsächlich um eine Veränderung der Energieproduktion in Tumoren geht. Er identifizierte einen Stoffwechselweg in Karzinomen, in dem Glucose anaerob degradiert wird, obwohl Sauerstoff vorhanden ist (aerobe Glykolyse). Bei diesem Stoffwechselweg wird viel Laktat produziert, was als Warburg Effekt bezeichnet wird [110]. Bis heute konnte eine gesteigerte aerobe Glykolyse für viele Krebsarten identifiziert werden. Da dieser Stoffwechselweg ineffizienter als die oxidative Phosphorylierung (2 gegen 36 mol ATP pro mol Glucose) ist, benötigen und verbrauchen diese Krebszellen mehr

Glucose, um ihre ATP Versorgung zu gewährleisten. Obwohl die Relevanz der aeroben Glykolyse in der Onkologie kontrovers diskutiert wird, gehen viele Wissenschaftler davon aus, dass Krebszellen, welche diesen Stoffwechselweg benutzen einen signifikanten Wachstumsvorteil verglichen mit Zellen ohne ihn haben [111]. Der gesteigerte Glucoseumsatz sowie die vermehrten Laktatproduktion werden als ungünstige Parameter für die Prognose von Tumoren aufgefasst.

Für den Abbau von Glucose zu Laktat ist der Embden-Meyerhof-Weg (Glykolyse) und der Pentosephosphatweg (PPP) zuständig. „Neuere“ Publikationen deuten auf eine Verbindung zwischen einem erhöhtem Glucoseverbrauch und Krebs hin. In dem PPP werden Redoxequivalente in Form von NADPH, Pentosen und Laktat produziert. Pentosen aus dem PPP werden für RNA und DNA Synthesen benötigt. Für einige Tumore konnte gezeigt werden, dass mehr als 85 % der Ribosen der Nukleinsäuren entweder direkt oder indirekt durch den nonoxidativen PPP generiert werden [112]. Der nonoxidative PPP wird von Transketolasen (TKTs) reguliert, welche einen sauerstoffunabhängigen Glucoseabbau ermöglichen und eine wichtige Rolle bei der Bereitstellung von Bausteinen für die Nukleinsäuresynthese spielen.

Durch Genom Duplikationen und *Exon-skipping* konnte das Transketolase-like1 (TKTL1) Protein entstehen, welches im Vergleich zu dem Transketolaseprotein (TKT) besondere enzymatische Funktionen aufweist. Neben der Bereitstellung von Ribose-5-P und Laktat, generiert es zusätzlich Acetyl-CoA, welches für die Fettsäuresynthese genutzt wird (vgl. Abb. 4). Auch dieser Effekt könnte TKTL1 überexprimierenden Zellen selektive Vorteile verschaffen. TKTL1 wird in verschiedenen Tumorzellen und Geweben überexprimiert, wobei die Überexpression in Krebspatienten mit Invasivität, Malignität, therapeutischer Resistenz und schlechter Prognose korreliert [113]. In Tumoren in denen TKTL1 eine Rolle spielt wird es für das schnelle Wachstum und die Tumorviabilität benötigt. Außerdem kann TKTL1 die Zellen vor oxidativem Stress, zytotoxischer Therapie und Wachstumsfaktor-abhängiger Apoptose beschützen [113]. Auch für Kopf-Hals-Tumoren wurde TKTL1 als metabolischer Marker beschrieben, der mit einer deutlich verkürzten Überlebenszeit von Tumorpatienten assoziiert ist [114]. Diese Eigenschaften machen TKTL1 zu einem potentiellen Tumormarker für einen unprogrammierten Metabolismus, welcher die Proliferation, die Malignität und Therapieresistenzen begünstigt.

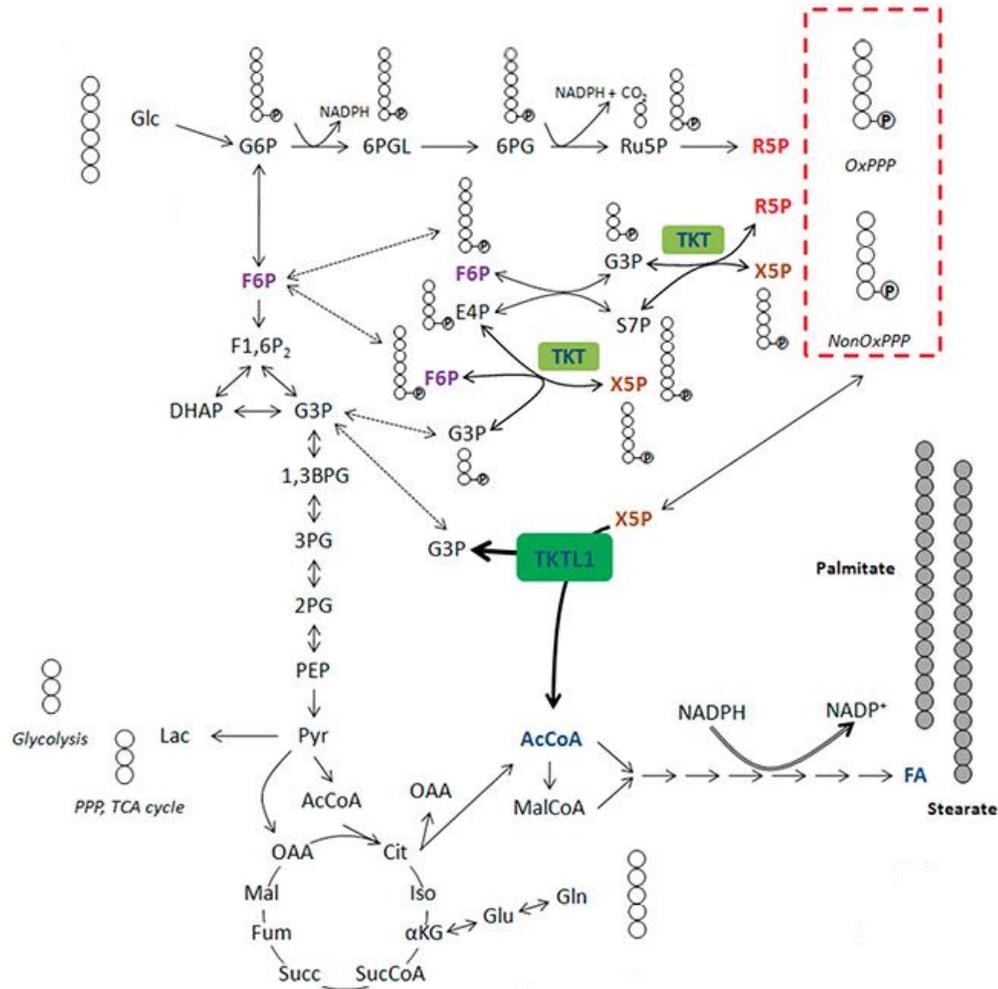


Abbildung 4: Überblick über die Funktionen von TKTL1 im Pentose-Phosphat-Weg.

In dem PPP wird NADPH als Coenzym für die Fettsäure- und Steroidbiosynthese sowie Ribose-5-Phosphat für die Nucleinsäuresynthese generiert. Im nonoxidativen PPP regulieren Transketolasen und Transaldolasen durch Umlagerung von C2- und C3-Körpern die Bildung von Fructose-6-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat. TKTL1 konvertiert Xylulose-5-Phosphat zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Acetat. Dieses Acetat kann in Folgereaktionen zur Synthese von Acetyl-CoA genutzt werden, wodurch TKTL1 den nonoxidativen PPP mit der Fettsäuresynthese verbindet. Kohlenstoffe werden durch weiße Kreise dargestellt. Kreise die ein P beinhalten repräsentieren eine Phosphat Gruppe. 1,3BPG: 1,3-Bisphosphoglycerat; 2PG: 2-Phosphoglycerat; 3PG: 3-Phosphoglycerat; 6PG: 6-Phosphogluconat; 6PGL: 6-Phosphogluconolacton; AcCoA: Acetyl-CoA; Cit: Citrat; DHAP: Dihydroxyaceton Phosphat; E4P: Erythrose-4-Phosphat; FA: Fettsäuren; F1,6P2: Fructose-1,6-Bisphosphat; F6P: Fructose-6-Phosphat; Fum: Fumarat; G3P: Glycerinaldehyd-3-Phosphat; Glc: Glucose; G6P: Glucose-6-Phosphat; Iso: Isocitrat; Lac: Lactat; Mal: Malat; MalCoA: Malonyl-CoA; OAA: Oxaloacetat; PEP: Phosphoenolpyruvat; Pyr: Pyruvat; R5P: Ribose-5-Phosphat; Ru5P: Ribulose-5-Phosphat; S7P: Sedoheptulose-7-Phosphat; Succ: Succinat; SucCoA: Succinyl-CoA; X5P: Xylulose-5-Phosphat; αKG: α-Ketoglutarat. Modifiziert nach [113].

1.3. Liquid Biopsy

Um bei Patienten mit Krebserkrankungen bestmögliche Diagnose und Therapiemöglichkeiten zu erzielen, hat sich das Konzept der Präzisionsmedizin in der Onkologie entwickelt. Es wird daran geforscht sehr genaue *screening*-, Diagnose- und Prognose-Methoden zu identifizieren, mit denen man zusätzlich auch Rezidive und Therapie-Resistenzen vorhersagen kann. Es läuft darauf hinaus, dass die Diagnose und Therapien individuell auf die Patienten und ihre Tumorerkrankung angepasst sind.

Gewebe-Biopsien sind bis heute der Gold-Standard, um Daten zu den jeweiligen Krebserkrankungen zu erhalten. Mit ihnen kann man unter anderem mithilfe histopathologischer Analysen erfahren, ob Läsionen malign oder benign sind. Außerdem können alle möglichen molekulargenetischen Analysen damit durchgeführt werden [115]. Solche Biopsien sind invasiv und die Ergebnisse hängen stark von dem Tumorstadium, der Lokalisation des Tumors sowie von der bisherigen Behandlung ab. Neben der Invasivität ist die intra-tumorale Heterogenität ein großes Problem der Gewebebiopsien, da die Möglichkeit besteht, dass das Biopsat nicht repräsentativ für den vollständigen Tumor ist [116].

Aus diesen Gründen sind in den letzten Jahren nicht-invasive Methoden entwickelt worden, welche unter dem Begriff „*liquid biopsy*“ zusammengefasst werden. Sie bilden alternative und attraktive neue Ansätze für Diagnose, Behandlung und Analyse von Krebserkrankungen [117], [118]. Unter *liquid biopsies* versteht man Verfahren zur Gewinnung von Materialien aus kanzerogenen Zellen für Diagnosezwecke aus Körperflüssigkeiten. Dabei können unterschiedlichste Materialien analysiert werden, wie beispielsweise zirkulierende Tumorzellen (CTC – *circulating tumor cells*), zellfreie Tumor-DNA (cfDNA – *tumor-derived cell free DNA*), RNA oder DNA in Exosomen oder microRNAs (miRNAs). Die Körperflüssigkeiten, aus denen die Materialien für die *liquid biopsy* verwendet werden, sind peripheres Blut, Urin, Zerebrospinalflüssigkeit oder Effusionsflüssigkeiten. Da die zu untersuchenden Materialien aus den Krebszellen hervorgehen, können sie unter anderem auf genetische Veränderungen untersucht werden, wie sie im Tumor selbst zu finden sind [115]. Abbildung 5 gibt einen Überblick über die prinzipiell durch *liquid biopsy* nachweisbaren Materialien in peripherem Blut.

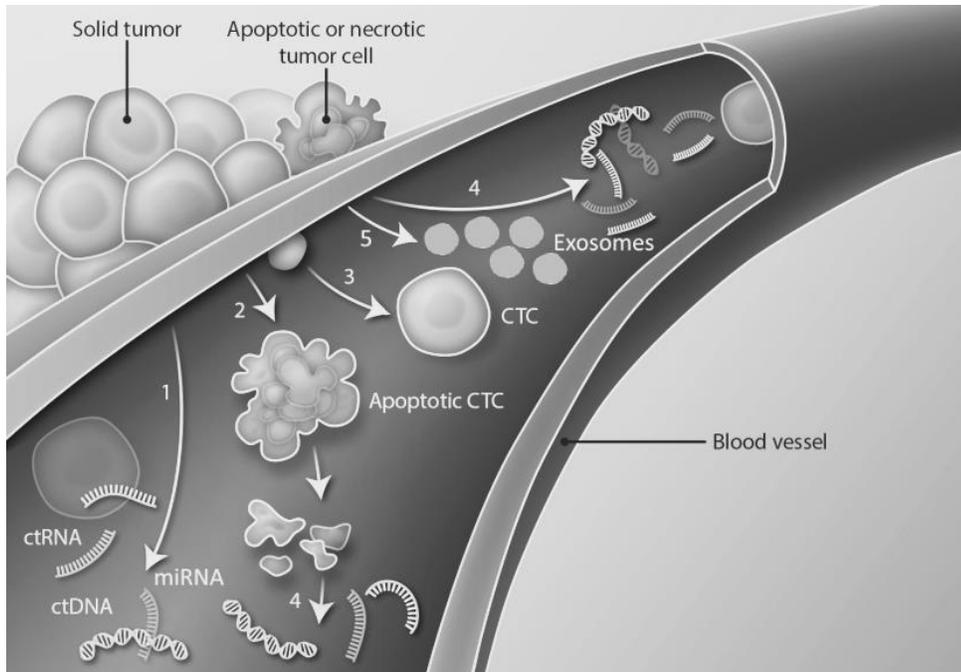


Abbildung 5: Überblick über verschiedene Materialien, die über *liquid biopsy*-Methoden genutzt werden können.

Solide Tumore können (1) zirkulierende Tumor DNA (ctDNA) und zirkulierende Tumor RNA (ctRNA) sowie miRNA ins Blut abgeben. Apoptotische (2) und lebende (3) zirkulierende Tumorzellen (CTC) können von der Tumormasse in die Blutbahn gelangen. (4) Auch ctDNA und ctRNA aus apoptotischen, zirkulierenden und nicht-zirkulierenden Tumorzellen können als Materialien für *liquid biopsy* Methoden verwendet werden. (5) In Geweben und Tumoren, bei denen es bekannt ist, dass sie Exosomen bilden, können diese ebenfalls als Material für Analysen genutzt werden. ctRNA: zirkulierende Tumor RNA; ctDNA: zirkulierende Tumor DNA; CTC: zirkulierende Tumor Zelle. Modifiziert nach [223].

Liquid biopsies werden zum einen nach den zu untersuchenden Materialien und zum anderen nach den Analyseverfahren zur Detektion und zum *monitoring* der Krebserkrankung kategorisiert. Im Nachfolgenden Abschnitt sollen die verschiedenen *liquid biopsy*-Methoden kurz vorgestellt werden.

1.3.1. Kategorisierung nach Materialtyp

Zirkulierende Tumorzellen (CTC)

CTCs sind Zellen, welche sich vom Primärtumor abgelöst haben und im Blutkreislauf oder im lymphatischen System zirkulieren. Sie können also beispielsweise aus peripherem Blut isoliert und analysiert werden. Diese Methode bietet die Möglichkeit Krebserkrankungen phänotypisch und genotypisch zu untersuchen [119]. Die dabei eingesetzten Analysemethoden sind unter anderem immunfluoreszenz-basierte Technologien, Durchflusszytometrie und reverse Transkriptase-PCR.

Zirkulierende Tumor DNA (ctDNA)

Eine weitere Möglichkeit bietet die Untersuchung von ctDNA, welche von Tumoren, entzündetem Gewebe und nekrotischen oder apoptotischen Zellen freigesetzt wird [120]. ctDNA wird aus dem Plasma isoliert und wurde erfolgreich genutzt, um *BRAF* Proto-Onkogene, *KRAS* und Serine/Threonin Kinase V600E Mutationen nachzuweisen [121].

Exosomen

Exosomen sind kleine, endocytische, von der Membran abgeleitete Vesikel, welche von vielen Zelltypen freigesetzt werden. Sie werden von spezifischen Geweben und Tumoren gebildet und können unter anderem die dsDNA ihrer Herkunftszellen enthalten. Zudem konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass Exosomen eine Rolle im *Zell-signaling* und in der interzellulären, molekularen Kommunikation von Tumorzellen spielen [122]. Daher kann die Analyse der exosomalen DNA über *liquid biopsy* ebenfalls Aufschluss über eine Tumorerkrankung geben.

microRNA (miRNA)

miRNAs sind kleine nichtkodierende RNA Moleküle, welche dazu in der Lage sind die Genexpression zu regulieren. Es konnte gezeigt werden, dass sich die kodierenden Bereiche der meisten miRNAs an fragilen Orten im Genom befinden, die sehr schnell durch verschiedene Arten von Krebs deletiert werden können [123]. In diversen Krebserkrankungen konnte aber auch

eine höhere Abundanz einiger miRNAs gezeigt werden. Neuere Studien versuchen die Expressionsmuster von miRNAs aus Tumoren mit den Entsprechenden in peripherem Blut zu korrelieren [124]. Hierbei werden mittels *next generation sequencing* oder *Expressions-profiling* miRNA Profile aus dem Blut generiert, die mit denen aus dem Tumor verglichen werden [124].

1.3.2. Kategorisierung nach Analyseverfahren

Small-scale Mutationsanalysen und *targeted deep sequencing*

Primäre Analysen, die mit *liquid biopsies* durchgeführt werden können, sind die Detektion von *small-scale* Mutationen wie Punktmutationen oder kleine definierte Insertionen und Deletionen. Es ist möglich Mutationen von *EGFR*, *BRAF*, *KRAS* und *kit* mithilfe von *liquid biopsies* zu detektieren. Die Detektion dieser Mutationen spielt eine wichtige Rolle für die Therapie, da sie Informationen über die Behandlungen geben können, wie zum Beispiel ob und wann eine bestimmte Behandlung zu beginnen ist. Als Beispiel ist die EGFR-Antikörpertherapie zu nennen, welche nur dann initiiert wird, wenn das RAS-Gen keine Mutationen aufweist [125].

Auch strukturelle Veränderungen der DNA können untersucht werden. Dazu wird oft die Sequenzierungsmethode nach Sanger verwendet. Damit können unter anderem Variationen der Kopienanzahl, fokale Mutationen wie Insertionen, Deletionen sowie *single nucleotide* Polymorphismen identifiziert (SNPs) werden [126].

Zur Feststellung von *large-scale* Mutationen kommen *next-generation* Sequenzierungsmethoden zum Einsatz. Mit ihnen ist es möglich ganze Gene oder sogar vollständige ctDNA zu sequenzieren. Das ermöglicht zum Beispiel den Nachweis von Mutationen in den SOX9-, TP53- und KRAS-Genen oder Patienten mit Lungen-, Haut-, Darm- und Brustkrebs für eine Behandlung mit Tyrosinkinaseinhibitoren auszuwählen [115].

Epitop Detektion in Monozyten (EDIM)

Eine neue *liquid biopsy*-Methode zur Früherkennung von Krebserkrankungen ist die Detektion von Tumorepitopen in Monozyten. Sie ermöglicht den Nachweis von Tumormarkern in speziellen Zellen des Immunsystems [101, 127]. Bei den dabei untersuchten Zellen handelt es sich um aktivierte Monozyten/Makrophagen ($M\Phi$), welche positiv für die beiden Oberflächenmarker CD14 und CD16 sind. Makrophagen sind nicht nur dazu in der Lage Bakterien und Parasiten, sondern auch endogene Zellen mit abnormalem Wachstum (Tumorzellen) und apoptotische Zellen zu phagozytieren. Nach der Phagozytose werden die Tumorzellen oder Zellfragmente im Inneren der $M\Phi$ mehrere Tage lang verdaut. In dieser Zeit migrieren die $M\Phi$ über Blutgefäße wieder zurück in den Blutkreislauf und können dort, wenn sie in Kontakt mit weiteren Tumorzellen oder Fragmenten kommen, diese ebenfalls phagozytieren (vgl. Abb. 6). Die Idee dieser Methode basiert auf die Entdeckung des prostataspezifischen Antigens (PSA) in den CD14/CD16 positiven Monozyten [128].

Zur Analyse dieser Zellen wird den Patienten Vollblut entnommen, in dem sich die zirkulierenden $M\Phi$ befinden. Anhand der spezifischen Oberflächenmoleküle CD14/CD16 können die $M\Phi$ mit fluoreszenz-markierten Antikörpern angefärbt und somit über Durchflusszytometrie analysiert werden [101, 127]. Zusätzlich zu den Antikörpern, welche die $M\Phi$ erkennen, werden weitere markierte Antikörper eingesetzt, welche an den Tumorepitopen (TKTL1 und Apo10) in den $M\Phi$ binden. Das Vorhandensein dieser Marker in den $M\Phi$ von Patienten wird über durchflusszytometrische Analysen nachgewiesen. Anhand dessen können dann Aussagen über die Krebserkrankung getroffen werden. Mit dieser Methode konnten bereits Tumormarker in $M\Phi$ von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle, kolorektalen Karzinomen ebenso wie im Prostatakarzinom erfolgreich detektiert werden [129-131]. Außerdem wurde gezeigt, dass die Detektion von Biomarkern mit der EDIM-Technologie spezifischer und sensitiver ist, im Vergleich einer Messung von freien Markern im Blut [131]. Da $M\Phi$ theoretisch alle möglichen Arten von Molekülen phagozytieren können und diese Epitope danach in intrazellulär nachgewiesen werden können, könnte die EDIM-Technologie als eine Plattform genutzt werden, um weitere Tumormarker aber auch andere Biomarker zu detektieren.

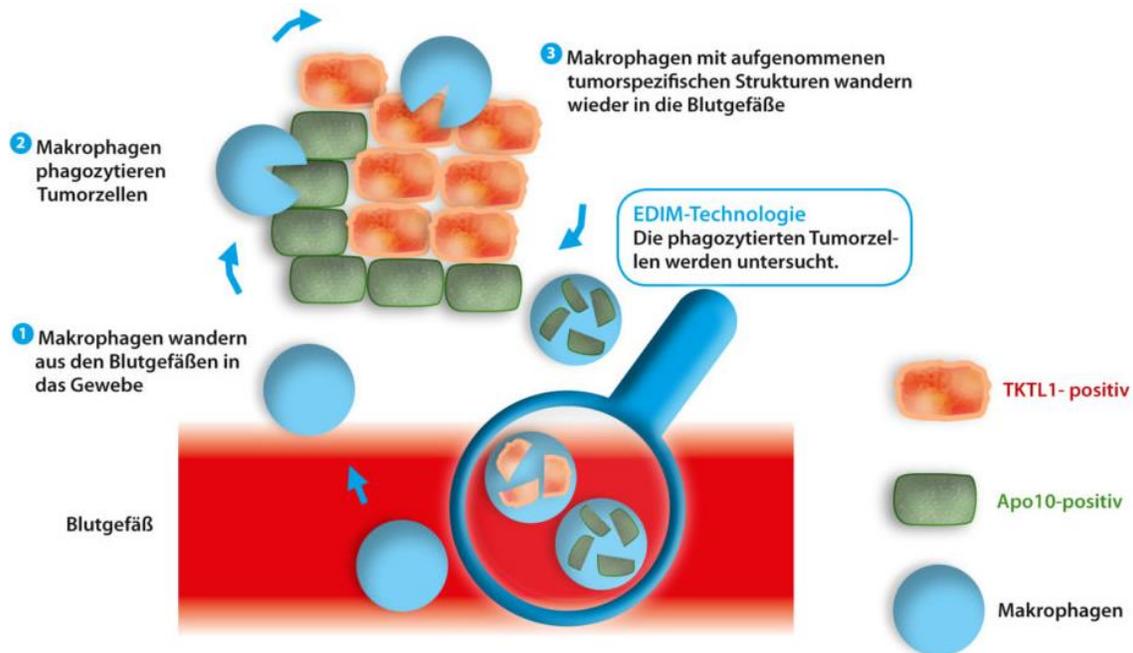


Abbildung 6: Prinzip der EDIM Technologie.

(1) M Φ migrieren aus dem Blut in das Gewebe und (2) phagozytieren Tumorzellen oder Bruchstücke von Tumorzellen. (3) Nach Aufnahme der Tumorpartikel migrieren sie wieder in den Blutkreislauf. Durch Blutabnahme können die M Φ auf das Vorhandensein der Tumormarker (hier TKTL1 und Apo10) analysiert werden. [224].

1.4. Regulation der Expression durch DNA-Methylierung

Bei Epigenetik handelt es sich vereinfacht um vererbare Änderungen der Funktion des Genoms, welche ohne eine Veränderung in der DNA-Sequenz hervorgerufen werden [132]. Es kann auch als eine stabile Veränderung der Genexpression während der Entwicklung und Zellproliferation, ohne Änderungen der Gensequenz beschrieben werden. Eines der am häufigsten vorkommenden, epigenetischen Ereignisse in Säugetier-Genomen, ist die DNA-Methylierung. Sie spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung, Differenzierung sowie Aufrechterhaltung der zellulären Identität durch Kontrolle der Genexpression [133]. Außerdem zeigen viele Untersuchungen, dass DNA-Methylierung wichtig bei X-Inaktivierung, genomischem *imprinting*, viralen Transfektionen, Aktivität von mobilen Elementen, somatischen Gentherapien, Entwicklungsstörungen und in der Onkologie ist [134].

Bei der DNA-Methylierung handelt es sich um eine kovalente Modifikation der DNA, in der eine Methylgruppe (CH₃) an der fünften Position des Cytosinringes (5mC) angefügt wird (vgl. Abb. 7 A). Obwohl die meisten Methylierungen auf CpG-Dinukleotide beschränkt sind, gibt es auch welche in CpA- und CpT-Dinukleotiden [135].

Das menschliche Genom ist nicht gleichmäßig methyliert. Es gibt Regionen mit unmethylierten Segmenten, in denen methylierte Regionen dazwischen liegen, aber es gibt auch kleine Regionen im Genom, welche ein anderes Methylierungsmuster aufweisen. Letztere werden als CpG-Inseln (CGI) bezeichnet. Sie sind von 0,5 bis 5 kb lang, kommen ungefähr alle 100 kb vor, weisen eine hohe CG-Dichte auf und sind meistens unmethyliert (vgl. Abb. 7 B). Etwa die Hälfte der Gene im Menschen haben CGI, welche sowohl in *housekeeping* Genen als auch in Genen mit gewebespezifischen Expressionsmuster vorhanden sind.

Die Enzyme, die die Methylierungsreaktion katalysieren nennt man DNA-Methyltransferasen (DNMT). Man unterscheidet zwischen *de novo* und *maintenance* (Erhaltung) DNMTs. *De novo* DNMTs methylieren, wenn die CpG-Dinukleotide in beiden Strängen unmethyliert vorliegen, wohingegen eine *maintenance* Methylierung nur stattfinden kann, wenn CpG-Dinukleotide an einem Strang bereits methyliert sind. DNMT1 ist eine DNA-Methyltransferase, welche sowohl eine *de novo* als auch eine *maintenance* Methyltransferase-Aktivität besitzt. DNMT3A und DNMT3B sind Beispiele für reine *de novo* DNMTs [134].

Die Demethylierung einer DNA kann passiv und aktiv ablaufen. Eine passive DNA-Demethylierung geschieht, wenn es keine funktionierende DNA-Methylierungs-*maintenance* gibt und die neu synthetisierte DNA nach mehreren Replikationsrunden nicht methyliert wird. In der aktiven Demethylierung werden die Methylgruppen (5mC) von Enzymen entweder entfernt oder modifiziert [136].

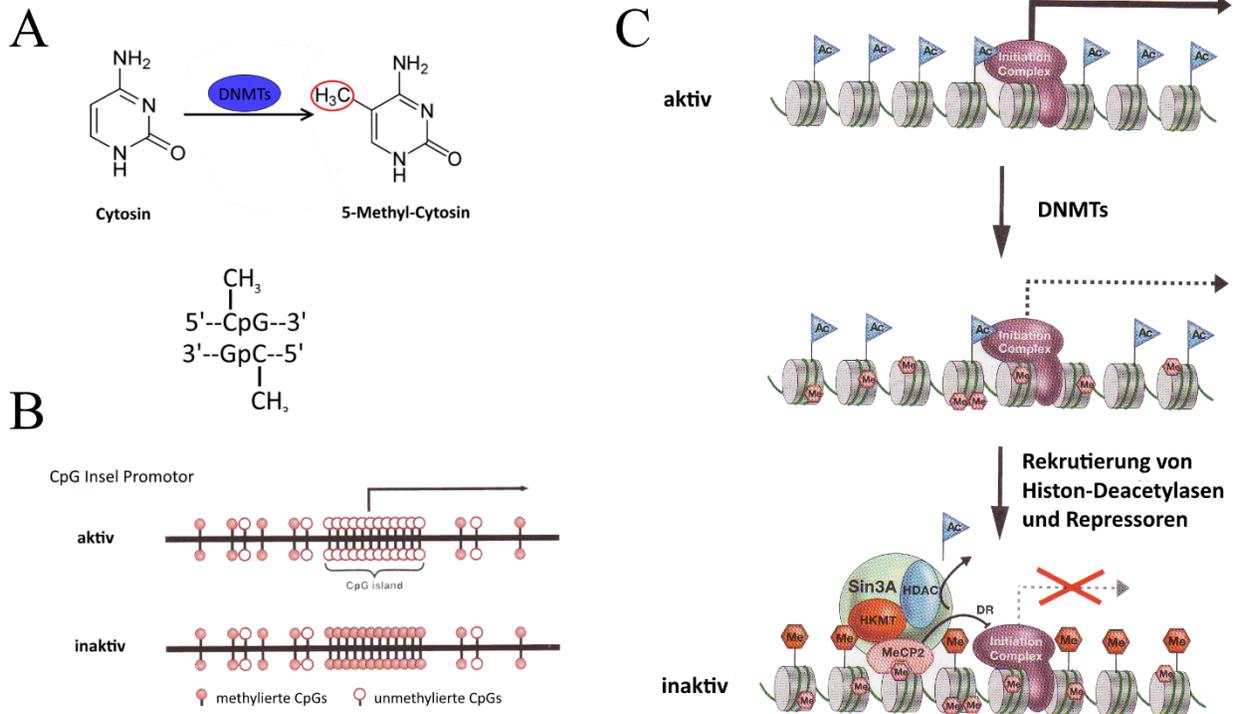


Abbildung 7: Überblick über die Cytosin-Methylierung der DNA.

A. Die Addition einer Methylgruppe (roter Kreis) an Position 5 des Pyrimidin-Ringes von Cytosin wird durch DNMTs katalysiert. Während dieser Reaktion binden die DNMTs kovalent den Kohlenstoff an Position 6 des Pyrimidin-Ringes. Die meisten DNA-Methylierungen finden an Cytosinen in einem CpG-Kontext statt. B. CpG Inseln sind Regionen mit einer hohen Dichte an CpG-Dinukleotiden. Sie sind hauptsächlich in Promotorregionen zu finden, wobei sie dort meistens unmethyliert vorliegen. Durch Methylierung der CpG-Inseln kann die Transkription von Genen inhibiert werden. C. Übergang von einem aktivem, unmethyliertem zu einem inaktivem, methyliertem Promotor. Durch DNA-Methylierung werden Proteine rekrutiert, welche eine Bindestelle für methylierte CpGs besitzen. Diese Proteine können unter anderem direkten Einfluss auf die Aktivität des Promotors haben, indem sie den Transkriptions-Initiations-Komplex inhibieren, oder mit weiteren Repressoren interagieren. Zusätzlich sind auch Mechanismen bekannt, bei denen auch Histon modifizierende Komplexe, wie der Histon Deacetylase Komplex rekrutiert werden und damit die Transkription zu reprimieren. Ac: Acetyl Gruppe; DNMTs: DNA Methyltransferasen; Me: Methyl Gruppe. Modifiziert nach [137].

Die Regulation der eukaryotischen Genexpression ist ein komplexer Prozess. Die Genexpression und vor allem die Transkriptionsinitiation sind sehr stark kontrollierte Vorgänge, bei denen viele Faktoren wichtig sind. Es ist auch bekannt, dass DNA-Methylierung eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression spielt. Gehäuft vorkommende Methylierungen in Promotorregionen von Genen führen zu einer Reduktion oder Stilllegung der Expression, wohingegen Methylierungen in den zu transkribierenden Regionen selbst unterschiedliche Effekte auf die Genexpression haben können. Es gibt einige Mechanismen, die für die Repression verantwortlich sein können. Zum einen kann die DNA-Methylierung die Bindung von Transkriptionsfaktoren an ihren Erkennungsstellen im Promotor blockieren. Ein weiterer Mechanismus ist die direkte Bindung von transkriptionellen Repressoren an methylierte DNA. Zusätzlich kann DNA-Methylierung auch einen Einfluss auf Histonmodifikationen und Chromatinstruktur haben, welche dann ebenfalls die Genexpression beeinflussen können. Ein Beispiel dafür sind Proteine, welche methylierte CpGs erkennen und durch Interaktionen mit Histon-Deacetylase-Komplexen zu einer Repression der Genexpression beitragen (vgl. Abb. 7 C) [134].

Die Aufrechterhaltung eines funktionierenden Methylierungsapparates ist unabdingbar für die Entwicklung ebenso wie für einen gesunden menschlichen Organismus. Wie oben bereits erwähnt können Fehler in diesen Mechanismen zu verschiedenen Krankheitsbildern führen. Neben direkten Mutationen der DNA-Sequenz ist die Veränderung der DNA-Methylierung eine Ursache, die zu einer onkogenen Transformation beitragen kann. Viele Tumorentitäten zeigen eine anomale DNA-Methylierung. Weit verbreitet in Tumorgenomen ist eine globale Hypomethylierung, eine Promotormethylierung von Tumorsuppressorgenen und eine potentielle direkte Mutagenese des 5mC durch Desaminierung.

Hypo- und Hypermethylierungen sind relative Begriffe, welche sich auf einen geringeren (Hypo) bzw. auf einen erhöhten (Hyper) Methylierungsgrad beziehen. In der Onkologie bezieht sich der Vergleich auf gesundes Gewebe.

Berichte über Hypermethylierungen in Krebserkrankungen kommen viel häufiger vor als Berichte über Hypomethylierungen. Krebs-assoziierte lokale Hypermethylierung wird meistens in CGI gefunden. Wenn CGI Promotoren überlappen, sind sie üblicherweise unmethyliert. Kommt es zu einer Hypermethylierung in diesen Bereichen, führt das zu einem transkriptionellen *silencing*. Bei Krebserkrankungen werden oft CGI in den Promotoren von

Tumorsuppressorgenen hypermethyliert, wodurch diese nicht exprimiert werden. Studien zeigen, dass Hypermethylierung von CGI in verschiedenen Tumorentitäten wie Brustkrebs, Colonkarzinomen, Hirn-, Kopf-, Nacken-, neuroektodermalen Tumoren und Leukämien nachweisbar sind [137].

DNA-Hypomethylierung ist ein weiterer Methylierungsdefekt, welcher in Tumoren beobachtet wird. Dieser betrifft oft einen größeren Anteil am Genom als die Hypermethylierung, sodass es, wenn man das ganze Genom einer Tumorentität betrachtet, eher zu einem Verlust von 5mC kommt [137]. Eine globale Hypomethylierung ist vor allem in soliden Tumoren üblich, wie in metastasierten, hepatozellulären Karzinomen, Gebärmutterhalskrebs, Prostata Krebs und in hämatologischen Malignitäten. Die Bedeutung von Hypomethylierungen in der Onkologie ist noch nicht ganz geklärt. Ein Erklärungsansatz ist, dass sie durch Aktivierung von Onkogenen (Bspw. *c-myc*) und/oder durch chromosomale Instabilität zur Tumorentstehung beiträgt [134]. Im Gegensatz zu der Hypermethylierung kommen die Hypomethylierungen gehäuft in verstreuten repetitiven Sequenzen (*repeated interspersed sequences*), Satelliten-DNA und in Einzel-Kopie-Genen vor [137]. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass Promotor-Hypomethylierungen mit Krebs in Verbindung stehen, wodurch Onkogene aktiviert werden. Ein Beispiel dafür ist die Aktivierung von RAS-Familienmitgliedern in Kolonkarzinom und in kleinzelligem Lungenkrebs [138].

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Das Rhabdomyosarkom (RMS) und das Neuroblastom (NB) gehören zu den häufigsten extrakranialen, soliden Tumoren im Kindesalter. Dabei beruhen Tumorstaging, Diagnose und Verlaufskontrollen bisher überwiegend auf bildgebenden Verfahren und auf histopathologischen Untersuchungen von Gewebematerial. Bisher sind für RMS und NB keine geeigneten prognostischen und diagnostischen Tumormarker bekannt. Aus diesem Grund ist das Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, ob es in den beiden Tumorentitäten möglich ist, mithilfe des EDIM-Tests, TKTL1, Apo10 und bei NB auch GD2 also mögliche Tumormarker zu identifizieren.

Dazu soll im ersten Teil dieser Arbeit untersucht werden, ob diese Tumormarker sich sowohl in RMS- und NB-Zelllinien, als auch in Tumorgewebe-Material nachweisen lassen. Nachfolgend soll das Blut von Tumorpatienten mithilfe des EDIM-Tests auf das Vorhandensein der drei Tumormarker analysiert werden. Die Ergebnisse sollen einen Hinweis darauf geben, ob sich die Methode und auch die drei Marker für eine (Verlaufs-)Diagnose der beiden Tumorentitäten eignen.

Der zweite Teil beschäftigt sich mit einer genaueren Analyse des EDIM-Verfahrens an sich. Dabei soll betrachtet werden, wie Makrophagen ($M\Phi$) Tumorpartikel internalisieren und ob sich diese Tumorpartikel in den $M\Phi$ nachweisen lassen. Außerdem soll die Abundanz der Tumormarker in aktivierten und nicht-aktivierten $M\Phi$ untersucht werden.

In dem letzten Teil der Arbeit wird der Mechanismus der erhöhten TKTL1-Expression genauer analysiert. Dazu soll eine mögliche Korrelation zwischen DNA-Hypomethylierung und TKTL1-Expression in RMS- und NB-Zelllinien verifiziert werden. Außerdem soll überprüft werden, ob eine Hypomethylierung des TKTL1-Promotors mit einer erhöhten TKTL1-Expression in Tumor-Gewebeproben von RMS- und NB-Patienten in Verbindung steht.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Verbrauchsmaterialien und Geräte

In Tabelle 3 und 4 sind die für diese Arbeit genutzten allgemeinen Verbrauchsmaterialien und Geräte aufgelistet. Spezielle Materialien und Geräte sind in den entsprechenden Methodenabschnitten vermerkt.

Tabelle 3: In dieser Arbeit genutzte Verbrauchsmaterialien und sonstige Reagenzien.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
7-AAD viability staining Solution; eBioscience	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Kryoröhrchen Cryo's	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Desinfektionsspray Descosept AF	Dr. Schumacher GmbH, Malsfeld
Einwegpinzetten, steril	Servoprax GmbH, Wesel
Entsorgungsbeutel, PP autoklavierbar	BRAND GmbH und Co KG, Wertheim
FACS-Röhrchen (5 ml Rundboden)	Corning Incorporated, New York, USA
Handschuhe nitrile, powder-free	Abena GmbH, Zörbig
Handschuhe Peha-soft nitrile GUARD	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Intracellular Fixation and Permeabilization Puffer Set	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
IntraPrep Permeabilization Reagents	Beckman Coulter, Krefeld
Pasteur-Kapillarpipetten 230 mm	Wilhelm Ulbrich GdBR, Mainz
Pipette, Eppendorf Reference	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten (Falcon Serologische Pipette) (2, 5, 10, 25 ml)	Corning Incorporated, New York, USA
Pipettenspitzen (0,5 – 20 µl, Kristall E)	Ratiolab GmbH, Dreieich
Pipettenspitzen (100-1000 µl)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen (10-200 µl)	Sarstedt, Nürmbrecht
Pipettenspitzen mit Filter (0,5-10, 10-100,100-1500 µl)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Reaktionsgefäße (0,2 ml) Thermo PCR Tube	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Reaktionsgefäße (Safe Lock, 0,5 ml)	Sarstedt, Nürmbrecht
Reaktionsgefäße (Safe Lock, 1,5-2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße (8-Tube Strip 0,2 ml)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Taschenrechner (Sharp EL-243S)	Sharp Devices Europe GmbH, München
Zellkulturflaschen (Cellstar 75 cm ² , 125 cm ² , 175 cm ²)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflaschen 25 cm ²	Corning incorporated, New York, USA
Zentrifugenröhrchen mit konischem Boden (15 ml/ 50ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendeten Geräte.

Gerät	Hersteller
Advia 120 Hämatology System	Siemens Healthcare GmbH, Erlangen
Durchflusszytometer FACS Canto II (3 Laser: blau=488 nm, rot=633 nm und violet=405 nm)	Becton Dickinson, Heidelberg
Brutschrank BBD 6220	Heraeus Holding GmbH, Hanau
CFX96 Real-Time System mit C1000 Thermalen Cycler	Bio-Rad, München
Eismaschine	Scotsman, Ipswich, Großbritannien
GeneAmp PCR System 9700 von Applied Biosystems	Bio-Rad, München
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr, Ochsenhausen
MilliQ-Wasseraufbereitungsanlage	Millipore, Molsheim, Frankreich
Mikroskop Axioskop 40	Carl Zeiss, Oberkochen
Mikroskop Leica DMi1	Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar
Multipipette (Multipette Xstream)	Eppendorf AG, Hamburg
Nanodrop 2000 Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Pipettierhilfe Pipetboy acu Integra	Bioscience AG, Chur, Schweiz
Sterilbank (Msc-Advantage)	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Stickstofftank CryoSystem 4000 Chart	MVE BioMedical, Ball Ground, USA
Tischabzug	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG, Wangen
Ultra-Turrax T8 Homogenisierer	IKA, Staufen im Breisgau
Vakuumpumpe EcoVac	Schuett-biotec GmbH, Göttingen
Vortex-Schüttler VF2	Janke & Kunkel, Labortechnik, Staufen
Wasserbad Typ 1003	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Zentrifuge Multifuge 1S-R	Heraeus, Hanau

2.1.2. Zelllinien

Die Zellexperimente in dieser Arbeit wurden mit Zelllinien durchgeführt. Für Analysen an Rhabdomyosarkomen (RMS) wurden die Zelllinien RD (embryonales RMS) und RH30 (alveoläres RMS) verwendet. Für die Untersuchungen am Neuroblastom (NB) wurden die Zelllinien LAN-1, SK-N-BE, LS und IMR-32 genutzt.

RD: Die RD-Zelllinie wächst adhärent und weist eine große und spindelförmige Morphologie auf und besitzen mehrere Zellkerne. Ursprünglich wurde diese Zelllinien aus einer Biopsieprobe eines siebenjährigen kaukasischen Mädchens mit einem RMS im Becken isoliert und etabliert. Das Mädchen wurde zur Zeit der Biopsie mit Radiotherapie und Cyclophosphamid behandelt [139]. Anhand der Histologie des Biopsates, der kultivierten Zellen und der 51-hyperdiploiden Chromosomen, wird diese Zelllinie zu den embryonalen RMS gezählt. Zusätzlich zeigen RD Zellen molekulargenetisch eine Amplifikation des *myc* Onkogens [140], eine *nras*-Mutation [141] und eine homozygote Mutation von *p53* [142, 143].

RH30: Tumorzellen, der RH30 Zelllinie, sind adhärente, epithel-ähnliche Zellen, die aus einer Knochenmetastase eines 17-jährigen Jungen mit undifferenziertem, alveolärem Rhabdomyosarkom isoliert wurden. Zum Zeitpunkt der Biopsie war der Junge noch nicht vortherapiert. Diese RH30 Tumorzellen weisen eine *p53*-Mutation auf und zeigen eine hohe Expression von zwei muskelspezifischen Transkriptionsfaktoren, Myogenin und MyoD. Zusätzlich sind sie positiv für die t(2;13)(q35;q14) Translokation, welche zu der Bildung des Fusionsproteins PAX3/FOXO1 führt.

LAN-1: LAN-1 Zellen wachsen adhärent, aber auch in Suspension als Zellaggregate. Sie wurden 1977 aus einer Knochenmarksmetastase eines zweijährigen Jungen mit einem Stadium IV Neuroblastom isoliert. Diese malignen Zellen sind hypotetraploid und haben eigene Markerchromosomen [144].

SK-N-BE: Diese Neuroblasten-ähnlichen Zellen wachsen sowohl adhärent als auch in Suspension und können Aggregate bilden. Isoliert wurden sie aus einer Knochenmarksmetastase eines zwei jährigen Jungen mit einem NB. Der Primärtumor war im Gehirn lokalisiert. Die Biopsie erfolgte nach mehreren Zyklen Chemotherapie und Radiotherapie. Die modale Chromosomenanzahl bei diesen Tumorzellen ist 46, was einen nahezu diploiden Chromosomensatz zeigt [145].

LS: LS Zellen sind polymorph und wachsen adhärent in Einzelzellschichten. Isoliert wurden sie aus einem abdominellen Tumor eines 16-Monate alten Mädchens mit einem NB. Die Zellen besitzen zwei Chromosomen mit *homogeneous staining regions* (HSRs), welche aus *n-myc* Amplifikationen und *mouse double minute 2 homolog* (MDM2) Kopien bestehen [146, 147].

IMR-32: Die IMR-32 Zelllinie wurde 1967 von einer abdominellen Metastase eines 13-Monate-alten kaukasischen Jungen isoliert, dessen Primärtumor ein im Gehirn lokalisiertes Neuroblastom war. Der Tumor zeigte seltene Bereiche organoider Differenzierung. Morphologisch können zwei Zelltypen unterschieden werden, welche den gleichen Karyotypen aufweisen. Beide sind hyperdiploid und besitzen dieselben Markerchromosomen, die typisch für diese Zelllinie sind. Zusätzlich weisen sie molekulargenetisch *n-myc* Amplifikationen in der HSR Regionen auf [148].

2.2. Zellbiologische Methoden

2.2.1. (Sub)kultivierung

Alle Arbeiten mit humanen Primärzellen oder Zelllinien wurden unter einer Sicherheitswerkbank (*laminar flow*) durchgeführt. Die Sterilbank soll eine keimfreie und sterile Umgebung bereitstellen. Um eine Kontamination mit Bakterien, Pilzen, Viren aber auch mit anderen humanen Zellen und Zelllinien auszuschließen, wurde der Arbeitsplatz, sowie alle Materialien, Geräte und Hilfsmittel regelmäßig, nach Bedarf und Herstellerangaben autoklaviert, sterilisiert oder falls nicht anders möglich desinfiziert. Zellkulturmedien und Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) wurden in einem Wasserbad auf 37 °C, alle anderen Reagenzien, mit Ausnahme von Antikörpern und Enzymen auf Raumtemperatur (RT) erwärmt.

