

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin  
des Universitätsklinikums Halle (Saale)  
(Direktor: Professor Dr. med. Dieter Körholz)

## **Charakterisierung Ewingtumor-assoziiertes *Cancer-Testis*-Antigens**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Dorothea Elisabeth Mahlendorf, geb. Große,  
geboren am 12. März 1981 in Berlin

Betreuer: PD Dr. rer. nat., rer. medic. habil. Martin S. Staeger  
Gutachter: PD Dr. med. Malte Kornhuber, Prof. Dr. med. Michael Paulussen, PD Dr. rer. nat.,  
rer. medic. habil. Martin S. Staeger

Eröffnungsdatum des Promotionsverfahrens: 01.11.2011

Verteidigungsdatum: 11.10.2012

## Referat

Die Prognose für Patienten mit Ewingtumor konnte trotz deutlicher Fortschritte in den letzten Jahren bisher nicht ausreichend verbessert werden. Neben konventionellen Therapiestrategien werden deshalb neue Ansätze im Bereich der Immuntherapie gesucht. Kritisch ist dabei insbesondere das Auffinden Ewingtumor-spezifischer Antigene, mit deren Hilfe eine Ewingtumor-spezifische Immunantwort induziert werden könnte.

*Cancer-Testis*-Antigene (CTA) werden normalerweise ausschließlich in Keimzellen, embryonalem Gewebe und Stammzellen exprimiert. In verschiedenen Malignomen kommt es jedoch zu einer aberranten Expression von CTA. Aufgrund der selektiven Expression weisen CTA oft immunogene Eigenschaften auf und induzieren teilweise spontane Immunantworten bei Krebspatienten. Deshalb eignen sie sich womöglich als Zielstrukturen für die Immuntherapie. Um neue Ewingtumor-assoziierte CTA identifizieren zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit öffentlich zugängliche Microarray-Datensätze analysiert. Aufgrund des hieraus resultierenden charakteristischen CTA-Expressionsmusters (Hoden und Tumor) und eines weiteren Datenbank-Screenings konnten zahlreiche Gene hier erstmals als neue CTA-Kandidaten benannt werden. Die Ergebnisse umfassen zudem einige schon bekannte CTA, deren Expression hier erstmals auch im Ewingtumor beschrieben wurde. Des Weiteren wurde der Einfluss der Ewingtumor-spezifischen aberranten Transkriptionsfaktoren EWS-ERG und EWS-FLI1 auf die Expression von CTA in öffentlich zugänglichen Datensätzen transgener mesenchymaler Stammzellen untersucht. Dabei erwiesen sich einige der bekannten CTA und einige der neuen hier erstmals benannten CTA-Kandidaten in Microarray-Analysen als Zielgene von EWS-ERG oder EWS-FLI1, was sie zu noch interessanteren Zielstrukturen der Immuntherapie machen könnte. Aufgrund der hohen Spezifität des CTA Lipase I für den Ewingtumor wurden gegen dieses CTA gerichtete zytotoxische T-Zellen (CTL) induziert, die zur Lyse von Zellen der Ewingtumorzelllinie A673 fähig waren. Es konnten für zwei Peptid-Epitope aus Lipase I spezifische CTL *in vitro* generiert werden. Diese T-Zell-Epitope der Lipase I könnten in der klinischen Immuntherapie anwendbar sein.

## Inhaltsverzeichnis

Referat.....	I
Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	III
1 Einleitung.....	1
Zielsetzung der Arbeit.....	7
2 Material und Methoden.....	8
2.1 Reagenzien.....	8
2.2 Zelllinien.....	9
2.3 Geräte.....	9
2.4 Software.....	9
2.5 Datenbanken.....	10
2.6 Microarray-Expressionsdatensätze.....	10
2.7 Zellbiologische Methoden zur Generierung ESFT-spezifischer CTL.....	11
2.7.1 Zellkulturbedingungen für Tumorzellen.....	11
2.7.2 Bestimmung der Zellzahl.....	11
2.7.3 Herstellung von SK-N-MC-Lysat und A673-Lysat.....	11
2.7.4 Peptide.....	12
2.7.5 Aufarbeitung von PBMC.....	12
2.7.6 Gewinnung naiver CD8-angereicherter PBMC.....	12
2.7.7 Epstein-Barr-Virus immortalisierte LCL.....	13
2.7.8 Generation Dendritischer Zellen und primäre Stimulation naiver CD8+ver Zellen.....	13
2.7.9 Phänotypische Charakterisierung Dendritischer Zellen.....	14
2.7.10 Restimulation der geprimten T-Zellen.....	15
2.7.11 Charakterisierung der zytotoxischen T-Zellen (CTL).....	15
2.7.12 IFN $\gamma$ -Elispot assay.....	16
2.7.13 Laktatdehydrogenaseassay zur Messung der Zytotoxizität.....	16
2.8 Bioinformatische Methoden.....	17
2.8.1 Identifizierung CTA-spezifischer Expressionsprofile.....	17
2.8.2 Expressionsanalyse von EWS-ETS transgenen Mesenchymalen Stammzellen (MSC).....	19
3 Ergebnisse.....	20
3.1 Bioinformatische Analyse der CTA-Expression in ESFT.....	20
3.1.1 Identifikation potentieller CTA in ESFT.....	20
3.1.2 Expressionsanalyse EWS-ETS transgener MSC.....	25
3.2 Generierung ESFT-spezifischer CTL.....	25

3.2.1	Phänotypische Identifizierung von DC.....	25
3.2.2	Phänotypische Charakterisierung der stimulierten T-Zellen.....	26
3.2.3	IFN $\gamma$ -Elispot assay.....	28
3.2.4	Nachweis der Zell-mediierten Zytotoxizität im Laktatdehydrogenaseassay (LDH assay).....	30
4	Diskussion.....	32
4.1	Microarrays.....	32
4.2	CTA in der Onkogenese und Gametogenese.....	34
4.3	Bekannte und potentielle CTA im ESFT.....	35
4.3.1	Für das Überleben von Tumorzellen essentielle Signalwege von CTA.....	36
4.3.2	NROB1 (DAX1).....	36
4.3.3	EZH2.....	37
4.3.4	CENPE und andere neue CTA mit wichtigen Funktionen in Malignomen.....	37
4.3.5	Beschriebene Immunantworten gegen CTA.....	38
4.3.6	EWS-FLI1-Induktion von CTA.....	39
4.4	Das Ewingtumor-spezifische <i>Cancer-Testis</i> -Antigen LIPI.....	40
4.4.1	Immunantwort durch Lipase I (LIPI)-T-Zell-Epitope versus Cyclin D1 (CCND1)-T-Zell-Epitope versus Tumorzell-Lysat.....	42
4.4.2	Lysat versus Peptid versus Protein.....	44
4.4.3	Dendritische Zellen.....	46
4.4.4	Klinische Effektivität von Immuntherapien.....	47
5	Zusammenfassung.....	48
6	Literaturverzeichnis.....	51
7	Anhang.....	59
8	Thesen.....	80

Lebenslauf

Selbständigkeitserklärung

Danksagung

## Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen präsentierende Zellen
CCND1	Cyclin D1
CD	<i>Cluster of differentiation</i> , Differenzierungsantigen
CD34+HSC	CD34+ hämatopoetische Stammzellen
CENPE	<i>Centromere protein E</i>
CTA	<i>Cancer-Testis</i> -Antigene
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
DC	Dendritische Zellen
DC1	Typ-1-Immunantwort-polarisierende DC
ELISPOT	<i>Enzyme-linked immuno spot assay</i>
EZH2	<i>Enhancer of zeste homolog 2</i>
ERG	<i>V-ets related gene</i>
ESC	Embryonale Stammzellen
ESFT	<i>Ewing sarcoma family tumor</i>
ETS	<i>E-twenty six</i>
ETV1	<i>Ets variant 1</i>
ETV4	<i>Ets variant 4</i>
Euro-E.W.I.N.G.	<i>European Ewing tumour working initiative of national groups</i>
EWS	<i>Ewing sarcoma breakpoint region 1</i>
FACScan	<i>Fluorescence-activated cell scanning</i> , Durchflusszytometrie
FCS	Fetales Kälberserum
FDR	<i>False discovery rate</i>
FEV	<i>Fifth Ewing variant protein</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FLI1	<i>Friend leukemia virus integration 1</i>
FSC	<i>Foreward scatter</i>
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
HLA-A2+	Humanes Leukozytenantigen Klasse I, A2 positiv
HMEC	Humane mikrovaskuläre Endothelzellen
HUVEC	Humane Umbilikalvenen-Endothelzellen
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
IL	Interleukin
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie
LDH	Laktatdehydrogenase
LDY	LDYTDAKFV, Peptid aus Lipase I