In der Routinezellkultur wurden die Zellen mit dem für die entsprechende Zelllinie geeigneten Zellkulturmedium in Zellkulturflaschen kultiviert (vgl. Tab. 6 und 7). Neben dem eigentlichen Medium enthalten Zellkulturmedien Zusätze, welche ebenfalls in den Tabellen aufgeführt sind. Zur Kultivierung wurden die Zellkulturflaschen mit den Zellen in einen Brutschrank gestellt. Dieser enthält für die Kultivierung ein Luftgemisch mit 5 % CO₂, 95 %iger Luftfeuchtigkeit und hat eine konstante Temperatur von 37 °C.

Um Tumorzellen für eine längere Zeit zu kultivieren, müssen sie „passagiert/gesplittet“ werden. Passagieren bedeutet die Zellen vom Boden einer Zellkulturflasche zu lösen, sie zu ernten und einen Teil von ihnen in eine neue Flasche auszusäen, damit sie sich wieder teilen und somit vermehren können. Dabei ist darauf zu achten, dass die Zellen nur eine bestimmte Konfluenz (80 – 90 %) in einer Flasche erreichen, da es ansonsten zu einer Kontakthemmung durch Zell-Zell-Kontakte kommt. Die Zellpassage erfolgte abhängig von der jeweiligen Wachstums-/Teilungsrates der Zelllinien in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:20. Da alle verwendeten Zelllinien adhärent wachsen, wurde für die Passage der Überstand abgesaugt, die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und eine Trypsin/EDTA Lösung hinzugegeben um die Zellen von den Zellkulturflaschen abzulösen. Das Ablösen der Zellen erfolgt enzymatisch durch die Protease Trypsin bei 37 °C im Brutschrank. EDTA komplexiert Magnesium und Calcium und führt so zu einer Lockerung der Zell-Zell-Kontakte. Durch Kontrolle am Mikroskop wurde beobachtet, wann sich die Zellen vom Flaschenboden lösten. Nach dem Ablösen der Zellen

wurde die Trypsinreaktion durch Zugabe von frischem Zellkulturmedium gestoppt und die Zellen anschließend in frischem Medium resuspendiert. Zur weiteren Kultivierung wurden die Zellen in einem gewünschten Verhältnis mit frischem Medium verdünnt, in eine neue Zellkulturflasche überführt und in den Brutschrank gestellt.

Tabelle 5: Verwendete Materialien für die Kultivierung von Zelllinien.

Material	Hersteller
DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Steinheim
RPMI-1640	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Steinheim
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 1x-PBS (ohne Ca ²⁺ / Mg ²⁺)	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Steinheim
Trypsin (Trypsin/EDTA, 0.05 %, Gibco)	Biochrom GmbH, Berlin Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe

Tabelle 6: Zellkulturmedium für RMS-Zelllinien.

Bestandteile Zellkulturmedium	Hersteller
88 % DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Steinheim
10 % FCS (fetales Calfserum)	Biochrom GmbH, Berlin
1 % L-Glutamin (200 mM)	Biochrom GmbH, Berlin
1 % Penicillin (10.000 U/ml) / Streptomycin (10.000 µg/ml)	Biochrom GmbH, Berlin

Tabelle 7: Zellkulturmedium für NB-Zelllinien.

Bestandteile Zellkulturmedium	Hersteller
88 % RPMI-1640	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Steinheim
10 % FCS (fetales Kälberserum)	Biochrom GmbH, Berlin
1 % L-Glutamin (200 mM)	Biochrom GmbH, Berlin
1 % Penicillin (10.000 U/ml) / Streptomycin (10.000 µg/ml)	Biochrom GmbH, Berlin

2.2.2. Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zur Kryokonservierung der Zellen ist ein spezielles Einfriermedium nötig (vgl. Tab. 9). Dieses Medium soll einerseits genügend Nährstoffe beim Auftauen der Zellen enthalten und andererseits verhindern, dass sich beim Einfrieren Eiskristalle bilden, welche die Zellen lysieren können. Zum

Einfrieren der Zellen ist es wichtig, dass diese sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Es wurde deshalb darauf geachtet, dass die Flaschen, in denen sich die Zellen für die Kryokonservierung befanden, etwa zu 80 – 90 % konfluent waren. Nach dem Ablösen der Zellen aus den Zellkulturflaschen wurden sie gezählt und in dem Einfriermedium auf 1×10^6 Zellen/ml verdünnt. 1,5 ml der Zellsuspension wurden pro Kryoröhrchen aliquotiert, sodass immer $1,5 \times 10^6$ Zellen pro Kryoröhrchen weggefroren wurden. Die Kryoröhrchen wurden in einen mit Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter überführt und dieser für 24 h in einen $-80\text{ }^\circ\text{C}$ Gefrierschrank gestellt. Die mit Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter dienen dazu, eine konstante Temperatursenkungsrate von $-1\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ zu gewährleisten. Nach 24 h wurden die Kryoröhrchen zur langfristigen Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff bei $-196\text{ }^\circ\text{C}$ eingelagert.

Zum Auftauen der Zellen wurde frisches Zellkulturmedium auf $37\text{ }^\circ\text{C}$ erwärmt und 10 ml davon in ein 15-ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die benötigten Kryoröhrchen wurden aus dem Flüssigstickstofftank entnommen, auf Trockeneis transportiert und in einem Wasserbad bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in das vorbereitete warme Medium überführt, resuspendiert und bei $470 \times g$ auf RT für 5 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand der Zellen abgenommen, die Zellen in 15 ml frischem Medium resuspendiert, in eine neue Zellkulturflasche (T-75) überführt und anschließend im Brutschrank inkubiert. Zellen, die den Auftauvorgang nicht überlebten, wurden nach 24 h anhand eines Mediumwechsels entfernt. Erst nach zwei Wochen in Kultur wurden die Zellen für Experimente verwendet.

Tabelle 8: Materialien Kryokonservierung.

Material	Hersteller
Gefrierbehälter (5100 Cryo „Mr.Frosty“)	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Einfriermedium	Selbst hergestellt

Tabelle 9: Einfriermedium.

Bestandteile	Hersteller
90 % FCS	Biochrom GmbH, Berlin
10 % DMSO	AppliChem GmbH, Darmstadt

2.2.3. Zellzahlbestimmung

Für jedes Experiment und für jede Zelllinie wurde eine bestimmte Anzahl von Zellen eingesetzt. Somit wird eine Beibehaltung gleicher Konditionen sowie eine bessere Vergleichbarkeit der Experimente und Resultate gewährleistet. Um die Zellzahl zu bestimmen wurden die Zellen aus den jeweiligen Zellkulturflaschen mit Hilfe von Trypsin abgelöst. Nach Aufnahme der Zellen in frisches Zellkulturmedium wurden sie gemischt und in einer Neubauer-Zählkammer (C-Chip) gezählt. Hierfür wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:1 mit Trypanblau gemischt, 10 µl dieser Suspension in die Zählkammer pipettiert und anschließend gezählt. Trypanblau ist ein polyanionischer Azofarbstoff, welcher nicht durch intakte Zellmembranen diffundieren kann. Tote Zellen nehmen den Farbstoff auf und erscheinen unter dem Mikroskop blau. Lebende Zellen schließen den Farbstoff aus und erscheinen unter dem Mikroskop weiß. Trypanblau kann also nicht nur zur Zellzahlbestimmung, sondern auch zu einer Bestimmung der Zellviabilität verwendet werden.

Tabelle 10: Eingesetzte Materialien zum Zellen zählen.

Material	Hersteller
Neubauer-Zählkammer DHC-N01 (C-Chip)	NanoEnTek Inc., Seoul, Korea
Trypanblau; Gibco	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe

Bei entsprechender Vergrößerung wurden die vitalen Zellen in den vier Eckquadranten einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und der Mittelwert der vier Quadranten bestimmt. Zur Berechnung des benötigten Volumens für eine entsprechend definierte Zellverdünnung wurde dieser Wert in die folgende Formel eingesetzt:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{S \times V \times 10^4}{4}$$

- S = Anzahl der gezählten Zellen
- V = Verdünnungsfaktor der Zellsuspension mit Trypanblau (Verhältnis 1:1, d.h. V=2)
- 10⁴ = Volumenfaktor eines Eckquadrates
- 4 = Anzahl der Eckquadranten
- ml = Gesamtvolumen der Zellsuspension

Während der Zellzahlbestimmung wurden die Zellen in einem Zentrifugenröhrchen pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium entsprechend der Rechnung auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Diese Zellsuspension diente als Stammlösung für die jeweiligen Experimente, in denen je nach Experiment festgelegte Zellzahlen eingesetzt wurden (s. Tab. 11).

Tabelle 11: Eingesetzte Zellzahlen in den Experimenten.

Versuch	RH30	RD	LAN-1	SKNBE	LS	IMR-32	PBMCs	MΦ
qRT-PCR	8×10^4	1×10^5	1×10^5	1×10^5	1×10^5	1×10^5	1×10^6	1×10^5
FACS-Exp.	2×10^5	2×10^5	2×10^5	2×10^5	2×10^5	2×10^5	1×10^6	1×10^5
Bisulfit-Seq	1×10^4	1×10^4	1×10^4	1×10^4	-	-	-	-
Decitabin	2×10^5	2×10^5	2×10^5	2×10^5	-	-	-	-
Phagocytose	-	-	$1,5 \times 10^5$	-	-	-	-	$1,5 \times 10^5$
MΦ-Diff.	-	-	-	-	-	-	1×10^7	-

2.2.4. Isolation von PBMCs aus Buffycoats

Zur Gewinnung der PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) von gesunden Spendern wurden *buffy-coats* des IKET (Institut für klinische und experimentelle Transfusionsmedizin) am Universitätsklinikum Tübingen verwendet.

PBMCs sind eine Mischpopulation aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes. Sie beinhalten wichtige Zellen des Immunsystems wie Lymphozyten (T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen) und Monozyten. Am häufigsten wird für die Isolation von PBMCs die Dichtegradientenzentrifugation verwendet. Da sich die Dichte von PBMCs von der Dichte von Erythrozyten, Granulozyten und von toten Zellen unterscheidet, können diese Zellen mithilfe eines ungeladenen Sukrose-Polymers (Biocoll) mit einer spezifischen Dichte von $1,077 \text{ g/ml}$ voneinander getrennt werden. Nach der Dichtegradientenzentrifugation befinden sich die Erythrozyten und tote Zellen in der unteren Phase des Biocolls, da sie durch ihre geringe Größe das Sukrose-Polymer passieren können. Granulozyten dringen in die Biocoll-Phase ein, während sich das Blutplasma oberhalb des Biocolls befindet. Die mononukleären Zellen (Monozyten, Lymphozyten und Thrombozyten) sammeln sich in der Interphase zwischen Plasma und Biocoll und können so abgenommen werden (vgl. Abb. 8).

Für diese Art der Isolation von PBMCs wurden die *buffy-coats* im ersten Schritt in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen zu gleichen Teilen mit PBS verdünnt und gemischt. In einem weiteren 50 ml Zentrifugenröhrchen wurden 20 ml Biocoll vorgelegt. Anschließend erfolgte das Aufsichten der Zellsuspension auf dem Biocoll (vgl. Abb. 8), wobei darauf geachtet wurde langsam und vorsichtig zu arbeiten, um die Biocoll-Schicht nicht zu verletzen, da sich sonst kein Zellgradient bildet. Es folgte eine Zentrifugation bei RT und 760 x g für 20 Minuten. Um den Gradienten nicht zu zerstören wurde bei der ersten Zentrifugation die Bremse der Zentrifuge ausgeschaltet. Nach der Zentrifugation wurde die Interphase mit den PBMCs entnommen und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Es folgten vier Waschschrte mit 20 ml PBS, wodurch die Zellen von Thrombozyten-Kontaminationen gereinigt wurden. Zum Schluss wurde die Zellzahl ermittelt (siehe 2.2.3.) und die PBMCs je nach Experiment bis zur weiteren Nutzung in RPMI Medium aufgenommen.

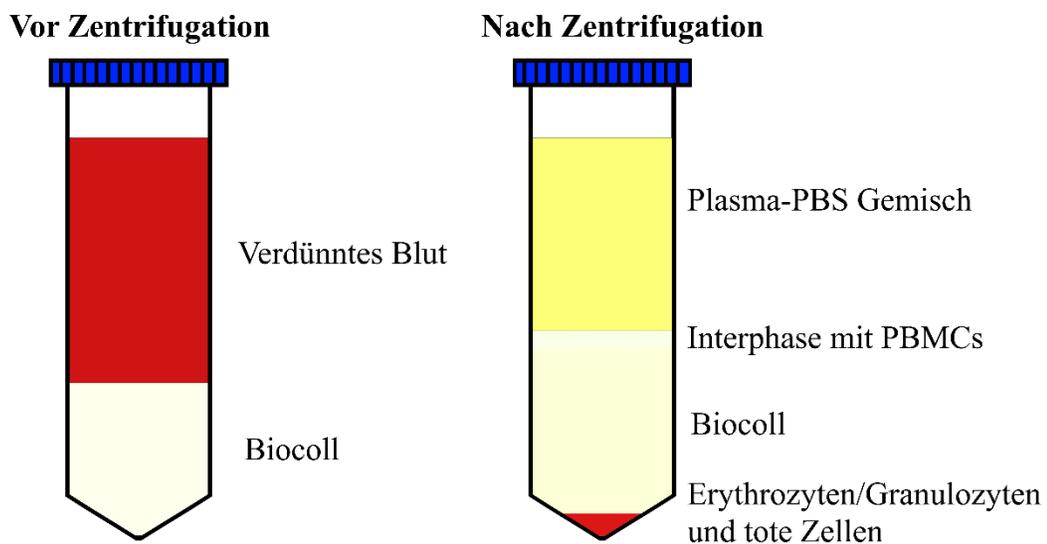


Abbildung 8: Isolierung von PBMCs aus *buffy-coats* über eine Biocoll-Dichtegradientenzentrifugation.

Tabelle 12: Biocoll.

Material	Hersteller
BIOCOLL (1,077 g/ml, isotonisch)	Biochrom GmbH, Berlin

2.2.5. Makrophagen Differenzierung

Die Experimente in dieser Arbeit wurden mit Makrophagen ($M\Phi$) durchgeführt, die *in vitro* aus isolierten Monozyten differenziert wurden. Diese Monozyten-abgeleiteten Makrophagen (*monocyte derived macrophages* – MDM) sind eine gute und anerkannte Alternative, zur Analyse von $M\Phi$.

Ausgangsmaterial für die Differenzierung von $M\Phi$ sind, wie im Abschnitt 2.2.4. erklärt, isolierte PBMCs. Nach der PBMC Isolation, wurden je 1×10^7 Zellen in sechs *wells* einer 6-well-Platte ausgesät. Die Zellkulturplatten wurden für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert, damit die Monozyten adhären können. Nach der Inkubation erfolgten zwei Waschschrte mit je 2 ml PBS mit anschließender Zugabe von 3 ml eines Differenzierungsmediums (vgl. Tab. 13). Das in diesem Medium enthaltene M-CSF ist dazu in der Lage, Monozyten zu $M\Phi$ werden zu lassen. Um MDMs zu erhalten wurden die Monozyten für sieben Tage im Brutschrank inkubiert, wobei ein Mediumwechsel an Tag drei und sechs erfolgte.

Für die Experimente wurden neben den, wie oben beschriebenen MDMs, auch M1- und M2-aktivierte $M\Phi$ verwendet. Die Aktivierung zu M1-/M2- $M\Phi$ wurde wie bei der Differenzierung, durch Zugabe eines Aktivierungs-Mediums, aus den davor erhaltenen MDMs ausgelöst (siehe Tab. 14). In diesem Aktivierungsmedium wurden die Zellen für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert.

Tabelle 13: Differenzierungsmedium für Makrophagen.

Komponente	Hersteller
88 % RPMI	Biochrom GmbH, Berlin
10 % FCS	Biochrom GmbH, Berlin
1 % L-Glutamin (200 mM)	Biochrom GmbH, Berlin
1 % Penicillin (100 U/ml) / Streptomycin (100 µg/ml)	Biochrom GmbH, Berlin
1x Natriumpyruvat; Gibco	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
1x MEM Non-essential Amino Acids; Gibco	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
100 ng/ml rh-M-CSF	ImmunoTools GmbH, Friesoythe

Tabelle 14: Aktivierungsmedien für Makrophagen.

Medium	Bestandteile	Hersteller
M1 Aktivierungsmedium	95 % RPMI	Biochrom GmbH, Berlin
	5 % FCS (fetales Kälberserum)	Biochrom GmbH, Berlin
	100 ng/ml LPS	ImmunoTools GmbH, Friesoythe
	20 ng/ml Interferon Gamma	ImmunoTools GmbH, Friesoythe
M2 Aktivierungsmedium	95 % RPMI	Biochrom GmbH, Berlin
	5 % FCS (fetales Kälberserum)	Biochrom GmbH, Berlin
	20 ng/ml Interleukin-4	ImmunoTools GmbH, Friesoythe

2.2.6. Phagozytose-Assay

Bei dem Phagozytose-Assay (Kokultur-Assay) wurden die MDMs mit der Tumorzelllinie LAN-1 kokultiviert. Das Experiment wurde mit drei MΦ-Typen durchgeführt, M0-/M1-/M2-MΦ. Die Zellen wurden mithilfe eines Durchflusszytometers analysiert. Hierfür wurden die Zellen nach der Kokultur mit Antikörpern angefärbt, die nur Moleküle der MΦ binden (CD14). Die Population der CD14-positiven Zellen wurde dann auf die entsprechenden Tumormoleküle untersucht.

Um genauer zu sein wurden im ersten Schritt des Assays die Tumorzellen (LAN-1) mit anti-GD2-AK (FITC gelabelt) angefärbt und danach erst die Kokultivierung mit den MΦ gestartet. Mit der „Vormarkierung“ der LAN-1 Zellen sollte verhindert werden, dass die anti-GD2-AK unspezifisch an die MΦ binden und es damit bei der späteren Analyse zu einem falsch-positiven Signal kommt. Nach der Kokultivierung wurden die Zellen mit einem anti-CD14-AK (PerCP gelabelt) angefärbt. CD14 ist ein Molekül, welches sich auf der Zelloberfläche der MΦ, nicht aber der LAN-1 Zellen befindet. Durch diese Färbung können die beiden Zellpopulationen in der FACS-Analyse voneinander unterschieden werden. Im letzten Schritt - direkt vor der durchflusszytometrischen Messung - wurden die Zellsuspensionen mit Trypanblau (TB) versetzt. Der Vitalfarbstoff TB kann die Zellmembran von lebenden Zellen nicht durchdringen und lagert sich deshalb an der Oberfläche der Zellen an. Er ist dazu in der Lage die von FITC ausgestrahlte Fluoreszenz zu *quenchen* (Trypanblau-*quenching*), sodass nur noch die FITC-markierten Antikörper fluoreszieren, welche sich in den Zellen befinden [149]. Durch die Zugabe von TB kann also unterschieden werden, ob die Tumorpartikel von den MDMs

internalisiert oder nur an ihre Oberfläche gebunden wurden. Abbildung 9 zeigt schematisch den Ablauf des Phagozytose-Assays.

Für die Kokultur wurden LAN-1 Zellen aus Zellkulturflaschen abgelöst, geerntet und gezählt. Die Zellen wurden in FACS-Puffer auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und für 1 h bei 4°C mit GD2-FITC ($1 \mu\text{g/ml}$) markiert. Während der Inkubation erfolgte die Verarbeitung der M Φ . Nach der Ernte und Zellzahlbestimmung wurden die M Φ in RPMI-Medium auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Je 1×10^5 Zellen (1:1 Verhältnis von *target:effector* Zellen) wurden für die Kokultur-Versuche eingesetzt. Die M Φ und die LAN-1 Zellen wurden zusammen in FACS-Röhrchen bei 37°C für 24 h, 4 h oder 0 h im Brutschrank inkubiert. Alle Inkubationen starteten zur gleichen Zeit und wurden nach Ablauf der jeweiligen Zeit im Dunkeln auf Eis gestellt, um die Phagozytose und Degradation der Zellen abzustoppen. Nach Ende der letzten Inkubation wurden alle Ansätze zwei Mal mit je 3 ml kaltem FACS-Puffer gewaschen und bei $400 \times g$ für fünf min bei 4°C zentrifugiert. Zur Oberflächenfärbung der Zellen wurde nach der Zentrifugation der Überstand abgeschüttet und die CD14-PerCP Antikörper-Lösung nach Angaben des Herstellers zugegeben (siehe Tab. 17). Die CD14-Antikörper wurden in der Zellsuspension resuspendiert und für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation und zweimaligem Waschen mit 3 ml FACS-Puffer, wurden die Proben mit einem Durchflusszytometer gemessen und analysiert. Zu den jeweiligen *quenching*-Kontrollen wurde direkt vor der Messung am Durchflusszytometer Trypanblau (TB) dazugegeben und resuspendiert. Die quantitative Bestimmung der Phagozytose wurde anhand der Durchflusszytometrie ermittelt, wobei sich die Menge der phagozytierten Tumorpartikel in der FITC-Fluoreszenzintensität widerspiegelt.

Tabelle 15: Verwendete Materialien Phagozytoseassay.

Material	Hersteller
FACS-Puffer	Becton Dickinson, Heidelberg
Trypanblau; Gibco	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe

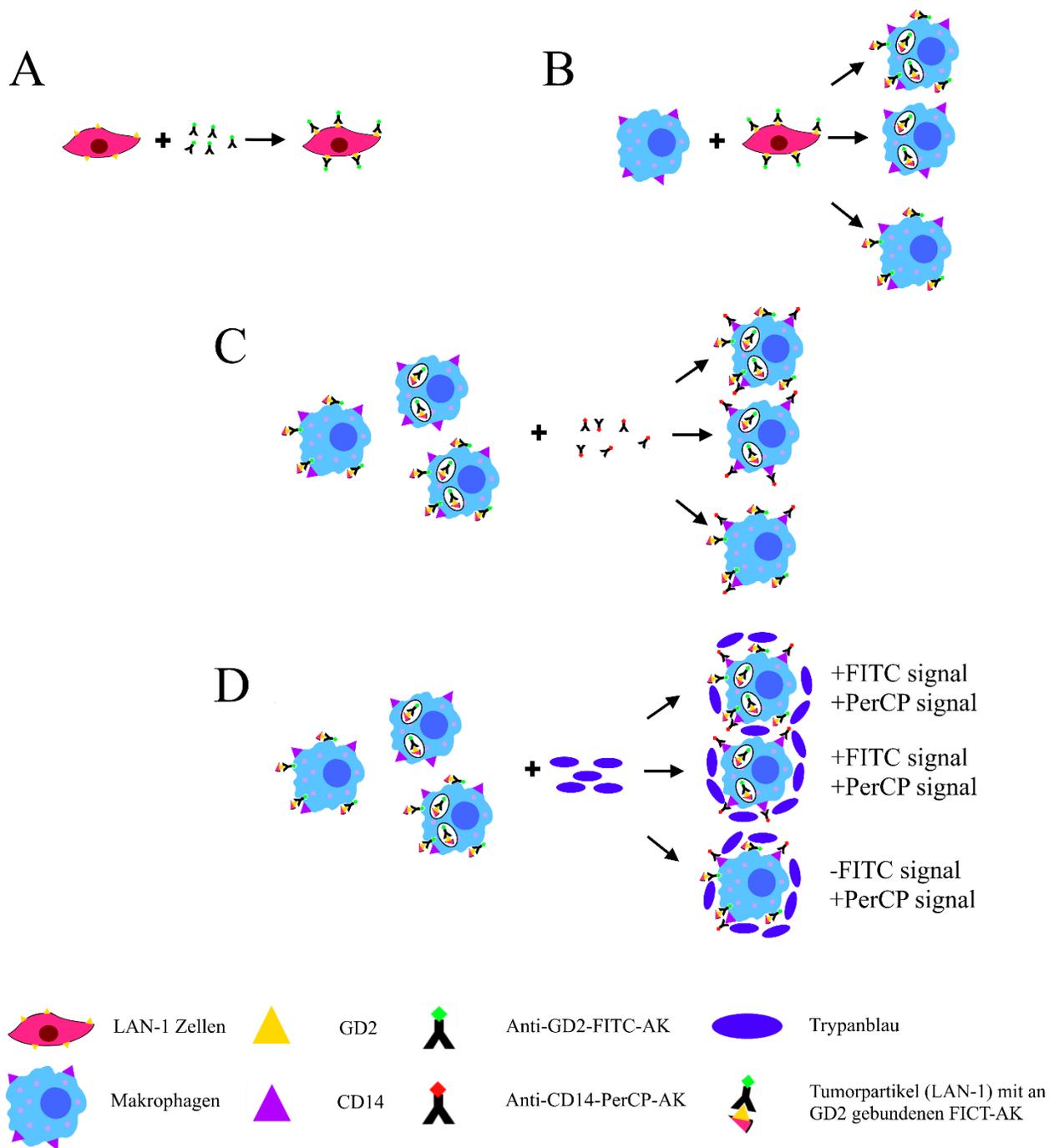


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Phagozytoseassays.

LAN-1 Zellen werden mit anti-GD2-AK (FITC gelabelt) markiert (A) und anschließend mit MΦ zusammen inkubiert (B). Dabei sind unter anderem drei Ereignisse denkbar: MΦ phagozytieren Tumorpartikel, Tumorpartikel mit AK werden von den MΦ auf der Zellmembran gebunden oder beides tritt gleichzeitig auf. Nach der Kokultivierung werden die Zellen mit einem anti-CD14-AK (PerCP gelabelt) angefärbt (C). Direkt vor der durchflusszytometrischen Messung wird Trypanblau zugegeben (D), welches nur die an der Oberfläche der MΦ gebundenen AK *quenched*, da TB nicht in lebende Zellen diffundieren kann. In der FACS-Analyse geben nur die MΦ ein FITC Signal, welche die Tumorpartikel phagozytiert haben.

2.2.7. Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated cell scanning* – FACS)

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur quantitativen und funktionellen Analyse von Einzelzellen in einer Zellsuspension. Sie erlaubt durch die hohe Messrate eine schnelle und repräsentative Stichprobe einer Zellpopulation. Die Messung beruht auf der Emission von optischen Signalen (Streulicht- und Fluoreszenzsignalen) seitens der Zellen, wenn diese einen Laserstrahl passieren. Die Zellsuspension wird über einen Unterdruck aus dem Proberöhrchen in eine Kapillare gesogen, in der sie von einer isotonen Pufferlösung (Trägerlösung) umgeben ist. Durch die hohe Flussgeschwindigkeit dieser Lösung und dem trichterförmigen Aufbau der Messzelle werden die Zellen vor dem ersten Messpunkt vereinzelt. Dieses Phänomen bezeichnet man als hydrodynamische Fokussierung: Die Zellen fließen wie an einer Perlenschnur aufgereiht durch die Kapillare und an den Messbereichen, in denen sich die Laserstrahlen befinden vorbei und können so einzeln gemessen werden. Bei Kontakt der Zellen mit dem einfallenden Laserstrahl wird das Licht in verschiedene Richtungen gestreut und von Detektoren registriert. Das dabei erzeugte Streu- und Fluoreszenzlicht wird separat detektiert. Die Streulichteigenschaften einer Zelle sind abhängig von Zellgröße, strukturellen Membraneigenschaften und intrazellulären Bestandteilen. Das Vorwärtsstreulicht (*forward side scatter*, FSC) welches den größten Anteil des Streulichts darstellt, dient als ein Maß für die Zellgröße, während das im rechten Winkel zur Lichtquelle gestreute Seitwärtslicht (*sideward light scatter*, SSC) mit der Granularität von Zellen korreliert. Mithilfe dieser physikalischen Parameter ist zunächst eine grobe Einteilung der Zellen nach morphologischen Kriterien möglich. Neben der Detektion des Streulichts werden auch von der Zelle ausgehende Fluoreszenzsignale gemessen. Mithilfe von fluoreszierenden Farbstoffen (Fluorochrome), die an spezifische Antikörper gekoppelt sind, können Zellen mit bestimmten Molekülen markiert werden, z.B. über bestimmte Oberflächenantigene oder intrazelluläre Proteine. Im Rahmen der vorliegenden Forschungsarbeit wurden die Fluorochrome Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Allophycocyanin (APC), Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP), APC-H7 und BrilliantViolette 421 (BV421) verwendet (vgl. Tab. 17). In Abbildung 10 sind die Fluoreszenzspektren der jeweiligen Fluorochrome dargestellt. Der spezifisch an den jeweiligen Molekülen bindende Fluorochrom-gebundene Antikörper wird mit Licht einer definierten Wellenlänge (monochromatischer Laser) bestrahlt und durch kurzfristige Absorption der

Lichtenergie angeregt. Im Anschluss daran emittiert es - bei Rückkehr der Elektronen in ihren Grundzustand - selbst Licht einer bestimmten Wellenlänge, welches über Spiegel- und Filtersysteme auf Photoverstärkerröhren (PMT – *photo multiplier tube*) geleitet und anschließend von Detektoren gemessen wird. Häufig können Farbstoffe über Licht der gleichen Wellenlänge angeregt werden, unterscheiden sich jedoch in ihren Emissionsspektren und können so gleichzeitig eingesetzt werden. Der Einsatz von Fluorochromen ermöglicht multiparametrische Messungen, die differenziertere Aussagen über die Morphologie ebenso wie funktionelle Analysen von Zellen zulassen [150]. In dieser Arbeit wurden alle durchflusszytometrischen Messungen mit dem CANTOII (BD Biosciences) durchgeführt. Für die Analysen wurde die FACS Diva Software v8.0 (BD Biosciences) verwendet.

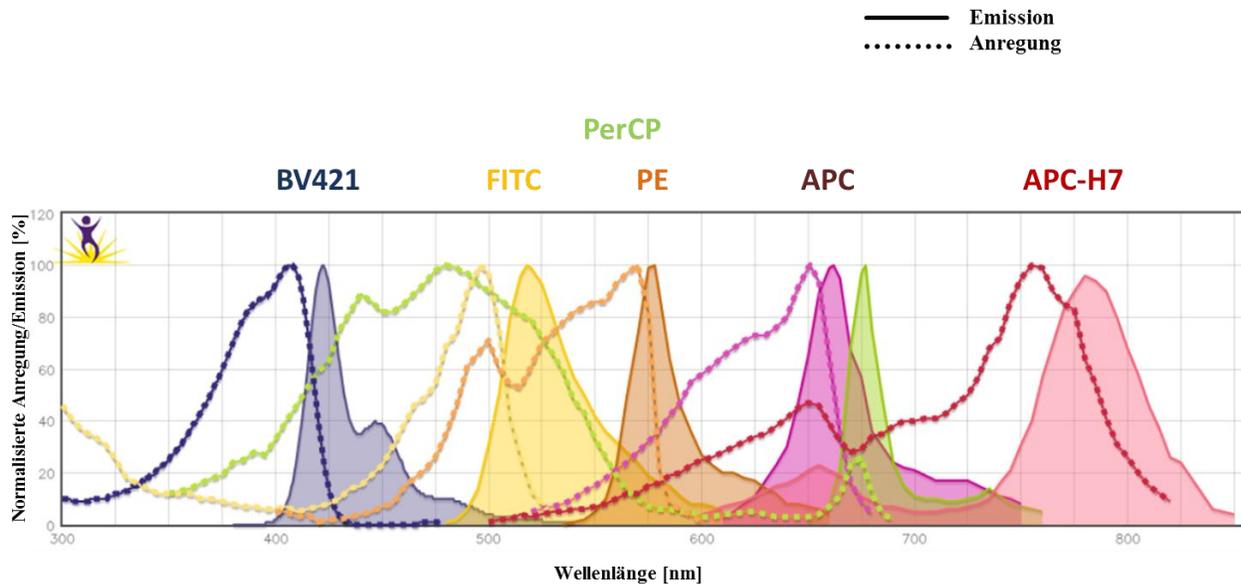


Abbildung 10: Anregungs- und Emissionsspektren der in dieser Arbeit verwendeten Fluorochrome.

BV421: Brilliant Violet 421; FITC: Fluorescein-isothiocyanat; PerCP: Peridinin-Chlorophyll-Protein; PE: Phycoerythrin; APC: Allophycocyanin; APC-H7: APC-Cyanin Tandem Fluorochrom. Die Abbildung wurde mithilfe des BioLegend Spectra Analyzer erstellt. (Quelle: Modifiziert nach biolegend.com)

Tabelle 16: FACS-Instandhaltungs-Materialien.

Material	Hersteller
FACS-Flow	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Rinse	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Safe	Becton Dickinson, Heidelberg
Cell WASH solution	Becton Dickinson, Heidelberg

2.2.7.1. Tumormarker Expression auf Zelllinien (TKTL1, Apo10 und GD2)

Durchflusszytometrische Analysen können wie oben beschrieben genutzt werden, um das Vorhandensein oder die Expression bestimmter Moleküle in Zellen oder auf der Oberfläche von Zellen zu untersuchen. In diesem Versuch wurden die in Abschnitt 2.1.2. aufgeführten Zelllinien auf die Expression von TKTL1 und Apo10 analysiert. Zusätzlich wurde die Abundanz des Markers GD2 in Neuroblastom-Zelllinien bestimmt.

Da GD2 ein membrangebundenes Molekül ist, reicht eine Oberflächenmarkierung für diese Färbung aus. Dazu wurden die Zellen geerntet, gezählt, zwei Mal mit 3 ml FACS-Puffer gewaschen und anschließend auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Für die Färbung wurden 1×10^5 Zellen verwendet, welche in ein FACS-Röhrchen mit 15 μ l (1:100 verdünnt) vorgelegtem anti-GD2-Antikörper (anti-GD2-FITC) gegeben wurden. Für die Bindung der Antikörper an GD2 wurden die Zellen 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden nach der Inkubation durch zweimaliges Waschen mit 3 ml FACS-Puffer entfernt. Kurz vor der Messung erfolgte eine Lebend-Tot-Färbung der Zellen mit drei μ l des Avitalfarbstoffes 7-AAD. Die Zellen werden 5 min bei RT im Dunkeln mit dem Farbstoff inkubiert und dann ohne Waschen am Durchflusszytometer gemessen.

Bei TKTL1 und Apo10 handelt es sich um zwei intrazelluläre Proteine, weshalb die Zellen erst permeabilisiert werden müssen, bevor die Antikörper hinzugegeben werden. Die Zellen wurden geerntet, gezählt, zwei Mal mit 3 ml FACS-Puffer gewaschen und anschließend auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. 1×10^5 Zellen wurden pro FACS-Röhrchen bzw. Färbung eingesetzt. Für die intrazelluläre Färbung wurden die Zellen erst fixiert. Dazu wurden 200 μ l Fixierlösung zu den Zellen gegeben, resuspendiert und für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Permeabilisierung der Zellmembran, wobei die Zellen mit je 1 ml Permeabilisierungspuffer zweimal gewaschen und bei 400 x g für 5 min bei RT zentrifugiert wurden. Nach dem Waschen wurde der Überstand verworfen, die intrazellulären Antikörper anti-TKTL1 (PE) und anti-Apo10 (FITC) in die Zellsuspension (jeweils 10 μ l) gegeben und diese resuspendiert. Die Zellen wurden für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert und anschließend einmal mit 1 ml Permeabilisierungspuffer inkubiert. Auch bei dieser Färbung wurden kurz vor der Messung jeweils drei μ l 7-AAD als Lebend-Tot Farbstoff hinzugegeben und die Zellen damit 5 min bei RT im Dunkeln inkubiert, bevor sie am Durchflusszytometer gemessen wurden.

2.2.7.2. Epitop Detektion in Monozyten (EDIM)

Für den EDIM-Test wurden den an der Studie teilnehmenden Patienten und Probanden 2,7 ml Blut in EDTA-Röhrchen entnommen, diese Proben pseudonymisiert und am folgenden Tag weiterverarbeitet. Nach der Durchführung des Färbeprotokolls (siehe unten) wurden die Vollblutproben durchflusszytometrisch analysiert. Die Einschluss- und Ausschlusskriterien der an der Studie Teilnehmenden Patienten werden in Abschnitt 2.4. aufgeführt.

Zur Durchführung des EDIM-Tests wurden 110 µl Blut zu dem in FACS-Röhrchen vorgelegtem Antikörper-Mix pipettiert (vgl. Tab. 18), gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Zugabe von 100 µl IntraPrep Reagenz 1. Die Röhrchen wurden manuell durch 3-maliges ratschen an dem Röhrchenständer gemischt und wieder 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Röhrchen mit 3,5 ml CellWash gewaschen und bei 300 x g für 5 min bei RT zentrifugiert. Um die Zellpellets zu resuspendieren wurden die FACS-Röhrchen für 5 min bei RT inkubiert und danach vorsichtig mit einer Pipette gemischt. Im nächsten Schritt wurden 100 µl des IntraPrep 2 Reagenzes hinzugegeben, die Röhrchen wieder manuell geschüttelt und für 5 min bei RT inkubiert. Im nächsten Schritt wurden jeweils 10 µl der intrazellulären Antikörper anti-TKTL1 (PE) und anti-Apo10 (FITC) oder 15 µl (1:100 verdünnt) anti-GD2 (FITC) zu der resuspendierten Zellsuspension gegeben und durch leichtes Schütteln gemischt. Die Proben wurden nun für 20 min bei RT inkubiert und anschließend zwei Mal mit 3,5 ml CellWash gewaschen und bei 300 x g für 5 min bei RT zentrifugiert. Nach Abschütten des Überstandes wurden die Zellpellets durch dreimaliges „Ratschen“ der Röhrchen gelöst und diese mit 300 µl Cell Wash aufgefüllt. Vor der Messung wurden die Proben für 30 min bei RT inkubiert und danach sofort an einem Durchflusszytometer gemessen. Es wurden immer 1000 CD14⁺/CD16⁺ Zellen (aktivierte Monozyten/MΦ) analysiert. Alle Inkubationen erfolgten bei RT und im Dunkeln. In Abbildung 11 wird die FACS-*gating*-Strategie des EDIM-Tests erläutert.

Tabelle 17: Zusammenstellung aller Antikörper die für FACS-basierte Analysen eingesetzt wurden.

Antikörper	Spezies	Klon	Hersteller
anti-CD14-PerCP	Maus	MΦP9	Becton Dickinson, Heidelberg
anti-CD16-APC	Maus	B73.1	Becton Dickinson, Heidelberg
anti-CD45-APC H7	Maus	2D1	Becton Dickinson, Heidelberg
anti-GD2 FITC		Delta 2	Zyagnum AG, Pfungstadt
anti-CD163-BV421	Maus	GHI/61	BD Biosciences, Heidelberg
anti-TKTL1	Hase		Zytomed Systems, Berlin
anti-Apo10	Hase		Zyagnum AG, Pfungstadt

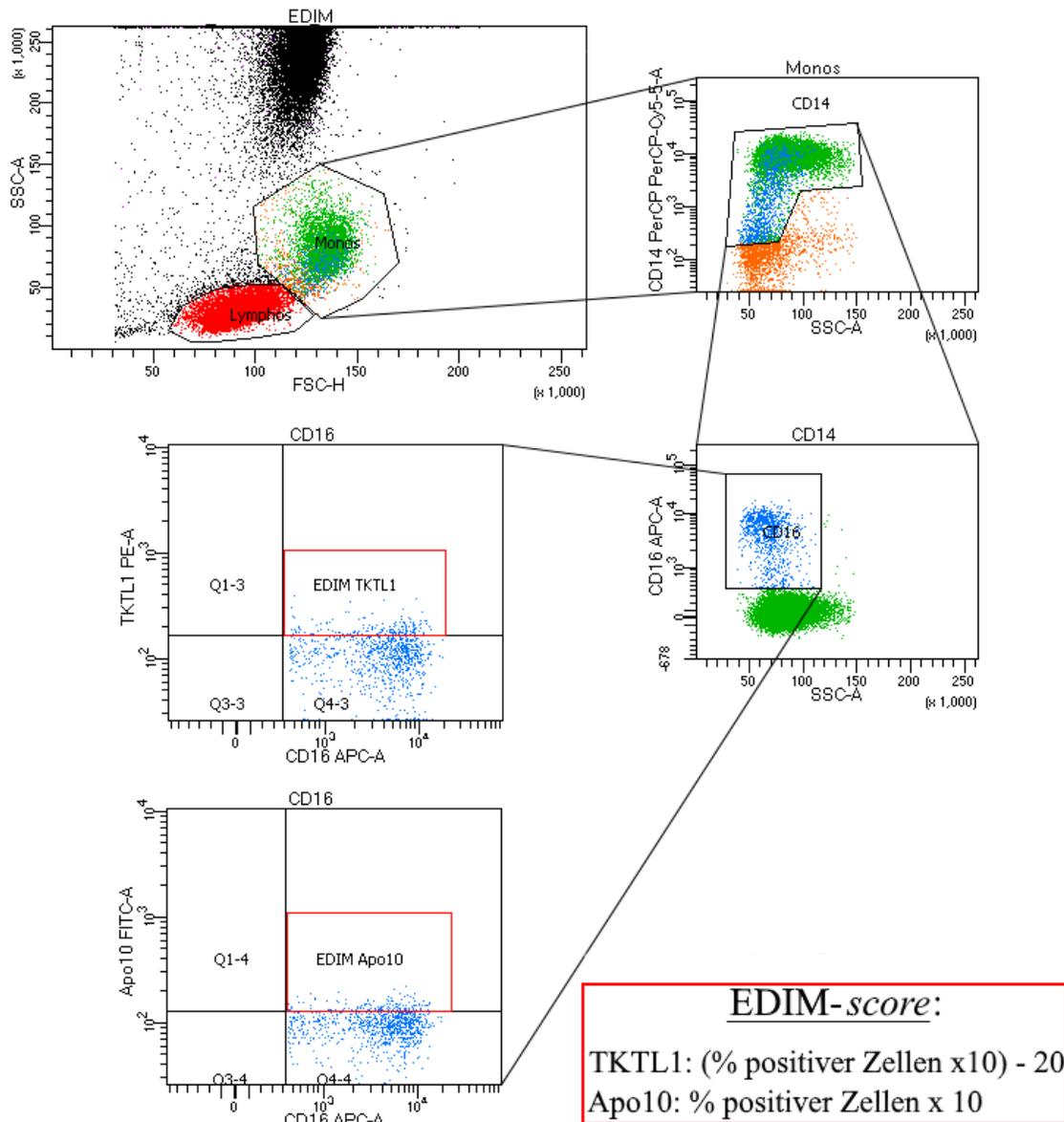


Abbildung 11: EDIM-gating-Strategie.

Diese beispielhafte FACS-Messung einer Probe, die anhand des EDIM-Tests angefärbt und ausgewertet wurde, dient zur Erläuterung der FACS-gating-Strategie des EDIM-Tests. In dem ersten Schritt wird die Monozyten-Population anhand ihrer Größe und Granularität (FSC und SSC) von den anderen getrennt. Diese Zellpopulation enthält neben den Monozyten zusätzlich weitere Zellen, weshalb sie auf CD14-Positivität untersucht wird. Durch Setzen eines Gates auf die CD14-positiven Zellen werden sich im weiteren Verlauf nur noch Monozyten in der Analyse befinden. Um nur die aktivierten Monozyten/Makrophagen zu betrachten, folgt ein weiteres gating auf CD16. Diese CD14/CD16-doppelpositiven Zellen werden dann auf die Tumormarker (hier: TKTL1 und Apo10) untersucht. Wie in dem roten Kasten gezeigt, berechnet sich der EDIM-score aus dem Prozentsatz der für die jeweiligen Tumormarker-positiven Zellen. EDIM: Epitop Detektion in Monozyten; FSC: Vorwärtstreulicht; SSC: Seitenstreulicht; PerCP: Peridinin-Chlorophyll-Protein; APC: Allophycocyanin; PE: Phycoerythrin; FITC: Fluorescein-isothiocyanat; Lymphos: Lymphozyten; Monos: Monozyten.

Tabelle 18: Zusammensetzung des AK-Mixes für den EDIM-Test.

Antikörper	Volumen in μl
Anti-CD14-PerCP	5
Anti-CD16-APC	1,25
Anti-CD45-APC H7	1,25
Anti-CD163-BV421	1,25

2.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.1. RNA-Extraktion aus Zelllinien

Das Prinzip der in dieser Arbeit eingesetzten Methode für die RNA-Extraktion basiert auf der Nutzung von chaotropen Salzen und Silica-Membranen. Der eingesetzte Lysepuffer (RLT Puffer) enthält eine hohe Konzentration des chaotropen Salzes Guanidiniumthiocyanat (GATC), welches hydrophile Bindungen unterbricht. Dies führt zur Lyse der Zellmembran, linearisiert Nukleinsäuren und destabilisiert gleichzeitig RNasen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration kann die RNA außerdem an der positiv geladenen Silica-Membran, der bei der Aufreinigung benötigten Säulen, binden. Durch Waschschrte werden andere Moleküle wie Lipide und Proteine entfernt. Um die RNA zu ernten wird mit RNase freiem Wasser eluiert.

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen wurde je nach Zelllinie, eine bestimmte Zellzahl (vgl. Tab. 11) in 6-well Platten ausgesät. Nach der Lyse wurden die Lysate zur Homogenisierung auf QIAshredder pipettiert und entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -80 °C eingefroren. Die Isolierung der Gesamt-RNA aus den Lysaten erfolgte dann mithilfe des RNeasy Mini Kits von Qiagen nach Angaben des Herstellers.

Tabelle 19: Materialien für eine RNA-Extraktion.

Material	Hersteller
RNeasy Mini Kit	QUIAGEN, Hilden
RNAlater Stabilisierungs Reagenz	QUIAGEN, Hilden
QIAshredder	QUIAGEN, Hilden
RLT Puffer	QUIAGEN, Hilden

2.3.2. RNA Extraktion aus Gewebeproben

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus Gewebeproben wurde analog (siehe Abschnitt 2.4.1) zur Isolation der RNA aus Zellen durchgeführt. Es wurden nur Gewebeproben verwendet, welche nach der Entnahme aus dem Patienten mit *RNA-later* überschichtet und für 24 h bei 4 °C inkubiert wurden. *RNA-later* ist ein RNA Stabilisierungsreagenz, welches Gewebe schnell durchdringt und sowohl RNA als auch die Expressionsmuster stabilisieren soll. Vor der Lyse des Gewebes mit RLT-Puffer, erfolgte ein einminütiger mechanischer Homogenisierungsschritt mit einem Homogenisierer. Dieser zusätzliche Homogenisierungsschritt führt zu einer effizienteren Lyse des Gewebes. Nach diesem Schritt wurden die Proben wie in Abschnitt 2.3.1. erklärt, behandelt.

2.3.3. Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Konzentration der RNA-Lösungen wurde mittels spektrophotometrischer Messung der Extinktion E_λ bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm an einer NanoDrop-Apparatur bestimmt. Diese Methode basiert auf dem Prinzip des Lambert-Beerschen Gesetzes.

$$E_\lambda = \log\left(\frac{I_0}{I_I}\right) = \varepsilon_\lambda * c * d$$

- E_λ : Extinktion bei bestimmter Wellenlänge λ
 I_0 : Intensität des emittierten Lichts (Strahlungsquelle, [$W * m^{-2}$])
 I_I : Intensität des transmittierten Lichts [$W * m^{-2}$]
 ε_λ : molarer Extinktionskoeffizient [$M^{-1} * cm^{-1}$]
 c : Konzentration der absorbierenden RNA [$\frac{mol}{L}$]
 d : Schichtdicke [cm]

Die Extinktion der RNA wird durch die einzelnen, als Chromophore wirkenden Nucleoside bestimmt. Ein Extinktionswert $E_{260\text{nm}}=1$ entspricht dabei $40 \mu\text{g/ml}$ RNA. Bei der Konzentrationsbestimmung von RNA misst man zusätzlich die optische Dichte bei 280 nm , dem Absorptionsmaximum von Proteinen. Das Verhältnis von $E_{260\text{nm}}/E_{280\text{nm}}$ gibt Aufschluss über den Reinheitsgrad der RNA-Präparation, wobei ein Wert von $2,0$ für reine RNA steht und Werte, die darunter liegen deuten auf Verunreinigungen mit genomischer DNA, Proteinen und aromatischen Substanzen hin. Für die Messung wurde zunächst als Referenz der Nuklease-freies H_2O verwendet und nachfolgend die Extinktion der RNA-Lösung bestimmt.

2.3.4. Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung des DNA-Gehaltes einer Lösung basiert auf dem in Abschnitt 2.3.3. beschriebenen Prinzip. Auch hier wird die Extinktion durch die einzelnen Nucleoside bestimmt. Der Unterschied ist, dass bei der DNA Messung der Extinktionswert $E_{260\text{nm}}=1$ einer Konzentration von $50 \mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA entspricht. Auch hier gibt das Verhältnis von $E_{260\text{nm}}/E_{280\text{nm}}$ Aufschluss über den Reinheitsgrad der DNA-Präparation. Ein Wert von $1,8$ steht für reine DNA, Werte $>1,8$ deuten auf Kontaminationen mit RNA und Werte $<1,8$ auf Kontaminationen durch Proteine, Peptide, Kohlenhydrate und Phenolate (auch durch Messung der Extinktion bei $\lambda 230 \text{ nm}$ detektierbar) hin. Für die Messung wurde zunächst als Referenz das Nuklease-freie H_2O verwendet und nachfolgend die Extinktion der DNA-Lösung bestimmt.

2.3.5. PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Die PCR ist eine weit verbreitete Technik, um gezielt DNA-Sequenzen exponentiell zu amplifizieren. Dafür werden DNA als *template*, sequenzspezifische Primer zur Bestimmung der Zielsequenz und eine hitzebeständige Polymerase zur Amplifikation benötigt [151].

Der Ablauf der Reaktion ist in mehrere Schritte unterteilt. Im ersten Schritt, dem Denaturierungsschritt, wird die Temperatur auf $95 \text{ }^\circ\text{C}$ erhöht. Bei dieser Temperatur werden die Sekundärstrukturen des *templates* und der Primer aufgelöst und zusätzlich die Einzelstränge voneinander getrennt. Nach der Denaturierung erfolgt die *annealing*-Phase, bei der die Primer

spezifisch, anhand ihrer Sequenz, mit den dazu komplementären *template*-Sequenzen hybridisieren. Dieser Komplex bildet den Startpunkt für die Elongation durch die DNA-abhängige-DNA-Polymerase.

Die primerspezifische Hybridisierungstemperatur T_m ist in der *annealing*-Phase essentiell und wird durch den Anteil der Nukleotide A/T und G/C bestimmt. Mit folgender Formel kann die Hybridisierungstemperatur T_m annähernd berechnet werden [152]:

$$T_m = 4^{\circ}\text{C} * (G_n + C_n) + 2^{\circ}\text{C} * (A_n + T_n)$$

T_m :	primerspezifische Hybridisierungstemperatur [$^{\circ}\text{C}$]
G_n :	Anzahl n der enthaltenen Desoxyguanosinmonophosphate (dGMP)
C_n :	Anzahl n der enthaltenen Desoxycytidinmonophosphate (dCMP)
A_n :	Anzahl n der enthaltenen Desoxyadenosinmonophosphate (dAMP)
T_n :	Anzahl n der enthaltenen Desoxythymidinmonophosphate (dTMP)
4°C :	Temperaturfaktor pro dGMP/dCMP
2°C :	Temperaturfaktor pro dAMP/dTMP

Im Elongationsschritt amplifizieren die hitzestabilen Polymerasen die Zielsequenz [153]. Dafür wird in der Reaktion das Temperaturoptimum der eingesetzten Polymerase eingestellt. Mit dem Primer als Startpunkt synthetisiert sie einen neuen DNA-Strang in 5'-3' Orientierung. Die Schritte Denaturierung, *annealing* und Elongation werden mehrfach wiederholt, um eine hohe Kopienzahl des gewünschten Produktes zu erhalten. Abschließend erfolgt eine finale Elongationsphase, in der alle unfertigen Amplifikationsreaktionen vollendet werden sollen.

In dieser Arbeit wurden verschiedene PCR Techniken verwendet, die im Folgenden genauer erläutert werden.

2.3.5.1. PCR zu Sequenzierungszwecken

Die in Abschnitt 2.3.7. erhaltenen DNA-Proben wurden für die Analyse an ein Sequenzierlabor verschickt, um die genaue DNA-Sequenz zu bestimmen. Da die Sequenzen der zur Sequenzierung versendeten Proben korrekt sein müssen, wurde für diese PCR die *Phusion* Polymerase verwendet. Zusätzlich zu der 5'-3' Polymerase-Aktivität besitzt diese Polymerase eine 3'-5' Exonuklease Aktivität (*proof reading*), weshalb sie eine sehr hohe Genauigkeit aufweist. Verglichen mit der *Taq*-Polymerase hat sie eine 50x und verglichen mit der *Pfu*-Polymerase eine 6x geringere Fehlerrate, weshalb sie sich besonders für diese Anwendung eignet. Tabelle 20 und 21 zeigen die Einstellungen des Thermocyclers und die Zusammensetzung des PCR Ansatzes für die *Phusion* PCR.

Tabelle 20: Typische Reaktion einer PCR für Sequenzierungszwecken.

Komponente	20 µl Reaktion	50 µl Reaktion	Endkonzentration	Hersteller
Nuklease-freies Wasser	Bis 20 µl	Bis 50 µl		
5x <i>Phusion</i> HF Puffer	4 µl	10 µl	1x	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
10 mM dNTPs	0,4 µl	1 µl	200 µM	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Steinheim
10 µM Forward Primer	1 µl	2,5 µl	0,5 µM	
10 µM Reverse Primer	1 µl	2,5 µl	0,5 µM	
Template DNA	Variabel	Variabel	<250 ng	
<i>Phusion</i> Polymerase	0,2 µl	0,5 µl	1 Unit/50 µl PCR	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe

Tabelle 21: Thermocycler-Einstellungen für die PCR zu Sequenzierungszwecken.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	
Initiale Denaturierung	98	60	35 Zyklen
Denaturierung	98	10	
Annealing	54	20	
Elongation	72	15	
Finale Elongation	72	300	
Ende	4		

2.3.5.2. Quantitative reverse Transkriptase PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR ist eine Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren in einer Probe [154]. Normalerweise ist die Quantifizierung von Nukleinsäuren aufgrund ihrer geringen Mengen in den zu untersuchenden Proben problematisch. Durch die PCR ist man dazu in der Lage die gewünschte Nukleinsäure zu amplifizieren und somit die quantitative Analyse zu ermöglichen. Das in dieser Arbeit genutzte Verfahren zur Quantifizierung von Genexpression ist die *real-time* PCR. Mit dieser Technik wird die Akkumulation, der bei der PCR entstehenden Produkte in Echtzeit verfolgt. Somit kann die exponentielle Phase der Reaktion gefunden werden, welche für eine Quantifizierung genutzt wird.

Um die Expression von Genen quantitativ zu analysieren, muss mRNA zuerst über eine reverse Transkription (rT) in cDNA umgeschrieben und diese dann in einer herkömmlichen PCR amplifiziert werden. Das Prinzip der rT basiert auf der Nutzung einer RNA-abhängigen-DNA-Polymerase (reverse Transkriptase), die mithilfe von *random* hexameren Primern die sich in der Probe befindende Gesamt-RNA in cDNA umschreibt. Abschließend erfolgt ein Denaturierungsschritt, um die reverse Transkriptase zu inaktivieren.

Nach der rT erfolgt die PCR zur Quantifizierung der DNA. Um die Produktakkumulation zu bestimmen, wird bei der *real-time* PCR nach jedem Zyklus die Fluoreszenzlichtemission gemessen, welche proportional zur Produktmenge zunimmt. Die Änderung der Fluoreszenz über die Zeit wird genutzt, um die Menge des produzierten Amplikons zu berechnen. Der in dieser Arbeit verwendete Fluoreszenzfarbstoff ist SYBR-Green I. Er ist ein unsymmetrischer Cyaninfarbstoff, welcher sensitiv für dsDNA ist. Dabei interkaliert der Farbstoff nicht, sondern bindet sequenzunspezifisch in der kleinen Furche der dsDNA. In Gegenwart von dsDNA wird SYBR-Green I mit Blaulicht (480 nm) angeregt und hat ein Emissionsmaximum bei 520 nm. Liegt der Farbstoff ungebunden vor, so weist er eine geringe Fluoreszenz in der Lösung auf. Bindet er aber dsDNA, erhöht sich die Fluoreszenz um das 1000-fache. Dadurch wird angenommen, dass das Fluoreszenzsignal proportional zu der Produktmenge ist. Dieses Signal wird dann zur Quantifizierung genutzt.

Um die Quantifizierung besser zu beschreiben ist in Abbildung 12 ein typisches Amplifikationsdiagramm einer *real-time* PCR dargestellt. Auf der Y-Achse wird das Fluoreszenzsignal der Amplifikationsreaktion und auf der X-Achse die Zyklusnummer der PCR

angezeigt. Die Reaktion teilt sich in eine exponentiellen und in eine Plateau Phase auf. In der exponentiellen Phase verdoppeln sich die Produkte in jedem Zyklus. Zu einer Plateauphase kommt es erst wenn die Nukleotide aufgebraucht sind oder die Polymerase an Aktivität verliert. Am Anfang der exponentiellen Phase ist aufgrund der geringen Menge an Produkt das Fluoreszenzsignal nur so hoch wie das Hintergrundsignal, wodurch der Fluoreszenzanstieg nicht detektierbar ist. Ist genug Produkt entstanden, kann das Fluoreszenzsignal detektiert werden. Der Zyklus bei dem das möglich ist wird *threshold cycle* C_T (Schwellenwert Zyklus) genannt. Da der C_T Wert in der exponentiellen Phase gemessen wird, kann mit ihm sehr genau die Anfangsmenge des eingesetzten Templates berechnet werden.

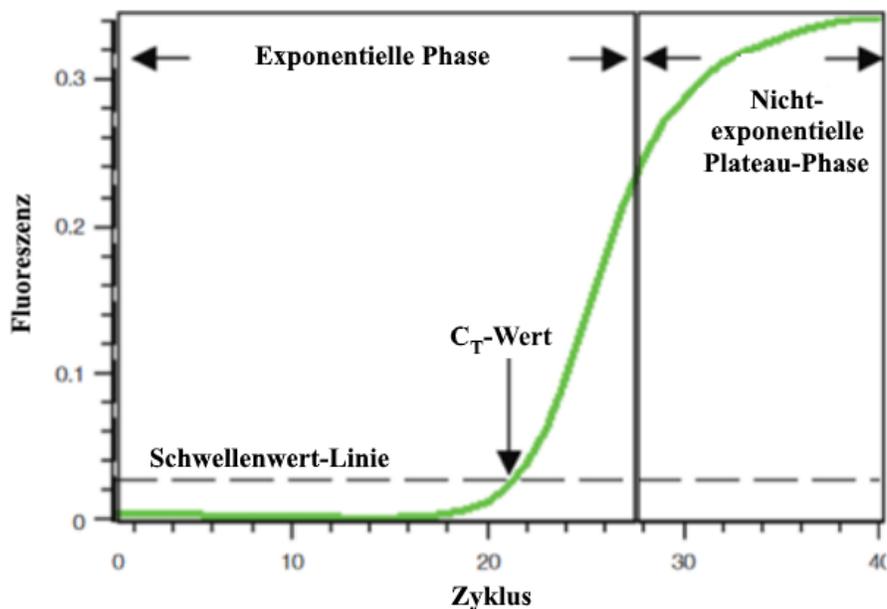


Abbildung 12: Amplifikationsdiagramm einer *real-time* PCR.

Typisches Amplifikationsdiagramm einer *real-time* PCR (Quelle: Modifiziert nach [146])

Bei der Analyse der Ergebnisse einer *real-time* PCR unterscheidet man zwischen der absoluten und der relativen Quantifizierung.

Da in dieser Arbeit nur die relative Quantifizierung genutzt wurde, wird die absolute Quantifizierung nur kurz erläutert. Mit der absoluten Quantifizierung kann die Menge der

untersuchten Nukleinsäure bestimmt werden, wobei die C_T Werte der Probe mit C_T Werten einer Standardreihe verglichen werden, bei der die Konzentrationen bekannt sind.

In der relativen Quantifizierung werden die C_T Werte mit Werten einer Kontrolle verglichen und das Verhältnis der Probe zur Kontrolle bestimmt. Als Kontrollen können hierbei gesundes Gewebe oder normale Zellen dienen.

Da nicht garantiert ist, dass in jeder Probe dieselbe Menge an RNA eingesetzt wurde und damit die C_T -Werte miteinander verglichen werden können, müssen die Ergebnisse normalisiert werden. Für die Normalisierung bedient man sich der Expression eines Referenzgens. Dieses Gen muss eine konstante Expression in allen untersuchten Proben aufweisen und die Expression darf nicht durch die Behandlung der Experimente beeinflusst werden. Das in dieser Arbeit verwendete Referenzgen ist *TBP* (*TATA sequence binding protein*).

In dieser Arbeit wurden die Analysen der relativen Genexpression nach der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak) Methode ausgewertet. Dafür müssen die C_T Werte des untersuchten und des Kontrollgens zuerst auf das Referenzgen normalisiert werden.

$$\Delta C_{T(\text{Probe})} = C_{T(\text{Probe})} - C_{T(\text{Referenzgen, Probe})} \quad \Delta C_{T(\text{Kontrolle})} = C_{T(\text{Kontrolle})} - C_{T(\text{Referenzgen, Kontrolle})}$$

Dann wird das ΔC_T der Probe zu dem ΔC_T der Kontrolle normalisiert.

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{Probe})} - \Delta C_{T(\text{Kontrolle})}$$

Zuletzt wird folgende Formel eingesetzt, um das Verhältnis der Expression zu berechnen:

$$2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Das Ergebnis ist eine x-Fache Steigerung oder Verringerung der Expression im Vergleich zu der gewählten Kontrolle.

Die RNA wurde mit dem *high capacity cDNA reverse transcription* Kit zu cDNA umgeschrieben. 2000 ng RNA wurden pro Probe in der reversen Transkription eingesetzt und nach folgendem Schema pipettiert (siehe Tab. 22).

Tabelle 22: Reaktionsansatz und Reaktionsbedingungen für eine rT.

Komponente	20 µl Reaktion	Hersteller	Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
10x RT Puffer	2 µl	Promega GmbH, Mannheim	1	25	10
25x dNTP Mix (100 mM)	0,8 µl	Promega GmbH, Mannheim	2	37	120
10x Random Hexamere Primer	2 µl	Promega GmbH, Mannheim	3	85	5
MultiScribe Reverse Transcriptase	1 µl	Promega GmbH, Mannheim	4	4	∞
RNase Inhibitor	1 µl	Promega GmbH, Mannheim			
RNA (2000 ng)	10 µl				
Nuklease freies Wasser	3,2 µl				

Nach der rT erfolgte die qPCR, welche mit dem GoTaq qPCR Master Mix genau nach Angaben des Herstellers durchgeführt wurde. Die Komponenten der PCR sowie die Einstellungen des Thermocyclers sind in Tabelle 23 – 25 dargestellt.

Tabelle 23: Reaktionsansatz für die qPCR.

Komponente	20 µl Reaktion	Hersteller
2x Go Taq Mastermix	10 µl	Promega GmbH, Mannheim
FWD Primer (10 µM/µl)	1 µl	
REV Primer (10 µM/µl)	1 µl	
cDNA	2 µl	
Wasser	6	

Tabelle 24: Thermocycler-Einstellungen für die TKTL1 qPCR.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Schmelzkurve
Initiale	95	300	60 °C 5s
Denaturierung			
Denaturierung	95	15	95 °C 5s
Annealing	60	30	40 Zyklen
Elongation	72	30	
Finale Elongation	72	300	
Ende	4	∞	

Tabelle 25: Thermocycler-Einstellungen für die Apo10 qPCR.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Schmelzkurve	
Initiale	95	300	60 °C	5s
Denaturierung	95	15	95 °C	5s
Denaturierung				
Annealing	58	30	40 Zyklen	
Elongation	72	30		
Finale Elongation	72	300		
Ende	4	∞		

2.3.5.3. Touchdown-PCR (TD-PCR)

Die Amplifikation von Genen aus komplexen Genomen führt in manchen Fällen zur Entstehung unspezifischer Nebenprodukte. Diese Nebenprodukte werden häufig stärker amplifiziert als das gewünschte spezifische Produkt. Mithilfe der TD-PCR ist es möglich diese Nebenprodukte zu verringern [155]. Dafür wird in den ersten Schritten der PCR eine hohe *annealing*-Temperatur gewählt, welche zu einer hohen Spezifität der Primerbindung an das Template führt. Die *annealing*-Temperatur wird nach jedem zweiten Zyklus um 2° C gesenkt, bis die errechnete Schmelztemperatur der Primer erreicht ist. Nachdem die Schmelztemperatur erreicht wurde, folgen 35 weitere Zyklen, um das spezifisch entstandene Produkt zu amplifizieren. Um die Spezifität zusätzlich zu erhöhen kann eine *Hot Start* Polymerase eingesetzt werden, die unterhalb ihres Temperaturoptimums nicht aktiv ist.

Die TD-PCR wurde verwendet, um die TKTL1-Promotorregion nach Bisulfit-Konversion (BS-Konversion) in der genomischen DNA zu amplifizieren. Für die PCR wurde die EpiMark *Hot Start Taq* DNA Polymerase verwendet, welche speziell für die Amplifikation von BS-DNA entwickelt wurde. Die für die PCR eingesetzten Primer wurden mit *MethPrimer* entworfen und sind in Tabelle 28 dargestellt [156]. Die Tabellen 26 und 27 zeigen die Reaktionskomponenten und die Einstellungen des Thermocyclers für die TD-PCR.

Tabelle 26: Thermocycler-Einstellungen für die TD-PCR.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	
Initiale Denaturierung	95	300	
Denaturierung	95	30	2 Zyklen/ <i>annealing</i> -temperatur
Annealing	56-64	30	
Elongation	68	60	35 Zyklen bei letzter <i>annealing</i> -temperatur (56° C)
Finale Elongation	68	300	
Ende	4	∞	

Tabelle 27: Reaktionsansatz für die TD-PCR.

Komponente	25 µl Reaktion	Hersteller
5x EpiMark Puffer	5 µl	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
10 mM dNTP Mix	0,5 µl	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Steinheim
FWD Primer (10 µM)	0,5 µl	
REV Primer (10 µM)	0,5 µl	
EpiMark Hot Start Polymerase	0,125 µl	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Template-DNA	3 µl	
Nuklease freies Wasser	15,375 µl	

Tabelle 28: In dieser Arbeit eingesetzte Primer.

Primer	Sequenz	Versuch	Tm
TKTL1-FWD	5'- CGCCGAGCACTGCATAAA -3'	Quantifizierung der mRNA	56° C
TKTL1-REV	5'- CCACATAAGTGTTCCACCCAAA -3'	Expression	56° C
Apo10-FWD	5'- AGCTGGTGTCTGTGAAGAGG -3'	Quantifizierung der mRNA	56° C
Apo10-REV	5'- CCGTG TAGACCTCAACCAAC -3'	Expression	56° C
TBP-FWD	5'-GCCCGAAACGCCGAATAT-3'	Quantifizierung der mRNA	56° C
TBP-REV	5'-CCGTGGTTCGTGGCTCTC-3'	Expression	56° C
TKTL1Promotor-FWD	5'- TTGTGTAGAGAAAGAAGATTTTG-3'	Amplifikation des TKTL1 Promotors nach BS Behandlung und zur Sequenzierung	50° C
TKTL1Promotor-REV	5'- ACCCCTTTAAAATCTAAAAACCC-3'		52° C

2.3.6. Agarose-Gelelektrophorese

Diese analytische Methode dient der Auftrennung und Analyse von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten verschiedener Größe. Agarose bildet eine poröse Matrix, durch welche die Nukleinsäuren anhand eines Siebeffektes unter Einfluss eines elektrischen Feldes der Größe nach aufgetrennt werden. Genauer erfolgt die Trennung aufgrund der Ladung, Größe und dreidimensionaler Struktur der Moleküle [157]. Dadurch kann die relative Molekülmasse im Vergleich zu geeichten Markern, welche ebenfalls auf dem Gel mit aufgetragen werden, bestimmt werden. Bei der Agarose-Gelelektrophorese (AGE) können Fragmente von 300 bp bis 20000 bp aufgetrennt werden.

Für die Auftrennung wurden die entsprechenden Proben mit einem DNA-Ladepuffer vermischt und dann auf das Gel aufgetragen. Die Proben wurden auf dem Gel für 90 min bei einer Feldstärke von 3 - 10 V/cm aufgetrennt, wobei 1xTAE als Pufferlösung diente. Zur Visualisierung der DNA wurde 1x GelRed dem Agarosegel vor dem Gellauf zugesetzt.

GelRed ist ein sensitiver und stabiler Fluoreszenzfarbstoff, welcher dazu in der Lage ist in Nukleinsäuren zu interkalieren. Bei Anregung mit UV-Licht fluoresziert der Farbstoff. Durch das Interkalieren zwischen den hydrophoben Basen der DNA wird dieser Effekt gesteigert, was zu einer erhöhten Fluoreszenzintensität führt und als spezifisches Bandenmuster am Geldokumentationsgerät detektiert werden kann [158].

Tabelle 29: Materialien zur Probenvorbereitung der AGE.

Material	Hersteller
GelRED Nukleinsäurefärbung	Biotrend Chemikalien, Köln
DNA-Ladepuffer 6x	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
GeneRuler DNA 100 bp Leiter	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
PowerPac Basic	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Tabelle 30: Puffer und Gel für die Agarose-Gelelektrophorese.

Puffer/Gel	Komponente	Hersteller
<u>Tris Acetat EDTA (TAE) Puffer (10x) 1L</u>	100 g Tris Base 1 ml Essigsäure EDTA mit bidest. H ₂ O auf 1000 ml auffüllen	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Steinheim AppliChem GmbH, Darmstadt Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
<u>Tris Acetat EDTA (TAE) Puffer (1x) 1L</u>	100 ml TAE (10x) mit bidest. H ₂ O auf 1000 ml auffüllen	
<u>Agarosegel (1,5 %)</u>	1,5 g Agarose mit 1x TAE auf 100 ml auffüllen	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe

2.3.6.1. Präparative Agarose-Gelelektrophorese

Präparative Gele werden dazu verwendet, um Nukleinsäure-Fragmente aus einem Agarosegel zu isolieren. Die gewünschten DNA-Fragmente (Banden) wurden dazu nach dem Gellauf unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der Fragmente mit dem Gel-Extraktions Kit von *Zymo Research*. Die Materialien für die Präparative-Gelelektrophorese sind in Abschnitt 2.3.6. aufgeführt.

Tabelle 31: Gel-Extraktions Kit.

Material	Hersteller
Zymoclean Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research, Freiburg

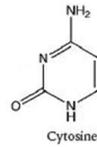
2.3.7. Bisulfit-Sequenzierung (BS-Sequenzierung)

DNA-Methylierungen können anhand verschiedener Methoden analysiert werden. Eine häufig eingesetzte Methode ist die BS-Konversion der DNA mit anschließender Sequenzierung [159]. Durch die BS-Behandlung werden unmethylierte Cytosine zu Uracil umgewandelt, während methylierte Cytosine unverändert bleiben. Durch die anschließende Sequenzierung der Proben können so ursprünglich methylierte von unmethylierten Cytosinen unterschieden werden. In Abbildung 13 ist der Reaktionsmechanismus der Bisulfit-Konversion dargestellt. Genomische DNA wird dafür zuerst bei hohen Temperaturen (95 °C) denaturiert und fragmentiert. Durch Behandlung der fragmentierten DNA mit Natriumhydrogensulfit (Bisulfit) kommt es zu einer nukleophilen Addition des Sulfit-Ions an unmethylierte Cytosine, wodurch Cytosinsulfonat entsteht. Eine hydrolytische Desaminierung des Cytosinsulfonates führt dann zur Bildung von Uracilsulfonat. Erhöht man anschließend den pH-Wert, werden die Uracilsulfonate desulfoniert und es entsteht Uracil. Nach der BS-Behandlung werden die zu untersuchenden DNA-Bereiche mittels PCR amplifiziert und die Amplifikate zur Analyse sequenziert. In der PCR wird Uracil wie Thymin behandelt und der Gegenstrang folglich komplementär mit Adenin aufgefüllt. Unbehandelte DNA Sequenzen werden parallel dazu ebenfalls sequenziert, wobei hier Cytosine mit Guaninen paaren. Durch die Sequenzierung und den Vergleich beider Proben können so methylierte Cytosine bestimmt und dadurch eine Aussage über den Methylierungszustand der DNA getroffen werden.

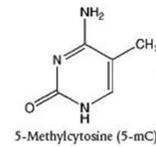
Die BS-Konversion und Aufreinigung der DNA aus Zelllinien und Patientenmaterial wurde mit dem EZ DNA Methylation-Direct Kit von Zymo Research durchgeführt. Mit der BS-Sequenzierung sollte untersucht werden, ob eine Hypomethylierung des TKTL1-Promotors der Grund für die Überexpression von TKTL1 in Tumorzellen und Patientenproben ist. Die Amplifikation der TKTL1-Promotorregion erfolgte durch eine TD-PCR (vgl. Abschnitt 2.3.5.3). Anschließend wurden die PCR-Produkte über eine präparative Agarose-Gelelektrophorese isoliert und aufgereinigt. Zur Sequenzierung wurden diese Amplifikate mit entsprechenden Primern (vgl. Tab. 28) zu *SourceBioscience* versendet. Das Sequenzierungslabor von *SourceBioscience* nutzte für diese Proben die Kettenabbruchmethode nach Sanger.

Schritt 1

Denaturierung:
Bei 95 °C wird die genomische DNA fragmentiert



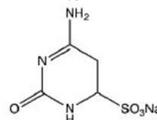
NaHSO₃, pH 5.0



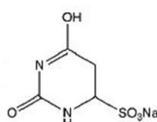
NaHSO₃, pH 5.0

Schritt 2

Konversion:
Behandlung der fragmentierten DNA mit
Natrium-Bisulfit bei 65 °C desaminiert Cytosinreste

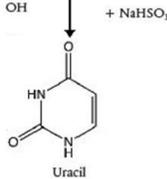


+ H₂O, - NH₃



Schritt 3

Desulfonierung:
Inkubation bei einem hohen pH entfernt die meisten
Sulfite, wodurch Uracil entsteht.



5-mC kann nicht durch Bisulfit
umgewandelt werden.

Abbildung 13: Reaktionsmechanismus der Bisulfit-Konversion

Im ersten Schritt wird die genomische DNA bei 95 °C denaturiert und fragmentiert. Im zweiten Schritt erfolgt die Behandlung der DNA mit Bisulfit, wodurch es zu einer nukleophilen Addition des Sulfit-Ions an unmethylierte Cytosine kommt und Cytosinsulfonat entsteht. Eine hydrolytische Desaminierung des Cytosinsulfonates führt dann zur Bildung von Uracilsulfonat. Im letzten Schritt wird der pH-Wert erhöht, wodurch die Uracilsulfonate desulfoniert werden und Uracil entsteht.

Tabelle 32: BS-Konversions Kit.

Material	Hersteller
EZ DNA Methylation Direct Kit	Zymo Research, Freiburg

2.3.8. 5-aza-2'-deoxycytidin Behandlung

5-aza-2'-deoxycytidin (Decitabin) ist ein chemisches Analogon des Nucleosids Desoxycytidin und wird als DNA-Methyltransferase-Inhibitor eingesetzt [160]. Werden Zellen mit Decitabin behandelt, wird es bei der DNA-Replikation in die neuen DNA-Stränge eingebaut. DNA-Methyltransferasen welche das Methylierungsmuster der Elternstränge auf die Tochterstränge replizieren, werden von Decitabin irreversibel gebunden und können sich nicht mehr lösen. Dadurch kann die Methylierung nicht an die Tochterstränge weitergegeben werden, was zu einer teilungsabhängigen Hypomethylierung der DNA führt.

Um zu untersuchen, ob das TKTL1-Gen in Neuroblastom- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien durch Methylierungen reguliert wird, wurden die Zelllinien für 72 h mit 100 nM und 500 nM Decitabin in 6-well Platten behandelt. Die Anzahl der eingesetzten Zellen ist in Tabelle 11 aufgeführt. Das Medium und die Behandlung wurden nach 24 h und 48 h erneuert. Nach der Behandlung wurden die Zellen geerntet, die RNA isoliert (vgl. Abschnitt 2.3.1.) und die Expression des TKTL1-Gens über eine qRT-PCR quantifiziert (vgl. Abschnitt 2.3.5.2.).

Tabelle 33: Decitabin.

Material	Hersteller
5-aza-2'-deoxycytidin (Decitabin)	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Steinheim

2.4. Patientenkollektiv

Die EDIM-Studie erfasst prospektiv ein Kollektiv von insgesamt 70 Patienten. Davon haben 32 Patienten ein histologisch gesichertes Rhabdomyosarkom (n=32) und 38 Patienten ein histologisch gesichertes Neuroblastom (n=38). Die Patienten wurden in einem Zeitintervall von 3 Jahren in der Kinderklinik des Universitätsklinikums Tübingen behandelt und der Krankheitsverlauf in Nachuntersuchungen überwacht. Zusätzlich wurde eine Kontrollgruppe von 25 gesunden Blutspendern (n=25) in die Studie aufgenommen (Genehmigung der Ethikkommission, Zulassungsnummern 190/2017B01 und 615/2015B02). Patienten- und

Tumorcharakteristiken sind in den Tabellen 35 und 36 (S.78 und 79) zusammengestellt. Das Blut für die Studie wurde den Patienten bei Diagnose, vor, nach oder falls nicht anders möglich auch zwischen den Behandlungen (OP/Chemotherapie oder Radiotherapie) während einer regulären Blutentnahme zusätzlich abgenommen. Detailliertere Angaben über die Studie können in den Ethikanträgen mit den Zulassungsnummern 190/2017B01 und 615/2015B02 eingesehen werden.

Die Bestimmung der Tumorstadien (Staging) wurde nach der 7. Auflage der TNM-Klassifikation der UICC von 2010 durchgeführt [161, 162]. Das *grading* erfolgte nach den WHO-Kriterien.

2.4.1. Einschlusskriterien der Studie

Pädiatrische Patienten mit histologisch gesichertem Rhabdomyosarkom oder Neuroblastom zwischen 0 und 18 Jahren. Für die Kontrollgruppe wurde Blut von Kindern verwendet, welchen wegen einer anderen (nicht onkologischer) Erkrankung am Universitätsklinikum Tübingen behandelt wurden. Im Rahmen der Behandlung der Kontroll-Patienten findet unabhängig von unserer Studie eine Blutentnahme statt. Diese sind gegenüber den Tumorpatienten in Alter und Geschlecht übereinstimmend. In der Kontrollgruppe wurden Teilnehmer zwischen 0 und 18 Jahren ohne onkologisch, pathologischen Hintergrund einbezogen.

2.4.2. Ausschlusskriterien der Studie

Patienten mit akuten Infektionen oder immunvermittelnden Krankheiten werden in der Studie nicht miteinbezogen. Aber auch Patienten, welche bis zu sechs Wochen vor der Blutabnahme operiert oder therapeutischen Behandlungen unterzogen wurden, sind nicht in die Studie integriert worden.

2.4.3. Rekrutierung

Die Rekrutierung der Studienteilnehmer erfolgte immer über die behandelnden und kooperierenden Ärzte aus den Abteilungen Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, sowie über die Ärzte aus der Kinderchirurgie & Kinderurologie. Dabei wurden die Blutproben von

Tumorpatienten und Probanden im Rahmen der Routineblutentnahme gewonnen. Da die Blutentnahmen im Rahmen der Routineblutentnahmen erfolgen, entstehen somit keinerlei zusätzliche unerwünschte Nebenwirkungen, Risiken oder Belastungen für die Studienteilnehmer.

2.4.4. Studienablauf

Die Untersuchung wurde in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki und der Berufsordnung für Ärzte/innen der Landesärztekammer Baden-Württemberg durchgeführt. Die Teilnahme der Studienteilnehmer an der Untersuchung war freiwillig.

Die Patienten wurden vor Studienbeginn schriftlich und mündlich über Inhalt und Tragweite der geplanten Untersuchung, insbesondere über den möglichen Nutzen für ihre Gesundheit und eventuelle Risiken, aufgeklärt. Die Namen der Patienten und alle anderen vertraulichen Informationen unterliegen der ärztlichen Schweigepflicht und den Bestimmungen des Bundesdatenschutzgesetzes (BDSG). Eine Speicherung der Daten sowie eine mögliche Weitergabe der Daten erfolgte nur in pseudonymisierter Form. Die Patienten hatten zu jeder Zeit die Möglichkeit, ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile für die weitere medizinische Versorgung, ihre Zustimmung zurückzuziehen.

2.5. *In silico* Recherchen zur Analyse des TKTL1-Promotors

MethPrimer ist eine Online-Software, welche anhand eingegebener Sequenzen CpG-Inseln vorhersagen kann. Außerdem können mit dem Programm Primer designt werden, welche zur Analyse der betroffenen DNA-Region genutzt werden können [156].

Um zu untersuchen, ob das TKTL1-Gen durch Methylierungen reguliert werden kann, wurde der Promotor des TKTL1-Gens mithilfe von *MethPrimer* auf CpG-Inseln untersucht.

Die Analysen des TKTL1-Promotors zeigten zwei CpG-Inseln, welche für die Untersuchung des Methylierungszustandes in Frage kommen. Für eine der CpG-Inseln wurden Primer designt, welche für die Amplifikation des TKTL1-Promotors nach der BS-Behandlung der DNA dienen (vgl. Abschnitt 2.4.3. und Tab. 28). Im Anhang Abschnitt 7.1. sind die Sequenzen des TKTL1-

Gens und des Promotors dargestellt. Dabei sind die Sequenzen des Promotors, der CpG-Inseln und der Primer hervorgehoben.

2.6. Semi-quantitative Methylierungs-Analyse

Mit Hilfe von semi-quantitativen Methylierungs-Analysen ist es möglich, das Verhältnis von methylierten und unmethylierten CpG-Dinukleotiden zu bestimmen. Es kann also bestimmt werden zu wie viel Prozent jedes untersuchte CpG-Dinukleotid in der Probe methyliert beziehungsweise unmethyliert vorliegt. Somit ist eine sehr präzise Aussage über den Methylierungsstatus der untersuchten CpGs möglich. Die in dieser Arbeit verwendete Analysemethode wird als semi-quantitativ bezeichnet, da quantitative Analysen über Pyrosequenzierungen vorgenommen werden.

Für die hier eingesetzte semi-quantitative Methylierungs-Analyse wurde die Software *QSVanalyser (Quantitative Sequence Variants)* [163] verwendet. Das Programm erlaubt die Analyse von DNA-Sequenz-Spuren, für die Bestimmung der relativen Anteile von zwei Sequenzvarianten. In dieser Arbeit wurde es verwendet, um zu bestimmen, wie viel Prozent jedes untersuchte CpG-Dinukleotids in der Probe methyliert beziehungsweise unmethyliert vorliegt. Zuerst wurden dafür die von dem Sequenzierlabor erhaltenen „ab1“ Dateien mit *QSVanalyser* geöffnet. In dem daraufhin angezeigten Elektropherogramm wurden alle CpG-Dinukleotide nach Sequenzvarianten abgesucht. Nach auffinden einer Sequenzvariante wurde diese ausgewählt und von dem Programm analysiert. Die Analyse bestimmt dann die relative Peakhöhe der beiden in einer Position detektierten Peaks. Anhand der dadurch erhaltenen Werte wurde die Methylierungsrate nach folgender Formel bestimmt [164]:

$$\text{Methylierungsrate} = \frac{\text{Relative Cytosin Peakhöhe (Fwd Primer) oder Guanin Peakhöhe (Rev Primer)}}{\text{Summe der Peakhöhe von Cytosin und Thymin (Fwd Primer) oder Summe von Guanin und Adenin (Rev Primer)}}$$

Um die Ergebnisse übersichtlich darzustellen, wurden mit den erhaltenen Methylierungsraten für die jeweiligen Tumorentitäten Heatmaps erstellt.

2.7. Statistik

Die vorliegende Dissertationsschrift wurde mit dem Textverarbeitungsprogramm Word verfasst. Die statistische Auswertung der Daten und die Erstellung der Diagramme erfolgte mit der Statistiksoftware GraphPad Prism 7. Für die deskriptive Statistik der Daten (teilweise auch mithilfe von Windows Excel) und die statistische Prüfung der Hypothese wurde mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) analysiert. Als Testverfahren wurde die Bonferroni-Methode verwendet. Alle Versuche wurden mindestens 3x durchgeführt, die Mittelwerte der Einzelversuche wurden in den Diagrammen jeweils mit Standardfehler (SEM) angegeben. Als Signifikanzniveau wurde das 95 % Konfidenzniveau gewählt, d.h. alle p-Werte $< 0,05$ wurden als signifikant gewertet.

Dabei gilt für die Graphen:

*	=	$p < 0,05$	***	=	$p < 0,001$
**	=	$p < 0,01$	****	=	$p < 0,0001$

Tabelle 34: In dieser Arbeit verwendete Softwares.

Software	Herdsteller
Adobe Reader	Adobe Systems, München
FACSCanto II System Software	Becton Dickinson, Heidelberg
FACSDiva Software Version 8.0	Becton Dickinson, Heidelberg
GraphPad Prism Version 7.0	GraphPad Software, La Jolla, USA
Office 365 Education Plus	Microsoft, Unterschleißheim
Paint.NET	dotPDN LLC, Unterschleißheim
<i>QSVanalyser</i>	Universität Leeds

3. Ergebnisse

3.1. Expression der Tumormarker TKTL1, Apo10 und GD2 in Neuroblastom- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien

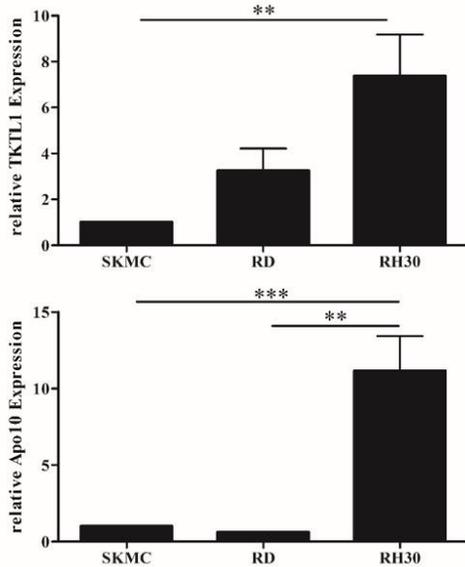
Mit der EDIM-Technologie können Tumormarker in Monozyten/Makrophagen untersucht werden, nachdem diese Tumorzellpartikel phagozytiert haben. Demnach ist die Expression der Tumormarker TKTL1, Apo10 und GD2 die Voraussetzung den EDIM-Test zur Detektion von bestimmten Tumorentitäten in Patienten nutzen zu können. Daher setzt sich der erste Ergebnisteil mit der Expression/Abundanz der Tumormarker TKTL1, Apo10 und GD2 in Rhabdomyosarkom (RMS)- und Neuroblastom (NB)-Zelllinien sowie mit Patientenproben auseinander.

3.1.1. Expression der Tumormarker TKTL1 und Apo10 in RMS Zelllinien

Um die Expression der Tumormarker TKTL1 und Apo10 in Rhabdomyosarkom-Zelllinien zu untersuchen wurden eine embryonale RMS-Zelllinie (RD) und eine alveoläre RMS-Zelllinie (RH30) ausgewählt. Als benigne Kontrolle der Expression wurden Skelettmuskelzellen (SkMCs) verwendet. Die Zellen wurden in Zellkulturplatten ausgesät, nach 24 h geerntet und entweder für eine mRNA-Expressionsanalyse lysiert und einer gesamt-RNA Extraktion unterzogen oder direkt für eine durchflusszytometrische Expressionsanalyse auf Proteinebene genutzt (vgl. Abb. 14).

Nach der RNA-Extraktion erfolgte eine reverse Transkription zur Herstellung von cDNA, gefolgt von einer quantitativen *real-time* PCR zur Bestimmung der mRNA Expression der Tumormarker TKTL1 und Apo10 (vgl. Abb. 14 A). Als interne Kontrolle in der *real-time* PCR diente die mRNA des *house-keeping* Gens *tbp*. Die Expressionen werden im Folgenden als relative Werte beziehungsweise als Vielfaches der Tumormarkerexpression in den Kontrollzellen (SkMCs) dargestellt.

A



B

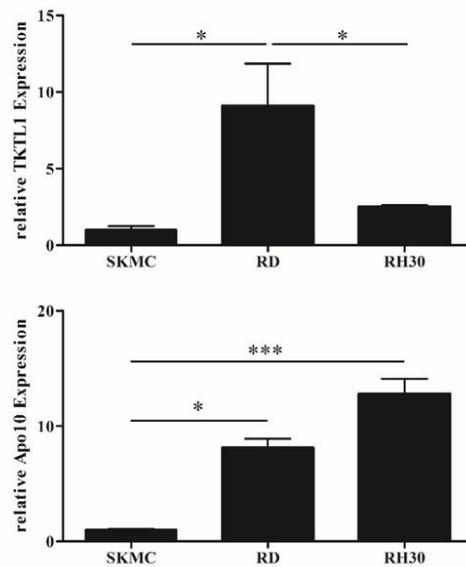


Abbildung 14: TKTL1- und Apo10- Expression in RMS-Zelllinien.

(A) Transkriptionelle Expression von TKTL1 (obere Graphiken) und Apo10 (untere Graphiken) in den RMS-Zelllinien RD und RH30. Für die Quantifizierung der mRNA-Level wurde eine quantitative *real-time* RT-PCR durchgeführt, wobei TBP als interne Kontrolle diente. (B) TKTL1- und Apo10-Proteinexpression in RD und RH30 Zellen. Die Bestimmung der Proteinexpression basiert auf durchflusszytometrischen Messungen. Bei den Expressionen in der Abbildung handelt es sich um relative Werte, da die Tumorzelllinien zu einer Kontrollzelllinie (SkMCs) verglichen wurden. SkMC: Skelettmuskelzellen. Die Sterne zeigen eine Statistische Signifikanz zwischen den markierten Gruppen an “*Ordinary one-way ANOVA; Dunnetts multiple comparison test*“ *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; (n=4-5).

Im Vergleich zu den SkMCs, zeigt die embryonale RMS (eRMS) Zelllinie RD eine 3,2-fach und die alveoläre RMS-Zelllinie (aRMS) RH30 eine 7,4-fach höhere Expression der TKTL1-mRNA. Betrachtet man die Expression der mRNA des Tumormarkers Apo10, ist zu beobachten, dass RH30-Zellen eine 11,2-fach höhere Expression aufweisen als die benigne SkMC-Zelllinie. In RD-Zellen ist die Expression der Apo10-mRNA mit der von den SkMCs vergleichbar. Auffallend bei dem Vergleich der mRNA-Expression der beiden Marker ist außerdem die höhere Expression in der alveolären Zelllinie RH30. Zwar ist nur die Apo10-mRNA Expression in

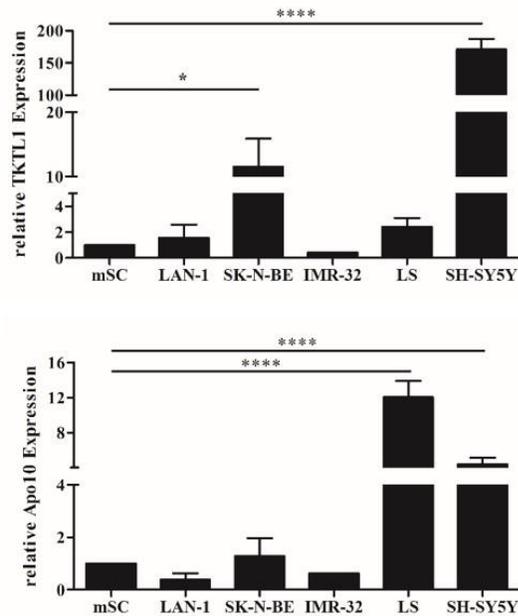
RH30-Zellen signifikant höher als in RD-Zellen, ein Trend ist aber auch bei der TKTL1-mRNA-Expression zu erkennen.

Wie bereits beschrieben, wurden mithilfe von durchflusszytometrischen Analysen ebenfalls die Proteinexpressionen der Marker TKTL1 und Apo10 in den Tumorzelllinien im Vergleich zu den Kontrollzellen (SkMCs) analysiert (vgl. Abb. 14 B). Da es sich bei beiden Markern um intrazelluläre Proteine handelt, wurden die Zellen in der FACS-Färbung permeabilisiert. Auch auf Proteinebene ist im Vergleich zu den SkMCs eine höhere TKTL1-Expression in RD- (9,1-fach) und RH30- (2,5-fach) Zellen zu beobachten. Anders als bei der mRNA-Expression, ist die Expression in RD-Zellen höher als in RH30-Zellen. Auch die Apo10-Proteinexpression weicht von der mRNA-Expression ab. Zwar ist die Expression in RH30-Zellen (12,8-fach höher als in den SkMCs) höher als in RD-Zellen, jedoch zeigen die RD-Zellen eine 8,1-fach höhere Expression als die SkMCs und das obwohl die Apo10-mRNA-Expression der RD-Zellen vergleichbar ist mit der von den SkMCs.

3.1.2. Expression von TKTL1, Apo10 und GD2 in NB Zelllinien

Analog zu den RMS-Zelllinien wurden die Expressionsanalysen (transkriptionelle und Proteinexpression) der Tumormarker TKTL1 und Apo10 in NB-Zelllinien durchgeführt. Im Gegensatz zu dem Versuchsaufbau der RMS-Zelllinien wurden mesenchymale Stammzellen (mSC) als Kontrolle der Expression in gesunden Zellen gewählt. Auch bei diesem Versuch wird die Expressionen als vielfaches der Expression in den Kontrollzellen (mSCs) angegeben (vgl. Abb. 15).