LIP1	Lipase I, alias membranassoziierte Phospholipase A1 $\beta$
LLG	LLGATCMFV, Peptid aus Cyclin D1
LPA	Lysophosphatidsäure
LPAR	LPA-Rezeptor
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	<i>Magnetic cell sorting</i>
MDC1	<i>Mediator of DNA damage checkpoint 1</i>
MPC	Mesenchymale Progenitorzellen
MRD	<i>Minimal residual disease</i>
MSC	Mesenchymale Stammzellen
NANOG	<i>Homeobox transcription factor Nanog</i>
NBA	<i>Normal body atlas</i>
NLL	NLLKHGASL, Peptid aus Lipase I
Non-X-CTA	Auf autosomalen Chromosomen kodierte CTA
NR0B1	<i>Nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1</i>
OLQ	Oberer linker Quadrant
ORQ	Oberer rechter Quadrant
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
PE	Phycoerythrin
RLT	RLTRFLSRV, Peptid aus Cyclin D1
RT-PCR	<i>Real time polymerase chain reaction</i>
SAM	<i>Significance analysis of microarrays</i>
SEREX	<i>Serological analysis of recombinant cDNA expression libraries</i>
SLS	SLSVHIKNC, Peptid aus Lipase I
SSC	<i>Sideward scatter</i>
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TEX15	<i>Testis expressed 15</i>
TLR	<i>Toll like receptor</i>
ULQ	Unterer linker Quadrant
URQ	Unterer rechter Quadrant
VAC	Vincristin, Actinomycin D und Cyclofosamid
VAI	Vincristin, Actinomycin D und Ifosamid
VIDE	Vincristin, Ifosamide, Doxorubicin und Etoposid
XAGE1	<i>X antigen family, member 1</i>
X-CTA	Auf dem X-Chromosom kodierte CTA

## 1 Einleitung

Ewingtumore, auch als *Ewing sarcoma family tumors* (ESFT) bezeichnet, sind die zweithäufigsten soliden Malignome des Knochens und des Weichteilgewebes in Kindheit und Adoleszenz mit einem Häufigkeitsgipfel zwischen 5 und 15 Jahren. Die Inzidenz von ESFT beträgt ca. 0,6 Neuerkrankungen pro 1 Million Einwohner und Jahr (Paulussen et al. 1998). ESFT manifestieren sich bevorzugt am wachsenden Skelett im Bereich der Diaphysen langer Röhrenknochen oder des Beckens. Das männliche Geschlecht ist mit 56 % häufiger betroffen als das weibliche Geschlecht. Zu den ESFT gehören das Ewing-Sarkom, der periphere primitive neuroektodermale Tumor und der Askin-Tumor, ein Ewingsarkom der Rippe. ESFT gehören zu der histologisch schwer unterscheidbaren Gruppe der undifferenzierten, kleinen, blauzelligen Tumore. Hierzu werden aufgrund der gemeinsamen histologischen Kriterien auch das Rhabdomyosarkom, das Neuroblastom und Lymphome gezählt. Molekularbiologisch sind ESFT über die Expression eines chimären *Ewing sarcoma breakpoint region 1* (EWS)-*E-twenty six* (ETS)-Fusionsproteins definiert. Dieses entsteht durch eine reziproke Chromosomentranslokation und bildet einen aberranten Transkriptionsfaktor. EWS ist ein ubiquitär exprimiertes Gen, wohingegen Gene der ETS-Familie, wie *Friend leukemia virus integration 1* (FLI1) oder *v-ets related gene* (ERG), nur sehr selektiv exprimiert werden. Wildtyp-FLI1 wird während der Embryogenese und Hämatopoese exprimiert (Truong und Ben-David 2000). FLI1 ist bei Vögeln sehr selektiv während der Entwicklung von Zellen der Neuralleiste zu Mesenchymzellen exprimiert (Mager et al. 1998). Ein ESFT-spezifisches Gen-Expressionsprofil, im Vergleich zu zahlreichen Normalgeweben (Staege et al. 2004a) durch Microarray-Technik analysiert, bestätigte auf molekularer Ebene die Ähnlichkeit der ESFT-Stammzelle zu der Neuralleiste sowie die Ähnlichkeit zu Endothelzellen und Mesenchym. EWS (Chromosom 22q12) kodiert für ein Protein, das Genexpression, zelluläre Signalwege und RNA-Prozessierung und -Transport reguliert. Die N-terminale Region umfasst eine Transkriptions-Aktivierungs-Domäne. Die Gene der ETS-Genfamilie kodieren Transkriptionsfaktoren. Das chimäre Protein ist zusammengesetzt aus der N-terminalen Transkriptions-Aktivierungs-Domäne von EWS fusioniert mit der C-terminalen DNA-Bindungsdomäne eines Transkriptionsfaktors der ETS-Genfamilie. Die beteiligten Gene der ETS-Genfamilie liegen meist auf Chromosom 11p24 für das Gen FLI1 oder auf Chromosom 21q22 für das Gen ERG. EWS-FLI-1 kommt in 85 % aller Ewingtumore vor (Arvand und Denny 2001), sodass die Translokation t(11;22)(q24;q12) am häufigsten vorkommt. In den anderen Ewingtumoren findet man Fusionspartner, die Mitglieder aus der ETS-Genfamilie darstellen und ERG (10 %), *Ets variant 1* (ETV1), *Ets variant 4* (ETV4) oder *Fifth Ewing variant protein* (FEV) sein können (Riggi et al. 2008). Alternatives Splicing der Fusionsgene führt zu unterschiedlichen Transkriptionsvarianten mit Heterogenität in der Fusions-RNA und Protein-Architektur. Die prospektive klinische Studie *European Ewing tumour working initiative of*

*national groups* (Euro-E.W.I.N.G.) 1999 ergab keine Hinweise dafür, dass prognostische Unterschiede mit verschiedenen EWS-FLI1-Fusionsproteinen einhergehen. Es konnte kein prognostischer Nachteil für nicht-Typ-1-EWS-FLI1-Fusionen bei lokalisiertem ESFT (van Doorninck et al. 2010) gefunden werden.

EWS-ETS-Fusions-Gene kodieren einen das Tumorwachstum und die maligne Transformation beeinflussenden aberranten Transkriptionsfaktor. EWS-FLI1 reguliert vorwiegend solche Gene, die den Zellzyklus antreiben oder einen undifferenzierten Phänotyp aufrechterhalten (Kauer et al. 2009). EWS-ETS-Fusionsgene sind oftmals die einzige genetische Aberration, die im ESFT detektiert werden kann. Deshalb wird davon ausgegangen, dass EWS-ETS Transkriptionsfaktoren hauptverantwortlich für die maligne Transformation und den hoch aggressiven Phänotyp sind (Kovar 2003). Die EWS-ETS-Fusionsproteine oder direkte Zielgene von EWS-ETS werden deshalb als potentielle therapeutische Zielstrukturen angesehen und in dieser Arbeit wird u. a. der Einfluss von EWS-FLI1 und EWS-ERG auf die Expression von *Cancer-Testis*-Antigenen (CTA) and Datensätzen von Mesenchymalen Stammzellen (MSC) untersucht. CTA sind allein aufgrund ihrer restringierten Expression in Hoden und Tumorgewebe schon interessante therapeutische Zielstrukturen. Wäre ein CTA erwiesenes Zielgen von EWS-ETS, würde das ein betreffendes CTA zu einem noch vielversprechenderen Angriffspunkt in der Immuntherapie machen.

Eine weitere Eigenschaft und zugleich Differenzierungsmöglichkeit von ESFT-Zellen besteht in einer hohen Expression von MIC2 (*monoclonal, Imperial Cancer Research Fund, 2*)/*Cluster of differentiation 99* (CD99), was in der Diagnosestellung genutzt wird.

Um die Diagnose des Ewingtumors weiterhin zu bestätigen und die molekulare Unterscheidung zwischen den kleinen, blauzelligen Tumoren zu erleichtern, können auch DNA-Microarrays, allerdings nicht routinemäßig in der klinischen Praxis, eingesetzt werden (Wai et al. 2002; Staeger et al. 2003b). So erstellten Staeger und Mitarbeiter (Staeger et al. 2004b) mittels Microarray-Analysen ein ESFT-spezifisches Genexpressionsprofil, das auch mittels quantitativer und konventioneller *Real Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) in den ESFT nachweisbar war. Auch Baird et al. 2005 ermittelten durch Microarray-Analysen spezifische Unterschiede in den Expressionsmustern verschiedener Sarkome. Durch Microarray-Technik ermittelte Genexpressionsprofile stellen neue diagnostische, prognostische und therapeutische Ansatzpunkte dar und gewähren Einblicke in die Molekularbiologie der Tumorzellen. Vorteil der DNA-Microarray-Analysen ist der mögliche Vergleich des gesamten Gen-Expressionsprofils zahlreicher Tumorproben und ebenso zahlreicher Vergleichsgewebe in einem einzigen Experiment (Staeger et al. 2003). Durch DNA-Microarrays können jedoch nur normale zelluläre Transkripte erfasst werden. Tumorspezifische Transkripte, die durch Punktmutationen oder durch Translokation entstanden sind, entgehen dieser Technik. Mit Microarray-Analysen lassen sich jedoch die Gene mit exklusiver Expression in den Tumorproben erfassen, die keine oder



nur geringfügige Expression in Normalgeweben haben. Diesen Eigenschaften wird die Gruppe der *Cancer-Testis*-Antigene (CTA) gerecht, die neue Diagnose- und Therapieoptionen durch ihre selektive Expression in den immunprivilegierten Keim- und Tumorzellen eröffnen. In der vorliegenden Arbeit wird deshalb mittels der Microarray-Methode nach bekannten und möglichen neuen CTA im ESFT gesucht.