A



B

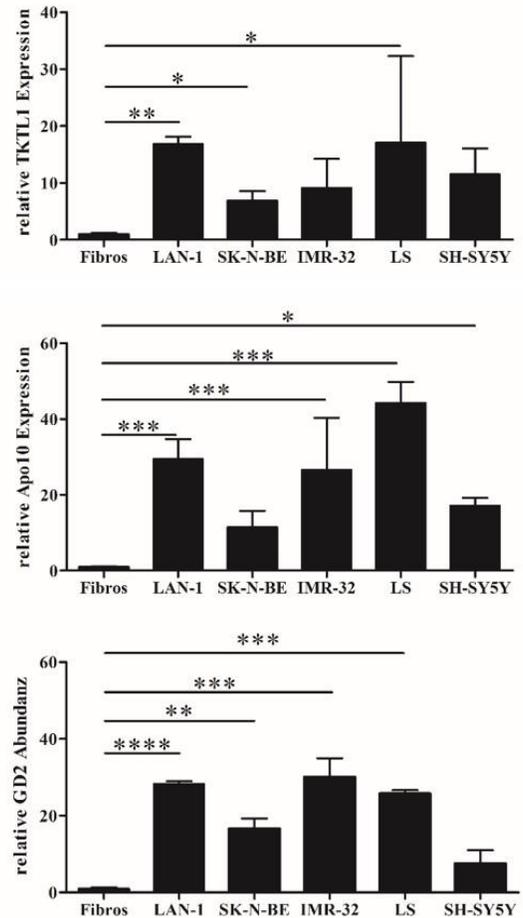


Abbildung 15: TKTL1- und Apo10-Expression und Abundanz von GD2 in NB-Zelllinien.

(A) Transkriptionelle Expression von TKTL1 (obere Graphik) und Apo10 (mittlere Graphik) in den NB-Zelllinien LAN-1, SK-N-BE, IMR-32, LS und SH-SY5Y. Für die Quantifizierung der mRNA-Level wurde eine quantitative *real-time* RT-PCR durchgeführt, wobei TBP als interne Kontrolle diente. (B) TKTL1-, Apo10-Proteinexpression und Abundanz von GD2 in LAN-1, SK-N-BE, IMR-32, LS und SH-SY5Y. Die Bestimmung der Proteinexpression basiert auf durchflusszytometrischen Messungen. Bei den Expressionen in der Abbildung handelt es sich um relative Werte, da die Tumorzelllinien mit Kontrollzellen (Fibroblasten oder mSCs) verglichen wurden. mSC: mesenchymale Stammzellen; Fibros: Fibroblasten. Die Sterne zeigen eine Statistische Signifikanz zwischen den markierten Gruppen an "Ordinary one-way ANOVA; Dunnetts multiple comparison test": *; $p < 0,05$; **; $p < 0,01$; ***; $p < 0,001$; ****; $p < 0,0001$; (n=4).

Betrachtet man die TKTL1-mRNA-Expression, so ist diese nur bei den Zelllinien SK-N-BE (11,5-fach) und SH-SY-5Y (170,7-fach im Vergleich zu den mSCs) signifikant höher (vgl. Abb. 15 A). Die Zelllinien LAN-1 (1,6-fach) und LS (2,4-fach) zeigen zwar keinen signifikanten

Unterschied, aber besitzen dennoch eine höhere Expression als die mSCs. In IMR-32 ist die TKTL1-Expression mit der der mSCs vergleichbar. Der Vergleich der Apo10-mRNA-Expression zeigt, dass nur die Zelllinien LS und SH-SY5Y eine signifikant höhere Expression als die mSCs aufweisen (12-fach bzw. 4,4-fach).

Ähnlich wie bei den RMS-Zelllinien weichen die Ergebnisse der Proteinexpression von denen der transkriptionellen Expression ab (vgl. Abb. 15 B). So kann auf transkriptioneller Ebene bei der LAN-1-Zelllinie keine signifikant erhöhte Expression von TKTL1 und Apo10 beobachtet werden, aber die über FACS-Messungen bestimmte Proteinexpression ist bei TKTL1 16,8-fach und bei Apo10 sogar 29,4-fach höher als in Fibroblasten. In SK-N-BEs ist die TKTL1-Proteinexpression (6,9-fach höher) vergleichbar mit der TKTL1-mRNA-Expression, aber die Apo10-Proteinexpression ist mit einer 9,6-fachen Erhöhung zu den Kontrollzellen deutlich über der Apo10-mRNA Expression. IMR-32 zeigt bei der mRNA-Expression keinen Unterschied zu den Kontrollzellen und die Proteinexpression ist zwar erhöht (TKTL1: 9,1-fach; Apo10: 26,6-fach), aber nur das Ergebnis von Apo10 ist signifikant. Auch in LS-Zellen weicht das Ergebnis der transkriptionellen Analyse von der Proteinexpression ab. Hier ist die TKTL1-Expression 17-fach höher und die Apo10-Expression 44,3-fach höher als in den Kontrollzellen. Vergleicht man die Proteinexpressionsdaten von SH-SY5Y-Zellen (TKTL1: 11,5-fach und Apo10: 17,1-fach höher) mit den Transkriptionsdaten, kann man sehen, dass die TKTL1-Proteinexpression niedriger und die von Apo10 höher ausfällt.

Zusammenfassend kann beobachtet werden, dass die mRNA-Expression nicht mit der Proteinexpression übereinstimmt und dass sich die Expressionsunterschiede auf mRNA- und Proteinebene je nach Zelllinie anders verhalten. In Bezug auf die TKTL1- und Apo10-Proteinexpression zeigt sich aber in allen NB-Zelllinien eine erhöhte Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen. Vergleicht man außerdem die transkriptionelle Expression mit der Proteinexpression in den NB-Zelllinien fällt auf, dass die Proteinexpression, außer bei den SH-SY5Y, mindestens genauso hoch aber meistens höher ausfällt.

Zusätzlich zu TKTL1 und Apo10 wurden die gleichen NB-Zelllinien auf die Abundanz des NB-Tumormarkers GD2 über durchflusszytometrische Messungen analysiert. Da es sich bei GD2 um ein sich auf der Membran befindendes Makromolekül handelt, wurden die Zellen für die FACS-Färbung nicht permeabilisiert. Denselben Schema wie bei den zwei vorherigen Markern

folgend ist die GD2-Abundanz als relativer Wert beziehungsweise als Vielfaches der GD2-Abundanz in den Kontrollzellen (Fibroblasten) angegeben (vgl. Abb. 15 B, unteres Diagramm). Alle NB-Zelllinien weisen im Vergleich zu den Kontrollzelllinien eine erhöhte GD2-Abundanz auf (LAN-1: 28,3-fach, SK-N-BE: 16,5-fach, IMR-32:30-fach, LS: 25,7-fach und SH-SY5Y: 7,5-fach). Dabei sind die Ergebnisse aller Zellen bis auf das der SH-SY5Y-Zellen signifikant unterschiedlich zu den Ergebnissen der Fibroblasten.

3.1.3. Expression von TKTL1 und Apo10 in Patientenmaterial

Tumorzelllinien sind zwar geeignete Modellsysteme um die Expression von Tumormarkern in den jeweiligen Entitäten (hier: RMS und NB) zu untersuchen, dennoch kann anhand von Patientenmaterial, welches beispielsweise während einer Biopsie entnommen wurde, eine bessere Aussage getroffen werden, wie sich die untersuchten Tumormarker verhalten. Aus diesem Grund wurden fünf RMS-Tumorproben (vgl. Abb. 16 A) und sieben NB-Tumorproben (vgl. Abb. 16 B) auf die mRNA-Expression von TKTL1 und Apo10 hin analysiert. Für die Analyse wurden nur pseudonymisierte Proben aus der Tumorbank der Abteilung Kinderchirurgie und Kinderurologie des Universitätsklinikums Tübingen verwendet. Nach dem Auftauen wurden die Tumorproben mechanisch homogenisiert, lysiert und einer gesamt-RNA Extraktion unterzogen. Zur Bestimmung der transkriptionellen mRNA Expression erfolgte dann eine reverse Transkription und eine quantitative *real-time* PCR.

Wie oben beschrieben (vgl. Abschnitt 3.1.1.) beziehen sich die angegebenen Werte auf eine Kontrolle. Bei den RMS-Proben wurde als Referenzgewebe Muskelgewebe verwendet. Außerdem sind von den fünf analysierten Proben drei aus eRMS- und zwei aus aRMS-Patienten. Verglichen mit dem Muskelgewebe zeigen alle untersuchten RMS-Proben eine erhöhte TKTL1-mRNA-Expression (vgl. Abb. 16 A). Die Expression ist von 2-fach bis 150-fach höher als in Muskelgewebe. Dabei ist kein Unterschied zwischen eRMS und aRMS erkennbar. Auch die Apo10-Expression ist in den meisten Tumorproben deutlich erhöht. Bis auf T4, die eine 2-fach geringere Expression aufweist, zeigen die restlichen Proben eine von 10-fach bis 22,5-fach höhere Expression als das Kontrollgewebe. Ähnlich wie bei TKTL1 gibt es keinen Unterschied zwischen eRMS und aRMS.

Das NB-Patientenmaterial wurde wie bereits in Abschnitt 3.1.2. mit mSCs verglichen. Betrachtet man die Ergebnisse der NB-Proben, ist bei TKTL1 in allen Proben abgesehen von T4 eine erhöhte Expression verglichen mit den Kontrollzellen erkennbar (siehe Abb. 16 B oben). Dabei weisen die Expressionsunterschiede von 10-fach bis 400-fach höhere Werte auf. Dasselbe ist bei der Apo10-mRNA-Expression in den NB-Tumorproben zu sehen (siehe Abb. 16 B unten). Alle NB-Proben besitzen eine höhere Apo10-Expression als die mSCs auf. Hier sind Expressionsunterschiede von 40-fach bis 30.000-fach höher verglichen mit den Kontrollzellen.

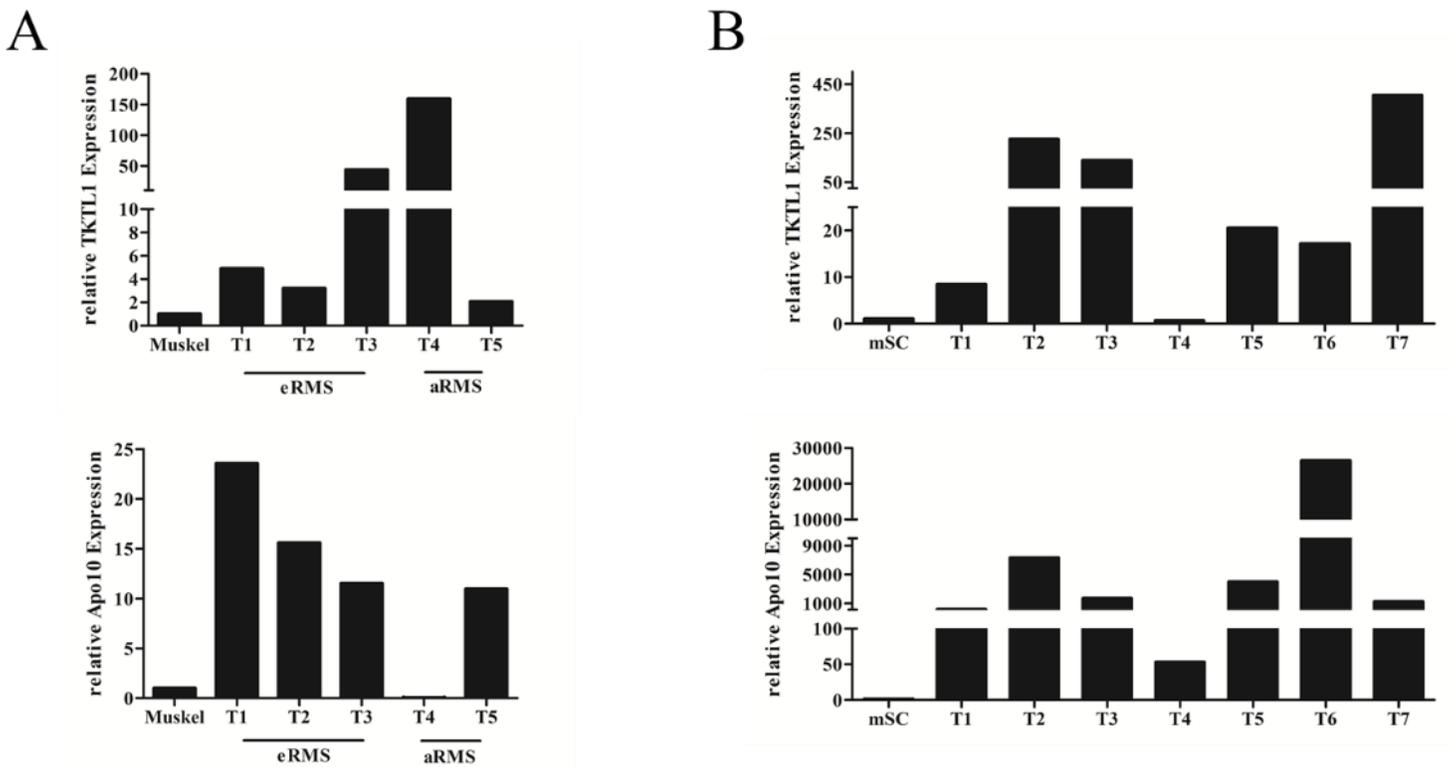


Abbildung 16: TKTL1- und Apo10-Expression in Tumorproben von Patienten.

Transkriptionelle Expression von TKTL1 (obere Graphik) und Apo10 (untere Graphik) in Gewebeproben aus RMS- (A) und in NB-Patienten (B). Für die Quantifizierung der mRNA-Level wurde die quantitative *real-time* RT-PCR durchgeführt, wobei TBP als interne Kontrolle diente. Bei den Expressionen handelt es sich um relative Werte, da die Patientenproben zu jeweiligen Kontrollgeweben verglichen wurden. aRMS: alveoläres Rhabdomyosarkom; eRMS: embryonales Rhabdomyosarkom, mSC: mesenchymale Stammzellen; Tx: Nummer der Tumorprobe.

3.2. EDIM-Test in Neuroblastom- und Rhabdomyosarkom-Patienten

Wie Anhand der Ergebnisse (vgl. 3.1.) gezeigt werden konnte, ist die Expression der Tumormarker TKTL1 und Apo10 sowohl in den hier untersuchten Tumorzelllinien als auch in Patientenmaterial von NB- und RMS-Patienten erhöht. Außerdem ist bekannt, dass die Abundanz von GD2 in NB-Tumoren erhöht ist (117), was durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt werden konnte (siehe 3.1.2.). Damit ist die Hauptvoraussetzung für die Durchführung einer prospektiven Untersuchung der beiden Tumorentitäten NB und RMS mit der EDIM-Technologie gegeben.

3.2.1. EDIM-scores bei Neuroblastom- und Rhabdomyosarkom-Patienten

Für den EDIM-Test werden gesunden Bluspendern (GBS) oder solchen mit einem pathologischen Hintergrund Blut entnommen (vgl. M&M Abschnitt 2.2.7.). Über durchflusszytometrische Analysen werden, mithilfe von spezifischen Antikörpern, aktivierte Monozyten/Makrophagen in diesen Proben auf die Aufnahme der Tumormarker TKTL1, Apo10 und GD2 (nur NB) untersucht. Abbildung 17 zeigt exemplarisch eine durchflusszytometrische Analyse eines RMS-Patienten mit einem positiven TKTL1- und Apo10-Ergebnis (oben), im Vergleich zu denen eines GBS mit einem negativen TKTL1- und Apo10-Ergebnis (unten). Aus der Anzahl, der für die jeweiligen Tumormarker positiven Makrophagen (rotes Rechteck) ergibt sich ein *score*, mit dem es möglich ist, Patienten mit einem Tumor von GBS zu unterscheiden. Die genaue Bestimmung des TKTL1- und Apo10-EDIM-scores ist in Abschnitt 2.2.7.2. beschrieben.

Für die hier durchgeführte, prospektive Untersuchung der Tumormarker TKTL1 und Apo10, wurden Bluttests bei 32 RMS- und 38 NB-Patienten mit primärem und/oder rezidiertem Tumor durchgeführt. Als Kontrollgruppe dienten hierbei 25 GBS ohne pathologischen Hintergrund. Zusätzlich wurden 19 NB-Patienten und 22 GBS für eine Untersuchung des Markers GD2 einbezogen. Die Charakteristika der Patienten mit den jeweiligen Tumorentitäten sind in den Tabellen 35 und 36 dargestellt.

Tabelle 35: Charakteristiken der RMS-Patienten und der gesunden Probanden in der TKTL1- und Apo10 EDIM-Untersuchung.

Eigenschaften	Anzahl der Patienten	Anzahl der gesunden Probanden
	n=32 Anzahl der Patienten (%)	n=25 Anzahl der Individuen (%)
Alter (Monaten)		
< 24	5 (15,6 %)	0 (0 %)
24 – 72	19 (59,4 %)	3 (12 %)
84 – 144	5 (15,6 %)	7 (28 %)
156 – 240	3 (9,4 %)	15 (60 %)
Geschlecht		
Weiblich	15 (46,9 %)	11 (44 %)
Männlich	17 (53,1 %)	14 (56 %)
Stadium		
I	0 (0 %)	
II	2 (6,3 %)	
III	14 (43,8 %)	
IV	16 (50 %)	
Histologischer-Subtyp		
eRMS	27 (84,4 %)	
aRMS	5 (15,6 %)	
Genfusions-Status		
PAX3/FOXO1	2 (6,3 %)	
PAX7/FOXO1	2 (6,3 %)	

Tabelle 36: Charakteristiken der NB-Patienten der TKTL1 und Apo10 EDIM-Untersuchung, sowie die Charakteristiken der gesunden Probanden der GD2 EDIM-Untersuchung.

Eigenschaften	Anzahl der Patienten	Anzahl der gesunden Probanden
	n=38 Anzahl der Patienten (%)	n=22 Anzahl der Individuen (%)
Alter (Monaten)		
< 24	3 (8,8 %)	2 (9,1 %)
24 – 72	25 (65,8 %)	3 (13,6 %)
84 – 144	8 (21,1 %)	5 (22,7 %)
156 – 240	1 (2,6 %)	13 (59,1 %)
Geschlecht		
Weiblich	14 (36,8 %)	10 (45,5 %)
Männlich	24 (63,2 %)	12 (54,5 %)
Stadium		
I	1 (2,6 %)	
II	1 (2,6 %)	
III	10 (26,3 %)	
IV	22 (57,9 %)	
Stadium (Hughes)		
Ia	11 (28,9 %)	
Ib	6 (15,8 %)	
II	1 (2,6 %)	
III	11 (28,9 %)	
IV	1 (2,6 %)	
NMYC Status		
Negativ	33 (86,8 %)	
Positiv	5 (13,2 %)	
Chromosom 1 (p36)		
Negativ	9 (23,7 %)	
Positiv	4 (10,5 %)	
Differenzierungs-Stadium		
Differenziert	12 (31,6 %)	
Undifferenziert	12 (31,6 %)	
Gering differenziert	3 (7,9 %)	
ALK		
Negativ	3 (7,9 %)	
Positiv	5 (13,2 %)	
MIBG		
Negativ	0 (0 %)	
Positiv	24 (63,2 %)	

Die in der Studie einbezogenen 32 RMS-Patienten (15 weiblich, 17 männlich) haben ein medianes Lebensalter von 36 Monaten (12 bis 204 Monaten) und zeigen histopathologisch gesicherte RMS. Die Kontrollgruppe fasst 25 GBS (11 weiblich, 14 männlich), welche ein medianes Lebensalter von 162 Monaten (60 bis 204 Monate) haben.

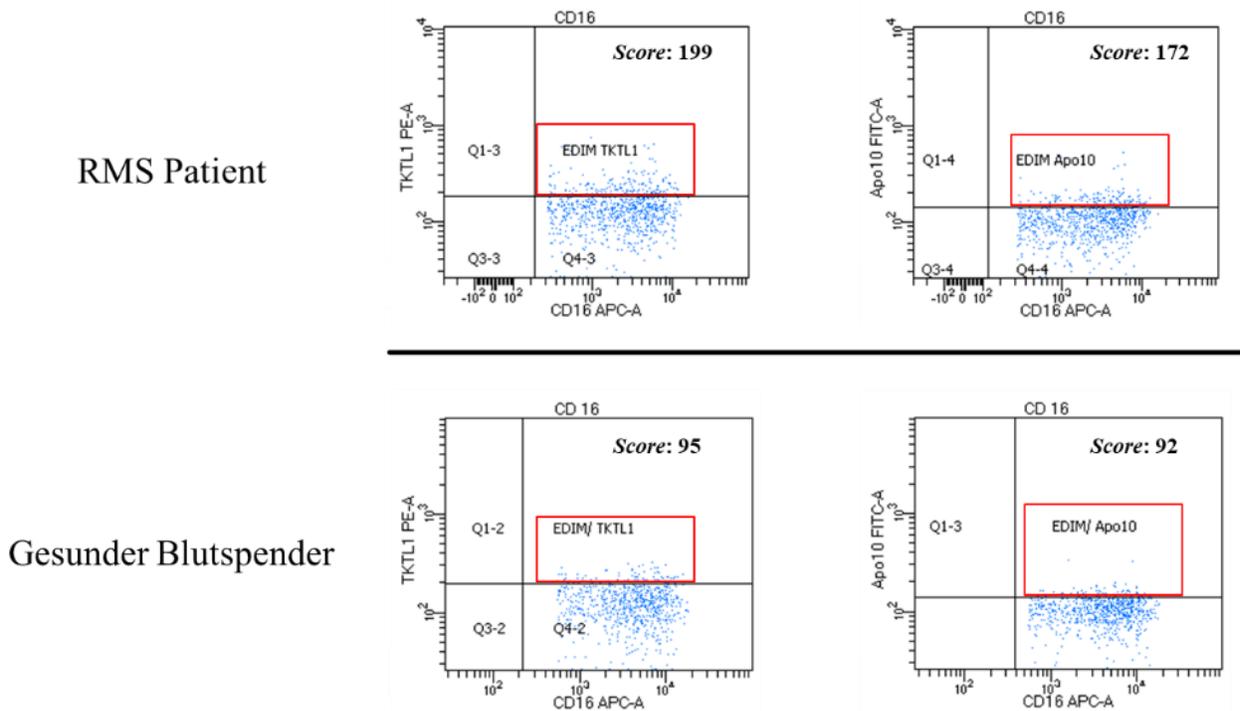


Abbildung 17: Durchflusszytometrische Analyse des TKTL1- und Apo10-EDIM-Tests.

Vergleich der TKTL1- (links) und Apo10- (rechts) EDIM-Analysen eines gesunden Blutspenders (unten) mit der eines RMS-Tumorpatienten (oben). Die Populationen aus denen sich die angegebenen EDIM-scores berechnen, sind durch rote Rechtecke gekennzeichnet. RMS: Rhabdomyosarkom; FITC: Fluorescein-isothiocyanat; PE: Phycoerythrin; APC: Allophycocyanin.

Die Ergebnisse der Messungen bei den RMS-Patienten sind in Abbildung 18 A dargestellt. Dabei zeigen 30 von 32 RMS-Patienten (93,8 %) einen positiven EDIM-TKTL1-score (>119) und 26 von 32 (81,3 %) einen positiven EDIM-Apo10-score (>130). Zwei von 32 (6,3 %) und 6 von 32 (18,8 %) Patienten weisen einen falsch negativen TKTL1- beziehungsweise Apo10-score auf. Dem hingegen ist keiner der gesunden Blutspender positiv auf einen der beiden Biomarker TKTL1 und Apo10. Der Median des EDIM-TKTL1- und EDIM-Apo10-scores ist signifikant höher als der Median der Kontrollgruppe (vgl. Abb.5 A). Betrachtet man den kombinierten score (Summe aus EDIM-TKTL1- und EDIM-Apo10-score) dieser Patientengruppe, so sind dabei

ebenfalls 30 von 32 Patienten (93,8 %) positiv. Auch hierbei ist der *score* der Patientengruppe signifikant höher als der der Kontrollgruppe.

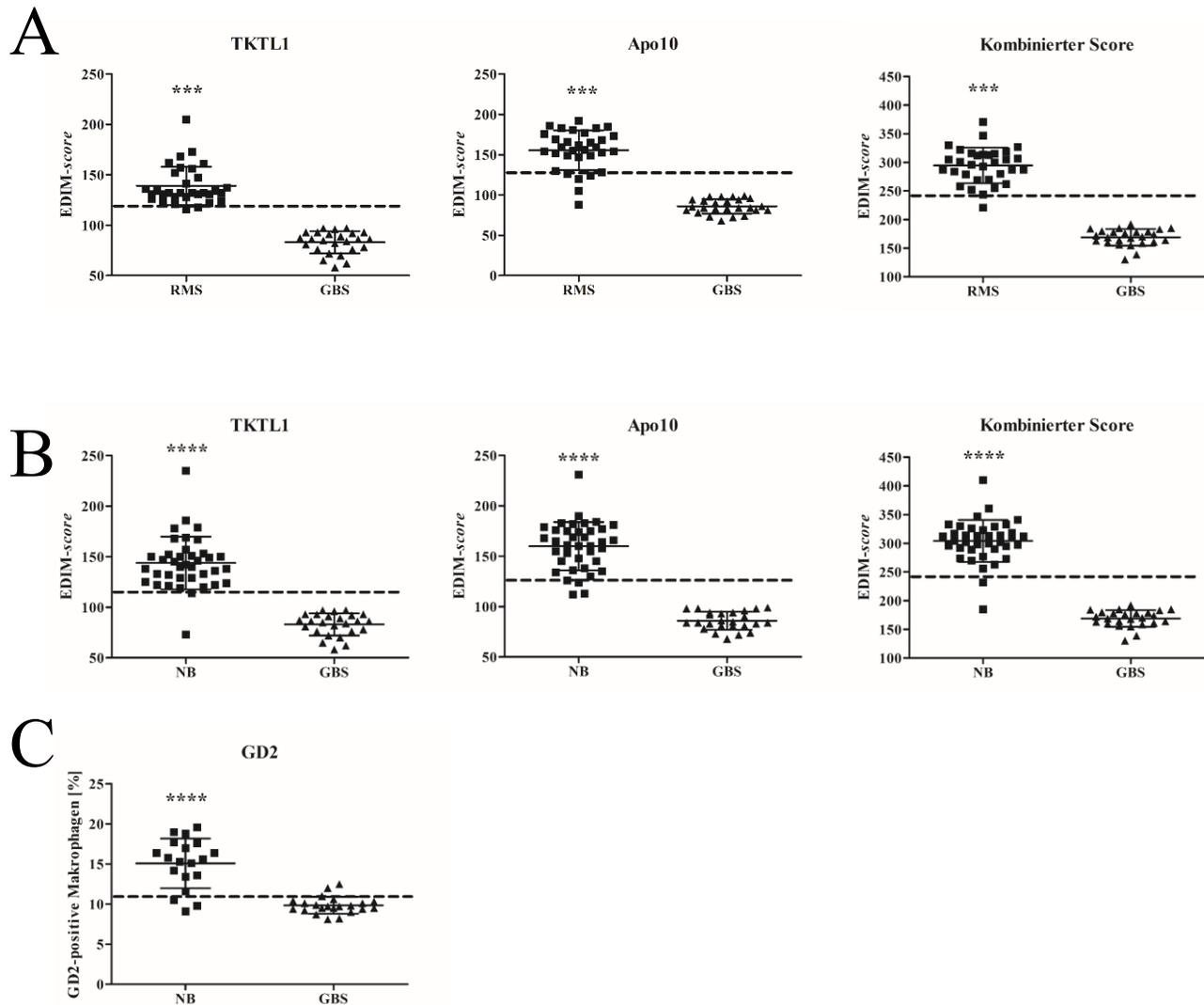


Abbildung 18: Scatterplots der EDIM-scores von RMS- und NB-Patienten

(A) TKTL1-, Apo10- und kombinierter EDIM-score bei RMS-Patienten. (B) TKTL1-, Apo10- und kombinierter EDIM-score bei NB-Patienten. (C) Bei 19 NB-Patienten wurde zusätzlich der Tumormarker GD2 untersucht und die GD2-positiven Makrophagen mit denen von 22 gesunden Blutspendern verglichen. Für den kombinierten score wurden die TKTL1- und Apo10-EDIM-scores addiert. Die EDIM-*scores* werden aus der Abundanz der jeweiligen Tumormarker in den Makrophagen des Vollbluts über durchflusszytometrische Analysen bestimmt. Die gestrichelte Linie zeigt den Grenzwert, welcher genutzt wird, um zwischen gesunden und nicht gesunden Blutspendern zu unterscheiden. RMS: Rhabdomyosarkom-Patienten (n=32); NB: Neuroblastom-Patienten (n=38); GBS: Gesundblutspender (n=25). Für die GD2-Messungen: NB (n=19) und GBS (n=22). Die Sterne zeigen eine Statistische Signifikanz zwischen den beiden Gruppen an “Ungepaarter t-Test“; *: p<0,05; **: p<0,01; p: ***<0,001; ****: p<0,0001.

Für den EDIM-Test der NB-Patienten wurden 38 Kinder (16 weiblich und 22 männlich) mit einem medianen Lebensalter von 66 Monaten (24 bis 168 Monaten) mit histopathologisch gesicherten NB getestet. Die Kontrollgruppe umfasst dieselben GBS wie bei der RMS-Untersuchung. Von den getesteten Patienten sind 36 von 38 (94,7 %) positiv auf den EDIM-TKTL1-*score* und 34 von 38 (89,5 %) positiv auf den EDIM-Apo10-*score* (vgl. Abb. 18 B). Zwei Patienten sind falsch negativ für den EDIM-TKTL1-*score* und vier sind negativ auf den EDIM-Apo10-*score*. Wird der kombinierte *score* genutzt, um eine Aussage über die Tumormarker-Abundanz in den Makrophagen der Patienten zu machen, sind auch hier 36 von 38 (94,7 %) der Patienten positiv auf erhöhte Tumormarkerlevel. Sowohl der einzelne als auch der kombinierte *score* ist auch bei den NB-Patienten signifikant höher als bei der Kontrollgruppe.

In einem dritten Ansatz wurde das Blut von 19 NB-Patienten (5 weiblich und 14 männlich) mit einem medianen Alter von 48 Monaten (24 bis 156 Monaten) und von 22 GBS (10 weiblich und 12 männlich) mit einem medianen Alter von 164 Monaten (24 bis 240) hinsichtlich des GD2-Levels getestet. Da die Messung des Tumormarkers GD2 mithilfe des EDIM-Tests noch nicht etabliert ist, gibt es noch keinen EDIM-GD2-*score*. Aus diesem Grund wird als Ergebnis dieses Versuches die relative Anzahl von GD2-positiven Makrophagen (in %) angegeben (vgl. Abb. 18 C). 16 der 19 NB-Patienten (84 %) sind EDIM-GD2 positiv (mehr als 11 % GD2-positive Makrophagen). Zwei von 22 gesunden Blutspendern (9 %) sind ebenfalls EDIM-GD2 positiv. Vergleicht man den Median der GD2-positiven Makrophagen zwischen den beiden Gruppen (NB vs. GBS) so ist er bei NB-Patienten signifikant höher als bei der Kontrollgruppe.

3.2.2. Korrelation der EDIM-*scores* mit klinischen Parametern

Um zu überprüfen, ob die EDIM-TKTL1- und -Apo10-*scores* mit zusätzlichen klinischen Parametern (bei NB: mit Stadium und *n-myc*-Status; bei RMS: mit den Subtypen) korrelieren, werden die EDIM-*scores* der Patienten derselben Tumorentität miteinander verglichen (vgl. Abb. 19).

Vergleicht man bei den RMS-Patienten die EDIM-scores von eRMS-Patienten mit denen von aRMS-Patienten kann weder bei den einzelnen noch bei dem kombinierten score ein Unterschied beobachtet werden (vgl. Abb. 19 A). Auch der Vergleich zwischen den EDIM-scores von NB-Patienten mit und ohne *n-myc* Amplifikation oder von Stadium III vs. Stadium IV Patienten zeigt keine Korrelationen mit den EDIM-scores (vgl. Abb. 19 B).

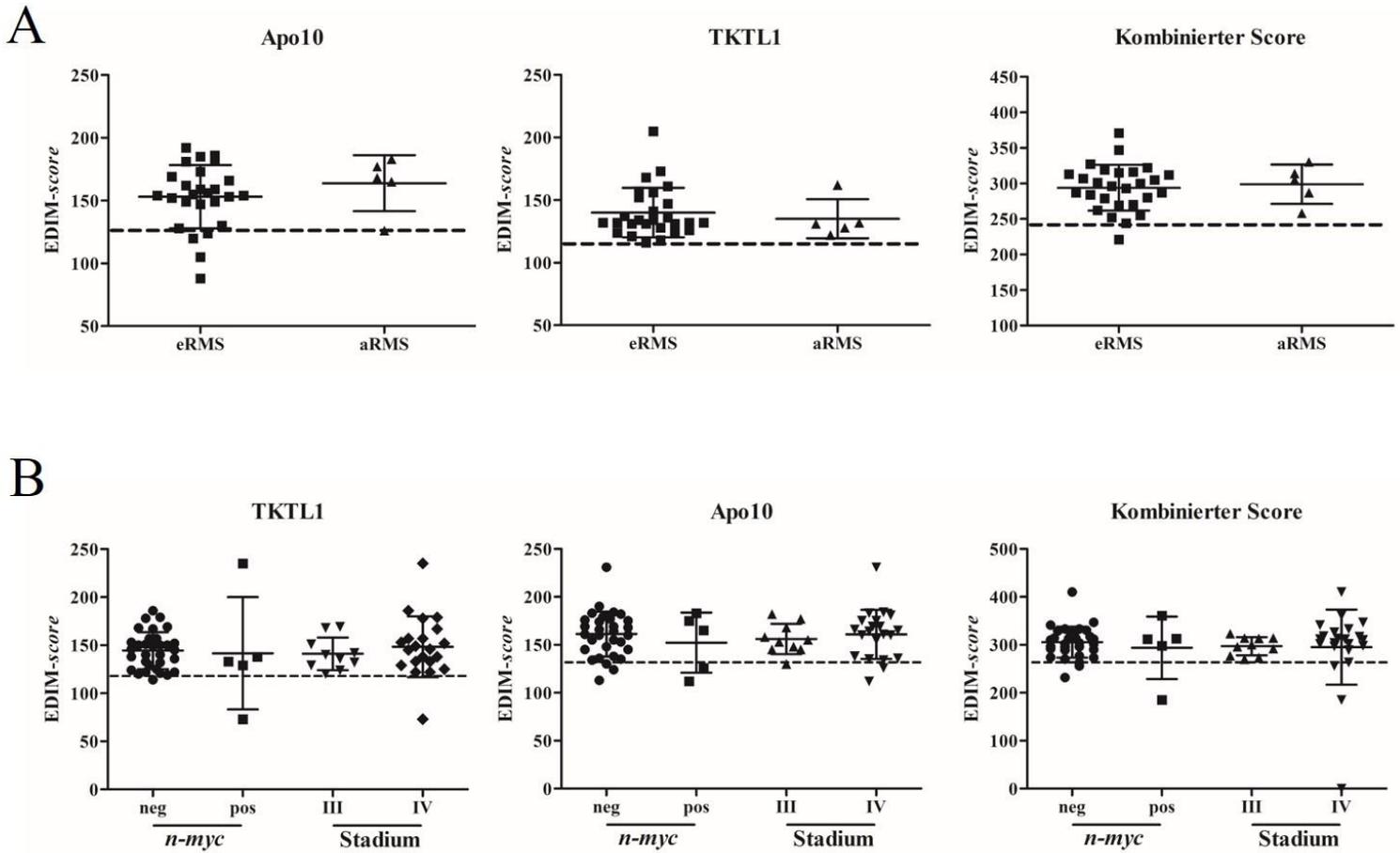


Abbildung 19: Korrelation des EDIM-scores mit klinischen Parametern

(A) Vergleich der TKTL1-, Apo10- und kombinierten EDIM-scores zwischen eRMS- und aRMS-Patienten. (B) Vergleich der TKTL1-, Apo10- und kombinierten EDIM-scores von NB-Patienten mit unterschiedlichem *n-myc* Status und Tumorstadien. eRMS: Patienten mit einem embryonalem Rhabdomyosarkom (n=27); aRMS: Patienten mit einem alveolärem Rhabdomyosarkom (n=5); *n-myc* pos: NB-Patienten mit einer *n-myc* Amplifikation (n=5); *n-myc* neg: NB-Patienten ohne *n-myc* Amplifikation (n=32); Tumorstadium III (n=10); Tumorstadium IV (n=22).

3.2.3. EDIM-scores als Verlaufsparemeter

Neben der Möglichkeit Patienten mithilfe des EDIM-Tests nach einer malignen Entartung zu untersuchen, ist eine Verwendung des Tests für Verlaufskontrollen denkbar. Dabei wird den Patienten über einen längeren Zeitraum Blut abgenommen und dieses dann über einen EDIM-Test analysiert. Daraufhin könnten die EDIM-scores mit dem Verlauf der Erkrankung des jeweiligen Patienten verglichen werden, um herauszufinden, ob der Verlauf mit dem EDIM-Test überwacht werden könnte. Um zu überprüfen, ob sich die EDIM-scores dafür eignen, sind in Abbildung 20 exemplarisch die EDIM-scores von 6 Patienten (drei je Tumorentität) prä- und postoperativ aufgezeigt.

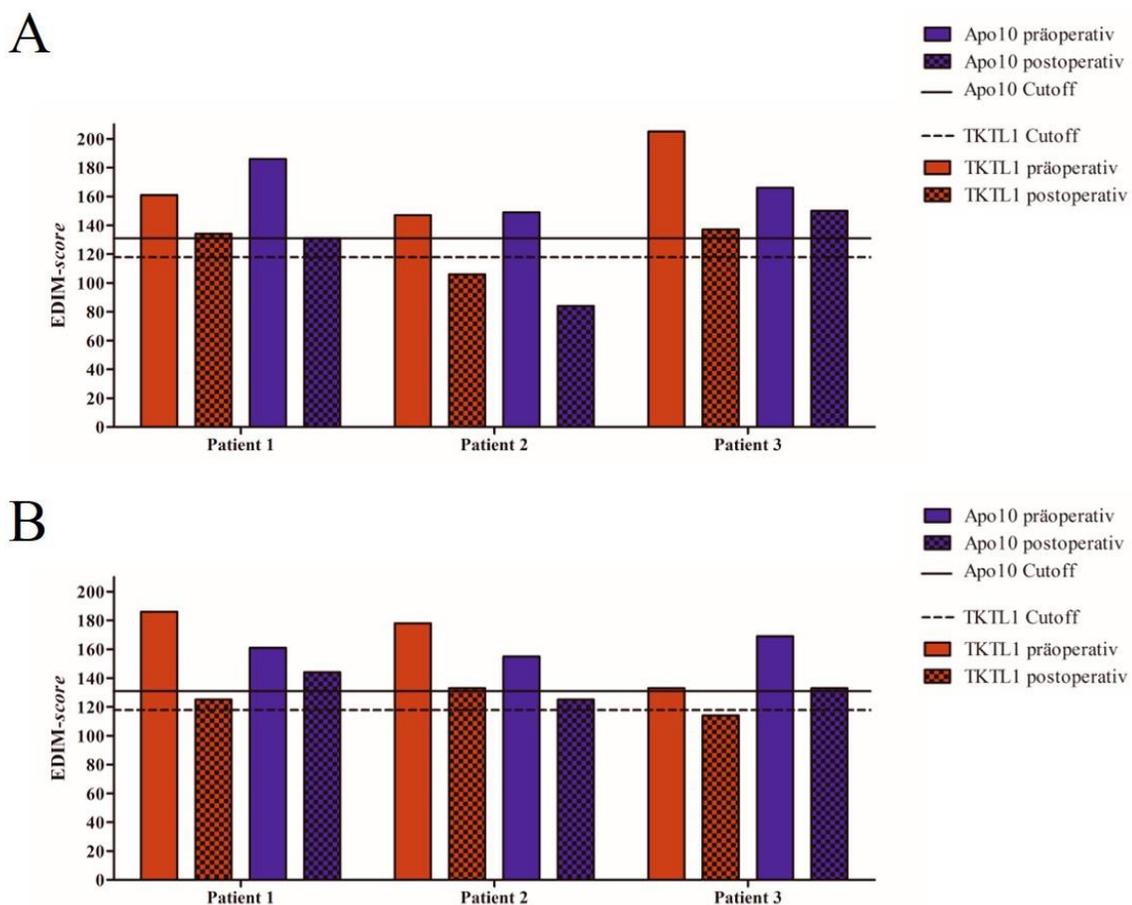


Abbildung 20: Prä- und postoperativer Vergleich von EDIM-scores bei RMS- und NB-Patienten.

Prä- und postoperative EDIM-TKTL1- (rot) und EDIM-Apo10- (blau) scores von RMS- (A) und NB- (B) Patienten. Die durchgezogene und die gestrichelte Linie geben die Apo10- beziehungsweise TKTL1-Cutoff-Werte wieder, die anhand gesunder Blutspender bestimmt worden sind.

Das Probenmaterial wurde sechs bis 24 Wochen nach der R₀-Resektion entnommen. Sowohl bei den RMS- als auch bei den NB-Patienten ist ein Rückgang der EDIM-TKTL1- und EDIM-Apo10-*scores* bei der postoperativen Messung zu sehen (vgl. Abb. 20). In einigen Patienten fallen entweder beide oder ein Wert unter den Cutoff (gemessen an den Werten gesunder Blutspender; RMS: Patient 2 (Abb. 20 A) und NB: Patient 3 (Abb. 20 B)). In den meisten Fällen aber, streuen die EDIM-*scores* um die Cutoff-Werte. Interessanterweise ist ebenfalls zu beobachten, dass die Apo10- und TKTL1-*scores* innerhalb eines Patienten nicht in gleichem Maße fallen.

3.2.4. CD16-Expression in Monozyten von Rhabdomyosarkom- und Neuroblastom-Patienten

In einem weiteren Versuch wurde die Expression eines reifungs-assoziierten Antigens von Monozyten der Studienpatienten analysiert. Bei Menschen ohne pathologischen Hintergrund exprimiert nur ein kleiner Teil der Monozyten das reifungs-assoziierte Antigen CD16. Bei Patienten mit einer bakteriellen Sepsis oder verschiedenen Krebstypen wird eine Erhöhung dieser Monozytenpopulation beobachtet [165]. Für die Expressionsanalysen wurde Blut der Patienten mit Anti-CD14 und Anti-CD16 Antikörpern angefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Es wurden verschiedene Patientenpopulationen der jeweiligen Tumorentitäten (GBS vs. RMS-Patienten, eRMS vs. aRMS; GBS vs. NB-Patienten, NB St. III vs. NB St. IV und *n-myc* positive vs. *n-myc* negative NB-Patienten) analysiert und miteinander verglichen (vgl. Abb. 21).

Es ist weder bei RMS- noch bei NB-Patienten ein signifikanter Unterschied der CD16-Expression zwischen den miteinander verglichenen Patientenpopulationen zu sehen. Ebenso ist kein signifikanter Unterschied zu GBS erkennbar. Auffällig ist aber, dass bei allen GBS etwa 10 % der Monozyten CD16 positiv sind und dass bei einigen RMS- und NB-Patienten eine höhere CD16-Expression vorhanden ist. Das ist vor allem bei den NB-Patienten zu beobachten, bei denen die Monozyten von 10 der 32 (31,3 %) Patienten erhöhte CD16-Expressionen zeigen (>18 % der Monozyten CD16 positiv). Dieses Ergebnis lässt sich jedoch nicht mit der Aggressivität der Tumore (St. III vs. St IV und *n-myc* positiv vs. *n-myc* negativ) erklären.

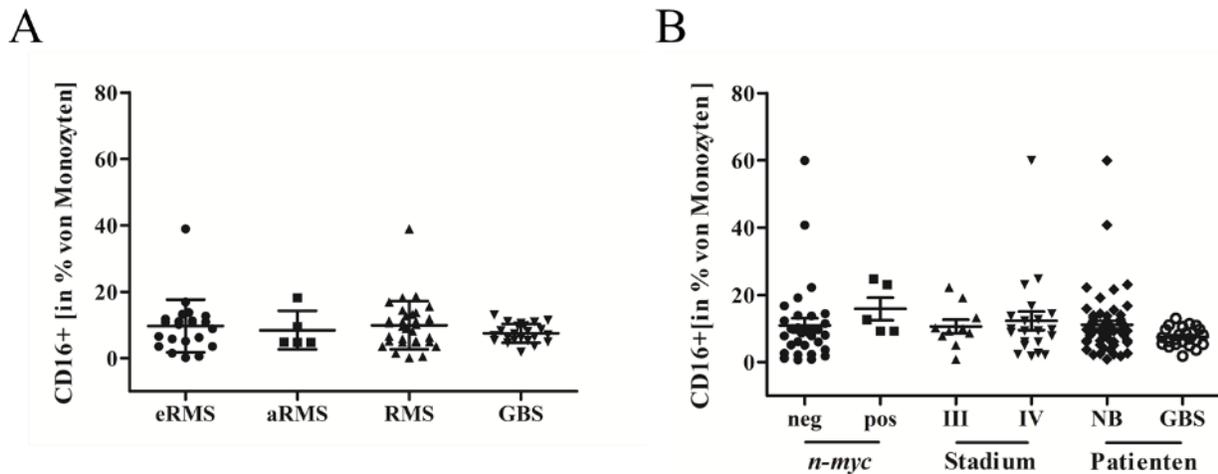


Abbildung 21: Vergleich der Abundanz von CD16 positiven Monozyten in RMS- und NB-Patienten und gesunden Blutspendern.

Monozyten von (A) RMS- und (B) NB-Patienten wurden auf die Expression von CD16 getestet. Als Kontrolle wurden zusätzlich Monozyten gesunder Blutspender ebenfalls auf die Expression von CD16 untersucht. Dargestellt ist außerdem die CD16-Expression der Tumorpatienten untergliedert in unterschiedliche klinische Parameter. eRMS: Patienten mit einem embryonalem Rhabdomyosarkom (n=27); Patienten mit einem alveolärem Rhabdomyosarkom (n=5); *n-myc* pos: NB-Patienten mit einer *n-myc* Amplifikation (n=5); *n-myc* neg: NB-Patienten ohne *n-myc* Amplifikation (n=32); Tumorstadium III (n=10); Tumorstadium IV (n=22), GBS: gesunde Blutspender (n=25).

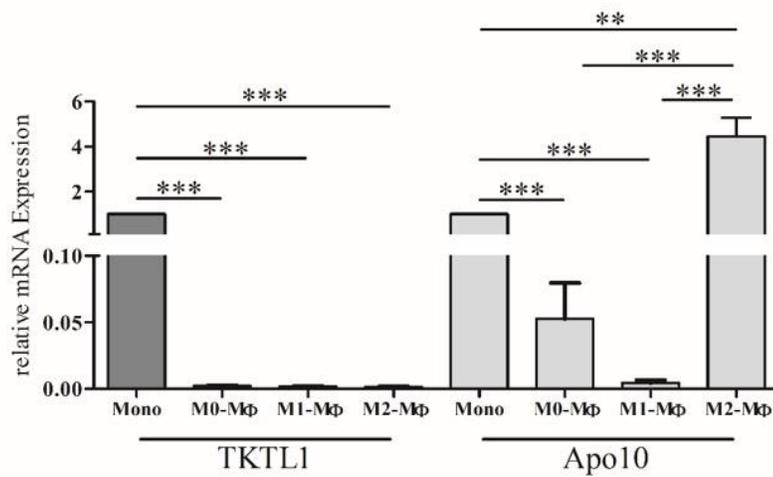
3.3. *In vitro*-Analyse der Tumormarker in Makrophagen

Die Ergebnisse in 3.2. veranschaulichen die Funktionalität des EDIM-Tests bei RMS- und NB-Patienten bezüglich der Detektion der Tumore. Mithilfe dieser Methode ist es möglich die Tumormarker TKTL1, Apo10 und GD2 (nur in NB-Patienten) in Makrophagen (MΦ) der Tumorpatienten nachzuweisen. Im folgenden Abschnitt wird die Funktionalität des EDIM-Tests *in vitro* genauer untersucht.

3.3.1. Expression der Tumormarker TKTL1, Apo10 und GD2 in MDMs

Die folgenden Analysen wurden in *in vitro*-differenzierten M Φ , genannt MDMs (*monocyte derived macrophages*) durchgeführt. Für die Analysen wurde ein Teil der M Φ zusätzlich noch aktiviert (M1-Aktivierung mit LPS und INF- γ ; M2-Aktivierung mit IL-4). Die Differenzierung als auch die Aktivierung der M Φ ist in Abschnitt 2.2.5. erläutert. Die Expression von TKTL1, Apo10 und GD2 in aktivierten beziehungsweise nicht-aktivierten MDMs wurde untersucht, um auszuschließen, dass die Aktivierung von M Φ nicht bereits zu einer Erhöhung der Expression der Biomarker führt. Die Expressionsanalysen der Tumormarker TKTL1 und Apo10 wurden sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene durchgeführt. Da GD2 kein Protein ist, beziehen sich die Daten auf die Abundanz des Moleküls auf der Membran der MDMs. Zur Analyse auf transkriptioneller Ebene der Tumormarker TKTL1 und Apo10 wurden die MDMs nach der Aktivierung geerntet, lysiert und die gesamt-RNA isoliert. Nach der RNA-Extraktion erfolgte eine reverse Transkription zu Herstellung von cDNA, gefolgt von einer quantitativen *real-time* PCR zur Bestimmung der transkriptionellen mRNA-Expression. Die Expressionslevel sind als relative Werte in Bezug auf eine Kontrolle angegeben. Als Kontrolle bei den Expressionsanalysen dienen undifferenzierte Monozyten (vgl. Abb. 22 A).

A



B

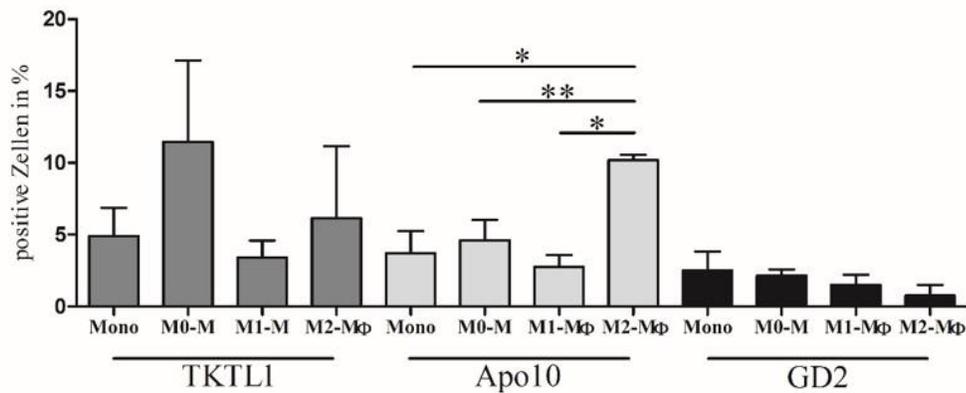


Abbildung 22: Expression der untersuchten Tumormarker in MDMs.

(A) Transkriptionelle Expression von TKTL1 (dunkelgrau) und Apo10 (hellgrau) in MDMs. Für die Quantifizierung der mRNA-Level wurde eine quantitative *real-time* RT-PCR durchgeführt, wobei TBP als interne Kontrolle diente. Die Expressionen in den MDMs werden mit der Expression in undifferenzierten Monozyten verglichen, weshalb sie als relative Werte dargestellt sind (n=4). (B) TKTL1 (dunkelgrau), Apo10 (hellgrau) und GD2 (schwarz) Proteinexpression/Abundanz in MDMs. Die Bestimmung der Proteinexpression basiert auf durchflusszytometrischen Messungen und ist als Prozentsatz von allen gemessenen Zellen dargestellt. (n=5). M0-Mφ: nicht aktivierte Makrophagen; M1- Mφ: Makrophagen mit dem M1 Subtyp; M2- Mφ: Makrophagen mit dem M2 Subtyp. Die Sterne zeigen eine Statistische Signifikanz zwischen den markierten Gruppen an “*Ordinary one way ANOVA; Dunnetts multiple comparison test*“ *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001.

Im Vergleich zu den Monozyten, ist die Expression der TKTL1-mRNA in allen MDMs signifikant niedriger. TKTL1-mRNA wird in MDMs kaum exprimiert, wobei es keinen Unterschied zwischen den verschiedenen MDMs gibt. Betrachtet man die Apo10-mRNA-Expression so fällt auf, dass sie bei M0-M Φ und M1-M Φ signifikant niedriger und bei M2-M Φ signifikant höher ist (4-fach) als bei Monozyten. Die Apo10-Expression in M2-M Φ ist außerdem signifikant höher als bei den beiden anderen MDM-Subtypen. Zwischen M0-M Φ und M1-M Φ ist kein signifikanter Unterschied zu sehen.

Zur Expressionsanalyse auf Proteinebene (TKTL1 und Apo10) beziehungsweise die Abundanz der GD2-Moleküle auf den MDMs wurden die Zellen mit fluoreszenz-gelabelten Antikörpern angefärbt und anschließend durchflusszytometrisch gemessen. Auch hier wurden die Expressionen/Abundanz der Marker zusätzlich mit den Monozyten als Kontrollen analysiert (vgl. Abb. 22 B). Die Ergebnisse der FACS-Analyse werden als Prozentsatz der für die jeweiligen Marker positiven Zellen angegeben (alle Zellen = 100 %). Es gibt keinen Unterschied in der TKTL1-Expression zwischen Monozyten und MDMs. Nur ~5 % der Zellen jeder Gruppe sind positiv für TKTL1, was bedeutet, dass die Hauptpopulation der Zellen keine erhöhte TKTL1-Expression aufweist. Auch bei dem Vergleich der GD2-Abundanz auf den Zellen ist kein Unterschied zwischen den untersuchten Zelltypen auszumachen. Hier sind sogar über 95 % der Zellen negativ für GD2, was mit einem Fehlen des Moleküls erklärt werden kann. Der Vergleich der Apo10-Proteinexpression in den Zellen lässt ein ähnliches Ergebnis wie bei der transkriptionellen Expression erkennen. Nur die M2-M Φ zeigen eine signifikant höhere Expression von Apo10 im Vergleich zu den Monozyten und den anderen MDM-Subtypen. Auffällig ist auch, dass obwohl die mRNA-Expression von TKTL1 und Apo10 relativ große Unterschiede zwischen den Zelltypen aufweist, es auf Proteinebene keinen Unterschied mehr gibt.

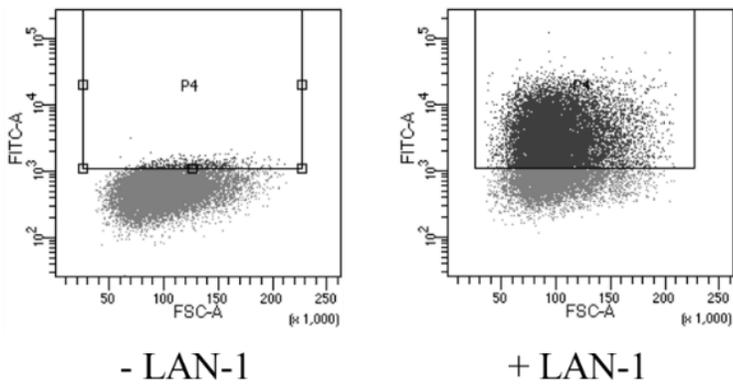
3.3.2. Analysen zur Internalisation von Tumorpartikeln durch Makrophagen

Um zu überprüfen, ob M Φ dazu in der Lage sind Tumorzellen oder Stücke von Tumorzellen zu phagozytieren und diese zu internalisieren, wurden *in vitro*-Kokultur-Experimente durchgeführt. Die Aufnahme der Tumorpartikel wurde anhand des Tumormarkers GD2 mit LAN-1-Zellen überprüft, da über 90 % dieser Zellen positiv auf GD2 sind (siehe Abschnitt 3.1.2.). Ziel dieses Experimentes war es ein *in vitro proof of principle* für den EDIM-Test zu entwickeln, in dem überprüft werden sollte, ob sich Tumormoleküle (hier GD2) nach der Phagozytose in den MDMs nachweisen lassen. Für diese Experimente wurden LAN-1-Zellen mit einer Anti-GD2-Antikörperlösung angefärbt und mit den verschiedenen differenzierten MDM-Subtypen inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit M Φ -spezifischen-AK angefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (vgl. Abb. 10). Bei der Analyse wurde nach den M Φ -Populationen „gated“ und diese dann auf die GD2-Positivität untersucht. Um Zellen auszuschließen, welche Tumorpartikel nicht internalisiert, sondern nur auf der Zelloberfläche gebunden haben, erfolgte unmittelbar vor der FACS-Analyse ein Trypanblau-*Quenching*.

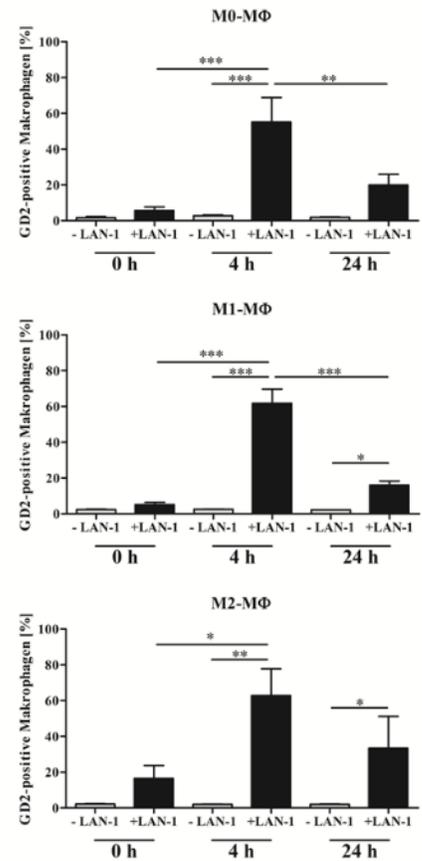
Nach Inkubation mit den gelabelten LAN-1-Zellen, ist ein Teil der *in vitro*-differenzierten MDMs positiv für GD2. In Abbildung 23 A ist eine beispielhafte FACS-Analyse von M2-M Φ mit und ohne LAN-1-Zellen abgebildet. Vergleicht man die Inkubationszeiten der Kokulturen miteinander, so ist bei den drei MDM-Subtypen ein ähnliches Ergebnis zu beobachten. Nach vier Stunden ist die Population der GD2-positiven MDMs am höchsten (~60 %) und nach 24 Stunden nehmen die GD2-positiven MDMs wieder ab (~20 %; vgl. Abb. 23 B). Gleichzeitig ist bei den Kokulturansätzen nach vier und 24 Stunden stets ein signifikanter Unterschied zu den Ansätzen ohne LAN-1 zu sehen. Nur die M0-M Φ zeigen nach 24 Stunden Inkubation keinen signifikanten Unterschied zwischen mit und ohne LAN-1-Zellen-inkubierten MDMs. Stellt man die Ergebnisse der drei Subtypen zusammen dar, so lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Subtypen erkennen (vgl. Abb. 23 C).

A

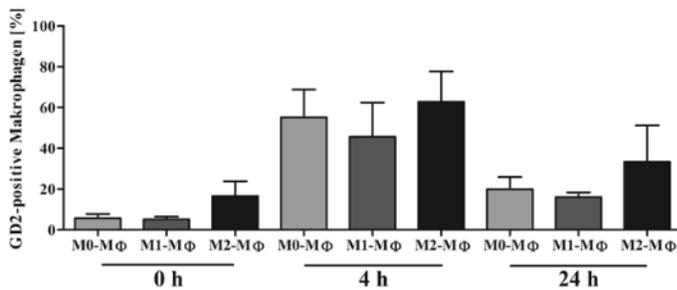
M2-MΦ 4 h Inkubation



B



C

**Abbildung 23: GD2-positive MDMs nach Kokultur mit LAN-1-Zellen.**

In vitro-differenzierte und aktivierte MDMs wurden entweder mit oder ohne Anti-GD2-Antikörper-gelabelte LAN-1 Zellen inkubiert, um die Aufnahme der Tumorbestandteile zu analysieren. Zur Auswertung der Aufnahme erfolgte nach der Inkubation eine Färbung, sowie eine durchflusszytometrische Messung der MDMs. (A) Dotplot-Diagramme beispielhafter FACS-Messungen der MDMs. GD2-FITC Population der M2-MΦ mit (rechts) und ohne (links) Tumorzellen. (B) Durchflusszytometrische Auswertung der GD2-positiven MDMs nach verschiedenen Aktivierungstypen. Die Kokultur mit den Tumorzellen erfolgte für 0 h bis 24 h. (C) Vergleich der auf verschiedene Arten aktivierten MDMs in Bezug auf die Aufnahme der Tumorbestandteile. Auf der y-Achse sind die für die jeweiligen Marker positiven MDMs in Prozent dargestellt. FITC: Fluorescein-5-isothiocyanate; FSC: *Forward Scatter*/Vorwärtsstreulicht; P4: Analyisierte Population. Die Sterne zeigen eine Statistische Signifikanz zwischen den markierten Gruppen an “*Ordinary one-way ANOVA; Dunnetts multiple comparison test*“ *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; (n=3-4).

Da Daten aus *in vitro*-Experimenten nicht immer mit Daten aus Patienten oder aus Probanden vergleichbar sind und um zu überprüfen ob es mit dem EDIM-Test möglich ist Tumorpartikel in M Φ aus Probandenblut nachzuweisen, wurden *spike*-Experimente durchgeführt. Dazu wurde gesunden Spendern Blut entnommen und dieses mit Tumorzellen für 24 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Bestimmung der für die Tumormarker TKTL1, Apo10 und GD2 positiven M Φ über den EDIM-Test. Als Kontrolle diente nur Blut und Blut, welches mit Zellkulturmedium inkubiert wurde. Für den Versuch wurden sowohl die RMS-Zelllinien RD und RH30 als auch die NB-Zelllinien LAN-1 und SK-N-BE verwendet. Die LAN-1-Zellen wurden aufgrund ihrer hohen Expression beziehungsweise Abundanz der drei Tumormarker ausgewählt. Demgegenüber wurden die SK-N-BE-Zellen gewählt, da die Abundanz der Marker hier am niedrigsten ist und so die beiden Datensätze miteinander verglichen werden können. In den Versuchen mit RMS-Zelllinien, wurden die M Φ anhand des EDIM-Tests auf TKTL1- und Apo10-Expression untersucht (vgl. Abb. 24 A und B). Die Versuchsansätze mit den NB-Zelllinien wurden zusätzlich noch auf die für GD2-positiven-M Φ analysiert (vgl. Abb. 24 C und D). Die Ergebnisse werden als Prozentsatz, der für die jeweiligen Tumormarker-positiven M Φ angegeben.

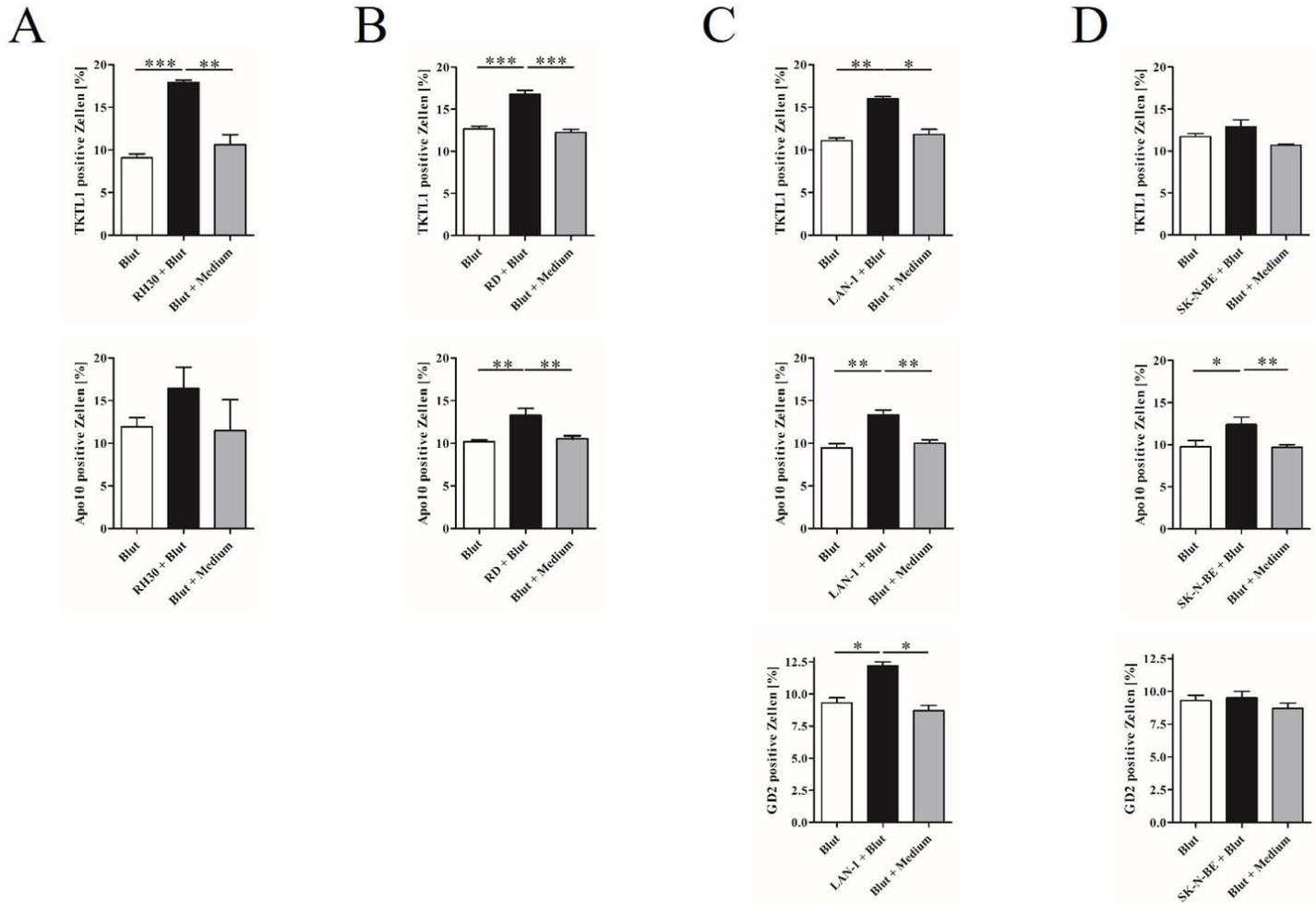


Abbildung 24: Tumormarker-Abundanz in Makrophagen nach Kokultur von Blut mit Tumorzelllinien.

Für die Bestimmung der Abundanz der Tumormarker TKTL1 (oben), Apo10 (Mitte) und GD2 (unten) wurde Blut von gesunden Probanden mit den Tumorzelllinien (A) RH30, (B) RD, (C) LAN-1 und (D) SK-N-BE für 24 h inkubiert. Nach der Inkubation wurden mithilfe des EDIM-Tests und nachfolgender durchflusszytometrischer Analyse, die CD14+/CD16+ Monozyten/Makrophagen auf die Aufnahme der Tumormarker untersucht. Auf der y-Achse sind die für die jeweiligen Marker positiven Makrophagen in Prozent dargestellt. Neben den Kokultur-Daten (schwarzer Balken) ist nur Blut (weißer Balken) und Blut welches mit Zellkulturmedium (grauer Balken) kultiviert wurde, als interne Kontrollen abgebildet. Die Sterne zeigen eine statistische Signifikanz zwischen den markierten Gruppen an "Ordinary one-way ANOVA; Dunnetts multiple comparison test": *; p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001; (n=3).

In den Kokultur-Experimenten mit den RH30-Zellen zeigen sich nur für TKTL1 signifikant mehr positive MΦ im Vergleich zu den Kontrollen (17,5 % vs. 10 %). Auch für Apo10 sind mehr MΦ positiv, wenn sie mit Tumorzellen inkubiert werden, jedoch ist dieses Ergebnis nicht signifikant (vgl. Abb. 24 A). Nach Inkubation mit RD-Zellen sind signifikant mehr MΦ für beide Marker positiv als bei den Kontrollen (TKTL1: 17 % vs. 12 % und Apo10: 14 % vs. 10 %; vgl. Abb. 24 B). Auch die Ansätze mit LAN-1 zeigen signifikant mehr TKTL1-, Apo10- und GD2-positive MΦ, verglichen mit den Kontrollen (vgl. Abb. 24 C). MΦ, welche mit SK-N-BE-Zellen inkubiert werden, sind nur für Apo10 von den Kontrollen zu unterscheiden (vgl. Abb. 24 D). Mit dem EDIM-Test ist es also prinzipiell möglich Tumorpartikel in MΦ zu detektieren, welche mit Tumorzelllinien kokultiviert worden sind.

3.4. TKTL1-Expression und DNA-Hypomethylierung

TKTL1 und Apo10 werden in RMS- und NB-Zelllinien als auch in den entsprechenden Tumoren überexprimiert. Auch GD2 liegt in hoher Abundanz in NB-Zelllinien vor. Der kommende Abschnitt beschäftigt sich nun mit dem Mechanismus welcher der veränderten TKTL1-Expression zugrunde liegt. Die Entscheidung, bei welchem Tumormarker der Mechanismus untersucht wurde, fiel auf TKTL1, da es in beiden Tumorentitäten überexprimiert wird, wobei ausgeschlossen wurde, dass dieser Effekt durch die MΦ zustande kommt (vgl. dazu 3.1 und 3.3.2.). Im Melanom und Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches wird die TKTL1-Expression mit einer Hypomethylierung des TKTL1-Promotors in Zusammenhang gebracht [114]. Die Ergebnisse dieser Studien zeigen, dass es durch die Hypomethylierung des TKTL1-Promotors zu einer Überexpression von TKTL1 kommt. Aus diesem Grund wird in diesem Abschnitt untersucht, ob auch bei RMS und NB die Hypomethylierung des TKTL1-Promotors ein Grund für die Aktivierung des TKTL1-Gens ist.

Dafür wurde zuerst in RMS- und NB-Zelllinien überprüft ob die TKTL1-Expression mit dem Methylierungsgrad der DNA assoziiert ist. Darauffolgend wurde über eine *in silico*-Recherche nach CpG-Inseln im TKTL1-Promotor gesucht und eine dieser CpG-Inseln auf den DNA-Methylierungsgrad untersucht. Die CpG-Inseln wurden hierzu auf

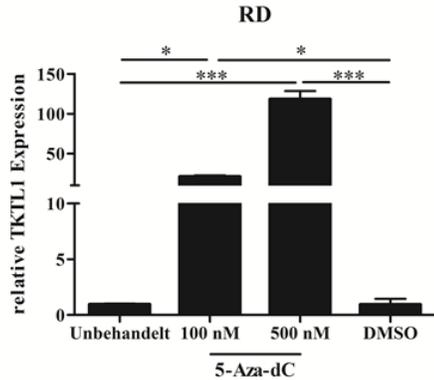
CpG-Dinukleotid-DNA-Methylierung über eine Bisulfit-Sequenzierung in Gewebeproben von Patienten analysiert.

3.4.1. Ist die TKTL1-Expression abhängig vom Methylierungsgrad der DNA?

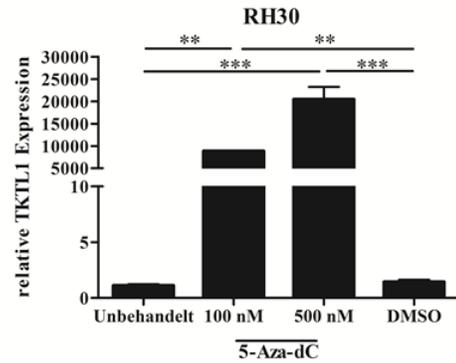
Zur Überprüfung der Korrelation der TKTL1-Expression und des Methylierungsgrades der DNA wurden die zwei RMS-Zelllinien RD und RH30 sowie die zwei NB-Zelllinien LAN-1 und SK-N-BE mit unterschiedlichen Konzentrationen der demethylierenden Substanz 5-Aza-dC (Decitabin) behandelt und danach die transkriptionelle Expression mit einer quantitativen *real-time* PCR analysiert. Die TKTL1-Expression wird als relativer Wert zu einer unbehandelten Kontrolle angegeben. Zusätzlich wurde eine mit dem Lösemittel von Decitabin (DMSO) behandelte Kontrolle analysiert (vgl. Abb. 12).

Die Ergebnisse der quantitativen *real-time* PCR zeigen in allen Zelllinien eine Zunahme der TKTL1-Expression durch Behandlung mit Decitabin. Dabei nimmt die TKTL1-Expression mit zunehmender Decitabinkonzentration zu. Allen Zelllinien gleich ist auch, dass die mit DMSO behandelte Kontrollen nicht zu einer Erhöhung der TKTL1-Expression beitragen. Dieses Ergebnis zeigt die Abhängigkeit der TKTL1-Expression vom Methylierungsgrad der DNA. Auffallend ist zudem noch die Tatsache, dass in den Zelllinien, die von vornherein eine geringere TKTL1-Expression aufweisen (RH30 und LAN-1; vgl. 3.1.), die Behandlung zu einer drastischen Zunahme der Expression führt (vgl. Abb. 25 B und C). Auch bei Zellen, welche vor der Behandlung eine hohe TKTL1-Expression aufweisen (RD und SK-N-BE), führt die Behandlung zu einer erhöhten Expression, jedoch in viel geringerem Ausmaß (vgl. Abb. 25 A und D).

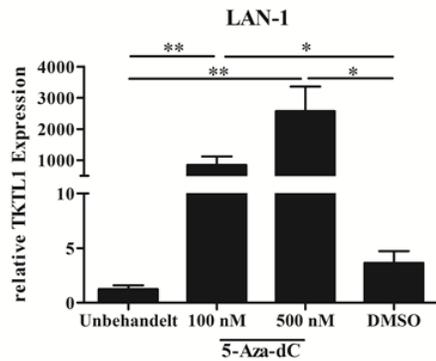
A



B



C



D

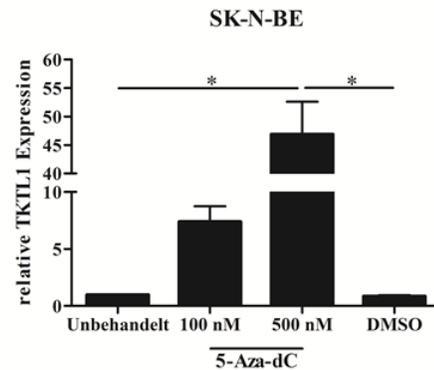


Abbildung 25: Abhängigkeit der TKTL1-mRNA-Expression vom DNA-Methylierungsgrad.

TKTL1-Expression der RMS-Zelllinien RD (A) und RH30 (B) sowie der NB-Zelllinien LAN-1 (C) und SK-N-BE (D) nach Behandlung mit dem DNA-Methyltransferase Inhibitor 5-Aza-dC. Für die Quantifizierung der mRNA-Level wurde eine quantitative *real-time* RT-PCR durchgeführt, wobei TBP als interne Kontrolle diente. Die Expression ist als relativer Wert im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle angegeben. RMS: Rhabdomyosarkoma; NB: Neuroblastoma; 5-Aza-dC: 5-Aza-2'-desoxycytidin. Die Sterne zeigen eine statistische Signifikanz zwischen den markierten Gruppen an "Ordinary one-way ANOVA; Dunnetts multiple comparison test" *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; (n=4).

3.4.2. *In silico*-Analyse des TKTL1-Promotors zur Identifikation von CpG-Inseln

Die TKTL1-Expression ist von dem Methylierungsgrad der DNA abhängig. Nun soll überprüft werden, ob eine Hypomethylierung des TKTL1-Promotors mit einer erhöhten TKTL1-Expression in Tumorproben von RMS- und NB-Patienten in Verbindung steht. Ein *in silico*-Ansatz wurde gewählt, um den Promotor auf vorhandene CpG-Inseln zu durchsuchen und damit CpG-Dinukleotide zu finden, welche für eine Hypomethylierung in Frage kommen. Zuerst wurde der Transkriptionsstart (TSS) des TKTL1-Gens ausfindig gemacht und dann mithilfe des Programmes *MethPrimer* nach CpG-Inseln in den Bereich des TSS gesucht. In Abbildung 26 A sind der TSS und die durch *MethPrimer* gefundenen CpG-Inseln in der Nähe des TSS dargestellt. Zwei CpG-Inseln befinden sich in unmittelbarer Nähe des TSS von TKTL1 und sind damit mögliche Bereiche der Hypomethylierung des Promotors. Mit dieser Analyse als Basis wurde in folgenden Experimenten die CpG-Inseln *downstream* des TSS über Bisulfit-Sequenzierung auf eine Hypomethylierung untersucht. Die genauen DNA-Sequenzen des TKTL1-Promotors und die der untersuchten CpG-Inseln sowie die mithilfe der Bisulfit-Sequenzierung analysierten Bereiche sind im Anhang zu finden (vgl. Abschnitt 7.1.).

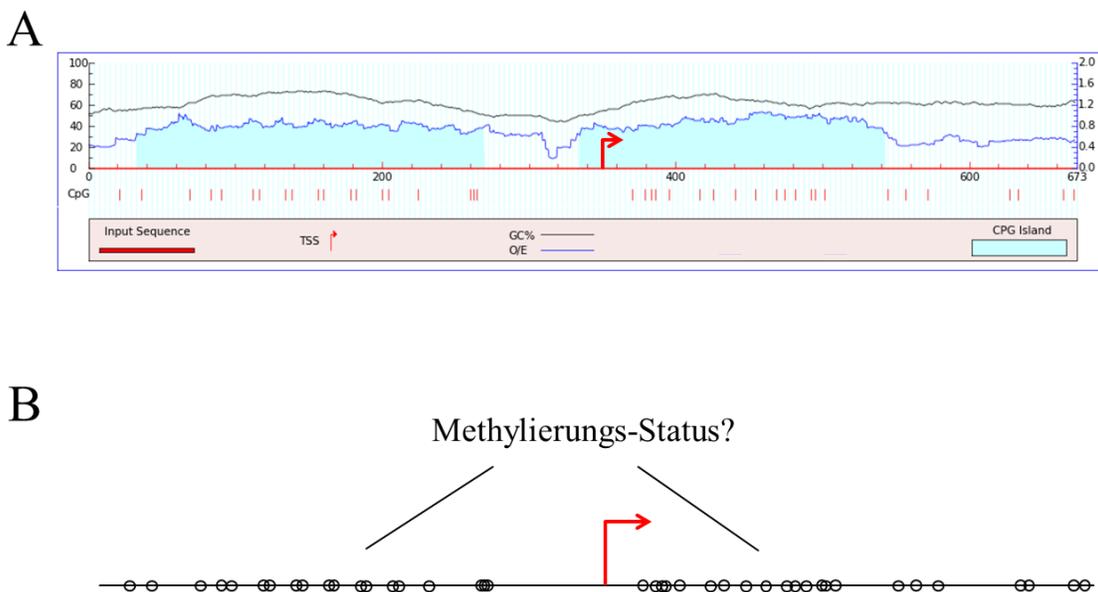


Abbildung 26: *In silico* Analyse zur Identifikation von CpG-Inseln im TKTL1-Promotor.

(A) Mithilfe der Browserssoftware *MethPrimer* konnten zwei CpG-Inseln im Promotor von TKTL1 gefunden werden. (B) Vereinfachte Darstellung der sich im TKTL1-Promotor befindenden CpG-Inseln. TSS und Pfeile: Transkriptionsstart; unausgefüllte Kreise: CpGs; CpG: CpG-Dinukleotide.

3.4.3. Bisulfit-Sequenzierung des TKTL1-Promotors in RMS- und NB-Gewebeproben

Wie bereits erwähnt sollte eine CpG-Insel des TKTL1-Promotors in Gewebeproben von Tumorpatienten auf mögliche Hypomethylierungen analysiert werden. Die Methode, die in dieser Arbeit zur Identifikation von Methylierungen der CpG-Dinukleotide verwendet wurde, ist die Bisulfit-Sequenzierung (BS-Sequenzierung). Hierfür wurde die genomische DNA der jeweiligen Proben isoliert und anschließend einer Bisulfitbehandlung unterzogen. Da nur der oben genannte Bereich untersucht werden sollte, wurde dieser mit spezifischen Primern über eine *touchdown*-PCR amplifiziert. Die Sequenzen der Primer, die für die Amplifikation der CpG-Insel genutzt wurden, wurden ebenfalls mit *MethPrimer* erstellt (vgl. Abschnitt 2.3.5.3. Tabelle 28). Nach der PCR wurden die Produkte über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (vgl. Abb. 27).

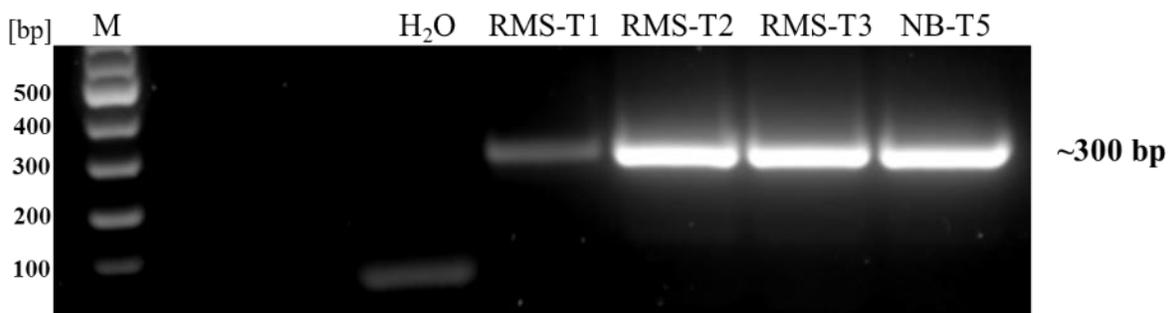


Abbildung 27: PCR-Produkt nach der *touchdown*-PCR.

Zur Bestimmung des DNA-Methylierungsmusters wurde die genomische DNA der Tumorproben einer Bisulfitbehandlung unterzogen. Nach der BS-Behandlung erfolgte eine *touchdown*-PCR zur Amplifikation der TKTL1-Promotor-Region. Die PCR-Produkte wurden über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Banden mit *GelRed* sichtbar gemacht. Beispielhaft sind hier die PCR Produkte von drei RMS-Gewebeproben und einer NB-Gewebeprobe dargestellt. Das erwartete Produkt besitzt eine Größe von etwa 300 bp. Als Kontrolle wurde Wasser verwendet. M: 100 bp DNA-Leiter.

Für diesen Versuch wurden dieselben Gewebeproben verwendet, mit denen die TKTL1-Expression in Abschnitt 3.1.3. bestimmt worden sind. Die Länge des erwarteten PCR-Produktes beträgt etwa 300 bp. In Abbildung 27 sind exemplarisch die *touchdown*-PCR-(TD-PCR) Produkte von drei RMS-Gewebeproben und einer NB-Gewebeprobe

abgebildet. Nach der Agarose-Gelelektrophorese wurden die Banden über eine Gelextraktion isoliert und aufgereinigt, um sie dann für Sequenzierungszwecke zu benutzen. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse dieses Versuches ist in Tabelle 37 zu sehen. Bei jeweils einer Gewebeprobe jeder Tumorentität konnte keine erfolgreiche TD-PCR und damit auch keine Sequenzierung durchgeführt werden (RMS: T4; NB: T3). Außerdem war von zwei NB-Gewebeproben nicht genug Gewebematerial vorhanden, um diese für den Versuch zu nutzen (NB: T2 und T4). Aus diesem Grund wurden zusätzliche Gewebeproben für diesen Versuch verwendet (RMS: T6 – T8; NB: T8). Mit 13 von 15 Proben konnte der TKTL1- Promotorabschnitt erfolgreich über eine TD-PCR amplifiziert und die DNA dann über Gelextraktion isoliert werden. Als Kontrolle in diesem Versuch diente die genomische DNA von Fibroblasten.

Tabelle 37: Zusammenfassung der Ergebnisse der Tumor-Gewebeproben für die BS-Sequenzierung.

Tumorentität	Probe	<i>touchdown-PCR</i>	Gelextraktion
-	Fibros	Erfolgreich	Erfolgreich
eRMS	T1	Erfolgreich	Erfolgreich
eRMS	T2	Erfolgreich	Erfolgreich
eRMS	T3	Erfolgreich	Erfolgreich
aRMS	T4	Nicht erfolgreich	-
aRMS	T5	Erfolgreich	Erfolgreich
eRMS	T6	Erfolgreich	Erfolgreich
eRMS	T7	Erfolgreich	Erfolgreich
eRMS	T8	Erfolgreich	Erfolgreich
NB	T1	Erfolgreich	Erfolgreich
NB	T2	Keine Gewebeprobe	-
NB	T3	Nicht erfolgreich	-
NB	T4	Keine Gewebeprobe	-
NB	T5	Erfolgreich	Erfolgreich
NB	T6	Erfolgreich	Erfolgreich
NB	T7	Erfolgreich	Erfolgreich
NB	T8	Erfolgreich	Erfolgreich

Nach der Gelextraktion wurden die 13 Proben für die Sequenzierung verwendet. Dabei wurden dieselben Primer wie bei der Amplifikation der CpG-Insel genutzt. Die Bereiche wurden sowohl mit dem *forward* als auch mit dem *reverse* Primer sequenziert, um etwaige Fehler zu verhindern. Anhand der erhaltenen Sequenzen können nun Rückschlüsse auf die DNA-Methylierung der untersuchten CpG-Insel gemacht werden (Erläuterung dazu in Abschnitt 2.3.7 und 2.6.). Die vollständigen Sequenzen sind im Anhang (vgl. Abschnitt 7.1.1.) zu finden.

Die Ergebnisse der BS-Sequenzierung zeigen, dass bei der hier genutzten Kontrollzelllinie (Fibroblasten) keine unmethylierten CpG-Dinukleotide in der untersuchten CpG-Insel vorhanden sind (vgl. Abb. 28 A und B). Im Gegensatz dazu weisen alle RMS-Gewebeproben mindestens ein hypomethyliertes CpG-Dinukleotid auf (vgl. Abb. 28 A). Auch in 4 von 5 NB-Gewebeproben sind ebenfalls unmethylierte CpGs präsent (vgl. Abb. 28 B). Werden die Ergebnisse der beiden Tumorentitäten miteinander verglichen, fällt vor allem die Hypomethylierung der ersten drei CpG-Dinukleotide in beiden Entitäten auf. Zwar treten vor allem bei RMS zusätzlich noch weitere unmethylierte CpGs auf (in 5 von 7 Proben), doch diese folgen keinem Muster. Sie kommen außerdem immer nur im Zusammenhang mit einer Hypomethylierung von mindestens einer der ersten drei CpGs vor. Auch eine NB-Probe zeigt ein weiteres unmethyliertes CpG, welches ebenfalls mit der Hypomethylierung der ersten drei CpGs auftritt (T7). Um genau zu sein gehören die ersten drei CpGs zu der CpG-Insel weiter *upstream* der hauptsächlich untersuchten CpG-Insel.

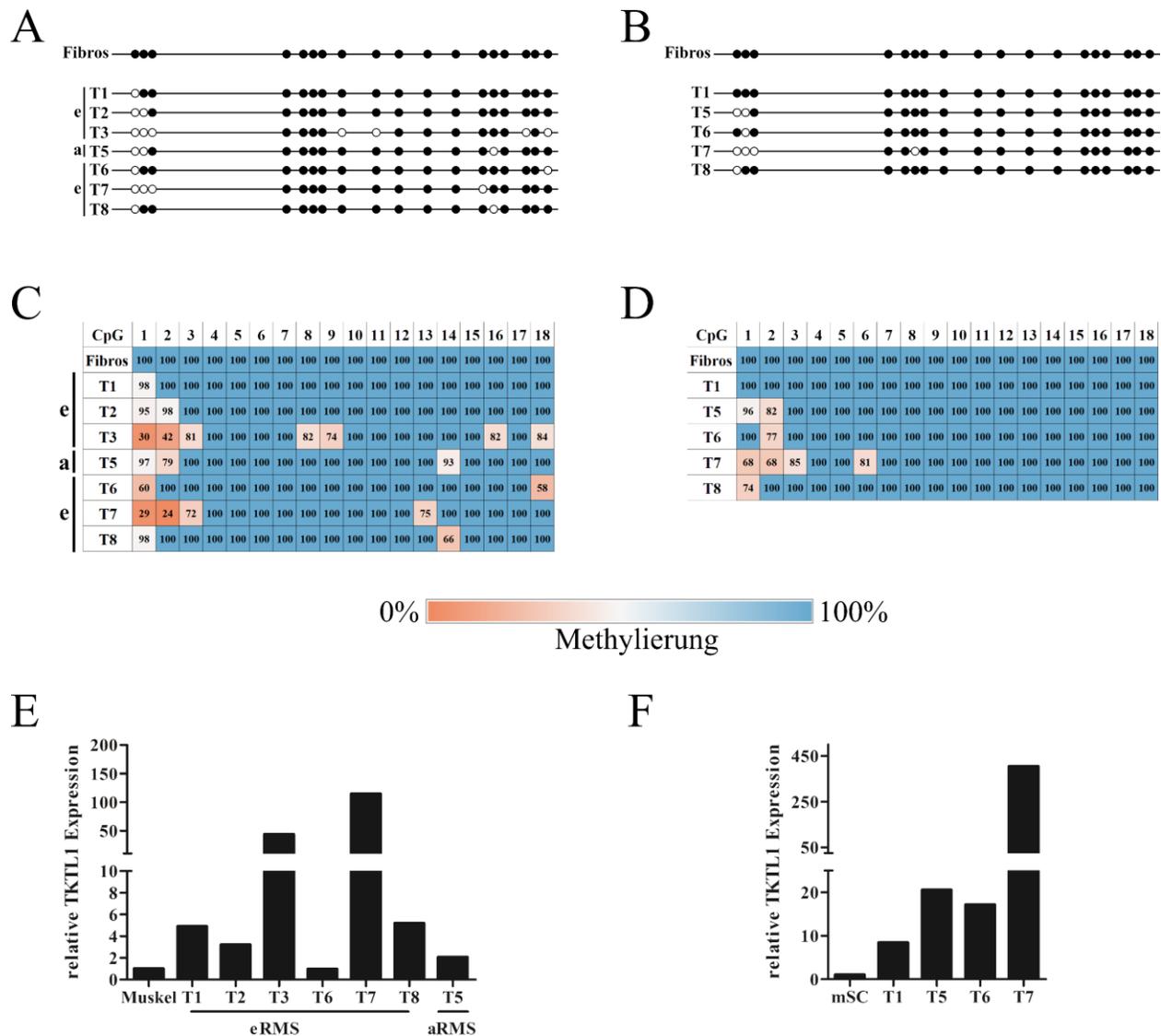


Abbildung 28: Semi-quantitative Methylierungs-Analyse eines Promotorbereiches von TKTL1 in Tumorproben von RMS- und NB-Patienten

BS-Sequenzierung des TKTL1-Promotorbereiches in RMS-Gewebeproben (A) und in NB-Gewebeproben (B). Heatmap der semi-quantitativen Methylierungs-Analyse von RMS-Gewebeproben (C) und NB-Gewebeproben (D). Die DNA-Methylierung jedes dargestellten CpG-Dinukleotids ist in Prozent dargestellt. Relative Expression der TKTL1-mRNA in RMS-Gewebeproben (E) und in NB-Gewebeproben (F), die für die quantitative Methylierungs-Analyse verwendet wurden. Für die Quantifizierung der mRNA-Level wurde eine quantitative *real-time* RT-PCR durchgeführt, wobei TBP als interne Kontrolle diente. Bei den Expressionen in der Abbildung handelt es sich um relative Werte, da die Patientenproben zu jeweiligen Kontrollgeweben verglichen wurden. aRMS/a: alveoläres Rhabdomyosarkoma; eRMS/e: embryonales Rhabdomyosarkoma, mSC: mesenchymale Stammzellen; Tx: Nummer der Tumorprobe; Fibros: Fibroblasten; unausgefüllte Kreise: Unmethylierte CpGs; ausgefüllte Kreise: Methylierte CpGs.

Durch semi-quantitative DNA-Methylierungs-Analysen ist eine präzisere Auswertung der Sequenzierungsergebnisse möglich (vgl. Abb. 28 C und D). Mithilfe dieser Analysen zeigt sich, dass bei 4 von 7 RMS-Proben immer noch ein sehr hoher Methylierungsgrad in den in Abbildung 28 A als unmethyliert gekennzeichneten CpG-Dinukleotiden vorliegt (vgl. Abb. 28 C; T1, T2, T5 und T8). Bei diesen Proben liegt der Methylierungsgrad der jeweils betroffenen CpGs über 90 %. Bei T3, T6 und T7 hingegen sind die in Abbildung 28 A gekennzeichneten CpGs zwischen 30 % und 80 % methyliert. In den NB-Proben liegt im eine Methylierung von etwa 70 % - 80 % vor (vgl. Abb. 28 D).

Um eine Korrelation zwischen der DNA-Methylierung des TKTL1-Promotors und der TKTL1-mRNA-Expression zu untersuchen, wurde die Expressionsanalyse aus Abschnitt 3.1.3. auch mit den oben genannten Zusatzproben durchgeführt und in Abbildung 28 E und F dargestellt. Bei den RMS-Proben ist die TKTL1-mRNA-Expression bei T3 und T7 am höchsten, was mit einer höheren Hypomethylierung korreliert (vgl. Abb. 28 C und E). Lediglich T6 bildet eine Ausnahme, da hier unmethylierte CpGs zu finden sind, aber die TKTL1-mRNA-Expression vergleichbar mit der Kontrolle ist. Auch bei den NB-Proben ist eine Korrelation zwischen Hypomethylierung und mRNA-Expression zu beobachten. Dort ist die TKTL1-mRNA-Expression in T5, T6 und T7 deutlich höher als die von T1 (vgl. Abb. 28 D und F). Auffällig ist auch das Vorhandensein einer - im Vergleich zu der Kontrolle - erhöhten TKTL1-mRNA-Expression in Tumorproben, welche eine sehr geringe oder keine Hypomethylierung aufweisen (RMS: T1, T2, T5 und T8; NB: T1). Es ist aber deutlich, dass die Proben mit einer höheren Anzahl an unmethylierten CpGs, eine höhere TKTL1-mRNA-Expression aufweisen, also dass die TKTL1-mRNA-Expression mit der Hypomethylierung korreliert. Mit der T8 Probe der Neuroblastompatienten konnte aufgrund fehlenden Probenmaterials keine Expressionsanalyse erfolgen.