Über die Hälfte der Patienten mit lokalisierter Manifestation der Erkrankung des ESFT kann mit konventionellen, multimodalen Therapieregimen geheilt werden, bestehend aus chirurgischer Resektion, Strahlentherapie bis zu 55 Gy und adjuvanter und neoadjuvanter Hochdosis-Chemotherapie. Nach dem Protokoll der klinischen Phase 3 Studie EURO-E.W.I.N.G. 08, nachzulesen auf der Homepage der Kinderkrebsinfo (Dobke 2010) erhalten zunächst alle Patienten 6 Zyklen Vincristin, Ifosfamide, Doxorubicin und Etoposid (VIDE) als Induktionstherapie, wie schon bei der Vorgängerstudie EURO-E.W.I.N.G. 99. Darauf folgt die Lokaltherapie, vorzugsweise Operation mit neoadjuvanter und/oder adjuvanter Radiotherapie, abhängig von der Operabilität bzw. Radikalität der Operation und dem histologischen Ansprechen auf die Chemotherapie. Anschließend wird die Behandlung weiter risikoadaptiert durchgeführt, wobei besonders Alter, Volumen und die Ausbreitung von Metastasen relevant sind (Ladenstein et al. 2010), aber auch das Ansprechen auf die initiale Chemotherapie. Patienten mit lokalisiertem Tumorbefall und günstigem Risikoprofil erhalten nach der bisher genannten Therapie laut EURO-E.W.I.N.G. 08 acht Kurse Vincristin, Actinomycin D und Cyclofosfamid (VAC für weibliche Patienten) oder Vincristin, Actinomycin D und Ifosfamid (VAI für männliche Patienten). Randomisiert erfolgt zusätzlich eine vierwöchige Therapie mit Fenretinid und/oder Zoledronat oder keiner dieser beiden Substanzen. Bei schlechtem Tumoransprechen oder initial pulmonaler Metastasierung erhalten die Patienten randomisiert 8 Zyklen VAI oder Melphalan und Busulfan als Hochdosischemotherapie mit anschließender autologer Stammzellretransfusion. Patienten mit primären Knochenmetastasen erhalten randomisiert entweder 8 Kurse VAC oder Hochdosis-Chemotherapie mit Treosulfan und Melphalan gefolgt von autologer Stammzellreinfusion und anschließend 8 Kursen VAC-Chemotherapie. Eine allogene Stammzelltransplantation in der Konsolidierungsphase bei fortgeschrittenen Ewingtumoren verbessert die Rezidivfreiheit nicht und geht mit hohen Komplikationen einher (Burdach et al. 2000). Eine autologe Stammzelltransplantation hingegen scheint die Überlebensrate zu verbessern (Al-Faris et al. 2007). Der Ewingtumor metastasiert hämatogen vorwiegend in die Lunge und in das Skelett, wobei Patienten mit multifokalen Knochen- oder Knochenmarksmetastasen eine schlechtere Prognose haben als solche mit Lungenmetastasen. Patienten mit zirkulierenden Tumorzellen oder Knochenmarksmikrometastasen haben im Rahmen einer *Minimal residual disease* (MRD) bei lokalisiertem Primärtumor das gleiche *Outcome* wie Patienten mit Metastasierung (Schleiermacher et al. 2003). Distale Tumoren sind meist kleiner und besser operabel, weshalb sie mit einer besseren Prognose einhergehen als proximale Tumoren. Eine schlechtere Prognose

haben auch Patienten mit einem Rezidiv innerhalb der ersten 2 Jahre (Burdach und Jürgens 2002). In 40 % der Fälle verläuft die Erkrankung letal bei lokalisierten Ewingtumoren mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 55 % bis 65 %. Bei primär metastasierten Tumoren sinkt diese auf 25 % (Laurence et al. 2005). Noch nach 5 Jahren kann es zum Auftreten eines Rezidivs kommen, was das Vorhandensein einer MRD nahelegt und auf die Existenz von Tumorstammzellen hindeutet. Bei Patienten die als rezidivfrei gelten, besteht nach einer Hochdosis-Chemotherapie die Gefahr von Zweitneoplasien. Somit lassen sich insgesamt bisher für Patienten mit ESFT besonders im metastasierten Erkrankungsstadium keine befriedigenden Resultate erzielen. Neue Therapieansätze bestehen in verschiedenen Formen der Immuntherapie oder der gezielten Regulation von EWS-FLI1 oder entsprechender Zielgene mit *Antisense-Technologien*, RNA-Interferenz oder Ribozymen (Maksimenko et al. 2003; Toub et al. 2006; Richter et al. 2009). Es verdichten sich die Anhaltspunkte dafür, dass auch einer effektiven Immunantwort eine wichtige Rolle bei Patienten mit ESFT zukommt. Malignome besitzen die Fähigkeit, eine Antitumor-Immunantwort aktiv herabzuregulieren und eine Toleranz gegenüber Tumor-assoziierten Antigenen (TAA) zu schaffen (Zou 2005). Regulatorische T-Zellen könnten aktiv die Funktion von Dendritischen Zellen (DC) suprimieren (Rosenberg et al. 2004). Ein aktives Durchbrechen von Immuntoleranz gegenüber neoplastischen Zellen erscheint deshalb auch ein möglicher Ansatzpunkt in der Therapie des ESFT zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass mit Interleukin (IL)-15 stimulierte Natürliche Killerzellen (NK) gesunder Spender ESFT-Zelllinien lysieren konnten (Verhoeven et al. 2008). Auch transgene IL-2 freisetzende ESFT-Zelllinien könnten als allogene Vakzine zum Einsatz kommen (Staege et al. 2003a). Immunstimulatorisch wirken auch *hypoxanthine/aminopterin/thymidine*-sensitive ESFT-Zellen auf gemischte Lymphozyten-Tumorzell-Kulturen, wobei diese ESFT-Zellen auch direkt mit DC fusioniert werden können (Pfeifle et al. 2009). Es konnte gezeigt werden, dass IL-2-transgene ESFT-Zellen zytolytische Effektorzellen rekrutieren (Staege et al. 2004a). Es gibt verschiedene klinische Studien, die die partielle Effektivität einer Therapie mit DC, die mit ESFT-spezifischen Antigenen beladen sind, nahelegen und zudem die Sicherheit dieser Therapie unterstreichen (Geiger et al. 2001; Guo et al. 2008; Suminoe et al. 2009). Eine Klasse von ESFT-spezifischen Antigenen, die in der Immuntherapie mit DC eingesetzt werden, bilden die CTA. Physiologisch exprimiert werden CTA ausschließlich oder vorwiegend in immunprivilegierten Geweben wie Hoden, Ovar, Plazenta (Simpson et al. 2005), Gehirn (Hofmann et al. 2008), Stammzellen oder während der Embryogenese (Costa et al. 2007). Sie haben keine oder eine sehr geringe Expression in anderen Normalgeweben, wobei eine sehr geringe Expression wahrscheinlich nicht zu immunologisch signifikanten Proteinleveln führt. CTA als immuntherapeutische Zielstruktur scheinen für die Onkogenese, das Überleben und die Proliferation der Tumorzellen elementar zu sein (Simpson et al. 2005). Dafür sprechen die selektive Expression von CTA in Keim- und Stammzellen sowie die Expression von X-chromosomal kodierten CTA (X-CTA) in Tumorstammzellen, die für

das Überleben des ESFT essentiell sind (Suva et al. 2009), aber auch die Funktion einiger CTA für die Regulation von Genexpression und Förderung von Zellproliferation (Simpson et al. 2005). Weiterhin wurde beschrieben, dass eine CTA-Expression einen direkten Einfluss auf die Sensibilität der Zelle gegenüber zytotoxischen Angriffen ausübt (Simpson et al. 2005). Eine aktuelle Datenbank des Ludwig-Instituts für Krebsforschung in Zusammenarbeit mit dem *Laboratório Nacional de Computação Científica* (Petrópolis, Brasilien), in der bekannte CTA (Almeida et al. 2009) aufgeführt werden, umfasst derzeit 136 CTA, davon 30 X-CTA. Die X-CTA sind häufig *multicopy*-Gene mit chromosomalen Clustern auf dem X-Chromosom. Sie sind überwiegend in mitotisch proliferierenden Spermato gonien exprimiert (Caballero und Chen 2009). Nicht auf dem X-Chromosom kodierte CTA (Non-X-CTA) treten meist als *singlecopy*-Gene in Erscheinung, sind über das gesamte Genom verteilt und können typischerweise Funktionen während der Meiose in Spermatozyten erfüllen (Simpson et al. 2005).

Die Expression von CTA variiert zwischen den verschiedenen Malignomen sehr stark. Jedoch ist zu beobachten, dass wenig differenziertes, hochgradig neoplastisches Gewebe und späte Erkrankungsstadien sehr häufig mehrere CTA simultan exprimieren. Eine hochfrequente Expression von CTA geht dabei mit einem schlechteren *Outcome* einher (Caballero und Chen 2009). Für die Gruppe der ESFT sind bisher in der Literatur die Expression von den CTA Lipase I, alias membranassoziierte Phospholipase A1  $\beta$ , alias *Lipase member 1* (LIPI), *Testis expressed 15* (TEX15) (Foell et al. 2008) *X-antigen family member 1* (XAGE1) (Liu et al. 2000) und *New York esophageal squamous cell carcinoma 1/cancer-testis antigen 1* (NY-ESO-1/CTAG1) (Schaefer et al. 2008) beschrieben. LIPI ist ein für den ESFT hochspezifisch exprimiertes CTA (Foell et al. 2008). Es besitzt wegen seiner beschriebenen molekularbiologischen Eigenschaften möglicherweise eine wichtige Funktion für die Pathophysiologie des ESFT. LIPI könnte die Angiogenese fördern und eine Motilitätserhöhung von Tumorzellen und eine Permeabilitätserhöhung von Endothelzellen bewirken (Mills und Moolenaar 2003; Moolenaar et al. 2004) und zur Ausbildung eines aggressiven Phänotyps mit erhöhter Metastasierungs-fähigkeit beitragen. Deshalb wurde für LIPI in dieser Arbeit die Induzierbarkeit einer zellulären Immunantwort im ESFT untersucht, indem DC mit T-Zell-Epitopen aus LIPI beladen wurden.