4. Diskussion

Rhabdomyosarkome (RMS) und Neuroblastome (NB) gehören zu den häufigsten extrakraniellen soliden Tumoren im Kindesalter. Beide Entitäten sind in sich sehr heterogene Gruppen von Tumoren. So können sich Tumore, welche zu einer Entität gehören, in ihrer Lokalisation, dem klinischen Erscheinungsbild ebenso wie in genetischen Merkmalen stark voneinander unterscheiden. Bei einem Subtyp von NB besteht sogar die Möglichkeit einer spontanen Regression oder Ausdifferenzierung des Tumors. Diese Heterogenität erschwert die Entwicklung von einheitlichen Therapie- und Diagnoseansätzen. Daher werden für die Diagnose verschiedene, hochauflösende Bilddiagnostiken, histopathologische Diagnostiken sowie Zyto- und Molekulargenetische Untersuchungen von einer Reihe von Markern durchgeführt. Bisher sind eindeutige und aussagekräftige Biomarker für RMS und NB nicht identifiziert worden, weshalb sich diese Arbeit mit der Untersuchung einer neuen Möglichkeit für die Detektion und die Diagnose dieser Tumore beschäftigt. Der EDIM-Test ist eine nichtinvasive *liquid biopsy*-Methode, mittels derer die Patienten auf Tumormarker in aktivierten Monozyten/Makrophagen untersucht werden. Ein nicht invasiver Bluttest, welcher genutzt werden kann, um RMS und NB in Kindern früh zu detektieren wäre aus vielen Gründen sehr nützlich. Unter anderem könnte man die Belastung der Patienten verringern, Tumore früher erkennen und eine Kosten- und Zeitersparnis erreichen, wobei Letzteres auch dazu führen würde Therapien frühzeitig zu beginnen und den Patienten so eine größere Überlebenschance zu gewährleisten. Außerdem wäre es auch denkbar, wirkungslose Chemotherapien frühzeitig erkennen zu können und somit die wertvolle Zeit für eine Therapieumstellung zu nutzen. Die Moleküle TKTL1, Apo10 und GD2 wurden als potentielle Biomarker für RMS und NB untersucht und die diagnostischen Kapazitäten des EDIM-Tests basierend auf diesen Tumormarkern in Patienten analysiert.

4.1. Expression der Tumormarker TKTL1, Apo10 und GD2 in Zelllinien und Tumoren

Eine Voraussetzung bestimmte Tumormarker für Diagnose- oder *screening*-Ansätze nutzen zu können, ist das Vorhandensein dieser Moleküle in den jeweiligen Tumoren. Da es sich bei den in dieser Arbeit untersuchten Marker um körpereigene Moleküle handelt, muss zudem auch gewährleistet sein, dass sie nicht oder nur in geringem Maße in gesundem Gewebe vorhanden sind. Dazu wurden RMS- und NB-Zelllinien, sowie Patientenmaterial auf das Vorhandensein der Tumormarker TKTL1, Apo10 und bei NB zusätzlich GD2 untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen zum ersten Mal eine erhöhte TKTL1- und Apo10-Expression in RMS- und NB-Tumorzellen und Patientenmaterial nach. Außerdem konnte die in der Literatur angegebene, hohe GD2-Abundanz in NB-Zelllinien reproduziert werden (vgl. Abschnitt 3.1.).

Neueste Studien zeigen, dass TKTL1 wichtig bei der Entstehung und Entwicklung von Tumoren ist. Im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnte eine TKTL1-Überexpression in verschiedenen Tumorentitäten detektiert werden, welche meist mit einer hohen Malignität und Aggressivität der Tumore, als auch mit einer erhöhten Therapieresistenz korreliert [166-172]. Außerdem zeigen Tumorzellen mit einer hohen TKTL1-Aktivität eine verstärkte Proliferation [173]. Die Rolle von TKTL1 in der Onkologie wird in der Wissenschaft zum Teil kontrovers diskutiert. In einer Studie wurde die TKTL1-Expression in verschiedenen Tumorzelllinien reevaluiert und kam zu dem Ergebnis einer nicht signifikanten Rolle von TKTL1 im Tumormetabolismus [174]. Prinzipiell geht man aber davon aus, dass Transketolaseenzyme (TKT-Enzyme) den nonoxidativen Pentosephosphatweg (PPP) regulieren, welcher es erlaubt Glucose direkt für die Nucleinsäuresynthese nutzen zu können und ebenfalls Reduktionsäquivalente wie NADPH zu generieren, welches für das Wachstum und die Proliferation von Zellen benötigt wird. Demnach führt eine Überexpression zu einer besseren Bereitstellung von Nucleinsäure-Edukten und Reduktionsäquivalenten [166]. Viele Tumore sind außerdem anaeroben Bedingungen ausgesetzt und deshalb auf anaerobe Energiegewinnung angewiesen [111]. Durch stärkere Nutzung des nonoxidativen PPP können Zellen Glucose anaerob degradieren und das in An- oder Abwesenheit von Sauerstoff. Zellen, welche TKT-Reaktionen hochregulieren, können so auch anaerob ATP generieren [169]. Zusätzlich führt

die Nutzung dieses Stoffwechselweges zu einer hohen Glucoseaufnahme und einer höheren Laktatproduktion. Letztere erlaubt durch Ausschleusen von Laktat aus den Zellen und des daraus entstehenden niedrigen pHs außerhalb der Zellen eine Matrixdegradation, welche die Invasivität und die Wahrscheinlichkeit einer Metastasenbildung erhöht [175, 176]. Gleichzeitig führt das saure Milieu zu einer Immunsuppression und fördert so weiter das Tumorwachstum [177]. In dieser Arbeit geht es hauptsächlich um die Bestimmung der Überexpression von TKTL1, da evaluiert werden soll, ob die Nutzung von TKTL1 zu Diagnosezwecke geeignet ist. Dennoch sollten perspektivisch die Prozesse hinter der Überexpression untersucht werden, was in einem späteren Abschnitt dieser Arbeit begonnen wurde. Es sollte außerdem nachgeprüft werden, ob die erhöhte TKTL1-Expression wirklich in RMS- und NB-Zellen zu einer erhöhten Invasion, Proliferation und Malignität führt. Ein *knock-out* oder *knock-down* von TKTL1 und nachgeschaltete Proliferations-, Invasions-, und Migrations-Assays könnten in Zukunft einen besseren Einblick in die Funktionalität von TKTL1 in RMS- und NB-Zellen geben. Außerdem könnten in diesen Zellen ebenfalls die Laktatproduktion und die Glucose-Aufnahme analysiert werden, um zu überprüfen, ob TKTL1 maßgeblich an diesen Prozessen beteiligt ist. Ein besseres Verständnis der Prozesse an denen TKTL1 in RMS- und NB-Tumoren beteiligt ist, würde je nach Erkenntnis im besten Fall neue Therapieansätze ermöglichen.

Eine Gemeinsamkeit aller Tumore ist die Abwesenheit eines funktionierenden Apoptosemechanismus, was zu einer geringen Apoptose-Rate und so zu einem Überleben der Tumorzellen führt. Apoptose ist ein sehr komplexer Vorgang bei dem viele Signalwege involviert sind [178]. Einer der letzten Schritte, in dem alle Apoptose-Signalwege Enden, ist die Aktivierung von DNasen und die daraus erfolgende Fragmentierung der DNA. Es ist bekannt, dass eine fehlerhafte oder ein Mangel an DNase-Aktivität bei vielen Tumoren eine wichtige Rolle spielt [99]. Dabei werden diese Mängel nicht als sekundäre Prozesse, sondern als wichtige Initiatoren der malignen Transformation angesehen, da sie in frühen Stadien der Karzinogenese beobachtet werden, bevor die Zellen entarten [100]. Es konnte gezeigt werden, dass das Fehlen der DNase-Aktivität nicht ausschließlich mit ihrer Expression zusammenhängt, sondern dass es spezifische Inhibitoren gibt, welche DNasen inhibieren [99]. Das führt zu einer Akkumulation der funktionslosen DNasen. Bei DNaseX konnte dieses Phänomen schon gezeigt werden [179]. Mit dem in dieser Arbeit ebenfalls eingesetzten Antikörper-Klon, welcher das Apo10-Epitop

erkennt, konnten bereits verschiedene Tumorentitäten wie Karzinome, Glioblastome, Lymphome und Leukämien detektiert werden [103]. Auch das passt zu den Ergebnissen dieser Arbeit, in der sowohl in Zelllinien als auch in Patientenmaterial von RMS- und NB-Tumoren, eine erhöhte Abundanz an DNaseX vorliegt. Auch hier zeigen diese Daten das Potential von DNaseX (Apo10) für die Detektion einer nicht funktionierenden Apoptose und einer malignen Transformation der Zellen. Dennoch wäre es von großem Nutzen zukünftig, zu überprüfen ob die Expression (Abundanz) von DNaseX in RMS und NB mit der DNaseX-Aktivität übereinstimmt und ob auch hier Inhibitoren für den Verlust der DNase-Funktion und der Akkumulation verantwortlich sind. Die Identifikation der Inhibitoren bietet eine weitere Möglichkeit neue Therapieansätze und vor allem ein besseres Verständnis dieses Prozesses zu analysieren.

Ganglioside sind eine bestimmte Gruppe von Glycolipiden auf der Zellmembran oder auch in den nukleären Membranen von Zellen. Sie spielen unter anderem eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion und Zell-Zell-Erkennung. Es gibt Ganglioside, welche in hoher Anzahl in einigen Tumorentitäten vorhanden sind und deshalb sowohl für die Therapie und die Diagnose eine immer wichtigere Rolle spielen [103]. Darunter ist GD2 eines der Prominentesten, da es vor allem in hoher Anzahl auf der Zellmembran von NB-Tumorzellen und nur in sehr geringen Mengen in Normalgewebszellen zu finden ist. Es ist also bekannt, dass NB-Zelllinien als auch Tumore eine hohe GD2-Abundanz aufweisen. Die Ergebnisse dieser Arbeit, in der verschiedene Zelllinien auf die GD2-Abundanz analysiert wurden, konnte die bereits bestehenden Kenntnisse reproduzieren. Verglichen mit der Kontrolle zeigen die NB-Zelllinien eine erhöhte GD2-Abundanz auf. Daher ist auch für dieses Molekül die Voraussetzung erfüllt, um es als Marker in dem EDIM-Test für RMS- und NB-Patienten nutzen zu können.

Obwohl alle drei Marker in RMS und NB hoch exprimiert werden, so sind für die Zukunft noch einige Fragen zu klären, um diese Ergebnisse vollständig zu deuten. Zum einen konnte die Überexpression von TKTL1 und Apo10 sowohl auf Transkriptions- als auch auf Proteinebene gezeigt werden, dennoch ist es auffällig, dass die Proteinexpression/Abundanz nicht immer mit der mRNA-Expression korreliert. Da viele Faktoren und Prozesse zwischen Transkription und Translation existieren, müsste geklärt werden warum die transkriptionelle Expression sich von der translationellen Expression unterscheidet. Gründe dafür könnten unter anderem die Stabilität der mRNA, ein Unterschied in den UTRs der mRNAs oder aber in bestimmten Zellen

vorhandene miRNAs sein. Auch andere Prozesse, welche bei der Transkriptions- oder Translationsregulation wichtige Rollen spielen könnten der Grund sein.

Auch ist anzumerken, dass es sich bei Quantifizierung der Expressionen in den Tumorzelllinien aber auch in Patientenmaterial um relative und nicht um absolute Werte handelt und sie immer im Vergleich zu Kontrollgewebe oder Kontrollzellen angegeben ist. Für eine besserer Aussage könnten weitere Quantifizierungsmethoden eingesetzt werden, wie beispielsweise die *digital* PCR oder bei Patientenmaterial auch *high throughput* Methoden wie Transkriptom- und Proteomanalytik über NGS oder Massenspektrometrie. Natürlich wären dafür mehr Tumorproben aus den Patienten nötig. Außerdem sind Vergleiche zwischen Tumor-Zelllinien und Tumorproben aus Patienten vorsichtig zu betrachten. Dabei spielt nicht nur die zuvor erwähnte Tumorheterogenität eine Rolle, sondern auch die Tatsache, dass Zelllinien niemals vollständig eine menschliche Krankheit widerspiegeln können [180]. Zelllinien sind proliferative Kulturen aus Tumorzellen, welche aus Patienten isoliert wurden. Die genomische Heterogenität der Tumorzelllinien, welche durch Mutationen und chromosomaler Instabilität während der Isolierung und Expansion hervorgebracht wird, kann die Genexpression ändern [181]. Ein weiterer Punkt, den man bei der Analyse von Tumormaterial bedenken sollte, ist die Heterogenität der Tumore jedes Patienten. Es ist bekannt, dass es in einem Tumor unterschiedliche Zellpopulationen gibt, die sich morphologisch, phänotypisch, im Metabolismus oder der Genexpression voneinander unterscheiden können [182, 183]. Die Möglichkeit besteht also, dass durch die Analyse eines sehr kleinen Stückes nur eine Teilpopulation des gesamten Tumors untersucht wird. Hier könnte es eine Lösung sein, unterschiedliche Stücke desselben Tumors zu untersuchen, oder auch über *single-cell*-Proteom- oder RNA-Sequenzierungsmethoden zu überprüfen, wie sich die Expressionen der Marker in einem Tumor unterscheiden [184]. Weitere Unstimmigkeiten in der Expressionanalyse der Marker in Patientenmaterial dieser Arbeit, ist das Fehlen der Proteinexpression. Hier könnte man über immunhistochemische Färbungen oder Western Blots mit geeigneten Antikörpern die Tumore der Patienten analysieren. GD2 ist ein Gangliosid, weswegen weder die oben genannten Transkriptom- noch Proteomanalysen dessen Abundanz genauer untersuchen könnten. Jedoch könnten anhand von *high throughput* Methoden die Proteine die bei der Bildung/Herstellung von GD2 wichtig sind untersucht werden. Ein weiterer offener Punkt ist die Auswirkung der unterschiedlichen

Therapien auf die Expression der Marker in RMS und NB. Da es schwer/oft nicht möglich ist, nicht therapiertes Patientenmaterial zu untersuchen, müsste geklärt werden, ob und in wie weit sich welche Therapien auf die Expression der jeweiligen Marker auswirkt. Ein Ansatz dafür könnte beispielsweise die Behandlung von den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien mit den für die jeweilige Tumorentität empfohlenen Chemostatika sein. Nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen der Therapeutika, müsste man anschließend die Expression der Tumormarker untersuchen.

Wie bereits erwähnt, ist es Ziel dieser Arbeit, die Möglichkeit der Nutzung der drei Marker für die Detektion von RMS und NB mithilfe des EDIM-Test zu analysieren. Aus diesem Grund liegt der Fokus der Analysen dieser Arbeit darauf eine hohe Abundanz der Marker in RMS- und NB-Patienten im Vergleich zu Kontrollgewebe nachzuweisen.

4.2. Evaluierung der EDIM-Technologie bei Rhabdomyosarkom- und Neuroblastom-Patienten

Makrophagen können aus Blutgefäßen in Gewebe eindringen, phagozytieren dort Zelltrümmer und kehren anschließend in den Blutkreislauf zurück [131, 185]. Dort können sie über eine einfache Blutentnahme entnommen werden. Die EDIM-Technologie als Methode nutzt CD14/CD16 positive Monozyten/Makrophagen aus dem Blutkreislauf, welche diese Tumor-Zelltrümmer aufgenommen haben, um tumorspezifische Biomarker intrazellulär in den aktivierten Makrophagen zu detektieren. Wie bereits erwähnt sind die Tumormarker TKTL1 und Apo10 in RMS- und NB-Zelllinien als auch in Tumormaterial überexprimiert. Mit diesen Daten als Grundlage wurde daraufhin eine prospektive Untersuchung von 32 RMS- und 38 NB-Patienten durchgeführt, um die Anwendung des EDIM-Tests zu überprüfen. Zusätzlich wurde die Möglichkeit der Nutzung des Biomarkers GD2 für den EDIM-Test in 19 NB-Patienten analysiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zum ersten Mal die Möglichkeit zur Detektion der Tumormarker TKTL1 und Apo10 in RMS- und NB-Patienten mithilfe des EDIM-Tests. Zur besseren Unterscheidung zwischen Probanden mit und ohne Malignität wurden der TKTL1- und

der Apo10-*score* addiert. In der daraus folgenden Analyse bleibt der Anteil an den für die Marker positiven Patienten gleich, jedoch vergrößert sich die Spanne zwischen Probanden mit und ohne Tumoren, was eine eindeutigere Tumordiagnose erlauben könnte. Das ist im Einklang mit bisherigen Studien zur Detektion von verschiedenen Tumoren mithilfe des EDIM-Tests. Auch in Patienten mit Prostatakarzinom, Mundhöhlenkarzinom und kolorektalem Karzinom konnten erhöhte Mengen an TKTL1 und Apo10 detektiert werden [101, 103, 127, 186].

Da der EDIM-Test auf der Analyse von aktivierten Monozyten/Makrophagen basiert, kann er auch als Plattform genutzt werden, um die Präsenz anderer Biomarker im Blut von Tumorpatienten zu analysieren. Diese Arbeit zeigt zum ersten Mal, dass es möglich ist, den Tumormarker GD2 in NB-Patienten mithilfe des EDIM-Tests zu detektieren. Dabei sind die Makrophagen bei 84 % der Patienten positiv für GD2. Dieses Ergebnis zeigt nicht nur die Möglichkeit auf, NB-Patienten mit dem EDIM-Test auf GD2 untersuchen zu können, sondern lässt die Annahme zu, dass der EDIM-Test genutzt werden kann, um verschiedene Biomarker in Patientenblut zu analysieren. Betrachtet man die Ergebnisse des EDIM-Tests fällt außerdem auf, dass es bei RMS-Patienten 6,2 % und bei NB-Patienten 5,3 % falsch-negative Patienten gibt. Bei einer geringen Anzahl an Patienten führt das zu keinem großen Problem. Bei großen Patientenpopulationen könnte ein Tumor in einer großen Anzahl an Menschen, welche unentdeckte Tumore haben, mit dem EDIM-Test nicht detektiert werden. Bei dem EDIM-Test mit GD2 sind sogar 16 % falsch-negativ, was zu einem größeren Problem werden könnte. Da es bisher noch keine weiteren Daten zur Detektion von GD2 mit dem EDIM-Test gibt und die Anzahl an untersuchten Patienten relativ gering ist, müssten weitere Untersuchungen zeigen, wie sich die Anzahl an falsch-negativ detektierten Patienten verhält. Eine denkbare Lösung für dieses Problem wäre womöglich weitere Tumormarker zu finden, welche man in dem EDIM-Test integrieren könnte. Wie das Beispiel GD2 in dieser Arbeit, könnten mehrere Tumormarker einer Tumorentität genutzt werden, um Patienten zu *screenen* und dadurch den Test zu verbessern. Bei NB könnten beispielsweise zusätzlich noch zwei neurosekretorische Proteine untersucht werden. Chromogranin A und Neuropeptid Y sind Marker der neuralen Differenzierung und potentiell mit NB assoziiert [187, 188]. Zusätzlich sind bei dem EDIM-GD2-Test ebenfalls 9,1 % (2 von 22) gesunden Probanden falsch-positiv. Auch das ist bei einer hohen Anzahl an Patienten ein nicht zu unterschätzendes Ergebnis. Falsch-positive Ergebnisse würde bei Patienten eine Reihe von Tests

nach sich ziehen, um diese Patienten genauer zu untersuchen. Das wiederum könnte zum einen sehr teuer werden, aber zudem auch unnötig zu starkem psychologischem Stress bei den Betroffenen führen. Dennoch zeigen die hier dargestellten Ergebnisse eine sehr gute Unterscheidung von RMS- und NB-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden und damit eine vielversprechende diagnostische Methode für die Detektion dieser Tumorentitäten in Kindern. Ein zusätzlicher Vorteil von GD2 in dem EDIM-Test, ist die mögliche Nutzung als Art-Diagnose Marker. So könnten idealerweise TKTL1 und Apo10 genutzt werden, um Tumore zu detektieren und GD2 um gleichzeitig die Tumorart zu bestimmen. Es ist jedoch auffällig, dass der EDIM-Test mit TKTL1 und Apo10 eine bessere Trennung von Tumorpatienten zu gesunden Probanden erlaubt als mit GD2. Und das obwohl GD2 ein für NB-spezifischer Marker ist und in hohen Mengen auf der Oberfläche der Tumorzellen von NB-Patienten vorhanden sein müsste. Da in dieser Arbeit aber in RMS- und NB-Patienten-Tumormaterial weder nach dem TKTL1- und Apo10-Proteinlevel noch nach der GD2-Abundanz geschaut wurde, ist leider keine Aussage über die tatsächlichen Mengen in den hier untersuchten Patienten möglich. Aber um das zu untersuchen, müssten mit Tumormaterial der Patienten, mit denen der EDIM-Test durchgeführt wurde, die Abundanz der drei Tumormarker überprüft werden. Dazu könnten Immunhistochemische-Methoden oder aber Massenspektrometrie zum Einsatz kommen. Außerdem könnte ein Grund für die bessere Detektion mit TKTL1 und Apo10 die für die jeweiligen Analysen eingesetzten Antikörper sein. Da der EDIM-Test mit TKTL1 und Apo10 schon länger etabliert ist und GD2 hier zum ersten Mal mit dem Test nachgewiesen wurde, könnten vielleicht durch Optimierung des anti-GD2-Antikörper-Klons eine bessere Trennung zwischen Probanden mit und ohne Malignitäten erreicht werden. Des Weiteren gibt es eine Studie zur Spezifität des eingesetzten anti-TKTL1-Antikörpers, in der diese angezweifelt wird [189]. Da es aber unerlässlich für die Nutzung eines Diagnose-Tests ist, die Spezifität des Antikörpers zu gewährleisten, müssten Experimente mit den in dieser Arbeit genutzten Antikörper durchgeführt werden, die eine eindeutige Aussage zur Spezifität, Selektivität und Reproduzierbarkeit erlauben. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zwar sehr deutlich die Nutzbarkeit des Tests und der Antikörper für die Detektion von Malignitäten, dennoch wäre es für einen Test, mit dem man Erkrankungen von Patienten detektiert unabdingbar jeden Schritt genau zu analysieren.

Mehrere Studien konnten zeigen, dass die TKTL1-Expression in verschiedenen Tumoren mit der Progression, Proliferation und der Malignität der Tumore korreliert [103, 172, 173, 176, 190, 191]. Zusätzlich konnte bei dem lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom gezeigt werden, dass eine TKTL1-Expression für Patienten mit einer schlechteren Prognose einhergeht [192]. Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die EDIM-scores mit verschiedenen klinischen Merkmalen von RMS und NB korrelieren. Alveoläre RMS (aRMS) sind aggressiver als embryonale RMS (eRMS) und weisen meist eine deutlich schlechtere Prognose auf, weswegen die EDIM-scores dieser beiden Gruppen miteinander verglichen wurden. Bei NB wurden sowohl die EDIM-scores der unterschiedlichen NB-Stadien als auch die mit An- oder Abwesenheit der *n-myc* Amplifikation miteinander verglichen. Auch eine *n-myc* Amplifikation führt zu aggressiveren Tumoren und die Patienten haben eine schlechtere Prognose. In dem in dieser Arbeit untersuchten Patientenkollektiv konnte keine Korrelation zwischen den klinischen Merkmalen von RMS und NB und den EDIM-scores identifiziert werden. Aber eine generelle Aussage bezüglich der EDIM-scores und den hier untersuchten klinischen Merkmalen zu treffen ist mit diesen Datensätzen nicht möglich, da die Anzahl der Patienten in den untersuchten Gruppen zu gering ist. Hierzu müsste ein breiteres Patientenkollektiv mit zusätzlichen klinischen Merkmalen gegeben sein. Solche Merkmale könnten unter anderem das Tumorstadium, die Größe der Tumormasse, die Invasivität oder die Lokalisation sein. Interessant wäre auch zu untersuchen wie hoch die EDIM-scores von Stadium IVS NB-Patienten sind, da bei diesen die Chance besteht, dass der Tumor spontan regrediert oder ausdifferenziert.

Neben der Diagnose einer Krebserkrankung, bietet das *monitoring* der Patienten eine weitere Möglichkeit für den Einsatz des EDIM-Tests. Dabei gibt es verschiedene Arten des *monitorings* einer Erkrankung. Zum einen könnte mit einem solchen Test bei Krebserkrankungen die Therapie oder die Tumoresektion überwacht werden. Auch die frühe Detektion einer Regression der Tumore wäre denkbar. In dieser Studie wurden jeweils drei RMS- und NB-Patienten prä- und postoperativ auf die TKTL1- und Apo10-EDIM-scores untersucht, um zu überprüfen, ob ein Rückgang der Tumormarker beobachtet werden kann. Prinzipiell ist ein *monitoring* des chirurgischen Verlaufes bei den sechs Patienten möglich. Nicht immer fallen die Marker-scores unter den Cutoff-Wert, jedoch ist postoperativ immer ein Rückgang der scores zu beobachten. Das ist im Einklang mit bisherigen Daten, bei denen ein Rückgang der scores nach chirurgischer

Resektion von Plattenepithelkarzinomen mithilfe des EDIM-Tests gezeigt werden konnte [101, 186]. Der Vergleich von prä- und postoperativen EDIM-scores könnte künftig Aufschluss über die erfolgreiche Totalresektion eines Tumors geben. Damit wäre es denkbar Patienten identifizieren zu können, bei denen der Rest-Tumor noch entfernt werden oder eine andere Therapie angegangen werden muss. Bei Beobachtung der EDIM-scores nach erfolgreicher Totalresektion könnte der Anstieg der Marker außerdem auf einen rezidivierenden Tumor oder auf Metastasen hinweisen. Dass das prinzipiell mit dem-EDIM Test möglich ist, konnte schon für kolorektale Karzinome gezeigt werden [103]. Aber um zu überprüfen, ob der EDIM-Test in RMS und NB wirklich für das *monitoring* eingesetzt werden kann, lässt sich mit den bisherigen Daten nicht zeigen, da dafür die Anzahl der für das *monitoring* untersuchten Patienten zu gering ist. Eine der Schwierigkeiten bei den von uns analysierten Patienten, ist die Möglichkeit, kontinuierlich Probenmaterial von demselben Patienten zu erhalten. Das liegt daran, dass in der Kinderchirurgie und -urologie Tübingen Patienten aus unterschiedlichen Ländern behandelt werden, welche zum Teil auch wieder in ihre Länder zurückkehren. Außerdem werden Kinder mit RMS oder NB Chemo- oder Immuntherapien unterzogen, welche sich unter anderem auf das angeborene Immunsystem auswirken. Ein Beispiel dafür ist das bei RMS- und NB-Patienten eingesetzte Doxorubicin. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Anthracyclin immunsuppressiv wirkt [193]. Auch für das bei RMS und NB eingesetzte Vincristin konnten immunsuppressive Eigenschaften festgestellt werden [194, 195]. Da der EDIM-Test auf Monozyten/Makrophagen basiert, könnten diese Therapien starken Einfluss auf die hier angewandte Methode haben. Ein Beispiel dafür ist das Mammakarzinom, bei dem Patienten, die mit neoadjuvante Chemotherapien behandelt wurden, ein erhöhtes Level an Tumor-assoziierten Makrophagen aufweisen [196]. Das zeigt die Möglichkeit einer veränderten Makrophagen-Aktivierung durch Chemotherapien. Je nach Makrophagen-Subtyp könnten sich die beispielsweise auch die Phagozytose-Raten ändern. Geringere Phagozytose-Raten würden zu einer geringeren Internalisierung von Tumorpartikeln führen, wodurch weniger Biomarker durch den EDIM-Test detektiert werden könnten. Außerdem wäre eine Förderung des apoptotischen Zelltodes von Makrophagen durch Chemotherapien denkbar, wie es bereits für dendritische Zellen gezeigt werden konnte (36). Das könnte zu einer nicht ausreichenden Menge an Makrophagen für den Test führen. Ein weiteres Beispiel in dem Chemotherapien Auswirkungen auf das Immunsystem haben, ist bei kolorektalen Karzinomen zu beobachten. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass kolorektale Karzinom-Patienten, welche

mit multimodalen Chemotherapien behandelt worden sind, erhöhte Leven an CD16-positiven Monozyten aufweisen [197]. Beide Studien zeigen die Möglichkeit einer Veränderung von Monozyten/Makrophagen-Phänotypen durch Chemotherapien. Da der EDIM-Test auf die Detektion von bestimmten Monozyten/Makrophagen-Phänotypen basiert, kann ohne passende Untersuchungen nicht ausgeschlossen werden, dass sich solche Therapien auf den Test auswirken. Da solche Effekte auf Monozyten/Makrophagen beobachtet wurden, ist der EDIM-Test nach bisherigen Kenntnissen ungeeignet für das *monitoring* innerhalb einer Therapie. Um darüber eine genaue Aussage treffen zu können, müsste aber untersucht werden, inwieweit sich welche Therapien auf den EDIM-Test auswirken. Zusätzlich wäre es sinnvoll zu analysieren, wie sich die Expression der hier untersuchten Marker nach verschiedenen Therapien sowohl auf Makrophagen als auch auf Tumorzellen verändert. Auch ist es schwierig einen Test für die Tumordiagnostik zu entwickeln, der bei Therapien keine eindeutige Aussage geben kann, da viele der Tumorpatienten schon vortheraipiert sind. Das trifft vor allem in Tumorzentren zu, in denen wie oben beschrieben Patienten aus verschiedenen Ländern aufgenommen werden, die häufig schon vortheraipiert sind.

Je nach Aktivierung und Differenzierung können Monozyten pro- oder anti-inflammatorisch wirken. 90 % bis 95 % der Monozyten in gesunden Menschen sind stark positiv für das Oberflächenmolekül CD14 und negativ für CD16 (CD14⁺⁺/CD16⁻). Dagegen zeigen 5 bis 10 % der Monozyten in gesunden Menschen eine Koexpression von CD14 und CD16 (CD14⁺/CD16⁺). Diese Subpopulation an Monozyten, die auch von Monozyten-abstammende Makrophagen (*monocyte derived macrophages*, MDM) genannt wird, weist ein höheres Potential zur Phagozytose auf und ist in inflammatorischen Erkrankungen in größerer Anzahl vorhanden. Es konnte auch beobachtet werden, dass die höhere Abundanz dieser Subpopulation mit der Progression von Krebserkrankungen einhergeht [198]. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit das Verhältnis von (CD14⁺⁺/CD16⁻) zu (CD14⁺/CD16⁺) in RMS- und NB-Patienten sowie in gesunden Probanden bestimmt und miteinander verglichen. Es konnte kein signifikanter Unterschied der Monozytenpopulationen in den untersuchten Patienten und Probanden festgestellt werden. Zusätzlich zu dem Vergleich zwischen gesunden Blutspendern und Krebspatienten, wurden die Monozytenpopulationen in den Tumorpatienten mit den im Voraus untersuchten klinischen Merkmalen miteinander verglichen. Aber auch hier ist kein signifikanter

Unterschied zu erkennen. Bei genauer Betrachtung der Ergebnisse zwischen NB-Patienten und gesunden Blutspendern, zeigen 8 von 38 NB-Patienten erhöhte CD16⁺ Monozyten. Dieser Trend ist aber nicht signifikant, da zu viele NB-Patienten ein ähnliches Verhältnis zwischen (CD14⁺⁺/CD16⁻) zu (CD14⁺/CD16⁺) aufzeigen wie gesunde Probanden. Auch eine andere Studie, in der die beiden Populationen in Plattenepithelkarzinomen miteinander verglichen wurden, konnte keinen Unterschied ausmachen [129].

Eine weitere bereits beschriebene Anwendungsmöglichkeit des EDIM-TKTL1-Tests, ist die metabolische Charakterisierung von Tumoren. In einer Studie wurde der erhöhte EDIM-TKTL1-*score* mit einer erhöhten Glucoseaufnahme der Tumore korreliert. Gemessen wurde die Glucoseaufnahme der Tumore über das ¹⁸fluor-desoxyglucose (FDG) PET-Imaging [127]. Auch das könnte für RMS- und NB-Patienten eine gute Anwendung sein, es müsste jedoch vorher analysiert werden, ob es durch die Überexpression von TKTL1 in diesen beiden pädiatrischen Tumoren zu einer erhöhten Glucoseaufnahme kommt. Erst dann wäre eine Studie sinnvoll, welche die Glucoseaufnahme von Tumoren mit der TKTL1-Expression vergleicht.

4.3. *In vitro*-Analyse der Tumormarker in Makrophagen

MΦ sind plastische Zellen des Immunsystems, die je nach Mikro-Umgebung verschiedene Aufgaben übernehmen, wobei sie sich je nach Stimulus in eine bestimmte Richtung polarisieren. Klassischerweise werden sie in M1- und M2-MΦ eingeteilt. Eine M1 Polarisierung erfolgt in einem pro-inflammatorischem Umfeld, wohingegen ein anti-inflammatorisches Milieu die Entstehung von M2-MΦ begünstigt [199]. M1-MΦ sind pro-inflammatorisch, töten Pathogene und wirken gewebsschädigend, während M2-MΦ anti-inflammatorisch sind, apoptotische Zellen beseitigen und die Wundheilung fördern [200]. Diese klassische Aufteilung der Polarisierung ist heutzutage aber überholt, da viele Studien zeigen, dass es in Menschen keine klare Grenze zwischen M1- und M2-MΦ gibt. Es ist zwar klar, dass MΦ sich polarisieren können, diese Polarisierung ist jedoch reversibel und je nach Mikro-Umgebung können sich die Phänotypen und somit auch die Aufgaben der MΦ ändern [201].

Obwohl die Einteilung in M1/M2-M Φ also nur eine simplifizierte Darstellung der Realität ist, wird sie für *in vitro* Untersuchungen an M Φ genutzt. Da im EDIM-Test aktivierte Monozyten/M Φ genutzt werden, um Tumormarker zu detektieren, sollte in diesem Teil der Arbeit untersucht werden, ob und wie stark die hier analysierten Tumormarker (TKTL1, Apo10, GD2) in den klassischen M1/M2-M Φ exprimiert werden. Dafür wurden Monozyten aus gesunden Probanden isoliert und diese *in vitro* zu M Φ differenziert. Zusätzlich erfolgte eine Aktivierung der M Φ durch Stimuli zu M1- oder M2-M Φ [202]. Auf transkriptioneller Ebene zeigen alle hier untersuchten M Φ -Subtypen (nicht aktivierte M0-M Φ , aktivierte M1- und M2-M Φ) eine verringerte TKTL1-Expression im Vergleich zu Monozyten. Zwischen den M Φ -Subpopulationen ist dabei kein Unterschied zu sehen. Vergleicht man jedoch die Apo10-Expression in diesen Zellen, so sind deutliche Unterschiede zu beobachten. M0- und M1-M Φ zeigen im Vergleich zu Monozyten und zu M2-M Φ eine verringerte Apo10-Expression. Die Apo10-Expression von M2-M Φ ist außerdem höher als die von Monozyten. Zusätzlich zur mRNA Expression wurden die M Φ über Durchflusszytometrie auf die Proteinexpression (von TKTL1 und Apo10) und die GD2-Abundanz hin analysiert. Dabei zeichnet sich ein zu den mRNA-Daten vergleichbares Ergebnis ab. Für TKTL1 ist dabei kein Unterschied zwischen Monozyten und den M Φ -Subpopulationen zu verzeichnen. Aber M2-M Φ zeigen auf Proteinebene eine signifikant erhöhte Abundanz von Apo10. Der neuroblastomspezifische Tumormarker GD2 ist bei weniger als 5 % der analysierten Zellen zu finden. Da es sich bei diesen Analysen um relative Abundanzen handelt, kann keine quantitative Aussage über die genaue Anzahl der Moleküle getroffen werden. Die Ergebnisse deuten aber auf eine Abwesenheit von GD2 in den hier untersuchten Zellen hin.

Die Abwesenheit einer erhöhten TKTL1- und GD2-Abundanz in den hier untersuchten M Φ zeigen, dass diese Moleküle eine gute Wahl für die Untersuchung als Tumormarker in M Φ sind. Die Ergebnisse zeigen aber einen Anstieg von Apo10 in M2-M Φ . Da bei dem EDIM-Test keine Unterscheidung zwischen M Φ -Subpopulationen stattfindet, werden auch die M2-M Φ mit dem EDIM analysiert. Die Detektion einer erhöhten Apo10-Expression in M Φ würde bei einem Test, der Tumore anhand dieses Markers detektiert, hinderlich wirken. So können bei Tumoren, in denen eine erhöhte Apo10-Expression gezeigt werden konnte, die erhöhten EDIM-Apo10-Werte entweder durch die von den M Φ -phagozytierten Tumorzellen oder von den M2-M Φ selbst

kommen. M2-M Φ agieren meistens in einer späteren Phase von Infektionen, wo sie, die bei der Immunreaktion entstandenen, apoptotischen Zellen beseitigen, die Wundheilung fördern und anti-inflammatorisch wirken, um die Immunreaktion zurückzufahren [200]. Das bedeutet, dass M2-M Φ bei oder am Ende einer Immunreaktion in erhöhter Anzahl vorliegen können. Interessanterweise haben zwei Studien mithilfe des EDIM-Tests untersucht, wie sich Entzündungen auf die EDIM-TKTL1- und EDIM-Apo10-*scores* auswirken [186] und [203]. Eine der Studien konnte eine Erhöhung von TKTL1- und Apo10-*scores* bei akuten oder chronischen, oralen, infektiösen Erkrankungen, sowie Remodellierungen von oralen Wunden und nach oralen operativen Eingriffen zeigen [186]. Die zweite Studie konnte keinen Zusammenhang zwischen Inflammationen des Gallengangs, des Pankreas, des Kolons und einem Anstieg der EDIM-Werte finden [203]. Es ist also noch unklar und es bedarf weiterer Untersuchungen, um zu zeigen, ob die in dieser Arbeit beobachtete Apo10-Erhöhung in M2-M Φ sich wirklich hinderlich auf den EDIM-Test auswirkt. Tatsache ist jedoch, dass einige Tumore M Φ rekrutieren und diese zu anti-inflammatorischen M Φ „erziehen“ [204, 205]. Diese Tumor-assoziierten M Φ (TAM) können einen Großteil des Tumors ausmachen und die Krebsentstehung fördern [204, 206-209]. Da sie anti-inflammatorisch sind, besitzen sie einen M2-*like* Phänotypen und könnten so vielleicht ebenfalls Apo10 positiv sein. Aber auch dazu gibt es noch keine Studien. Die in dieser Arbeit beobachtete erhöhte Apo10-Protein-Abundanz, könnte außerdem damit erklärt werden, dass die M2-M Φ apoptotische Zellen phagozytieren, welche DNaseX bei der Apoptose hochregulieren. Doch da der Anstieg der Expression in M Φ auch auf mRNA-Ebene zu sehen ist, deutet es eher auf eine interne Hochregulation hin. Eine weitere Möglichkeit der Interpretation des erhöhten DNaseX-Expression in M2-M Φ könnte die Initiation der Apoptose in diesen Zellen sein. Da bei der FACS Analyse zwar immer ein lebend-tot-Farbstoff eingesetzt wurde, kann nur ausgeschlossen werden, dass es sich bei der Analyse um tote Zellen handelt. Ob die Zellen aber die Apoptose schon induziert haben und diese Induktion zu einer erhöhten DNaseX-Expression führt, kann mit diesen Daten nicht geklärt werden. Dazu müssten mit einem ähnlichen Versuchsaufbau verschiedene Apoptose-Signalwege überprüft werden. Ein großer Nachteil der hier durchgeführten Versuche, ist außerdem Nutzung von *in vitro* generierten und aktivierten M Φ . Besser wäre es, die einzelnen M Φ -Subpopulationen direkt über *Zell-sorting*-Ansätze aus Blut von Probanden zu isolieren und diese dann auf das Vorhandensein der Tumormarker zu untersuchen. Weiterhin wäre es hilfreich, wenn Untersuchungen zum Einfluss von Chemo- und

anderen in der Onkologie eingesetzten Therapien, auf die Expression dieser Marker in den M Φ -Subpopulationen durchzuführen.

In einem weiteren Versuch wurden die drei analysierten M Φ -Subpopulationen mit Zellen der NB-Zelllinie LAN-1 kokultiviert, um zu überprüfen, ob der sich in den Tumorzellen befindende Marker (hier GD2) von den M Φ internalisiert wird. Die Ergebnisse zeigen, dass die drei M Φ -Subtypen dazu in der Lage sind, die Tumorzellen zu fressen und dass GD2 anschließend mithilfe eines Durchflusszytometers in den kokultivierten M Φ detektiert werden kann. In diesem Versuchsaufbau gibt es keinen Unterschied hinsichtlich des Phagozytosepotentials der drei M Φ -Subpopulationen in Bezug auf die Tumorzellen. Die Verringerung des Fluoreszenzsignals nach 24 Stunden lässt auf den Abbau des internalisierten Antikörpers in den M Φ schließen. Es wäre außerdem interessant zukünftig ähnliche Experimente auch mit TKTL1 und Apo10 durchzuführen. Damit könnte der Hintergrund der erhöhten Detektion von TKTL1 und Apo10 in M Φ geprüft werden. Es ist nämlich noch nicht geklärt, ob die beiden erhöhten Tumormarker in den M Φ wirklich aus dem Tumor kommen, oder ob die M Φ diese Moleküle als Reaktion auf die Tumorzellen hochregulieren. Dazu könnten TKTL1 und Apo10 beispielsweise mit Goldpartikeln gelabelt, nachfolgend mit M Φ kokultiviert und dann mithilfe eines Elektronenmikroskops analysiert werden [210].

In dem letzten Versuch dieses Ergebnisteils wurde Blut aus gesunden Probanden mit Tumorzellen kokultiviert und nach 24 Stunden Inkubation die Anwesenheit der Tumormarker mit dem EDIM-Test analysiert. Damit sollte getestet werden, ob es möglich ist, Apo10, TKTL1 und GD2 in M Φ von gesunden Probanden zu detektieren, nachdem sie mit Tumorzellen kultiviert wurden. In den Versuchen mit den RMS-Zelllinien konnten TKTL1 und Apo10 nach der Kokultur in den M Φ detektiert werden. Auch nach Inkubation mit den NB-Zelllinien konnten die Tumormarker TKTL1, Apo10 und GD2 in den M Φ detektiert werden. Auffallend ist, dass die M Φ welche mit den LAN-1 Zellen inkubiert wurden, stärker positiv für die drei Tumormarker sind, als die M Φ , welche mit den SK-N-BEs inkubiert wurden. Das ist im Einklang mit den in dieser Arbeit generierten Expressionsdaten der NB-Zelllinien, in denen LAN-1 eine höhere Expression der Marker zeigt als SK-N-BE. Nicht erklärt werden kann aber, dass die M Φ , welche mit RH30 kultiviert worden sind, positiv auf TKTL1 sind, obwohl die TKTL1-Proteinexpression in RH30 nicht signifikant höher ist verglichen mit der in gesunden Zellen. Die Ergebnisse deuten

aber tendenziell darauf hin, dass wenn MΦ mit Tumorzellen kokultiviert werden, welche einen Tumormarker verstärkt exprimieren, diese die Tumormarker aufnehmen oder hochregulieren. Auch hier kann nicht ins Detail geklärt werden, warum die MΦ nach Inkubation der Tumorzellen mit Blut aus gesunden Probanden, positiv für die untersuchten Marker sind. Nichtsdestotrotz können diese Marker nach der Kokultivierung in den MΦ detektiert werden. Auch dieser *in vitro* Versuch bestätigt die Nützlichkeit der Analyse von MΦ für die Detektion von Tumormarkern.

Nennenswert ist auch die geringe Zahl der für die Tumormarker positiven MΦ in dem *spiking*-Versuch. Verglichen mit dem vorherigen Versuch, in dem die MΦ isoliert auf die Tumorzelllinie LAN-1 gegeben wurden, ist die Spanne zwischen MΦ die positiv beziehungsweise negativ für die Tumormarker sind gering. Dieses Phänomen könnte unterschiedliche Gründe haben. Einer könnte die Anwesenheit diverser Zellen des Immunsystems sein, welche sich auf die Phagozytoseaktivität auswirken können. Ein weiterer Grund könnte die unbekannte Anzahl an MΦ im Blut sein und ob es während der Inkubation mit den Tumorzellen zu einer Polarisierung der Monozyten und MΦ kommt. Außerdem ist unklar, ob das Blut sich in einem solchen Versuchsaufbau überhaupt vergleichbar zu einem *in vivo*-System verhält.

4.4. Korrelation zwischen TKTL1-Promotor-Hypomethylierung und- Expression

Erste Hinweise, dass die DNA-Methylierung mit der Genexpression zusammenhängen könnte, lieferten unter anderem Experimente von McGhee und Ginder [211]. Viele Forscher haben seitdem dazu beigetragen, die Methylierung von DNA besser zu verstehen und konnten zeigen, dass sie einer der epigenetischen Hauptmechanismen für die Genregulation ist [212]. Dabei ist vor allem die Methylierung von CpG-Dinukleotiden eine der am besten erforschten, epigenetischen Mechanismen zur Genregulation [213]. Gleichzeitig ist, aufgrund der hohen Komplexität, der Zusammenhang zwischen Genexpression und DNA-Methylierung noch nicht vollständig geklärt. Eine wichtige Rolle dabei spielen CpG-Inseln (CGI). Das sind Regionen in unmittelbarer Nähe von Promotoren, welche reich an CpG-Dinukleotiden sind. In der Regel sind diese unmethyliert und werden mit der Regulation der Transkription in Zusammenhang gebracht. Eine geringe CpG-Methylierung korreliert dabei mit hoher Genexpression wohingegen eine hohe CpG-Methylierung mit einer Repression der Genexpression einhergeht [214]. Einige Forscher

konnten außerdem zeigen, dass Promotor Hypomethylierungen mit Tumoren in Verbindung steht, wodurch Onkogene aktiviert werden. Ein Beispiel dafür ist die Aktivierung von RAS Familienmitgliedern in Darmkrebs und im kleinzelligem Lungenkarzinom [138].

Da in dieser Arbeit die Überexpression von TKTL1 in RMS- und NB-Zelllinien als auch in Patientenmaterial nachgewiesen werden konnte, beschäftigt sich der letzte Abschnitt dieser Arbeit mit dem Mechanismus hinter der erhöhten Expression. Wie bereits erwähnt ist die DNA-Methylierung ein wichtiger Mechanismus zu Kontrolle der Genexpression, weswegen in dieser Arbeit untersucht wurde, ob die Hypomethylierung des TKTL1-Promotors der Grund für die erhöhte TKTL1-Expression ist.