Für einige CTA ist die Induktion humoraler und zellulärer Immunantworten bei einer Tumorerkrankung beschrieben, beispielsweise für die bekannten CTA XAGE1 (Kikuchi et al. 2008; Zhou et al. 2008), SSX2 (Scanlan et al. 2004) und PRAME (Quintarelli et al. 2008). Weitere CTA wurden mit der Methode der *serological analysis of recombinant cDNA expression libraries* (SEREX) identifiziert und induzieren spontane humorale Immunantworten bei einer Krebserkrankung, u. a. SSX4, NY-ESO-1, SCP1, CT7, NY-SAR-35/FMR1NB, OY-TES-1, SLCO6A1, PASD1, CAGE-1 und KK-LC-1/CXorf61 (Caballero und Chen 2009). SEREX besteht in einem Immunscreening von cDNA-Datenbanken mit autologem Patientenserum. Für

MAGE-A3 wird derzeit eine klinische Phase-3-Studie durchgeführt, und klinische Studien gibt es auch für NY-ESO-1. Beide Studien zeigen ein verbessertes, rezidivfreies Überleben durch die spezifisch gegen CTA gerichtete Immuntherapie bei Patienten mit MRD (Caballero und Chen 2009).

Es existieren vielfache Bestrebungen Dendritische Zellen (DC) in die Entwicklung tumorspezifischer Immunität einzubeziehen, darunter bis zu 100 klinische Studien (Hokey et al. 2005), um Effektivität und Sicherheit bewerten zu können. Im peripheren Gewebe befinden sich DC im unreifen Stadium. Durch die Phagozytose sterbender Zellen prozessieren die unreifen DC deren Antigene. Bei einer Aktivierung durch mitogene „Gefahrensignale“, hierzu zählen *Toll-like-receptor*-(TLR)-Liganden, reifen die DC, indem sie zahlreiche MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle sowie kostimulatorische Moleküle exprimieren und Signalstoffe sezernieren. Die DC migrieren während der Reifung in die drainierenden Lymphknoten. Im Kontext mit den MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Molekülen präsentieren sie den naiven *Cluster of differentiation* (CD)8+ven bzw. CD4+ven T-Zellen Peptidepitope und initiieren abhängig vom spezifisch ligierten TLR-Liganden eine Typ1- oder Typ2-Immunantwort (Hokey et al 2005). Pathogene, die unterschiedliche TLR-Liganden aktivieren, begründen dabei verschiedene Anforderungen an das Immunsystem, was zur funktionellen Dichotomie der T-Zell-Subpopulationen beiträgt. Virus-infizierte Zellen oder transformierte Zellen, intrazelluläre Bakterien, histoinkompatible Transplantate und Protozoen werden maßgeblich durch die zellvermittelte Typ1-Immunantwort beseitigt, wobei immunogene Epitope auf MHC-Klasse-I-Molekülen von überwiegend CD8+ven zytotoxischen T-Zellen über einen spezifischen T-Zell-Rezeptor erkannt werden. Die Abwehr gegenüber extrazellulären Pathogenen erfolgt über die CD4+ven Typ2-T-Zellen, die mit B-Zellen interagieren. Die DC bestimmen die Differenzierung naiver T-Zellen und deren funktionelle Ausrichtung als Effektorzellen durch die bereitgestellten Zytokine während der Antigenpräsentation. Die Polarisierung von Typ1-CD4+ven T-Zellen und Typ1-CD8+ven T-Zellen erfolgt hauptsächlich in Gegenwart von Interferon  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ) und IL12, während eine Typ2-Polarisierung von CD4+ven T-Zellen vornehmlich durch IL-4 und IL-10 stimuliert wird. Die von den beiden polarisierten T-Zell-Populationen gebildeten Interleukine sichern die weitere Differenzierung in jeweils eine Richtung der Immunantwort und hemmen die Ausbildung des jeweils anderen T-Zell-Effektortyps. Dabei sezernieren Typ1-T-Zellen typischerweise IFN $\gamma$ , IL2 und TNF $\beta$ , um die zellvermittelte Immunantwort aufrechtzuerhalten. Da CTA als therapeutische Zielstruktur keine Zelloberflächen-Antigene darstellen, lassen sich gegen CTA eher keine Antikörper-basierten Therapien entwickeln (Caballero und Chen 2009), weshalb Ziel die Ausbildung der zellvermittelten Typ1-Immunantwort zur Abwehr transformierter oder Virus-infizierter Zellen sein muss mit Aktivierung von Makrophagen, Antikörper-Isotypen-Wechsel der Plasmazellen gegen beispielsweise Virusproteine und insbesondere die Aktivierung spezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL). Typischerweise exprimieren

CTL den T-Zell-Korezeptor CD8, jedoch können bis zu 10 % der zytotoxischen Effektorzellen auch CD4 exprimieren. Proliferation und Differenzierung der CTL wird durch die Zytokine der T-Helferzellen reguliert. Professionelle Antigen-präsentierende Zellen wie DC können durch Bereitstellung kostimulatorischer Liganden die zytotoxische Effektorfunktion aktivieren. Die Befähigung der CTL zur Zytolyse erfolgt während des Kontakts mit der Zielzelle unter der Bildung einer immunologischen Synapse, an der der T-Zell-Rezeptor und das MHC-Klasse-I-Molekül mit dem entsprechenden Peptid-Epitop beteiligt sind sowie Korezeptoren wie CD11a (CD18, LFA-1, Integrin $\alpha$ L/Integrin $\beta$ 2), CD2 und CD8 auf der T-Zelle und CD58 und CD54 (ICAM-1, *intercellular adhesion molecule 1*) auf der Zielzelle. Durch Signalkaskaden kommt es zur Oberflächenexpression des IL-2-Rezeptors. In dem Raum zwischen CTL und Zielzelle kommt es zur Exozytose des zytoplasmatischen Granulainhalts der CTL. Dabei bildet das Glykoprotein Perforin Transmembran-Kanäle in der Zielzelle, während die CTL-Membran durch geeignete Moleküle geschützt wird. Granzym A und B werden durch rezeptorvermittelte Endozytose in der Zielzelle aufgenommen und bewirken unter Anwesenheit von Perforin die Induktion der Apoptose. Ein zweiter Weg zur Zytolyse besteht in der Interaktion von Fas-Liganden auf den CTL mit Fas-Molekülen auf der Zielzelle, was schließlich zur Transduktion jener Signale führt, die den programmierten Zelltod der Zielzelle herbeiführen. Da der beschriebenen Typ1-Immunantwort mit Aktivierung der CTL in der Abwehr transformierter Zellen eine zentrale Rolle zukommt, wird die Induktion dieser Richtung der Antitumor-Immunantwort in der Immuntherapie angestrebt, meist unter Einbeziehung von DC (Ladenstein et al. 2010) und wurde auch in der vorliegenden Arbeit verfolgt, unter Verwendung des ESFT-spezifischen CTA LIPI als immunologischer Zielstruktur.

### **Zielsetzung der Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifikation und Charakterisierung von ESFT-spezifischen CTA, gegen die aufgrund ihrer restringierten Expression möglicherweise eine Immunantwort induzierbar wäre und deren Einsatz als therapeutische Zielstruktur die unbefriedigende Prognose des ESFT verbessern könnte. Hierzu wurden Microarray-Expressions-Daten analysiert und zum einen die Expression bekannter CTA im ESFT untersucht, zum anderen Gene aufgrund des typischen Expressionsmusters (Hoden und Tumor) als potentielle neue CTA-Kandidaten benannt. Davon ausgehend, dass CTA, die durch die aberranten Transkriptionsfaktoren EWS-ERG und EWS-FLI1 induziert werden, in die Onkogenese eingebunden sein könnten, wurde eine mögliche Induktion von CTA in öffentlich verfügbaren Datensätzen von EWS-ERG- und EWS-FLI1-transgenen mesenchymalen Stammzellen (MSC) analysiert. Um einen Impfstoff in der Therapie des ESFT entwickeln zu können, sollten gegen ein möglichst pathogenetisch entscheidendes und spezifisches CTA im ESFT zytotoxische T-Zellen aktiviert werden. Die Wahl fiel auf das ESFT-spezifische CTA LIPI. LIPI sollte verwendet werden, um

zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) mit Spezifität für Epitope aus LIPI *in vitro* zu generieren und so eine Lyse von ESFT-Zellen zu erreichen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Reagenzien

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Reagenzien verwendet:

**Tabelle 1. Reagenzien.**

Reagenzien	Hersteller, Ort, Land
Anti-human CD4-Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) (Klon SK3)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Anti-human CD14 FITC (Klon M5E2)	
Anti-human CD8-Phycoerythrin (PE) (Klon SK1)	
Anti-human CD25 FITC (Klon M-A251)	
Anti-human CD80 FITC (Klon BB1)	
Anti-human CD11cPE (Klon Bly-6)	
Anti-human CD40PE (Klon 5C3)	
Anti-human CD83PE (Klon HB15e)	
Anti-human CD154 PE (Klon TRAP1)	
Anti-human HLA-ABC PE (Klon G46-2.6)	
Anti-human HLA-DR FITC (Klon G46-6)	
Anti-human IgG1 FITC (Klon MOPC-21)	
Anti-human IgG2a PE (Klon G155-178)	
Anti-human CD86 FITC (Klon BU63)	Caltag Laboratories, Berlingame, USA
β2-Mikroglobulin	Roche Diagnostics, Mannheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Biochrom, Berlin
Fetales Kälberserum	Biochrom, Berlin
GM-CSF, Leukine	Berlex Laboratories, Richmond, USA
Interferon γ	R&D Systems, Minneapolis, USA
Interferon γ Enzyme-linked immuno spot assay	Becton-Dickinson, Heidelberg
Interleukin 2	R&D Systems, Minneapolis, USA
Interleukin 4	R&D Systems, Minneapolis, USA
Interleukin 7	R&D Systems, Minneapolis, USA
Laktatdehydrogenaseassay (LDH assay)	Roche Diagnostics, Mannheim
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Magnetic cell sorting (MACS)-beads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mitomycin C	Roche Diagnostics, Mannheim
Penicillin und Streptomycin	Biochrom, Berlin
RPMI Medium	Biochrom,
TritonX100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin-EDTA-Lösung	Biochrom, Berlin
X VIVO 15 Medium	Lonza, Basel, Schweiz
Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline	Lonza, Basel, Schweiz

Petide aus Lipase I Position 163-171 NLLKHGASL, Position 219-227 LDYT- DAKFV, Position 156-164 SLSVHIKNC	WITA, Telto
Peptide aus Cyclin D1 Position 228-236 RLTRFLSRV, Position 101-109 LLGATCMFV	WITA, Telto
Standard Ficoll Paque	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Trypanblau	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA

## 2.2 Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Zelllinien verwendet:

**Tabelle 2. Zelllinien.**

Zelllinie	Bezugsquelle, Ort, Land
A673 (Giard et al. 1973)	American Type Culture Collection, Manassas, USA
Lymphoblastoide Zelllinie A2+2310 (Hoennscheidt et al. 2009)	M. S. Staeger, Labor der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Martin-Luther- Universität Halle/Wittenberg
SK-N-MC (Biedler et al. 1973)	Deutsche Sammlung für Zellkultur und Mik- roorganismen, Braunschweig

## 2.3 Geräte

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Geräte verwendet:

**Tabelle 3. Geräte.**

Geräte	Hersteller, Ort, Land
Durchflusszytometer (FACScan)	Becton-Dickinson, Heidelberg
FACS-Röhrchen	Becton-Dickinson, Heidelberg
KS-Elispot-System	ZEISS, Jena
Microplate Manager® 4.0	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Mikroskop Axioplan 25	ZEISS, Jena
Mikroskop Axiovert 40c	ZEISS, Jena
Neubauerkammer (Haemacytometer)	Optik-Labor, Friedrichshofen
PP-Testtube, steril	Greiner bio-one, CELLSTAR, Frickenhausen
Pipettboy	Integra, Neu-Ulm
Serologische Pipetten	TPP, Trasadingen, Schweiz
24well-Zellkulturplatten	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturflaschen	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zentrifuge	Multifuge 1s-r, Heraeus, Hanau

## 2.4 Software

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Programme für die Datenauswertung verwendet:

**Tabelle 4. Software.**

Software	Hersteller oder Referenz
CellQuestPro	Becton-Dickinson, Heidelberg

Genesis	(Sturn et al. 2002)
Microsoft Office Excel 2003	Microsoft, Redmond, USA
<i>Significance analysis of microarrays</i> (SAM)	(Tusher et al. 2001)

## 2.5 Datenbanken

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Datenbanken für die Datenerhebung verwendet:

**Tabelle 5. Datenbanken.**

Datenbank	Homepage
CTA-Datenbank (Ludwig-Institut für Krebsforschung, São Paulo) (Almeida et al. 2009)	<a href="http://www.cta.lncc.br/">http://www.cta.lncc.br/</a>
<i>Gene Expression Omnibus</i> -Datenbank (GEO-Datenbank) ( <i>National Center for Biotechnology Information</i> , NCBI, USA) (Barrett und Edgar 2006)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/</a>
SOURCE-Datenbank ( <i>Genetics Department Stanford University, CA, USA</i> ) (Diehn et al. 2003)	<a href="http://smd.stanford.edu/cgi-bin/SOURCE/SOURCESearch">http://smd.stanford.edu/cgi-bin/SOURCE/SOURCESearch</a>
SYFPEITHI zur Voraussage des Bindungsscores von Peptiden an HLA-A2-Moleküle (Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Universitätsklinikum Tübingen) (Rammensee et al. 1999)	<a href="http://www.syfpeithi.de/scripts/MHCServer.dll/">http://www.syfpeithi.de/scripts/MHCServer.dll/</a>

## 2.6 Microarray-Expressionsdatensätze

Für die Analyse von CTA in ESFT wurden folgende Affymetrix-Mikroarray-Datensätze herangezogen:

**Tabelle 6. Microarrays.**

Affymetrix Microarrays	Datensätze, gegebenenfalls mit GEO-Datenbank-Zugangsnummer
Affymetrix HG_U133A-Microarrays	Ewingtumor-Proben (ESFT) GSE7007 (Tirode et al. 2007); Verschiedene Normalgewebe, GSE2361 und GDS 1096, 31 Proben: Ovar, Plazenta, fetale Lunge, fetale Leber, fetales Hirn, Nebenniere, Uterus, Schilddrüse, Mamma, Lunge, Prostata, Niere, Blase, Herz, Muskel, Haut, Trachea, Speicheldrüse, Magen, Dickdarm, Dünndarm, Pankreas, Leber, Knochenmark, Milz, Thymus, Glandula Pinealis, Rückenmark, Thalamus, Hippocampus, Nucleus Caudatus, Corpus Callosum, Gehirn, Kleinhirn und Amygdala (Ge et al. 2005); Mesenchymale Stammzellen (MSC) GSE7332, 1 Probe (Barberi et al. 2005), GDS3402, 3 Proben (Markov et al. 2007); Embryonale Stammzellen (ESC), GSE7332, 3 Proben (Barberi et al. 2005); Humane mikrovaskuläre Endothelzellen (HMEC) und humanes Nabelschnurvenenendothel (HUVEC), GDS1543, je 3 Proben (Viemann et al. 2006); Hämatopoetische Stammzellen (HSC), GSE3788, 3 Proben (Georgantas et al. 2004); Hoden, GDS181, 3 Proben (Su et al. 2004); Neuroblastome, GSE7529, 10 Proben (Albino et al. 2008), Neuroblastome, 12 Proben (Staege et al. 2004a, Foell et al. 2008)



Affymetrix  
HG\_U133Plus2.0-  
Microarrays

Ewingtumor-Zelllinien GSE8596, 16 Proben (Miyagawa et al. 2008) und GSE2109, 1 Probe (M. Bittner 2004);  
21 verschiedene Normalgewebe, GSE3526, 48 Proben:  
4\*Ovar, 3\*Hoden, 5\*Knochenmark, 2\*Lymphknoten, 2\*Milz,  
2\*Kleinhirn, 2\*zerebraler Cortex, 2\*Rückenmark,  
2\*Skelettmuskel, 2\*Herzvorhof, 2\*Koronararterie, 2\*Vena  
saphena, 2\*Leber, 2\*Lunge, 2\*Magen Kardia, 2\*Nierenrinde,  
2\*Nierenmark, 2\*Kolon Coecum, 3\*Prostata, 3\*Schilddrüse,  
2\*Nebenniere (Roth et al. 2006);  
Sperma, GSE6969, 13 Proben (Platts et al. 2007);  
7 Expressionsdatensätze EWS-FLI1-transgener MSC und 7  
Expressionsdatensätze EWS-ERG-transgener MSC mit 4 ge-  
messenen Zeitpunkten: dem Ausgangswert sowie nach 24, 48  
und 72 Stunden jeweils mit und ohne Tetrazyklin-Exposition  
(Miyagawa et al. 2008)

## **2.7 Zellbiologische Methoden zur Generierung ESFT-spezifischer CTL**

### **2.7.1 Zellkulturbedingungen für Tumorzellen**

Die Ewingtumor-Zelllinien A673 und SK-N-MC wurden in 75-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen (TPP, Trasadingen, Schweiz) unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) kultiviert. Diese Zellen wurden als Zielzellen im Laktatdehydrogenase-Freisetzungstest / Interferon  $\gamma$  Elispot assay (Elispot) (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) oder zur Gewinnung von Tumorlysaten verwendet. Die Zellzüchtung erfolgte in RPMI-Medium (Biochrom, Berlin) mit Zugabe von 10 % fetalem Kälberserum (FCS) (Biochrom, Berlin) und Penicillin und Streptomycin (10.000 U/ml und 10.000  $\mu$ g/ml) (Biochrom, Berlin). Der Mediumwechsel wurde ein- bis zweimal pro Woche vorgenommen. Dabei wurde das alte Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit je 3ml Trypsin-EDTA-Lösung (Biochrom, Berlin, Deutschland) bei 37 °C im Brutschrank 5 bis 10 Minuten inkubiert, sodass sich die Zellen vom Flaschenboden lösten. Im Anschluss daran wurden 10 ml neues Kulturmedium hinzugegeben. Daraus wurden dann 2 ml Zellsuspension in eine neue 75-cm<sup>2</sup>-Flasche überführt, die bereits mit 18 ml frischem Medium gefüllt war.