Um zu überprüfen, ob die Expression des TKTL1-Gens überhaupt durch DNA-Methylierung reguliert werden kann, wurden im ersten Teil dieses Abschnittes RMS- und NB-Zelllinien mit einem demethylierendem Reagenz (5-Aza-dC) behandelt und danach die Expression der TKTL1-mRNA analysiert (vgl. Abschnitt 3.4.1.). Zum ersten Mal konnte hier gezeigt werden, dass es durch die Demethylierung der DNA zu einer Zunahme der TKTL1-mRNA-Expression in RMS- und NB-Zelllinien kommt. Die TKTL1-mRNA-Expression kann also durch die DNA-Methylierung reguliert werden. Auffällig ist, dass es bei den Zelllinien, die ohne Behandlung eine geringere TKTL1-mRNA-Expression zeigen (RH30 und LAN-1), durch die Behandlung zu einer drastischeren Erhöhung der mRNA-Expression kommt. Bei den Zelllinien, bei denen auch ohne Behandlung ein hohes Level an TKTL1-mRNA vorliegt, steigt die Expression im Vergleich dazu nicht so stark an. Das könnte darauf hinweisen, dass es ab einem gewissen (Hypo)Methylierungs-Zustand nicht mehr möglich ist die mRNA-Expression zu beeinflussen. Vergleicht man die Ergebnisse von RH30 und LAN-1 aus diesem Versuch mit der Proteinexpression von unbehandelten Tumorzelllinien (vgl. Abschnitt 3.1.), fällt außerdem noch auf, dass obwohl die mRNA-Expression gering ist, eine hohe Proteinexpression vorhanden ist. Das wiederum lässt auf einen weiteren, transkriptions-unabhängigen Mechanismus der Regulation der TKTL1-Expression schließen. Zur Überprüfung, ob die durch die Behandlung hervorgerufene Erhöhung der TKTL1-mRNA-Expression ebenfalls zu einer erhöhten Proteinexpression führt, wäre es sinnvoll in Zukunft ebenfalls die Proteinexpression nach der Behandlung zu analysieren. Damit könnte man in diesem Fall den Einfluss der mRNA-Expression auf die Translation untersuchen.

Auch andere Fälle, in denen es durch Hypomethylierung zu einer Aktivierung der Expression von Onkogenen kommt, sind bekannt [215-217]. Die Aktivierung der TKTL1-Expression durch Hypomethylierung in Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches konnte bereits gezeigt werden [114, 138]. Diese Ergebnisse bestätigen die Möglichkeit einer transkriptionellen Aktivierung durch Hypomethylierung und dessen Rolle bei der TKTL1-Expression.

Um den Mechanismus hinter der erhöhten mRNA-Expression in RMS- und NB-Tumoren genauer zu durchleuchten, wurde im zweiten Teil des letzten Abschnittes die DNA-Hypomethylierung des TKTL1-Gens präziser analysiert. Dafür wurde eine BS-Sequenzierung einer CGI im Promotor des TKTL1-Gens von RMS- und NB-Tumormaterial auf CpG-Hypomethylierungen untersucht. *In silico*-Analysen des Promotor-Bereiches zeigten zwei CGIs in unmittelbarer Umgebung des Transkriptionsstarts, welche mögliche Regulationen durch (Hypo)Methylierung zulassen könnten (vgl. Abschnitt 3.4.2.). Der gewählte Promotor-Bereich konnte in 12 von 14 Tumorproben erfolgreich amplifiziert und sequenziert werden (vgl. Abschnitt 3.4.3.). Eine Optimierung der TD-PCR zur Amplifikation des zu untersuchenden Bereiches könnte dazu beitragen, dass die Erfolgsrate gesteigert wird. Außerdem könnten die verwendeten Primer ebenfalls optimiert werden, um eine bessere Amplifikation zu gewährleisten.

Durch die Ergebnisse der BS-Sequenzierung konnte der TKTL1-Promotorbereich in RMS- und NB-Patienten zum ersten Mal auf den Methylierungsstatus analysiert werden. Der untersuchte Bereich ist in beiden Tumorentitäten hypomethyliert (vgl. Abschnitt 3.4.3.). Dabei zeigt sich, dass meistens drei CpG-Dinukleotide (-157/158 bp; -159/160 bp und -161/162 bp vor dem Transkriptionsstart) davon betroffen sind. Zwar sind bei den RMS-Proben mehr unmethylierte CpGs zu finden als bei den NB-Proben, diese treten jedoch in beiden Entitäten in keinem bestimmten Muster auf. Durch zusätzliche mRNA-Expressionsanalysen derselben Tumorproben, konnte außerdem eine inverse Korrelation zwischen der Methylierung dieses Bereiches und der mRNA-Expression gezeigt werden. Durch die semi-quantitative Methylierungsanalyse wird deutlich, dass selbst bei den Proben, welche die höchste TKTL1-mRNA-Expression zeigen, keine vollständig hypomethylierten CpGs zu finden sind. Diese Heterogenität der Methylierung könnte ein Indiz für eine gemischte Tumorzellpopulation (Tumorheterogenität) sein, wie sie oft und in verschiedensten Tumorentitäten beobachtet wird [218]. Ein weiter Grund könnte das für die Analysen genutzte Tumorstück an sich sein. Das Tumormaterial an sich ist zwar pathologisch

identifiziert und klassifiziert, jedoch wird davon im Labor nur ein kleines Stück für die Analysen abgeschnitten. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass sich in dem analysierten Stück noch Bindegewebe oder sonstiges nicht-Tumorgewebe befindet. Um dieses Problem zu umgehen, könnten *single-cell*-Analysen durchgeführt werden. Da das TKTL1-Gen auf dem X-Chromosom liegt, besteht außerdem die Möglichkeit einer Fehleinschätzung der hier angegebenen Methylierung. Menschen weiblichen Geschlechts besitzen zwei X-Chromosomen, wobei eines davon durch eine X-Inaktivierung inaktiv ist. Die X-Inaktivierung führt, in dem davon betroffenen Chromosom, zu einer erhöhten Anzahl an methylierten CpG-Inseln [219]. Da in der hier angewandten Methode die ganze genomische DNA analysiert wird, stellen die Ergebnisse den Methylierungsstatus beider X-Chromosomen dar. Falls die CpG-Inseln des TKTL1-Promotors also von der Methylierung der X-Inaktivierung betroffen sind, würde das in der hier angewandten semi-quantitativen Methylierungsanalyse bei den weiblichen Patienten zu einer falsch-Interpretation der Ergebnisse führen (RMS: 4 weibliche und 3 männliche Patienten; NB: 3 weibliche und 2 männliche Patienten). Der „wahre“ Methylierungsstatus bei weiblichen Patienten müsste demnach geringer sein als in den Ergebnissen hier dargestellt. Diese These könnte nur dann zutreffen, wenn das TKTL1-Gen in dem inaktivierten X-Chromosom nicht aktiv ist.

Die Korrelation von TKTL1-mRNA-Expression und Methylierung kann bei diesen Tumorproben in den untersuchten Entitäten gezeigt werden, jedoch wäre eine höhere Probenanzahl nötig, um ein vollständigeres Bild zu erhalten. Da die in dieser Arbeit genutzte Methodik sehr zeitaufwendig ist, wäre es auch hier sinnvoller und repräsentativer, Methylom-Analysen anzuwenden. Im besten Fall wäre eine Kombination aus *single-cell*-Analysen und *next-generation* Bisulfit-Sequenzierung (BS-NGS) nötig, um einerseits eine Vielzahl von Proben auf die Methylierung des TKTL1-Promotors zu untersuchen und andererseits, um die Heterogenität dieser Methylierung in einem Tumor darzustellen und zu analysieren. Zudem könnte damit auch untersucht werden, ob das Geschlecht beziehungsweise das inaktivierte X-Chromosom einen Einfluss auf die Ergebnisse der Methylierung hat. Dass es solche Möglichkeiten gibt, zeigen neuste Technologien und Anwendungen [220]. Ein weiterer offener Punkt ist die Analyse der weiter *upstream* liegenden CGI. Denn die drei CpGs die in beiden Entitäten hypomethyliert sind, gehören zu der sich weiter *upstream* befindenden CGI. Möglicherweise kann man durch deren Analyse weitere Informationen bekommen.

Beispielsweise könnten durch BS-NGS und eine hohe Probenanzahl auch weitere CpGs gefunden werden, deren Methylierung invers mit der mRNA-Expression korreliert. Interessant wäre es auch zu untersuchen, ob sich das Methylierungsmuster des TKTL1-Promotors in aRMS und eRMS voneinander unterscheidet. Da in dieser Arbeit nur eine aRMS Tumorprobe darauf untersucht wurde, konnte keine Aussage darüber getroffen werden. Da aRMS aber aggressiver sind und hohe TKTL1-Expressionen ebenfalls mit maligneren Tumoren korrelieren, wäre eine solche Analyse nicht uninteressant. Bei den NB-Patienten könnte man außerdem den Vergleich der Methylierung des TKTL1-Promotors zwischen Stadium 4S Patienten und anderen Tumorstadien untersuchen. Stadium 4S Tumore sind dafür bekannt spontan zurückzugehen. Man könnte also untersuchen, ob dieses nicht-maligne Stadium ebenfalls in dem untersuchten Bereich hypomethyliert ist, und so einen Hinweis bekommen, in wie weit TKTL1 für die NB-Malignität eine Rolle spielt.

Eine weitere Möglichkeit bieten bereits bestehende MethyloM-Datensätze von RMS- und NB-Patienten [225, 226]. Da die Ergebnisse in dieser Arbeit einen Zusammenhang zwischen TKTL1-Promotor-Methylierung und mRNA-Expression zeigen, könnten bereits gesammelten Datensätze zielgerichtet darauf untersucht werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen außerdem auch das Vorhandensein einer – im Vergleich zu der Kontrolle – erhöhten TKTL1-mRNA-Expression in Tumorproben, welche eine sehr geringe oder keine Hypomethylierung aufweisen (RMS: T1, T2, T5 und T8; NB: T1). Das könnte ein Indiz für einen zusätzlichen Methylierungs-unabhängigen Mechanismus der Regulation der TKTL1-mRNA-Expression sein. DNA-Methylierung alleine muss nicht unbedingt der einzige Grund einer hohen Transkription sein. Auch Histonmodifikationen können zu einer Aktivierung der Genexpression führen. Deshalb wäre es auch sinnvoll Tumorproben auf Histonmodifikationen zu untersuchen. Hohe mRNA-Level korrelieren nicht immer mit einer hohen Protein-Abundanz. Auch Ergebnisse dieser Arbeit konnten zeigen, dass bei Proben mit geringerer mRNA-Expression trotzdem höhere Proteinmengen vorhanden sein können. Das Ergebnis deutet wie bereits erwähnt auf weitere Mechanismen der Regulation der TKTL1-Expression hin. Die Translationskontrolle bildet einen weiteren Mechanismus der Kontrolle über die Expression von Genen. Außerdem könnte die mRNA-Stabilität eine Rolle bei einer hohen Expression spielen. Ist eine mRNA stabil und degradiert langsamer, so kann mehr

Protein hergestellt werden als mit einer Instabilen. Je nach Sequenz des *open reading frames* oder der UTRs einer mRNA können diese stabiler sein, einfacher zugänglich für die Translationskomponenten sein, oder Bindestellen für diese beherbergen. Auch verschiedene mRNA-Modifikationen können sich auf die Stabilität der mRNA und damit auf die Proteinexpression auswirken. All diese Mechanismen können in Zukunft weitere Untersuchungsgebiete für die hohe Expression von TKTL1 in RMS- und NB-Patienten sein.

5. Zusammenfassungen

5.1. Zusammenfassung

Das Rhabdomyosarkom (RMS) und das Neuroblastom (NB) gehören zu den häufigsten extrakraniellen, soliden Tumoren im Kindesalter. Dabei beruhen Tumorstaging, Diagnose und Verlaufskontrollen bisher überwiegend auf bildgebenden Verfahren und auf histopathologischen Untersuchungen von Gewebematerial. In der letzten Zeit konnten Tumormarker mithilfe einer *liquid biopsy* Methode in Makrophagen (M Φ) aus peripherem Blut von adulten Patienten mit verschiedenen soliden Tumoren detektiert werden. Bei dieser Methode handelt es sich um den EDIM-Test (Epitop Detektion In Monozyten), mit dem bisher die Tumormarker TKTL1 und Apo10 nachgewiesen wurden. In dieser Arbeit sollte evaluiert werden, ob die Detektion der Tumormarker TKTL1, Apo10 und bei NB auch GD2 in RMS- und NB-Patienten mit dem EDIM-Test möglich ist. Dabei sollte außerdem das Potential dieser Methode und der Tumormarker für die Diagnose und das Monitoring der beiden Tumorentitäten überprüft werden.

Im ersten Teil der Arbeit wurde untersucht, ob sowohl Tumorzelllinien als auch Gewebematerial der beiden Tumorentitäten eine erhöhte Expression der Tumormarker besitzen. Über eine RT-PCR konnte gezeigt werden, dass RMS- und NB-Zelllinien und Gewebematerial eine erhöhte TKTL1- und Apo10-mRNA-Expression aufweisen. Außerdem konnte über durchflusszytometrische Messungen der Zelllinien eine erhöhte Proteinexpression (TKTL1 und Apo10) und Molekülabundanz (GD2 nur in NB) im Vergleich zu Kontrollzellen gezeigt werden. Nachfolgend wurde in einer prospektiven Untersuchung analysiert, ob sich diese Tumormarker in M Φ von RMS- und NB-Patienten durch den EDIM-Test durchflusszytometrisch detektieren lassen. Die Expressions-scores der zwei Tumormarker (in NB drei Tumormarker) in den Tumorpatienten waren im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant erhöht. Eine Korrelation der EDIM-scores mit klinischen Parametern wie Tumorstadium, Tumorsubtypen und in NB auch *n-myc*-Amplifikation, konnte nicht gezeigt werden. Das Blut von drei Patienten jeder Tumorentität wurden prä- und postoperativ mit dem EDIM-Test untersucht, um das Potential des EDIM-Tests für ein Monitoring der Krankheitsverläufe zu überprüfen. Dabei war postoperativ ein Rückgang der EDIM-scores zu beobachten. Im nächsten Teil der Arbeit wurde die EDIM-Methode genauer untersucht. Dafür wurden *in vitro* differenzierte und aktivierte

beziehungsweise nicht-aktivierte M Φ auf die Expression der drei Tumormarker hin untersucht. Dabei konnte über RT-PCR und durchflusszytometrische Messungen gezeigt werden, dass M2-M Φ dazu in der Lage sind Apo10 sowohl auf transkriptioneller als auch auf translationaler Ebene hoch zu regulieren. Zusätzlich konnte die Internalisation von Tumorpartikeln durch *in vitro* differenzierte M Φ erfolgreich durchflusszytometrisch analysiert werden. In *spiking*-Experimenten wurden Tumorzelllinien mit Blut aus gesunden Probanden inkubiert. Auch hier war es möglich die Tumorpartikel in den M Φ nachzuweisen. In dem letzten Teil der Arbeit wurde eine DNA-Hypomethylierung als mögliche Ursache der erhöhten TKTL1-Expression untersucht. Durch die Behandlung von RMS- und NB-Zelllinien mit dem demethylierendem Reagenz Decitabin konnte eine erhöhte TKTL1-mRNA-Expression beobachtet werden. Zum Schluss wurde überprüft, ob eine Hypomethylierung des TKTL1-Promotors mit der erhöhten TKTL1-Expression in Tumorproben von RMS- und NB-Patienten in Verbindung steht. Dazu wurde eine CpG-Insel des TKTL1-Promotors in RMS- und NB-Gewebeproben durch eine Bisulfit-Sequenzierung auf den Methylierungszustand analysiert. Eine semi-quantitative Methylierungs-Analyse konnte in einem Teil der Gewebeproben eine Hypomethylierung der untersuchten CpG-Insel zeigen. Außerdem konnte eine Korrelation der TKTL1-Expression mit der Hypomethylierung des TKTL1-Promotors nachgewiesen werden. Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Erkenntnisse zeigen zum ersten Mal die Möglichkeit der Detektion von RMS- und NB-Tumoren mithilfe des EDIM-Tests. Die Verwendung dieses Tests könnte die Detektion von RMS- und NB-Tumoren in Kindern verbessern und relevant für die Diagnose dieser Tumore sein.

5.2. Summary

Rhabdomyosarcoma (RMS) and neuroblastoma (NB) are two of the most common extracranial solid tumors in infants and children. Until now tumor staging, diagnosis and monitoring of the diseases are based mainly on imaging techniques and pathological analysis. Recently tumor markers could be detected in macrophages ($M\Phi$) of patients with different solid tumors using a liquid biopsy method called EDIM blood test (Epitop Detection In Monocytes). The tumor markers that are mainly detected with the EDIM blood test are TKTL1 and Apo10. The present study evaluates the role of TKTL1, Apo10, and GD2 (only in NB) as potential biomarkers for diagnosis, monitoring, and disease progression in rhabdomyosarcoma and neuroblastoma. In the first part of this study tumor cell lines and tissue material from both tumor entities were analyzed for the expression of the biomarkers. Using RT PCR, it could be demonstrated, that RMS and NB cell lines as well as the tissue material have elevated the transcriptional expression of TKTL1 and Apo10. Furthermore, the cell lines showed an increased protein expression and GD2 abundance compared to control cells in flow cytometric measurements. In a prospective investigation $M\Phi$ from peripheral blood of patients with RMS, NB and healthy blood donors was analyzed using the EDIM blood test for the presence of the intracellular epitopes of TKTL1, Apo10, and GD2 (only in NB). Using flow cytometry, we identified tumor epitopes (TKTL1, Apo10, GD2) in peripheral blood macrophages of all investigated patients with RMS and NB. Expression scores of these three biomarkers were able to significantly differentiate between patients with malignancies and healthy blood donors. A correlation of the EDIM scores and other clinical parameters could not be shown. Analyzing and comparing the EDIM values of six patients pre- and postoperatively a decrease of the EDIM scores could be detected. In the next part of this work a more detailed investigation on the EDIM method was performed. In vitro differentiated and activated $M\Phi$ were analyzed for the presence of the biomarkers used in this work. Flow cytometric analysis and RT PCR were able to reveal a transcriptional and translational upregulation of Apo10 in M2 $M\Phi$. In addition, it could be shown, that in vitro differentiated and activated $M\Phi$ as well as $M\Phi$ in peripheral blood from healthy blood donors were able to internalize tumor particles and that the tumor markers could be detected in $M\Phi$ using flow cytometric experiments. In the last part of this study it was analyzed if DNA-hypomethylation is the root of elevated TKTL1 expression in RMS and NB tumors. Therefore RMS and NB cell lines

were treated with the demethylating reagent decitabin. The results demonstrate an increased mRNA expression of TKTL1 after the treatment. To verify hypomethylation as a root for the elevated TKTL1 transcription a CpG island in the TKTL1 promotor was analyzed for its methylation status in RMS and NB tissue material. Bisulfite sequencing of this CpG island followed by semi-quantitative methylation analysis indicated hypomethylated CpG sites in the investigated DNA section. Furthermore, a correlation between TKTL1 expression and TKTL1 promotor hypomethylation could be shown. The results of this work show the possibility to detect RMS- and NB-Tumors with the EDIM-test in children. The integration of this test in routine diagnosis might improve the detection of these malignancies.

6. Literatur

1. E.Koscielniak, T.K., *Weichteilsarkome*. Leitlinienprogramm der Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie, 2017.
2. Dasgupta, R. and D.A. Rodeberg, *Update on rhabdomyosarcoma*. Semin Pediatr Surg, 2012. **21**(1): p. 68-78.
3. Ries LAG, S.M., Gurney JG, Linet M, Tamra T, Young JL, Bunin GR (eds). *Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975-1995*. National Cancer Institute, SEER Program. NIH Pub.: Bethesda, MD, 1999.
4. Stout, A.P., *Rhabdomyosarcoma of the skeletal muscles*. Ann Surg, 1946. **123**: p. 447-72.
5. Radzikowska, J., et al., *Rhabdomyosarcoma of the head and neck in children*. Contemp Oncol (Pozn), 2015. **19**(2): p. 98-107.
6. Maurer, H.M., et al., *The Intergroup Rhabdomyosarcoma Study-I. A final report*. Cancer, 1988. **61**(2): p. 209-20.
7. Maurer, H.M., et al., *The Intergroup Rhabdomyosarcoma Study-II*. Cancer, 1993. **71**(5): p. 1904-22.
8. Crist, W., et al., *The Third Intergroup Rhabdomyosarcoma Study*. J Clin Oncol, 1995. **13**(3): p. 610-30.
9. Parham, D.M. and F.G. Barr, *Classification of rhabdomyosarcoma and its molecular basis*. Adv Anat Pathol, 2013. **20**(6): p. 387-97.
10. Kashi, V.P., M.E. Hatley, and R.L. Galindo, *Probing for a deeper understanding of rhabdomyosarcoma: insights from complementary model systems*. Nat Rev Cancer, 2015. **15**(7): p. 426-39.
11. Koufos, A., et al., *Loss of heterozygosity in three embryonal tumours suggests a common pathogenetic mechanism*. Nature, 1985. **316**(6026): p. 330-4.
12. Scrabble, H.J., et al., *Chromosomal localization of the human rhabdomyosarcoma locus by mitotic recombination mapping*. Nature, 1987. **329**(6140): p. 645-7.
13. Koi, M., et al., *Tumor cell growth arrest caused by subchromosomal transferable DNA fragments from chromosome 11*. Science, 1993. **260**(5106): p. 361-4.
14. Loh, W.E., Jr., et al., *Human chromosome 11 contains two different growth suppressor genes for embryonal rhabdomyosarcoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(5): p. 1755-9.
15. Anderson, J., et al., *Disruption of imprinted genes at chromosome region 11p15.5 in paediatric rhabdomyosarcoma*. Neoplasia, 1999. **1**(4): p. 340-8.
16. Smith, A.C., et al., *Growth regulation, imprinted genes, and chromosome 11p15.5*. Pediatr Res, 2007. **61**(5 Pt 2): p. 43R-47R.
17. Gordon, T., et al., *Cytogenetic abnormalities in 42 rhabdomyosarcoma: a United Kingdom Cancer Cytogenetics Group Study*. Med Pediatr Oncol, 2001. **36**(2): p. 259-67.
18. Wang-Wuu, S., et al., *Chromosomal analysis of sixteen human rhabdomyosarcomas*. Cancer Res, 1988. **48**(4): p. 983-7.
19. Stratton, M.R., et al., *Detection of point mutations in N-ras and K-ras genes of human embryonal rhabdomyosarcomas using oligonucleotide probes and the polymerase chain reaction*. Cancer Res, 1989. **49**(22): p. 6324-7.
20. Taylor, A.C., et al., *P53 mutation and MDM2 amplification frequency in pediatric rhabdomyosarcoma tumors and cell lines*. Med Pediatr Oncol, 2000. **35**(2): p. 96-103.
21. Iolascon, A., et al., *Analysis of cyclin-dependent kinase inhibitor genes (CDKN2A, CDKN2B, and CDKN2C) in childhood rhabdomyosarcoma*. Genes Chromosomes Cancer, 1996. **15**(4): p. 217-22.
22. Shapiro, D.N., et al., *Fusion of PAX3 to a member of the forkhead family of transcription factors in human alveolar rhabdomyosarcoma*. Cancer Res, 1993. **53**(21): p. 5108-12.
23. Galili, N., et al., *Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma*. Nat Genet, 1993. **5**(3): p. 230-5.
24. Davis, R.J., et al., *Fusion of PAX7 to FKHR by the variant t(1;13)(p36;q14) translocation in alveolar rhabdomyosarcoma*. Cancer Res, 1994. **54**(11): p. 2869-72.
25. Buckingham, M. and F. Relaix, *PAX3 and PAX7 as upstream regulators of myogenesis*. Semin Cell Dev Biol, 2015. **44**: p. 115-25.
26. Nakae, J., et al., *The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation*. Dev Cell, 2003. **4**(1): p. 119-29.

27. Rena, G., et al., *Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B*. J Biol Chem, 1999. **274**(24): p. 17179-83.
28. Bennicelli, J.L., et al., *PAX3 and PAX7 exhibit conserved cis-acting transcription repression domains and utilize a common gain of function mechanism in alveolar rhabdomyosarcoma*. Oncogene, 1999. **18**(30): p. 4348-56.
29. Bennicelli, J.L., R.H. Edwards, and F.G. Barr, *Mechanism for transcriptional gain of function resulting from chromosomal translocation in alveolar rhabdomyosarcoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(11): p. 5455-9.
30. Davis, R.J. and F.G. Barr, *Fusion genes resulting from alternative chromosomal translocations are overexpressed by gene-specific mechanisms in alveolar rhabdomyosarcoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(15): p. 8047-51.
31. del Peso, L., et al., *Regulation of the forkhead transcription factor FKHR, but not the PAX3-FKHR fusion protein, by the serine/threonine kinase Akt*. Oncogene, 1999. **18**(51): p. 7328-33.
32. Bernasconi, M., et al., *Induction of apoptosis in rhabdomyosarcoma cells through down-regulation of PAX proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(23): p. 13164-9.
33. Epstein, J.A., et al., *Pax3 inhibits myogenic differentiation of cultured myoblast cells*. J Biol Chem, 1995. **270**(20): p. 11719-22.
34. Khan, J., et al., *cDNA microarrays detect activation of a myogenic transcription program by the PAX3-FKHR fusion oncogene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(23): p. 13264-9.
35. Lam, P.Y., et al., *The oncogenic potential of the Pax3-FKHR fusion protein requires the Pax3 homeodomain recognition helix but not the Pax3 paired-box DNA binding domain*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(1): p. 594-601.
36. Xia, S.J., J.G. Pressey, and F.G. Barr, *Molecular Pathogenesis of Rhabdomyosarcoma*. Cancer Biology & Therapy, 2014. **1**(2): p. 97-104.
37. Sumegi, J., et al., *Recurrent t(2;2) and t(2;8) translocations in rhabdomyosarcoma without the canonical PAX-FOXO1 fuse PAX3 to members of the nuclear receptor transcriptional coactivator family*. Genes Chromosomes Cancer, 2010. **49**(3): p. 224-36.
38. Wachtel, M., et al., *Gene expression signatures identify rhabdomyosarcoma subtypes and detect a novel t(2;2)(q35;p23) translocation fusing PAX3 to NCOA1*. Cancer Res, 2004. **64**(16): p. 5539-45.
39. Shern, J.F., et al., *Comprehensive genomic analysis of rhabdomyosarcoma reveals a landscape of alterations affecting a common genetic axis in fusion-positive and fusion-negative tumors*. Cancer Discov, 2014. **4**(2): p. 216-31.
40. Sorensen, P.H., et al., *PAX3-FKHR and PAX7-FKHR gene fusions are prognostic indicators in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the children's oncology group*. J Clin Oncol, 2002. **20**(11): p. 2672-9.
41. Williamson, D., et al., *Fusion gene-negative alveolar rhabdomyosarcoma is clinically and molecularly indistinguishable from embryonal rhabdomyosarcoma*. J Clin Oncol, 2010. **28**(13): p. 2151-8.
42. Egas-Bejar, D. and W.W. Huh, *Rhabdomyosarcoma in adolescent and young adult patients: current perspectives*. Adolesc Health Med Ther, 2014. **5**: p. 115-25.
43. Sung, L., et al., *Neurofibromatosis in children with Rhabdomyosarcoma: a report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma study IV*. J Pediatr, 2004. **144**(5): p. 666-8.
44. Li, F.P. and J.F. Fraumeni, Jr., *Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome?* Ann Intern Med, 1969. **71**(4): p. 747-52.
45. Steenman, M., A. Westerveld, and M. Mannens, *Genetics of Beckwith-Wiedemann syndrome-associated tumors: common genetic pathways*. Genes Chromosomes Cancer, 2000. **28**(1): p. 1-13.
46. Hennekam, R.C., *Costello syndrome: an overview*. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2003. **117C**(1): p. 42-8.
47. Jongmans, M.C., et al., *Noonan syndrome, the SOS1 gene and embryonal rhabdomyosarcoma*. Genes Chromosomes Cancer, 2010. **49**(7): p. 635-41.
48. Ganguly, S., et al., *Gorlin-goltz syndrome: a rare case*. Indian J Dermatol, 2015. **60**(2): p. 216.
49. Cullinane CJ, B.S., Squire JA, O'Leary JJ, Lewis IJ, *Molecular Biology and Pathology of Paediatric Cancer*. 2003: Oxford University Press.
50. Koscielniak, E., et al., *Results of treatment for soft tissue sarcoma in childhood and adolescence: a final report of the German Cooperative Soft Tissue Sarcoma Study CWS-86*. J Clin Oncol, 1999. **17**(12): p. 3706-19.
51. Bisogno, G., et al., *Rhabdomyosarcoma in adolescents: a report from the AIEOP Soft Tissue Sarcoma Committee*. Cancer, 2012. **118**(3): p. 821-7.

52. Van Gaal, J.C., et al., *Building the bridge between rhabdomyosarcoma in children, adolescents and young adults: the road ahead*. Crit Rev Oncol Hematol, 2012. **82**(3): p. 259-79.
53. Cheung, N.K. and M.A. Dyer, *Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy*. Nat Rev Cancer, 2013. **13**(6): p. 397-411.
54. Stillier, C.A. and D.M. Parkin, *International variations in the incidence of neuroblastoma*. Int J Cancer, 1992. **52**(4): p. 538-43.
55. Heck, J.E., et al., *The epidemiology of neuroblastoma: a review*. Paediatr Perinat Epidemiol, 2009. **23**(2): p. 125-43.
56. Irwin, M.S. and J.R. Park, *Neuroblastoma: paradigm for precision medicine*. Pediatr Clin North Am, 2015. **62**(1): p. 225-56.
57. Li, J., et al., *Cancer incidence among children and adolescents in the United States, 2001-2003*. Pediatrics, 2008. **121**(6): p. e1470-7.
58. Matthay, K.K., et al., *Neuroblastoma*. Nat Rev Dis Primers, 2016. **2**: p. 16078.
59. Morgenstern, D.A., et al., *Prognostic significance of pattern and burden of metastatic disease in patients with stage 4 neuroblastoma: A study from the International Neuroblastoma Risk Group database*. Eur J Cancer, 2016. **65**: p. 1-10.
60. Nakagawara, A., et al., *Neuroblastoma*. Jpn J Clin Oncol, 2018. **48**(3): p. 214-241.
61. Pugh, T.J., et al., *The genetic landscape of high-risk neuroblastoma*. Nat Genet, 2013. **45**(3): p. 279-84.
62. Fujita, T., et al., *CHD5, a tumor suppressor gene deleted from 1p36.31 in neuroblastomas*. J Natl Cancer Inst, 2008. **100**(13): p. 940-9.
63. Theissen, J., et al., *Chromosome 17/17q gain and unaltered profiles in high resolution array-CGH are prognostically informative in neuroblastoma*. Genes Chromosomes Cancer, 2014. **53**(8): p. 639-49.
64. De Preter, K., et al., *Accurate outcome prediction in neuroblastoma across independent data sets using a multigene signature*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(5): p. 1532-41.
65. Westermann, F., et al., *Distinct transcriptional MYCN/c-MYC activities are associated with spontaneous regression or malignant progression in neuroblastomas*. Genome Biol, 2008. **9**(10): p. R150.
66. Bilke, S., et al., *Inferring a tumor progression model for neuroblastoma from genomic data*. J Clin Oncol, 2005. **23**(29): p. 7322-31.
67. Hansford, L.M., et al., *Mechanisms of embryonal tumor initiation: distinct roles for MycN expression and MYCN amplification*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(34): p. 12664-9.
68. Weiss, W.A., et al., *Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice*. EMBO J, 1997. **16**(11): p. 2985-95.
69. Schramm, A., et al., *Next-generation RNA sequencing reveals differential expression of MYCN target genes and suggests the mTOR pathway as a promising therapy target in MYCN-amplified neuroblastoma*. Int J Cancer, 2013. **132**(3): p. E106-15.
70. Stallings, R.L., *MicroRNA involvement in the pathogenesis of neuroblastoma: potential for microRNA mediated therapeutics*. Curr Pharm Des, 2009. **15**(4): p. 456-62.
71. Valentijn, L.J., et al., *Functional MYCN signature predicts outcome of neuroblastoma irrespective of MYCN amplification*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(47): p. 19190-5.
72. Shohet, J.M., et al., *A genome-wide search for promoters that respond to increased MYCN reveals both new oncogenic and tumor suppressor microRNAs associated with aggressive neuroblastoma*. Cancer Res, 2011. **71**(11): p. 3841-51.
73. Brodeur, G.M., et al., *Amplification of N-myc sequences in primary human neuroblastomas: correlation with advanced disease stage*. Prog Clin Biol Res, 1985. **175**: p. 105-13.
74. Maris, J.M., *How does MYCN amplification make neuroblastomas behave aggressively? Still more questions than answers*. Pediatr Blood Cancer, 2005. **45**(7): p. 869-70.
75. Peng, Y. and C.M. Croce, *The role of MicroRNAs in human cancer*. Signal Transduct Target Ther, 2016. **1**: p. 15004.
76. Cohn, S.L., et al., *The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report*. J Clin Oncol, 2009. **27**(2): p. 289-97.
77. Mestdagh, P., et al., *The miR-17-92 microRNA cluster regulates multiple components of the TGF-beta pathway in neuroblastoma*. Mol Cell, 2010. **40**(5): p. 762-73.
78. Hamilton, M.P., et al., *Identification of a pan-cancer oncogenic microRNA superfamily anchored by a central core seed motif*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 2730.
79. Domingo-Fernandez, R., et al., *The role of genetic and epigenetic alterations in neuroblastoma disease pathogenesis*. Pediatr Surg Int, 2013. **29**(2): p. 101-19.

80. Shojaei-Brosseau, T., et al., *Genetic epidemiology of neuroblastoma: a study of 426 cases at the Institut Gustave-Roussy in France*. *Pediatr Blood Cancer*, 2004. **42**(1): p. 99-105.
81. Maris, J.M., et al., *Familial neuroblastoma: a three-generation pedigree and a further association with Hirschsprung disease*. *Med Pediatr Oncol*, 1997. **28**(1): p. 1-5.
82. Riley, R.D., et al., *A systematic review of molecular and biological tumor markers in neuroblastoma*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(1 Pt 1): p. 4-12.
83. Whittle, S.B., et al., *Overview and recent advances in the treatment of neuroblastoma*. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2017. **17**(4): p. 369-386.
84. Hughes, M., H.B. Marsden, and M.K. Palmer, *Histologic patterns of neuroblastoma related to prognosis and clinical staging*. *Cancer*, 1974. **34**(5): p. 1706-11.
85. Kaatsch P, G.D., Spix C, *German Childhood Cancer Registry - Annual Report 2017 (1980-2016)*. 2018, Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz.
86. Brodeur, G.M., et al., *Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment*. *J Clin Oncol*, 1993. **11**(8): p. 1466-77.
87. Monclair, T., et al., *The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(2): p. 298-303.
88. Nuchtern, J.G., *Perinatal neuroblastoma*. *Semin Pediatr Surg*, 2006. **15**(1): p. 10-6.
89. Strother, D.R., et al., *Outcome after surgery alone or with restricted use of chemotherapy for patients with low-risk neuroblastoma: results of Children's Oncology Group study P9641*. *J Clin Oncol*, 2012. **30**(15): p. 1842-8.
90. Baker, D.L., et al., *Outcome after reduced chemotherapy for intermediate-risk neuroblastoma*. *N Engl J Med*, 2010. **363**(14): p. 1313-23.
91. Matthay, K.K., et al., *Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group*. *N Engl J Med*, 1999. **341**(16): p. 1165-73.
92. Sidell, N., *Retinoic acid-induced growth inhibition and morphologic differentiation of human neuroblastoma cells in vitro*. *J Natl Cancer Inst*, 1982. **68**(4): p. 589-96.
93. Yu, A.L., et al., *Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma*. *N Engl J Med*, 2010. **363**(14): p. 1324-34.
94. Pule, M.A., et al., *Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma*. *Nat Med*, 2008. **14**(11): p. 1264-70.
95. Schilling, F.H., et al., *Neuroblastoma screening at one year of age*. *N Engl J Med*, 2002. **346**(14): p. 1047-53.
96. Nagpal, M., et al., *Tumor markers: A diagnostic tool*. *Natl J Maxillofac Surg*, 2016. **7**(1): p. 17-20.
97. *Tumormarker: Biomarker in der Krebsmedizin*. Tumormarker, prädiktive Marker und Prognosefaktoren 2015 01.02.2014 [cited 2019 24.2.2019]; Available from: <https://www.krebsinformationsdienst.de/untersuchung/tumormarker.php>.
98. Coy, J.F., *EDIM-TKTL1/Apo10 Blood Test: An Innate Immune System Based Liquid Biopsy for the Early Detection, Characterization and Targeted Treatment of Cancer*. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(4).
99. Taper, H.S., *Altered deoxyribonuclease activity in cancer cells and its role in non toxic adjuvant cancer therapy with mixed vitamins C and K3*. *Anticancer Res*, 2008. **28**(5A): p. 2727-32.
100. Cleaver, J.E., D. Bootsma, and E. Friedberg, *Human diseases with genetically altered DNA repair processes*. *Genetics*, 1975. **79 Suppl**: p. 215-25.
101. Grimm, M., et al., *A biomarker based detection and characterization of carcinomas exploiting two fundamental biophysical mechanisms in mammalian cells*. *BMC Cancer*, 2013. **13**: p. 569.
102. Los, M., et al., *Functional characterization of DNase X, a novel endonuclease expressed in muscle cells*. *Biochemistry*, 2000. **39**(25): p. 7365-73.
103. Jansen, N. and J.F. Coy, *Diagnostic use of epitope detection in monocytes blood test for early detection of colon cancer metastasis*. *Future Oncol*, 2013. **9**(4): p. 605-9.
104. Groux-Degroote, S., et al., *Gangliosides in breast cancer: new perspectives*. *Biochemistry (Mosc)*, 2015. **80**(7): p. 808-19.
105. Yu, R.K., et al., *Structures, biosynthesis, and functions of gangliosides--an overview*. *J Oleo Sci*, 2011. **60**(10): p. 537-44.
106. Doronin, II, et al., *Ganglioside GD2 in reception and transduction of cell death signal in tumor cells*. *BMC Cancer*, 2014. **14**: p. 295.

107. Navid, F., V.M. Santana, and R.C. Barfield, *Anti-GD2 antibody therapy for GD2-expressing tumors*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2010. **10**(2): p. 200-9.
108. Alvarez-Rueda, N., et al., *Binding activities and antitumor properties of a new mouse/human chimeric antibody specific for GD2 ganglioside antigen*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(18 Pt 2): p. 5613s-5620s.
109. Schulz, G., et al., *Detection of ganglioside GD2 in tumor tissues and sera of neuroblastoma patients*. *Cancer Res*, 1984. **44**(12 Pt 1): p. 5914-20.
110. Liberti, M.V. and J.W. Locasale, *The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?* *Trends Biochem Sci*, 2016. **41**(3): p. 211-218.
111. Gatenby, R.A. and R.J. Gillies, *Why do cancers have high aerobic glycolysis?* *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(11): p. 891-9.
112. Boros, L.G., et al., *Oxythiamine and dehydroepiandrosterone inhibit the nonoxidative synthesis of ribose and tumor cell proliferation*. *Cancer Research*, 1997. **57**(19): p. 4242-4248.
113. Diaz-Moralli, S., et al., *A key role for transketolase-like 1 in tumor metabolic reprogramming*. *Oncotarget*, 2016. **7**(32): p. 51875-51897.
114. Sun, W., et al., *TKTL1 is activated by promoter hypomethylation and contributes to head and neck squamous cell carcinoma carcinogenesis through increased aerobic glycolysis and HIF1alpha stabilization*. *Clin Cancer Res*, 2010. **16**(3): p. 857-66.
115. Arneith, B., *Update on the types and usage of liquid biopsies in the clinical setting: a systematic review*. *BMC Cancer*, 2018. **18**(1): p. 527.
116. Bedard, P.L., et al., *Tumour heterogeneity in the clinic*. *Nature*, 2013. **501**(7467): p. 355-64.
117. Molina-Vila, M.A., et al., *Liquid Biopsy in Non-Small Cell Lung Cancer*. *Front Med (Lausanne)*, 2016. **3**: p. 69.
118. Yin, C.Q., et al., *Liquid Biopsy of Hepatocellular Carcinoma: Circulating Tumor-Derived Biomarkers*. *Dis Markers*, 2016. **2016**: p. 1427849.
119. Lim, J.S.J., F. Janku, and T.A. Yap, *Circulating tumor DNA-From bench to bedside*. *Curr Probl Cancer*, 2017. **41**(3): p. 212-221.
120. Ulz, P., M. Auer, and E. Heitzer, *Detection of Circulating Tumor DNA in the Blood of Cancer Patients: An Important Tool in Cancer Chemoprevention*. *Methods Mol Biol*, 2016. **1379**: p. 45-68.
121. A.Cree, I., *Liquid biopsy for cancer patients: Principles and practice*. *Pathogenesis*, 2015. **2**(1-2): p. 1-4.
122. Matteo Giulietti, G.O., Alessandra Righetti, Tatiana Armeni, Giovanni Principato and Francesco Piva, *Employment of Exosomes for Liquid Biopsies*. *Translational Biomedicine*, 2015. **6**(4): p. 37-40.
123. Mayo-de-Las-Casas, C., et al., *Large scale, prospective screening of EGFR mutations in the blood of advanced NSCLC patients to guide treatment decisions*. *Ann Oncol*, 2017. **28**(9): p. 2248-2255.
124. Gold, B., et al., *Do circulating tumor cells, exosomes, and circulating tumor nucleic acids have clinical utility? A report of the association for molecular pathology*. *J Mol Diagn*, 2015. **17**(3): p. 209-24.
125. Messadi, D.V., *Diagnostic aids for detection of oral precancerous conditions*. *Int J Oral Sci*, 2013. **5**(2): p. 59-65.
126. Mardis, E.R. and R.K. Wilson, *Cancer genome sequencing: a review*. *Hum Mol Genet*, 2009. **18**(R2): p. R163-8.
127. Feyen, O., et al., *EDIM-TKTL1 blood test: a noninvasive method to detect upregulated glucose metabolism in patients with malignancies*. *Future Oncol*, 2012. **8**(10): p. 1349-59.
128. Herwig, R., et al., *Measurement of intracellular versus extracellular prostate-specific antigen levels in peripheral macrophages: a new approach to noninvasive diagnosis of prostate cancer*. *Clin Prostate Cancer*, 2004. **3**(3): p. 184-8.
129. Grimm, M., et al., *Analysis of circulating CD14+/CD16+ monocyte-derived macrophages (MDMs) in the peripheral blood of patients with oral squamous cell carcinoma*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 2016. **121**(3): p. 301-6.
130. Japink, D., et al., *CEA in activated macrophages. New diagnostic possibilities for tumor markers in early colorectal cancer*. *Anticancer Res*, 2009. **29**(8): p. 3245-51.
131. Leers, M.P., et al., *Circulating PSA-containing macrophages as a possible target for the detection of prostate cancer: a three-color/five-parameter flow cytometric study on peripheral blood samples*. *Am J Clin Pathol*, 2008. **129**(4): p. 649-56.
132. Bernstein, B.E., A. Meissner, and E.S. Lander, *The mammalian epigenome*. *Cell*, 2007. **128**(4): p. 669-81.
133. Smith, Z.D. and A. Meissner, *DNA methylation: roles in mammalian development*. *Nat Rev Genet*, 2013. **14**(3): p. 204-20.
134. Das, P.M. and R. Singal, *DNA methylation and cancer*. *J Clin Oncol*, 2004. **22**(22): p. 4632-42.

135. Kim, M. and J. Costello, *DNA methylation: an epigenetic mark of cellular memory*. *Exp Mol Med*, 2017. **49**(4): p. e322.
136. Kohli, R.M. and Y. Zhang, *TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation*. *Nature*, 2013. **502**(7472): p. 472-9.
137. Ehrlich, M., *DNA methylation in cancer: too much, but also too little*. *Oncogene*, 2002. **21**(35): p. 5400-13.
138. Smith, I.M., et al., *Coordinated activation of candidate proto-oncogenes and cancer testis antigens via promoter demethylation in head and neck cancer and lung cancer*. *PLoS One*, 2009. **4**(3): p. e4961.
139. McAllister, R.M., et al., *Cultivation in vitro of cells derived from a human rhabdomyosarcoma*. *Cancer*, 1969. **24**(3): p. 520-6.
140. Missiaglia, E., et al., *Genomic Imbalances in Rhabdomyosarcoma Cell Lines Affect Expression of Genes Frequently Altered in Primary Tumors: An Approach to Identify Candidate Genes Involved in Tumor Development*. *Genes Chromosomes & Cancer*, 2009. **48**(6): p. 455-467.
141. Schaaf, G., et al., *Silencing of SPRY1 triggers complete regression of rhabdomyosarcoma tumors carrying a mutated RAS gene*. *Cancer Res*, 2010. **70**(2): p. 762-71.
142. Felix, C.A., et al., *Frequency and diversity of p53 mutations in childhood rhabdomyosarcoma*. *Cancer Res*, 1992. **52**(8): p. 2243-7.
143. Miyachi, M., et al., *Restoration of p53 pathway by nutlin-3 induces cell cycle arrest and apoptosis in human rhabdomyosarcoma cells*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(12): p. 4077-84.
144. Seeger, R.C., et al., *Morphology, growth, chromosomal pattern and fibrinolytic activity of two new human neuroblastoma cell lines*. *Cancer Res*, 1977. **37**(5): p. 1364-71.
145. Biedler, J.L., et al., *Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones*. *Cancer Res*, 1978. **38**(11 Pt 1): p. 3751-7.
146. Rudolph, G., et al., *Cytogenetic and molecular characterization of a newly established neuroblastoma cell line LS*. *Hum Genet*, 1991. **86**(6): p. 562-6.
147. Corvi, R., et al., *Cytogenetic evolution of MYCN and MDM2 amplification in the neuroblastoma LS tumour and its cell line*. *Eur J Cancer*, 1995. **31A**(4): p. 520-3.
148. Tumilowicz, J.J., et al., *Definition of a continuous human cell line derived from neuroblastoma*. *Cancer Res*, 1970. **30**(8): p. 2110-8.
149. Nuutila, J. and E.M. Lilius, *Flow cytometric quantitative determination of ingestion by phagocytes needs the distinguishing of overlapping populations of binding and ingesting cells*. *Cytometry A*, 2005. **65**(2): p. 93-102.
150. Hawley, T.S., et al., *Multiparameter flow cytometry of fluorescent protein reporters*. *Methods Mol Biol*, 2004. **263**: p. 219-38.
151. Saiki, R.K., et al., *Diagnosis of sickle cell anemia and beta-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes*. *N Engl J Med*, 1988. **319**(9): p. 537-41.
152. Rychlik, W. and R.E. Rhoads, *A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA*. *Nucleic Acids Res*, 1989. **17**(21): p. 8543-51.
153. Kucera, R.B. and N.M. Nichols, *DNA-dependent DNA polymerases*. *Curr Protoc Mol Biol*, 2008. **Chapter 3**: p. Unit3 5.
154. Bio-Rad Laboratories, I., *Real-Time PCR Applications Guide*. 2006.
155. Don, R.H., et al., *'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification*. *Nucleic Acids Res*, 1991. **19**(14): p. 4008.
156. Li, L.C. and R. Dahiya, *MethPrimer: designing primers for methylation PCRs*. *Bioinformatics*, 2002. **18**(11): p. 1427-31.
157. Slater, G.W., et al., *Quantitative analysis of the three regimes of DNA electrophoresis in agarose gels*. *Biopolymers*, 1988. **27**(3): p. 509-24.
158. Inc., B., *GelRed and GelGreen: Environmentally safe and ultra-sensitive nucleic acid gel stains for replacing EtBr*. 2012.
159. Frommer, M., et al., *A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(5): p. 1827-31.
160. Tomar, T., et al., *Genome-wide methylation profiling of ovarian cancer patient-derived xenografts treated with the demethylating agent decitabine identifies novel epigenetically regulated genes and pathways*. *Genome Med*, 2016. **8**(1): p. 107.
161. Sobin, L.H. and C.C. Compton, *TNM seventh edition: what's new, what's changed: communication from the International Union Against Cancer and the American Joint Committee on Cancer*. *Cancer*, 2010. **116**(22): p. 5336-9.