### **2.7.2 Bestimmung der Zellzahl**

Zellen wurden mikroskopisch (Mikroskope AxioPlan 25 und Axiovert 40c von ZEISS, Jena, Deutschland) in der Neubauerkammer (Optik-Labor, Friedrichshofen, Deutschland) nach Anfärbung durch Trypanblau 0,4 % (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA) gezählt.

### **2.7.3 Herstellung von SK-N-MC-Lysat und A673-Lysat**

Mit den Lysaten der Ewingtumor-Zelllinien A673 und SK-N-MC wurden DC bzw. die Lymphoblastoide Zelllinie A2+2310 (LCL) gepulst. Die Lyse der A673- und SK-N-MC-Zellen geschah durch mindestens dreimaliges Einfrieren bei -80 °C und sofortiges Wiederauftauen im Wasserbad bei 36 °C. Dazu wurde das alte Tumorzellkulturmedium abgesaugt und die Zellen bei 37 °C mit je 3 ml Trypsin-EDTA im Brutschrank 5 bis 10 Minuten inkubiert, sodass sich die

Zellen vom Flaschenboden lösten. Auf die Zellen wurden mit einer serologischen 10-ml-Pipette 12 ml neues RPMI Medium gegeben und die Zellsuspension dann in ein steriles Röhrchen überführt. Die Zellzahl wurde bestimmt und nach einem Zentrifugationsschritt für 10 Minuten bei 200 g wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in 1,5 ml X VIVO 15-Medium (Lonza, Basel, Schweiz) resuspendiert. Dann erfolgten die Einfrier- und Auftau-Zyklen.

#### **2.7.4 Peptide**

Die in dieser Arbeit verwendeten Peptide wurden dankenswerterweise aufgrund einer *in-silico*-Vorhersage mithilfe der SYFPEITHI-Datenbank (Rammensee et al. 1999) entsprechend ihrer Wahrscheinlichkeit, an HLA-A2-Moleküle zu binden, von PD Dr. rer. nat., rer. medic. habil. M. S. Staeger, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der MLU Halle / Wittenberg, ausgewählt und zur Verfügung gestellt. Die Synthese erfolgte durch die WITA GmbH, Telto.

Folgende Peptide aus Lipase I (LIPI) wurden verwendet: NLLKHGASL, Position 163-171, mit vorausgesagtem SYFPEITHI-Bindungsscore für HLA-A2 von 26 (NLL); LDYTDKAFV, Position 219-227, mit Bindungsscore 12 (LDY) sowie SLSVHIKNC, Position 156-164, mit Bindungsscore 25 (SLS). Folgende Peptide aus Cyclin D1 (CCND1) wurden verwendet: RLTRFLSRV, Position 228-236, mit Bindungsscore 24 (RLT), sowie LLGATCMFV, Position 101-109, mit Bindungsscore 22 (LLG). Die Peptide lagen in einer Konzentration von 1 mg/ml in *phosphate buffered saline* (PBS) vor.

#### **2.7.5 Aufarbeitung von PBMC**

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) wurden von freiwilligen HLA-A2+ven Spendern unter Benutzung von Standard Ficoll Paque (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert (Foell et al. 2008).

#### **2.7.6 Gewinnung naiver CD8-angereicherter PBMC**

CD8+ve PBMC wurden durch *Magnetic cell sorting* (MACS, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) durch negative Selektion angereichert. Hierzu wurden die PBMC zentrifugiert und zu  $10 \times 10^6$  in 900 µl MACS-Puffer aufgenommen. Der Puffer wurde nach den Anweisungen des Herstellers aus PBS mit Zugabe von 0,5 % FCS und 2mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Biochrom, Berlin, Deutschland) hergestellt. Dazu wurden 100 µl CD4 *microbeads human* gegeben und die Zellsuspension wurde 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden danach in Puffer gewaschen und dann erneut in 500 µl Puffer aufgenommen. Die Suspension konnte nun auf eine LS-MACS-Säule geladen werden, die sich im magnetischen Feld eines MACS-Separators befand. Die magnetisch markierten CD4+ven Zellen wurden in der Säule zurückgehalten. Nicht markierte Zellen wurden in einem 50 ml-Röhrchen aufgefangen. Diese CD4-depletierten Zellen wurden in Puffer gewaschen. Danach wurden sie zur Substitution der T-Helferzellen mit nicht aktivierten PBMC in frischem X VIVO 15 Medium zusammengege-

ben. Anschließend wurde diese T-Zellmischung mit vorgereiften DC zusammen kultiviert. Das Verhältnis von CD4<sup>+</sup>ven zu CD8<sup>+</sup>ven Zellen wurde mit Durchflusszytometrie (FACScan) wie unten beschrieben analysiert. Es betrug CD8/CD4 = 2/1. Folgende Antikörper (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) wurden für die Analyse kombiniert: Anti-human CD4-FITC (Klon SK3) und Anti-human CD8-PE (Klon SK1). Es wurden Isotypenkontrollen, um unspezifische Antikörperbindungen über Fc-Rezeptoren zu erfassen, mitgeführt. Die Isotypkontrollen entsprachen den IgG-Isotypen der spezifischen Antikörper und waren mit den gleichen Farbstoffen wie diese markiert. Es handelt sich um Mouse Anti-human IgG1-FITC (Klon MOPC-21) und Mouse Anti-human IgG2a PE (Klon G155-178, Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland).

### **2.7.7 Epstein-Barr-Virus immortalisierte LCL**

Zellen der lymphoblastoiden Zelllinie A2+2310 (LCL) wurden als antigenpräsentierende Zellen (APC) bei der Restimulation von CTL verwendet und freundlicherweise von PD Dr. rer. nat., rer. medic. habil. M. S. Staeger zur Verfügung gestellt. Des Weiteren wurden LCL im Interferon  $\gamma$ -Elispot (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) als APC eingesetzt. Zuvor erfolgte immer eine Inaktivierung der LCL mit Mitomycin C (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland).

Die LCL wurde in 25 cm<sup>2</sup> Flaschen unter Standardbedingungen kultiviert. Die Zellzüchtung erfolgte in X VIVO 15 Medium. Das Umsetzen der Zellen in frisches Medium wurde einmal wöchentlich durchgeführt. Dabei wurden 2 ml der Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche überführt. Dazu kamen 10 ml neues X VIVO 15 Medium.

### **2.7.8 Generation Dendritischer Zellen und primäre Stimulation naiver CD8<sup>+</sup>ver Zellen**

Dendritische Zellen (DC) wurden aus der adhärennten Fraktion von PBMC HLA-A2<sup>+</sup>ver Spender generiert. Die adhärennten Zellen entsprechen den Monozyten, die aus myeloiden Vorläuferzellen hervorgehen. Die Monozyten differenzierten unter den unten beschriebenen Kulturbedingungen *in vitro* zu CD11c/CD14<sup>+</sup>ven reifen DC. Es wurden 5\*10<sup>7</sup> bis 1\*10<sup>8</sup> PBMC 2 Stunden lang im Brutschrank unter Standardbedingungen in RPMI Medium in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen inkubiert. Danach wurden die nicht adhärennten Zellen im Überstand abgesaugt und verworfen. Auf die adhärennten Zellen wurde 12 ml PBS gegeben und sie wurden ca. 30-mal im PBS per Hand hin- und hergeschwenkt. PBS wurde abgesaugt und der Waschvorgang erfolgte noch zweimal. Anschließend wurden die adhärennten Zellen unter Standardbedingungen in RPMI Medium kultiviert. Hierzu wurden Granulozyten-Makrophagen-Colonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) (Leukine, Sargramostim®, Berlex Laboratories, Richmond, USA) und Interleukin 4 (IL4) (R&D Systems, Minneapolis, USA) hinzugefügt. Am ersten Tag kamen 300 U/ml IL4 und 1000 U/ml GM-CSF zur Zellkultur in Einsatz, ebenso am dritten Tag.

Am fünften Tag wurden die nun nicht mehr adhären, durch IL4 und GM-CSF aus Monozyten differenzierten, unreifen DC in 24well-Zellkulturplatten (TPP, Trasadingen, Schweiz) in RPMI Medium zu jeweils 50.000 DC/ml mit jeweils 0,5 µg Peptid/ml überführt. Peptide aus LIPI, nämlich NLL, LDY, SLS, aus Cyclin D1 (CCND1), RLT, LLG und A673-Lysat und SK-N-MC-Lysat, entsprechend einem Verhältnis von 50.000 DC/ml zu 8000 lysierten Tumorzellen/ml Medium wurden zum Pulsen der DC benutzt. Es wurden außerdem 3µg/ml β2-Mikroglobulin (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) dazugegeben. Die Antigen-Exposition erfolgte für insgesamt 6 bis 7 Stunden jeweils in Triplikaten. Als Kontrolle dienten nicht gepulste DC.

Zur weiteren Ausreifung der DC wurde nach zweistündigem Pulsen mit Peptid oder Lysat oder Nichtpulsen 1 µg/ml Lipopolysaccharid (LPS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) und 20 ng Interferon γ (IFNγ)/ml (R&D Systems, Minneapolis, USA) dazugefügt.

Nach 6 bis 7 stündiger Antigenexposition bzw. spätestens 4 bis 5 Stunden nach LPS und IFNγ-Gabe wurden die Zellen gewaschen. Die Zellsuspension wurde dazu mittels einer 1000 µl Pipette in ein 15 ml Röhrchen überführt. Dazu wurden 10 ml frisches Medium gegeben. Nach einem Zentrifugations-Schritt für 10 Minuten bei 200 g wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 500 µl frischem Medium resuspendiert und in ein neues Well pipettiert.

Nach dem Waschvorgang wurden ungefähr  $1,3 \cdot 10^6$  mit CD8<sup>+</sup>ven Zellen angereicherte PBMC zu 50.000 DC beigefügt und es wurden 10 ng/ml Interleukin 7 (IL-7) (R&D Systems, Minneapolis, USA) dazugegeben. Jeweils 24 und 48 Stunden nach der Stimulation wurden 10 U/ml Interleukin 2 (IL-2, R&D Systems, Minneapolis, USA) zu den Zellen gegeben.

### **2.7.9 Phänotypische Charakterisierung Dendritischer Zellen**

Dendritische Zellen wurden fünf Stunden nach LPS- und INFγ-Zugabe durchflusszytometrisch analysiert. Dazu wurden jeweils 50.000 DC in 100 µl X VIVO15 für 20 Minuten bei 4 °C im Kühlschrank mit gleichzeitig jeweils 0,125 µg zweier verschiedener FITC- und PE-gekoppelter Antikörper inkubiert. Als Gefäß dienten FACS-Röhrchen (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland). Die Antikörper kamen in folgenden Kombinationen zum Einsatz: Anti-human HLA-DR FITC (Klon G46-6, Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) und Anti-human HLA-ABC PE (Klon G46-2.6, Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland); Anti-human CD14 FITC (Klon M5E2, Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) und Anti-human CD11c PE (Klon B-ly6, Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland); Anti-human CD86 FITC (Klon BU63, Caltag Laboratories, Berlingame, CA, USA) und Anti-human CD83 PE (Klon HB15e, Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland); Anti-human CD80 FITC (Klon BB1, Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) und Anti-human CD40PE (Klon 5C3) (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland). Es wurden Isotypenkontrollen mitgeführt: Mouse IgG1 FITC (Klon MOPC-21, Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) und Mouse IgG2a PE (Klon G155-

178, Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland). Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal in 10 ml PBS in der Zentrifuge für 10 Minuten bei 200 g gewaschen. Jede Probe wurde anschließend in 100 µl PBS resuspendiert. Nun konnten die DC analysiert werden. Die Datenerfassung erfolgte mittels eines FACScans und CellQuestPro-Software (Becton-Dickinson, New Jersey, USA).

Zuerst wurden bei der FACScan-Analyse die Parameter *Forward scatter* (FSC) und *Sideward scatter* (SSC) im Dot-Plot gegeneinander aufgetragen. FSC ist ein Maß für die Größe, SSC ein Maß für die Granularität der Zellen. Es ließen sich hierdurch Lymphozyten- und Monozytenpopulationen, Zelltrümmer und Granulozyten voneinander unterscheiden. Durch das Legen eines Gates um eine bestimmte Zellpopulation konnte festgelegt werden, welche Zellpopulation im weiteren Verlauf charakterisiert werden sollte. Da die Emissionsspektren von FITC und PE überlappen, wurden die Einstellungen im Voraus so gewählt, dass die einfach gefärbten Zellen nur durch ihren entsprechenden Fluoreszenzkanal detektiert werden konnten und unspezifisch fluoreszierende Zellen im linken unteren Abschnitt des Dot-Plots zu liegen kamen. Da mehrfach überlagerte Punkte innerhalb eines Dichteplots verschiedenfarbig erkennbar sind, wurden die Ergebnisse als Dichteplot dargestellt.

#### **2.7.10 Restimulation der geprimten T-Zellen**

Fünf bis sieben Tage nach der Primärstimulation naiver T-Zellen mit den Peptiden von LIPI oder von CCND1 oder mit Tumorlysat wurden die Zellen mit dem jeweiligen Antigen restimuliert. Weitere Restimulationen erfolgten ggf. im wöchentlichen Abstand. Dies geschah unter Verwendung der zuvor gepulsten und danach mit Mitomycin C inaktivierten LCL A2+2310 als APC. Es wurden 800.000 LCL in 500 µl X VIVO Medium mit 50 µg/ml Mitomycin C zusammengegeben. Die Inkubation mit Mitomycin C erfolgte für 40 Minuten unter Standardkulturbedingungen. Nachdem die LCL auf diese Weise inaktiviert worden waren, wurden sie 3- bis 4-mal in jeweils 12 ml X VIVO Medium in der Zentrifuge bei 200 g für 10 Minuten gewaschen.

Jeweils 200.000 LCL in 500 µl X VIVO 15 wurden entweder mit 4 µg/ml des jeweiligen Peptids oder mit A673- bzw. SK-N-MC-Lysat entsprechend 8.000 lysierten Zellen/ml unter Zugabe von 3 µg/ml β2-Mikroglobulin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gepulst. Zu den T-Zellen wurden nach zweistündigem Pulsen der LCL mit dem entsprechenden Antigen je 50.000 LCL in 125 µl X VIVO 15 Medium beigefügt. Am ersten und zweiten Tag nach der Restimulation wurden 10U/ml IL2 zu den Zellen gegeben.

#### **2.7.11 Charakterisierung der zytotoxischen T-Zellen (CTL)**

Die CTL wurden nach der ersten erfolgten Restimulation mit Hilfe von FACScan phänotypisch charakterisiert. Es wurden folgende Antikörper kombiniert: Anti-human CD4 FITC (Klon SK3, Becton-Dickinson) und Anti-human CD8 PE (Klon SK1, Becton-Dickinson Biosciences), Anti-

human CD25 FITC (Klon M-A251, Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) und Anti-human CD154 PE (Klon TRAP1, Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland). Isotypkontrollen wurden wie oben bei den DC verwendet.

#### **2.7.12 IFN $\gamma$ -Elispot assay**

Insgesamt wurden 34 HLA-A2+ve Spender untersucht. In 13 Fällen proliferierten die stimulierten Zellen so stark, dass diese im Elispot oder LDH assay weiter charakterisiert werden konnten. Es wurden insgesamt 5 HLA-A2+ve Spender im Elispot und 8 HLA-A2+ve Spender im LDH assay, wie hier jeweils bei den Methoden beschrieben, untersucht. Der Interferon  $\gamma$  *Enzyme-linked immuno spot assay* (IFN $\gamma$ -Elispot) (Becton-Dickinson, New Jersey, USA) wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Im Elispot wurde die IFN $\gamma$ -Freisetzung der im Vorfeld hierfür stets mit SK-N-MC-Lysat stimulierten und einmal restimulierten CTL HLA-A2+ver Spender in Reaktion auf Peptide aus LIPI oder CCND1, präsentiert durch LCL oder auf lebende HLA-A2+ve A673- oder HLA-A2-ve SK-N-MC-Tumorzellen gemessen. Der Elispot erfolgte 7 Tage nach der letzten Restimulation, bildete selbst eine zweiten Restimulation. Es dienten allogene HLA-A2+ve LCL als APC, die in einem Verhältnis wie unter 2.7.10 beschrieben mit den Cyclin D1-Peptiden RLT oder LLG oder mit den Lipase I-Peptiden NLL, LDY oder SLS gepulst wurden. Die Messung der IFN $\gamma$ -Freisetzung wurde für die unterschiedlichen Zellansätze jeweils in Triplikaten ausgeführt. Die Spots wurden automatisch vom KS-Elispot-System (ZEISS, Jena, Deutschland) ausgezählt. Die IFN $\gamma$ -Produktion der Zellen im Medium wurde als Spotsumme eines Testfelds gemessen, ebenso die Spots vom Medium allein. Als Negativkontrolle dienten T-Zellen im Medium allein ohne APC oder Tumorzellen, also ohne zweite Restimulation während des Elislots. Es wurden die Stimulationsindizes für alle fünf im Elispot untersuchten Spender errechnet als Verhältnis der IFN $\gamma$ -Freisetzung von SK-N-MC-Lysat spezifischen T-Zellen in Reaktion auf LIPI-Peptid beladene LCL zu der IFN $\gamma$ -Freisetzung von SK-N-MC-Lysat spezifischen T-Zellen, die nicht während des Elislots restimuliert wurden.

#### **2.7.13 Laktatdehydrogenaseassay zur Messung der Zytotoxizität**

Mit LPS und INF $\gamma$  gereifte DC von HLA-A2+ven Spendern wurden im Vorfeld des Laktatdehydrogenaseassays (LDH assay, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) stets wie oben beschrieben jeweils mit A673-Lysat, SK-N-MC-Lysat, den CCND1-Peptiden RLT oder LLG oder mit den LIPI-Peptiden NLL, LDY oder SLS gepulst oder es erfolgte kein Pulsen der DC als Negativkontrolle. Die DC wurden danach zur Stimulation von mit CD8+ven Zellen angereicherten PBMC, wie oben beschrieben, verwendet. Sieben Tage nach der zweiten Restimulation erfolgte die Messung der Zell-medierten Zytotoxizität der CTL auf lebende A673 mittels LDH assay nach den Angaben des Herstellers. Es wurden jeweils 10.000 Target- und 100.000 Effektorzellen verwendet. Die Messung der LDH-Freisetzung wurde für die unter-

schiedlichen Zellansätze jeweils in Triplikaten ausgeführt. Die LDH-Freisetzung der CTL im Medium allein wurde gemessen, ebenso die LDH-Freisetzung vom Medium allein. Als Hintergrundkontrolle dienten, wie nach Anleitung des Herstellers gefordert, A673-Zellen im Medium und als Maximalkontrolle mittels TritonX100 (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) lysierte A673. Die Messungen erfolgten mit einem Microplate Manager® 4.0 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Die prozentuale Zell-mediierte Zytotoxizität wurde aus den Rohdaten nach den Angaben des Herstellers mit Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft, Redmond, USA) berechnet.