162. Wittekind, C. and B. Oberschmid, [TNM classification of malignant tumors 2010: General aspects and amendments in the general section]. *Pathologe*, 2010. **31**(5): p. 333-4, 336-8.
163. Carr, I.M., et al., *Inferring relative proportions of DNA variants from sequencing electropherograms*. *Bioinformatics*, 2009. **25**(24): p. 3244-50.
164. Kacevska, M., et al., *DNA methylation dynamics in the hepatic CYP3A4 gene promoter*. *Biochimie*, 2012. **94**(11): p. 2338-44.
165. Saleh, M.N., et al., *CD16+ monocytes in patients with cancer: spontaneous elevation and pharmacologic induction by recombinant human macrophage colony-stimulating factor*. *Blood*, 1995. **85**(10): p. 2910-7.
166. Langbein, S., et al., *Expression of transketolase TKTL1 predicts colon and urothelial cancer patient survival: Warburg effect reinterpreted*. *Br J Cancer*, 2006. **94**(4): p. 578-85.
167. Foldi, M., et al., *Transketolase protein TKTL1 overexpression: A potential biomarker and therapeutic target in breast cancer*. *Oncol Rep*, 2007. **17**(4): p. 841-5.
168. Krockenberger, M., et al., *Transketolase-like 1 expression correlates with subtypes of ovarian cancer and the presence of distant metastases*. *Int J Gynecol Cancer*, 2007. **17**(1): p. 101-6.
169. Langbein, S., et al., *Metastasis is promoted by a bioenergetic switch: new targets for progressive renal cell cancer*. *Int J Cancer*, 2008. **122**(11): p. 2422-8.
170. Zerilli, M., et al., *Increased expression of transketolase-like-1 in papillary thyroid carcinomas smaller than 1.5 cm in diameter is associated with lymph-node metastases*. *Cancer*, 2008. **113**(5): p. 936-44.
171. Zhang, S., et al., *Overexpression of transketolase protein TKTL1 is associated with occurrence and progression in nasopharyngeal carcinoma: a potential therapeutic target in nasopharyngeal carcinoma*. *Cancer Biol Ther*, 2008. **7**(4): p. 517-22.
172. Chen, H., et al., *Overexpression of transketolase-like gene 1 is associated with cell proliferation in uterine cervix cancer*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2009. **28**: p. 43.
173. Kohrenhagen, N., et al., *Expression of transketolase-like 1 (TKTL1) and p-Akt correlates with the progression of cervical neoplasia*. *J Obstet Gynaecol Res*, 2008. **34**(3): p. 293-300.
174. Mayer, A., A. von Wallbrunn, and P. Vaupel, *Evidence against a major role for TKTL-1 in hypoxic and normoxic cancer cells*. *Adv Exp Med Biol*, 2011. **701**: p. 123-8.
175. Stern, R., et al., *Lactate stimulates fibroblast expression of hyaluronan and CD44: the Warburg effect revisited*. *Exp Cell Res*, 2002. **276**(1): p. 24-31.
176. Li, J., et al., *TKTL1 promotes cell proliferation and metastasis in esophageal squamous cell carcinoma*. *Biomed Pharmacother*, 2015. **74**: p. 71-6.
177. Fischer, K., et al., *Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells*. *Blood*, 2007. **109**(9): p. 3812-9.
178. Wong, R.S., *Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2011. **30**: p. 87.
179. Zanotti, S., A. Fisseler-Eckhoff, and H.G. Mannherz, *Changes in the topological expression of markers of differentiation and apoptosis in defined stages of human cervical dysplasia and carcinoma*. *Gynecol Oncol*, 2003. **89**(3): p. 376-84.
180. Hughes, P., et al., *The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need?* *Biotechniques*, 2007. **43**(5): p. 575, 577-8, 581-2 passim.
181. Hynds, R.E., E. Vladimirov, and S.M. Janes, *The secret lives of cancer cell lines*. *Dis Model Mech*, 2018. **11**(11).
182. Russnes, H.G., et al., *Insight into the heterogeneity of breast cancer through next-generation sequencing*. *J Clin Invest*, 2011. **121**(10): p. 3810-8.
183. Diaz-Cano, S.J., *Tumor heterogeneity: mechanisms and bases for a reliable application of molecular marker design*. *Int J Mol Sci*, 2012. **13**(2): p. 1951-2011.
184. Tellez-Gabriel, M., et al., *Tumour Heterogeneity: The Key Advantages of Single-Cell Analysis*. *Int J Mol Sci*, 2016. **17**(12).
185. Parihar, A., T.D. Eubank, and A.I. Doseff, *Monocytes and macrophages regulate immunity through dynamic networks of survival and cell death*. *J Innate Immun*, 2010. **2**(3): p. 204-15.
186. Grimm, M., et al., *Evaluation of a biomarker based blood test for monitoring surgical resection of oral squamous cell carcinomas*. *Clin Oral Investig*, 2016. **20**(2): p. 329-38.
187. Singal AK, A.S., *Tumour markers in pediatric solid tumours*. *J Indian Assoc Pediatr Surg*, 2005. **10**(3): p. 183-190.
188. Georgantzi, K., et al., *Chromogranin A and neuron-specific enolase in neuroblastoma: Correlation to stage and prognostic factors*. *Pediatr Hematol Oncol*, 2018. **35**(2): p. 156-165.

189. Mayer, A., A. Von Wallbrunn, and P. Vaupel, *Glucose metabolism of malignant cells is not regulated by transketolase-like (TKTL)-1*. Int J Oncol, 2010. **37**(2): p. 265-71.
190. Kayser, G., et al., *Poor outcome in primary non-small cell lung cancers is predicted by transketolase TKTL1 expression*. Pathology, 2011. **43**(7): p. 719-24.
191. Song, Y., D. Liu, and G. He, *TKTL1 and p63 are biomarkers for the poor prognosis of gastric cancer patients*. Cancer Biomark, 2015. **15**(5): p. 591-7.
192. Schwaab, J., et al., *Expression of Transketolase like gene 1 (TKTL1) predicts disease-free survival in patients with locally advanced rectal cancer receiving neoadjuvant chemoradiotherapy*. BMC Cancer, 2011. **11**: p. 363.
193. Galluzzi, L., et al., *Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents*. Cancer Cell, 2015. **28**(6): p. 690-714.
194. Rubio, M.T., et al., *The immunosuppressive effect of vincristine on allostimulatory potential of human dendritic cells interferes with their function and survival*. Int J Oncol, 2004. **25**(2): p. 407-12.
195. Ryoyama, K., et al., *The differential sensitivity of T cell immune functions to vincristine and vinblastine*. Int J Immunopharmacol, 1982. **4**(3): p. 187-93.
196. DeNardo, D.G., et al., *Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy*. Cancer Discov, 2011. **1**(1): p. 54-67.
197. Sconocchia, G., et al., *Tumor infiltration by FcγRIII (CD16)+ myeloid cells is associated with improved survival in patients with colorectal carcinoma*. Int J Cancer, 2011. **128**(11): p. 2663-72.
198. Feng, A.L., et al., *CD16+ monocytes in breast cancer patients: expanded by monocyte chemoattractant protein-1 and may be useful for early diagnosis*. Clin Exp Immunol, 2011. **164**(1): p. 57-65.
199. Tarique, A.A., et al., *Phenotypic, functional, and plasticity features of classical and alternatively activated human macrophages*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2015. **53**(5): p. 676-88.
200. Zhang, X. and D.M. Mosser, *Macrophage activation by endogenous danger signals*. J Pathol, 2008. **214**(2): p. 161-78.
201. Xu, W., et al., *Reversible differentiation of pro- and anti-inflammatory macrophages*. Mol Immunol, 2013. **53**(3): p. 179-86.
202. Bertani, F.R., et al., *Classification of M1/M2-polarized human macrophages by label-free hyperspectral reflectance confocal microscopy and multivariate analysis*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 8965.
203. Saman S., S.M.J., Warmann S.W., Handgretinger R., Malek N.P., Plentz R.R., Schmid E., *Biomarkers Apo10 and TKTL1: epitope-detection in monocytes (EDIM) as a new diagnostic approach for cholangiocellular, pancreatic and colorectal carcinoma*. Cancer Biomarkers, 2020. **27**(1):p.129-37.
204. Leek, R.D., et al., *Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma*. Cancer Res, 1996. **56**(20): p. 4625-9.
205. Ruffell, B., et al., *Macrophage IL-10 blocks CD8+ T cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing IL-12 expression in intratumoral dendritic cells*. Cancer Cell, 2014. **26**(5): p. 623-37.
206. Lin, E.Y., et al., *Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy*. J Exp Med, 2001. **193**(6): p. 727-40.
207. Lin, E.Y., et al., *Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer*. Cancer Res, 2006. **66**(23): p. 11238-46.
208. De Palma, M., et al., *Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors*. Cancer Cell, 2005. **8**(3): p. 211-26.
209. Wyckoff, J.B., et al., *Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors*. Cancer Res, 2007. **67**(6): p. 2649-56.
210. Dambacher, C.M. and G.C. Lander, *Site-specific labeling of proteins for electron microscopy*. J Struct Biol, 2015. **192**(2): p. 151-8.
211. McGhee, J.D. and G.D. Ginder, *Specific DNA methylation sites in the vicinity of the chicken beta-globin genes*. Nature, 1979. **280**(5721): p. 419-20.
212. Lowdon, R.F., H.S. Jang, and T. Wang, *Evolution of Epigenetic Regulation in Vertebrate Genomes*. Trends Genet, 2016. **32**(5): p. 269-283.
213. Wagner, J.R., et al., *The relationship between DNA methylation, genetic and expression inter-individual variation in untransformed human fibroblasts*. Genome Biol, 2014. **15**(2): p. R37.
214. Suzuki, M.M. and A. Bird, *DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics*. Nat Rev Genet, 2008. **9**(6): p. 465-76.
215. Hanada, M., et al., *bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1993. **82**(6): p. 1820-8.

216. Nishigaki, M., et al., *Discovery of aberrant expression of R-RAS by cancer-linked DNA hypomethylation in gastric cancer using microarrays*. *Cancer Res*, 2005. **65**(6): p. 2115-24.
217. Oshimo, Y., et al., *Promoter methylation of cyclin D2 gene in gastric carcinoma*. *Int J Oncol*, 2003. **23**(6): p. 1663-70.
218. Marusyk, A. and K. Polyak, *Tumor heterogeneity: causes and consequences*. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1805**(1): p. 105-17.
219. Sharp, A.J., et al., *DNA methylation profiles of human active and inactive X chromosomes*. *Genome Res*, 2011. **21**(10): p. 1592-600.
220. Karemaker, I.D. and M. Vermeulen, *Single-Cell DNA Methylation Profiling: Technologies and Biological Applications*. *Trends Biotechnol*, 2018. **36**(9): p. 952-965.
221. Allen-Rhoades W., Whittle S.B., Rainusso N., *Pediatric Solid Tumors of Infancy: An Overview*. *Pediatrics in Review*, 2018. **39**(2): p. 57-67.
222. Nadtoetschi T., *Untersuchungen zur DNaseX- und TKTL1 Expression bei Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom*. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität zu Tübingen, 2015.
223. Labmedica International staff writers: *Liquid Biopsy Test Launched for NRAS Mutations*, 2017. [cited 18.10.2018]; Available from: <https://www.labmedica.com/molecular-diagnostics/articles/294770815/liquid-biopsy-test-launched-for-nras-mutations.html> [18.10.2018].
224. Zyagnum AG: *EDIM Technologie*, 2017. [cited 18.10.2018]; Available from: <https://zyagnum.com/wp-content/uploads/2016/09/S3-1030x609.jpg>.
225. Tombolan L, Poli E, Martini P, Zin A et al. Global DNA methylation profiling uncovers distinct methylation patterns of protocadherin alpha4 in metastatic and non-metastatic rhabdomyosarcoma. *BMC Cancer* 2016.**16**(1):886.
226. Decock, A., Ongenaert, M., Van Criekinge, W. et al. DNA methylation profiling of primary neuroblastoma tumors using methyl-CpG-binding domain sequencing. *Sci Data* **3**, 160004 (2016).

7. Anhang

7.1. Sequenzinformationen zu den TKTL1-Methylierungsexperimenten

7.1.1. DNA Sequenz des TKTL1 Promotors

TKTL1-Gen (INTRONS und EXONS)

+ 1000 bp *upstream* und 600 bp *downstream* des ersten EXONS werden dargestellt

>chromosome:GRCh38:X:154294671:154296621

```
CGGATGCCTGTAATCCCAGCTATTCAGGAGGCTGAGGCAGGAGAATCGCTTGAAGCCAGGAGGCAGA
GGTTGCAACGAGCTAAGTTCGAGCCACTGCACTCCAGCTTGGGCGACAGGGCGAGACTCCGTCTCAA
AAAAAAAAAATGTAAACACACATTCCCTTTAACCCAGCAGAACATGGGAACCAAGGGCATTTCAGCC
TGTGGCGCGACCAGGCGGCCTGACTTGAGCTCACGTAGAAATTCGGCATTTCGAAACCAAGAGACAGC
ACTTGGGATCCGGAATGTCTGGACTTGGGCACGGCGCTGTGGAGCTGGCGCCGTTGGGAGCCATGCGA
GTTCTGGGTCGGTAGGTACCTCAGAGGTGGGGAGAAGGTTCTCTGAGACCGACATGGGGGCTAGTGC
TGGCACCACCGGACATGGGGCATTTCAGACACAGGGCGAGCACATTCCCTAGTTACCAGGGTTCATT
GAGTCAGTCACGTACAGGCTGGCAATGGGCTAACTCCTCCTCAACAATCACACGGGGGCTTGCCTCAT
AGAATGTTTTAAAAAAGGAAAGGAGGCTGGCGCAGGCGCAACCGTCTCAGAACCTGAGCACTGCCC
CACCCACCCCTGCCCGCCATAGCCTGGGCTGTTGTGGGGGAGGGGTGACCATTTATCACGAAACAAA
AAATTGCGCCACAGCAGCTCCCTCCCTCCCCACCTTTACGGTTGCAGCTGCACGTCCCACGTGCAGC
ACCACCCCTGACACGTGCGGCACCACCCCTGACACGTGCGGCACCACCCCTGAC[169]ACGTGCG
GCACCACCCCTGACACGTGCGGCACCACCCCTGACACGTGCGGCACCACACAGCTAGTGCCGAA
CTTTTGTGCAGAGAAAGAAGACCCTGCACCCGCGCGGAGGGAGCCCTTTTGAGATTGCAGGAGAGA
AGATGAGAATGGGACTATTTTCAATAACTGTGCACATGCAAGTCACAAACATTCCAGATCCCTGACT
TGCTGCGGAGGGAGCGGCGGCGGAGGGAGCGGCAGGTGGAGGGAGTGGCACGAGGCATGC
GGAGGGAGCTGCACCGACATCACATAAACGCACTGGGCAGCTCGCAGCCGCCATTCCGTCTTCA
GACGCCGAGACGTAGGAGTGGGTCTTCAGACTCCAAAGGGGTGGACTAATGGCGGATGCTGA
GGCGAGGGCTGAGTTCCCGGAGGAGGCCAGACCTGACAGGGGCACCTTGCAGGTGTTGCAAGA
TATGGCCAGCCGCTTGCGAATCCATTCCATCAGGGCCACATGCTCCACGAGCTCCGGGTAAGTTC
TCCTCATTGAAGTCTGGGTCATGCAGGGCCACGGGCCCGGTGGCTTCAGGCCTGGTGGCCATGAGGCC
GTGTGGTGAAGGGAGAGCCTTCAGAGGCACAATGGGCTGTGTGTAATGCCCTGTCTTGGGCTGTTGG
GGCCCGTTCGAGCACCTAGATGGCAGCGAGGCACTATTCCCGCCAACCAAGGGTCGGTCGGTGGT
TGGTCAGCCGCGGGTCTGGAGCCCGCCCTCAATTTACCCACGGCCAAAGTTCTGGAGGTGCGCAAG
ATCTCCAGTTGGGAGACAAAGGATCCAGACTGGACTGAGGTGGCGGGAGAATGTCACTGGGATCAGAT
TGGGCTAGCTGTGGTTTTTCATTTTAGCGGGGAGCAGGGCTTCCCTGGTAAGCAGTTGTACTGGATCCCC
GAGGGTGAATGAGCGACTCTAACCCAGGATGTGAGGATAAAAAGCAATTAATAATCCAGCCTGGGCA
ACATGGCGAAACCCGTCCTTACCAAAAAATAAAAAATAAAAAATGAGTCGGGCATGGGGGCGCACA
CCTGCACTCCAGCTATTCGGGAGGCTTGCTTGTGCTGTTGGGTTTGCTGGTATGCAGTTGATGGTTTT
GCATCA
```

Alle Exons ins dieser Region

2 CpG-Inseln (32 CpGs)

TKTL1-Exon

Bisulfit-Sequenzierter Bereich

7.1.2. DNA Sequenz des TKTL1 Promotors nach Bisulfit Konvertierung

Konvertierung der Sequenzen der CpG-Inseln sowie 500 bp *up-* und *downstream* davon nach Bisulfitsbehandlung:

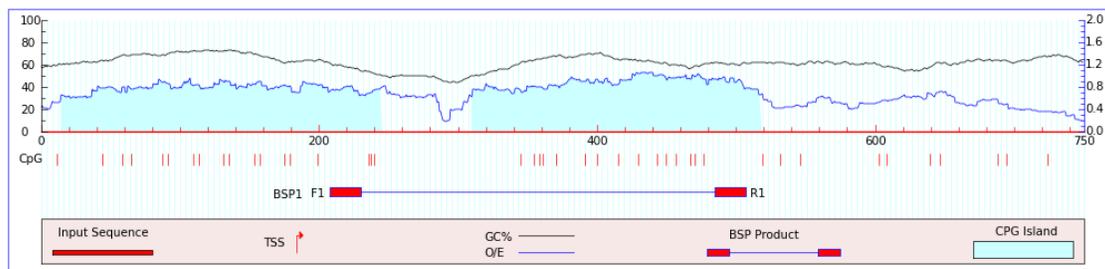
TACGGCGTTGTGGAGTTGGCGTCGTTGGGAGTTATGCGAGTTTTGGGTCGGTAGGTTATTTTAGAGGT
GGGAGAAGGTTTTTTGAGATCGATATGGGGTTAGTGTTGGTATTATCGGATATGGGGTATTTTAGA
TATAGGGCGAGTATATTTTTAGTTATTAGGGTTTATTCGAGTTAGTTACGTTATAGGTTGGTAATGGG
TTAATTTTTTTTTAATAATTACGGGGTTGTTTTATAGAATGTTTTAAAAAAGGAAAGGAGGTTGG
CGTAGGCGTTAATCGTTTTAGAAATTTGAGTATTGTTTTATTTTTATTTGTTTCGTTATAGTTGGGTTG
TTGTGGGGGAGGGGTGATTATTTATTACGAAATAAAAAATTGCGTTATAGTAGTTTTTTTTTTTTTTA
TTTTTA **CGGTTGTAGTTGTACGTTTTACGTGTAGTATTATTTTTGATACGTGCGGTATTATTTTTGA**
TACGTGCGGTATTATTTTTGATACGTGCGGTATTATTTTTGATACGTGCGGTATTATTTTTGATA
CGTGCGGTATTATATAGTTAGTGTCCGAATTTT **TGTGTAGAGAAAGAATTTG TATTCGCGCGG**
AGGGAGTTTTTTGAGATTGTAGGAGAGAAGATGAGAATGGGATTATTTTAATAATTGTGTATATGT
AAGTTATAAATATTTTAGATTTTTTGATTTGTTTGC GGAGGGAGCGGTCGGCGGAGGGAGCGGT
AGGTGGAGGGAGTGGTACGAGGTATGCGGAGGGAGTTGTATCGATATTATATAAACGTATTGG
GTAGTTCGTAGGCGTTATTCGTTTTTTAGACGTGCGGAGACGTAGGAGT **EGGTTTTAGATTTA**
AAGCGCTTGGATTAATGGCGGATGT **TGAGGCGAGGGTTGAGTTTTCGGAGGAGGTTAGATTTG**
ATAGGGGTATTTGTAGGTGTTGTAAGATATGGTTAGTCGTTTGC GAATTTATTTTATTAGGGT
TATATGTTTTACGAGTTTCGGTAAGTTTTTTTATTGAAGTTTGGGTTATGTAGGGTTACGGGTTTCG
GTGGTTTTAGGTTTGGTGGTTATGAGGTCGTGTGGTGAAGGGAGAGTTTTTTAGAGGTATAATGGGTTG
TGTCGTAATGTTTTGTTTTGGGTTGTTGGGGTTCGGTTCGAGTATTTTAGATGGTAGCGAGGTATTATTT
TCGTTAATTTAAGGTCGGTCGGTTGGTTGGTTAGTCGCGGTTTTGGAGTTCGTTTTTTAATTTATTT
ACGGTTAAAGTTTTGGAGGTCGTTAAGATTTTTAGTTGGGAGATAAAGGATTAGATTGGATTGAGGT
GGCGGGAGAATGTTATTGGGATTAGATTGGGTTAGTTGTGGTTTTTTATTTTAGCGGGGAGTAGGGTTT
TTTTGGTAAGTAG

CpG-Inseln (32 CpGs)

Bisulfit/Sequenzierungs-Primer

TKTL1-Exon

7.1.3. *In silico*-Analyse des TKTL1 Promotors



BSP Pair 1

	Primer name	Sequence (5'-3')	Len	Start	End	Degenerate	CpG's	C's	Self any	Self end	Tm	GC%	Stability	Score
Pair	F1	TTGTGTAGAGAAAGAAGATTTTG	23	208	230	No	0	4	400	200	53.3	30.4	7.6	4.4
	R1	ACCCCTTTAAAATCTAAAACCC	23	507	485	No	0	5	700	0	58.1	34.8	9.4	6.0
	Product size	Pair start	Pair end	CpG's	Comp any	Comp end	Tm	Tm diff	Score					
	300	208	507	18	700	200	70.2	4.7	10.2					

Abbildung 29: MethPrimer-Analyse des TKTL1-Promotors.

Mithilfe von *MethPrimer* konnten zwei CpG-Inseln im Promotorbereich des TKTL1-Gens gefunden werden. Dargestellt ist ebenfalls das in der Bisulfid-Konvertierung sowie in der Bisulfid-Sequenzierung eingesetzte Primerpaar.

7.1.4. Elektropherogramme der Bisulfit Sequenzierung

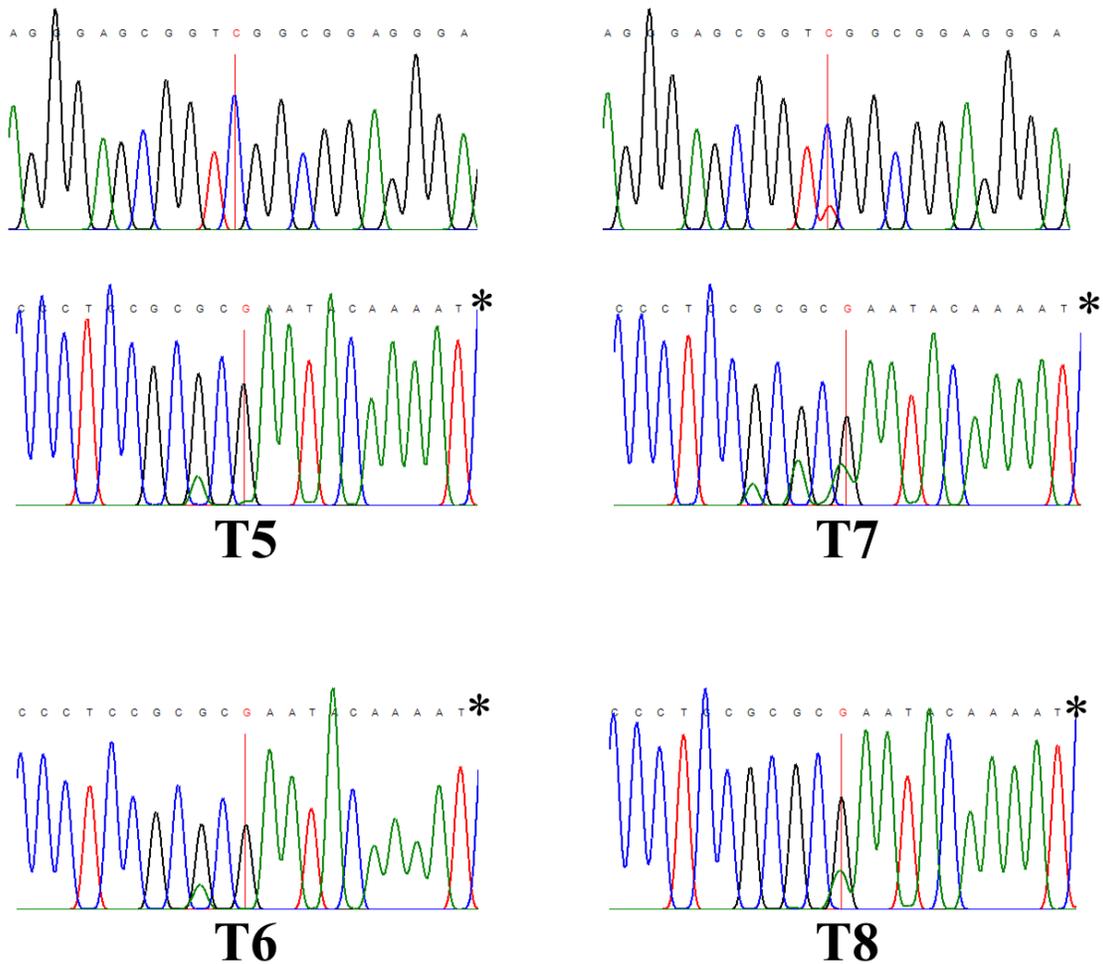
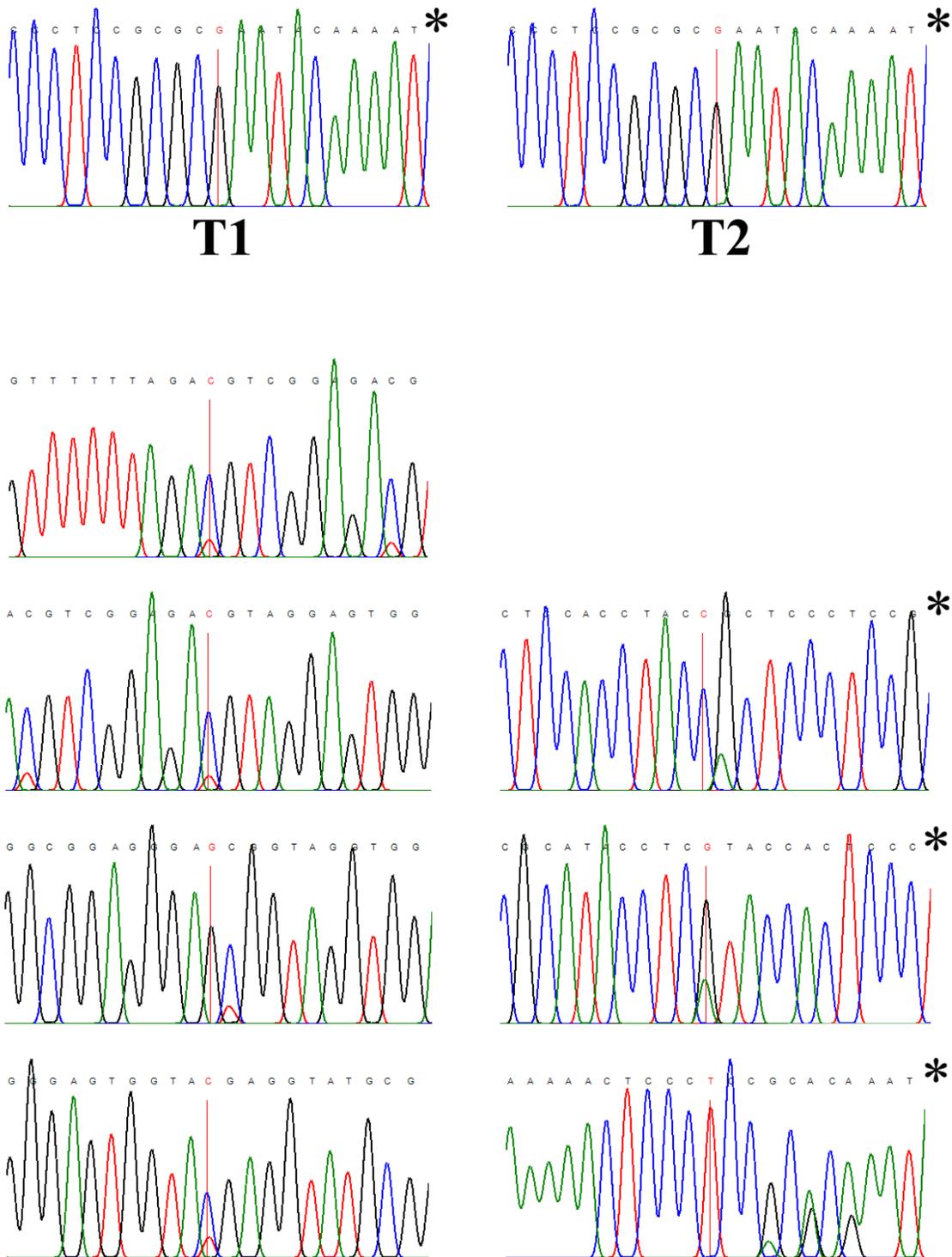


Abbildung 30: Elektropherogramm-Sequenzierungsdaten der NB-Tumorproben.

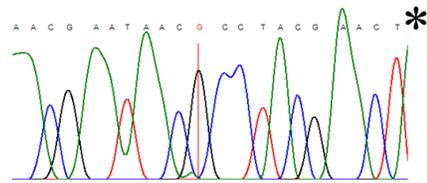
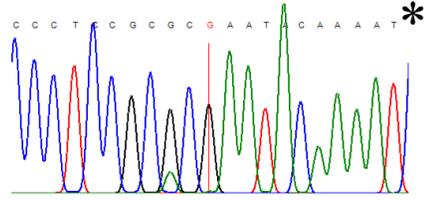
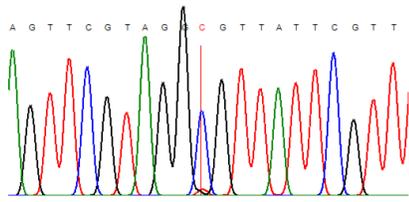
Elektropherogramme der Sequenzierungsbereiche, bei denen Hypomethylierungen entdeckt wurden. Elektropherogramme ohne Stern: Sequenzierung mit *forward* Primer; Elektropherogramme mit Stern: Sequenzierung mit *reverse* Primer.



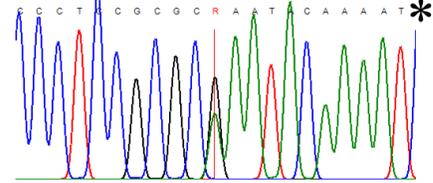
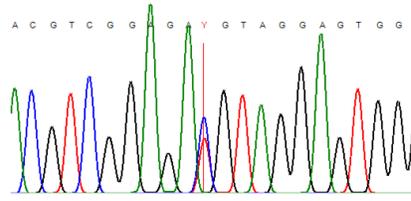
T3

Abbildung 31: Elektropherogramm-Sequenzierungsdaten der RMS-Tumorproben Teil 1.

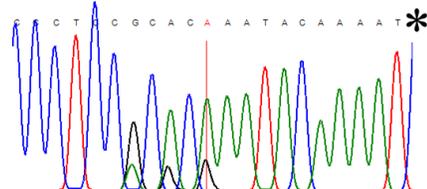
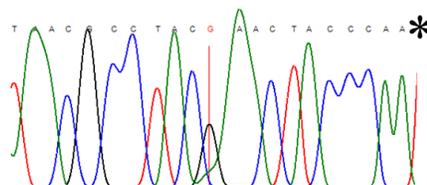
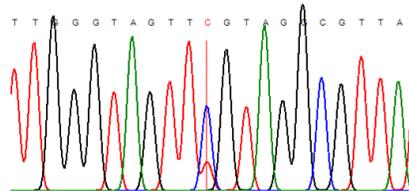
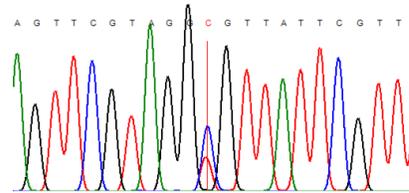
Elektropherogramme der Sequenzierungsbereiche, bei denen Hypomethylierungen entdeckt wurden. Elektropherogramme ohne Stern: Sequenzierung mit *forward* Primer; Elektropherogramme mit Stern: Sequenzierung mit *reverse* Primer.



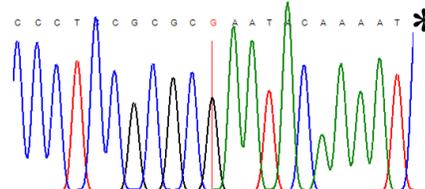
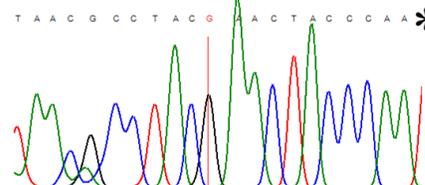
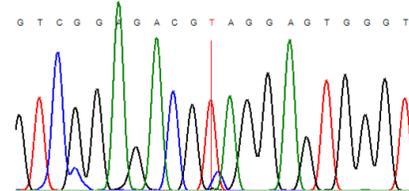
T5



T6



T7



T8

Abbildung 32: Elektropherogramm-Sequenzierungsdaten der RMS-Tumorproben Teil 2. Elektropherogramme der Sequenzierungsbereiche, bei denen Hypomethylierungen entdeckt wurden. Elektropherogramme ohne Stern: Sequenzierung mit *forward* Primer; Elektropherogramme mit Stern: Sequenzierung mit *reverse* Primer.

7.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verteilung von pädiatrischen Krebserkrankungen.....	6
Abbildung 2: Schematische Darstellung der DNaseX Funktion.....	16
Abbildung 3: Molekularstruktur von Disialdialgangliosid GD2.....	18
Abbildung 4: Überblick über die Funktionen von TKTL1 im PPP.	21
Abbildung 5: Überblick über verschiedene Materialien, die über <i>liquid biopsy</i> -Methoden genutzt werden können.	23
Abbildung 6: Prinzip der EDIM Technologie.....	27
Abbildung 7: Überblick über die Cytosin-Methylierung der DNA.	29
Abbildung 8: Isolierung von PBMCs aus <i>buffy-coats</i> über eine Biocoll-Dichtegradientenzentrifugation.....	41
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Phagocytoseassays.....	45
Abbildung 10: Anregungs- und Emissionsspektren der in dieser Arbeit verwendeten Fluorochrome.	47
Abbildung 11: EDIM- <i>gating</i> -Strategie.	50
Abbildung 12: Amplifikationsdiagramm einer <i>real-time</i> PCR.....	57
Abbildung 13: Reaktionsmechanismus der Bisulfit-Konversion.....	65
Abbildung 14: TKTL1- und Apo10- Expression in RMS-Zelllinien.....	72
Abbildung 15: TKTL1- und Apo10-Expression und Abundanz von GD2 in NB-Zelllinien.	74
Abbildung 16: TKTL1- und Apo10-Expression in Tumorproben von Patienten.	77
Abbildung 17: Durchflusszytometrische Analyse des TKTL1- und Apo10-EDIM-Tests.	81
Abbildung 18: <i>Scatterplots</i> der EDIM- <i>scores</i> von RMS- und NB-Patienten.....	82
Abbildung 19: Korrelation des EDIM- <i>scores</i> mit klinischen Parametern.....	84
Abbildung 20: Prä- und postoperativer Vergleich von EDIM- <i>scores</i> bei RMS- und NB-Patienten.	85
Abbildung 21: Vergleich der Abundanz von CD16 positiven Monozyten in RMS- und NB-Patienten und gesunden Blutspendern.....	87
Abbildung 22: Expression der untersuchten Tumormarker in MDMs.	89
Abbildung 23: GD2-positive MDMs nach Kokultur mit LAN-1-Zellen.....	92

Abbildung 24: Tumormarker-Abundanz in Makrophagen nach Kokultur von Blut mit Tumorzelllinien.	94
Abbildung 25: Abhängigkeit der TKTL1-mRNA-Expression vom DNA-Methylierungsgrad.	97
Abbildung 26: <i>In silico</i> Analyse zur Identifikation von CpG-Inseln im TKTL1-Promotor.	98
Abbildung 27: PCR-Produkt nach der <i>touchdown</i> -PCR.	99
Abbildung 28: Semi-quantitative Methylierungs-Analyse eines Promotorbereiches von TKTL1 in Tumorproben von RMS- und NB-Patienten	102
Abbildung 29: MethPrimer-Analyse des TKTL1-Promotors.	140
Abbildung 30: Elektropherogramm-Sequenzierungsdaten der NB-Tumorproben.	141
Abbildung 31: Elektropherogramm-Sequenzierungsdaten der RMS-Tumorproben Teil 1.	142
Abbildung 32: Elektropherogramm-Sequenzierungsdaten der RMS-Tumorproben Teil 2.	143

7.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: RMS-Subtypen klassifiziert nach histologischer Morphologie. Modifiziert nach [10].	2
Tabelle 2: Stadieneinteilung von Neuroblastomen nach Vorgaben des INSS.	12
Tabelle 3: In dieser Arbeit genutzte Verbrauchsmaterialien und sonstige Reagenzien.	33
Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendeten Geräte.	34
Tabelle 5: Verwendete Materialien für die Kultivierung von Zelllinien.	37
Tabelle 6: Zellkulturmedium für RMS-Zelllinien.	37
Tabelle 7: Zellkulturmedium für NB-Zelllinien.	37
Tabelle 8: Materialien Kryokonservierung.	38
Tabelle 9: Einfriermedium.	38
Tabelle 10: Eingesetzte Materialien zum Zellen zählen.	39
Tabelle 11: Eingesetzte Zellzahlen in den Experimenten.	40
Tabelle 12: Biocoll.	41
Tabelle 13: Differenzierungsmedium für Makrophagen.	42
Tabelle 14: Aktivierungsmedien für Makrophagen.	43
Tabelle 15: Verwendete Materialien Phagozytoseassay.	44
Tabelle 16: FACS-Instandhaltungs-Materialien.	47
Tabelle 17: Zusammenstellung aller Antikörper die für FACS-basierte Analysen eingesetzt wurden.	49
Tabelle 18: Zusammensetzung des AK-Mixes für den EDIM-Test.	51
Tabelle 19: Materialien für eine RNA-Extraktion.	51
Tabelle 20: Typische Reaktion einer PCR für Sequenzierungszwecken.	55
Tabelle 21: Thermocycler-Einstellungen für die PCR zu Sequenzierungszwecken.	55
Tabelle 22: Reaktionsansatz und Reaktionsbedingungen für eine rT.	59
Tabelle 23: Reaktionsansatz für die qPCR.	59
Tabelle 24: Thermocycler-Einstellungen für die TKTL1 qPCR.	59
Tabelle 25: Thermocycler-Einstellungen für die Apo10 qPCR.	60
Tabelle 26: Thermocycler-Einstellungen für die TD-PCR.	61
Tabelle 27: Reaktionsansatz für die TD-PCR.	61
Tabelle 28: In dieser Arbeit eingesetzte Primer.	61

Tabelle 29: Materialien zur Probenvorbereitung der AGE.	62
Tabelle 30: Puffer und Gel für die Agarose-Gelelektrophorese.....	63
Tabelle 31: Gel-Extraktions Kit.	63
Tabelle 32: BS-Konversions Kit.	65
Tabelle 33: Decitabin.	66
Tabelle 34: In dieser Arbeit verwendete Softwares.	70
Tabelle 35: Charakteristiken der RMS-Patienten und der gesunden Probanden in der TKTL1- und Apo10 EDIM-Untersuchung.	79
Tabelle 36: Charakteristiken der NB-Patienten der TKTL1 und Apo10 EDIM-Untersuchung, sowie die Charakteristiken der gesunden Probanden der GD2 EDIM-Untersuchung.	80
Tabelle 37: Zusammenfassung der Ergebnisse der Tumor-Gewebeproben für die BS-Sequenzierung.	100

7.4. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung
5-Aza-dC	5-Aza-2'-desoxycytidin
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> , Varianzanalyse
aRMS	Alveoläres RMS
bp	Basenpaare
BS	Bisulfit
CAR	Chimärer Antigen Rezeptor
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> , Unterscheidungsgruppen
CGI	CpG-Insel
CT	Computertomographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukelinsäure
EDIM	Epitop Detektion in Monozyten
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eRMS	Embryonales RMS
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Scanning</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> , Fetales Kälberserum
FDG	2-Fluor-2-desoxy-D-glucose
Fibros	Fibroblasten
fnRMS	Fusions-negative RMS
fpRMS	Fusions-positive RMS
FWD	<i>Forward</i> , Vorwärts
GSL	Glycosphingolipide
HMA	Homovanillinmandelsäure
IKET	Institut für klinische und experimentelle Transfusionsmedizin
INPC	International Neuroblastoma Pathology Classification
INRG	International Neuroblastoma Risk Group
INSS	International Neuroblastoma Staging System
kDa	Kilo Dalton
KM-MRT	Kontrastmittel-Magnetresonanztomographie
LOH	<i>Loss of Heterozygosity</i> , Verlust der Heterozygotie
LPS	Lipopolysaccharid
M-CSF	<i>Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>
MDM	<i>Monocyte Derived Macrophages</i> , Monozyten-abgeleiteten Makrophage
miRNA	<i>Micro RNA</i> , Mikro-RNA
MΦ	Makrophagen
Mono	Monozyten

mRNA	<i>Messenger RNA</i> , Boten-RNA
mSCs	Mesenchymale Stammzellen
NB	Neuroblastom
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> , Periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerease-Kettenreaktion
PET	Positronenemissionstomographie
PPP	Pentosephosphatweg
qPCR	Quantitative PCR
REV	<i>Reverse</i> , Revers
RMS	Rhabdomyosarkom
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raum Temperatur
s.	siehe
SkMC	<i>Skeletal Muscle Cell</i> , Skelett Muskelzellen
St.	Stadium
Tab.	Tabelle
TB	Trypanblau
TD-PCR	<i>touchdown</i> PCR
TKTL1	Transketolase-like 1
TNM	Tumor, Nodus, Metastasen
TSS	Transkriptionsstart
TX	Tumorprobe Nummer X
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i> , Internationale Vereinigung gegen Krebs
vgl.	Vergleiche
VMA	Vanillinmandelsäure
VP-16	Etoposid
WHO	<i>World Health Organization</i> , Weltgesundheitsorganisation

7.5. Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater und Erstgutachter Prof. Dr. Warmann und bei Prof. Dr. Fuchs bedanken, dass sie mir die Möglichkeit und die Mittel zur Verfügung gestellt haben, meine Dissertation im Labor der Kinderchirurgie durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Rieß für die Übernahme des Zweitgutachtens und der inspirierenden Diskussion über mein Thema.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. Handgretinger für das Interesse und die Diskussionen in Bezug auf meine Doktorarbeit bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Evi Schmid, die den Grundstein für mein Projekt legte, mir unter ihrer Anleitung die Möglichkeit gegeben hat meine Dissertation durchzuführen, für die gute Betreuung während meiner Dissertation, die Planung des Projektes und die damit verbundenen Diskussionen. Außerdem danke ich ihr ganz herzlich für die Korrektur meiner Thesis und die großartige Unterstützung in jeder Situation.

Dr. Oliver Feyen und der Tavarlin AG danke ich ganz besonders für die großartige Zusammenarbeit, den Methodentransfer des EDIM-Tests, das Einlernen in die Mehrfarbige Durchflusszytometrie, die anregenden Diskussionen und die Bereitstellung von Antikörpern für mein Projekt.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Bettina Kirchner, Melanie Hauth und Julia Wenz für die großartige technische und seelische Unterstützung im Labor bedanken, aber auch für alle weiteren Hilfestellungen, für das Erlernen der Zellkulturmethoden und für die tolle Zeit während meiner Doktor Arbeit.

Mein Dank gilt ebenfalls der Abteilung für Kinderchirurgie und -urologie für die Unterstützung der EDIM-Studie und die Bereitstellung der Blutproben und des Gewebematerials für mein Projekt.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Schulze-Hentrich für die Hilfestellungen und Vorschläge der Auswertung für die DNA-Methylierungs-Experimente.

Ich danke ebenfalls dem Hormonlabor der Kinderklinik für die Hilfestellungen während meiner Doktorarbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei den Medizindoktoranden Stephan, Yannick, Anni, Lucas, Christine, Anna und Hannes für die großartige Zusammenarbeit und die gute Zeit bedanken.

Und zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Verlobten Janis, für die seelische und moralische Unterstützung, das Durchlesen und Korrigieren meiner Arbeit und für die vielen Diskussionen und Anregungen bedanken. Und dafür, dass sie immer an mich geglaubt hat und immer für mich da war.

Auch meiner Familie möchte ich herzlich danken, die immer hinter mir standen, mich stets unterstützt und mir immer zugehört hat, wenn ich etwas brauchte. Vor allem bei meiner Mutter möchte ich mich ganz besonders für alles bedanken was mich bis hin zu dem Abschluss dieser Arbeit gebracht hat.