## **2.8 Bioinformatische Methoden**

Für die Identifikation von CTA-Expressionsprofilen aus Microarraydaten von Affymetrix HG\_U133Plus2.0- und HG\_U133A-Microarrays wurde Microsoft Office Excel 2003 verwendet. Die Expressionsdaten wurden aus der öffentlichen *Gene Expression Omnibus*-Datenbank (GEO-Datenbank) (Barrett und Edgar 2006) bezogen und freundlicherweise von PD Dr. rer. nat., rer. medic. habil. Martin S. Staeger mithilfe des Programms Microarray Suite 5.0 (Affymetrix) aus den Rohdatensätzen in Excel-Dateien umgewandelt. Die Microarrays wurden hierbei auf eine mittlere Intensität von 500 skaliert. Die verwendeten Datensätze sind mit zugehörigen Referenzen in Absatz 2.6 zusammengefasst.

### **2.8.1 Identifizierung CTA-spezifischer Expressionsprofile**

Ein CTA definiert sich darüber, dass es im Hoden und gleichzeitig im Tumorgewebe deutlich oberhalb der Normalgewebe exprimiert wird, wobei in nur wenigen anderen Geweben eine relevante Expression vorhanden sein darf. Es wurden drei Ansätze verfolgt, um neue ESFT-assoziierte CTA zu identifizieren: zum einen wurden Gene gesucht, die in den Microarray-Datensätzen im ESFT hoch exprimiert sind und nur in den Angaben der Source Datenbank (Diehn et al. 2003) im Hoden exprimiert werden (CTA-Kandidaten aufgrund der Mischung von Array-Expressionsanalyse und SOURCE-Datenbank). Der zweite Ansatz war, die in Hoden und ESFT in den Microarray-Datensätzen überexprimierten Gene zu ermitteln (CTA-Kandidaten aufgrund der Microarrays). Schließlich wurden in einer dritten Herangehensweise Gene gesucht, die als bekannte CTA in der CTA-Datenbank des Ludwig-Instituts für Krebsforschung (Almeida et al. 2009) erfasst sind und im EFST nach den Array-Daten exprimiert werden (bekannte, ESFT-assoziierte CTA aufgrund der Arrays). Es folgt die eingehendere Beschreibung der drei Ansätze. Es wurden zunächst die Gene betrachtet, die in Ewingtumorgewebe überexprimiert sind. Um diese Gene zu finden, wurde die 90. Perzentile der Expressionswerte eines Gens in allen Normalgeweben (Referenzgeweben), ausgenommen Keimzellen und Stammzellen, gebildet. Anschließend wurde der Median der Expressionswerte eines Gens in den Ewingtumorgeweben gebildet. Es wurde ermittelt, ob der gefundene Median um den Faktor 2,5 oberhalb der 90. Perzentile aller Referenzgewebe lag und im zutreffenden Fall von einer

Überexpression des Gens im ESFT ausgegangen. Durch diese Methode wurden solche Gene gefunden, die in anderen Normalgeweben nur sehr niedrig oder gar nicht exprimiert werden. Es wurde beschrieben, dass CTA im Hoden in Microarray-Analysen nicht konsequent exprimiert sein müssen, obwohl sie teilweise auf RNA-Ebene mit PCR nachweisbar sind (Staege et al. 2004a; Hofmann et al. 2008). Das Kriterium der Überexpression im Hoden wurde deshalb zunächst nicht berücksichtigt und zuerst eine Liste mit Genen erstellt, die nur das Kriterium der Überexpression im Ewinggewebe erfüllen. Diese Gene wurden in Tabellen (Tabelle A1 und A2) aufgeführt, sofern sie in der SOURCE-Datenbank im Hoden, im Ovar oder in der Plazenta als exprimiert ausgewiesen waren und sofern sie in nicht mehr als 6 Normalgeweben, ausgenommen Stammzellen, Keimzellen und embryonales Gewebe, als exprimiert beschrieben waren.

Anschließend wurde die Berechnung der im Hoden überexprimierten Gene, so vorgenommen, wie eben für die überexprimierten Gene im ESFT beschrieben und eine weitere Liste mit Genen, die gleichzeitig im ESFT und Hoden überexprimiert sind, erstellt. Die tabellarische Aufzählung dieser Gene, die diesmal die Expressionskriterien eines CTA laut der Analyse der Microarray-Daten erfüllten, wurde durchgeführt (Tabelle A3 und A4). Für alle so gefundenen potentiellen CTA wurde anschließend eine Literaturrecherche zum Zusammenhang mit ESFT bzw. einer früheren Identifikation als CTA in der CTA-Datenbank des Ludwig-Instituts für Krebsforschung (Almeida et al. 2009) durchgeführt. Außerdem wurde mithilfe der Datenbank SOURCE (Diehn et al. 2003) die Expression aller gefundenen Gene in Hoden, Ovar, Plazenta und Normalgeweben überprüft. Im dritten Ansatz zur Identifikation von ESFT-assoziierter CTA wurden die Microarray-Datensätze auch auf eine Expression schon bekannter CTA der CTA-Datenbank des Ludwig-Instituts für Krebsforschung (Almeida et al. 2009) untersucht. Es wurde statt eines fixierten *thresholds*, oberhalb dessen eine Expression angenommen wird, die Expression eines CTA nach einem relativen *threshold* gewichtet, welcher das Expressionsverhältnis von somatischen Geweben zu ESFT-Geweben einbezieht. Wenn die Expression eines CTA in einer ESFT-Probe bei einem Sondensatz zweifach oberhalb des Medians aller Normalgewebe für dieses CTA lag, wurde eine Expression dieses CTA angenommen. In der Arbeit wird in Tabellen (Tabelle A5 und A6) angegeben, in wie viel Prozent der Ewingtumor-Proben ein CTA jeweils exprimiert ist und in wie viel Normalgeweben dieses CTA vorkommt. In der Datenbank SOURCE (Diehn et al. 2003) wurde nach *pathways* der entsprechenden CTA gesucht.

Cluster-Analysen (Manhattan-Distanz, *Average linkage clustering*) zu Genen mit gleichzeitiger Überexpression in ESFT und Hoden wurden mithilfe des Programms Genesis (Sturn et al. 2002, [www.genome.tugraz.at](http://www.genome.tugraz.at)) durchgeführt. Hierzu wurden die Daten log<sub>2</sub>-transformiert und Medianzentriert.



### 2.8.2 Expressionsanalyse von EWS-ETS transgenen Mesenchymalen Stammzellen (MSC)

Um den Einfluss der in ESFT aktivierten, aberranten Transkriptionsfaktoren EWS-FLI1 und EWS-ERG auf eventuelle CTA-Expression hin zu untersuchen, wurde eine Analyse von öffentlich zugänglichen Microarray-Daten von MSC durchgeführt, in die diese Transkriptionsfaktoren unter der Kontrolle eines Tetracyclin-induzierbaren Promotors eingebracht worden waren (Miyagawa et al. 2008). Expressionsprofile wurden von den Autoren vor der Induktion mit Tetracyclin und jeweils nach 1, 2 und 3 Tagen mit und ohne Induktion gewonnen. Die Werte induzierter Proben wurden sowohl mit dem Ausgangswert als auch mit den nicht induzierten Kontrollansätzen verglichen. Es handelte sich um 7 Expressionsdatensätze zu EWS-FLI1 transgenen MSC und um 7 Expressionsdatensätze zu EWS-ERG transgenen MSC mit 4 gemessenen Zeitpunkten, jeweils dem Ausgangswert sowie nach 24, 48 und 72 Stunden jeweils mit oder ohne Tetrazyklin-Exposition (Miyagawa et al. 2008).

Obwohl Sondensätze für individuelle Gene unterschiedliche Signal-Rausch-Verhältnisse haben, ist für niedrig exprimierte Gene generell ein großer relativer Fehler zu erwarten. In der Analyse transgener MSC wurden Sondensätze, die für keine der experimentellen Situationen Werte größer als 100 (relative Intensitätseinheiten) erreichten, deshalb von der Untersuchung ausgeschlossen. Dadurch wurde die anfängliche Sondensatzzahl für die EWS-FLI1-Induktion auf 32.195 reduziert, für EWS-ERG auf 26.681. Das Verhältnis der mit Tetracyclin induzierten zu den nicht induzierten Proben wurde für die 3 Zeitpunkte bestimmt und als Logarithmus zur Basis 2 ausgedrückt. Die Datensätze wurden mittels *Significance analysis of microarrays* (SAM) getrennt analysiert (Download von <http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/>). Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass für jeden Sondensatz eine Teststatistik errechnet wird, die ein Ranking der Regulationsereignisse erlaubt. Durch vielfache Permutation der Datensätze (400 in der vorliegenden Analyse) wurde ermittelt, wie wahrscheinlich ein zufälliges Abweichen der erwarteten relativen Differenz von der beobachteten auftreten wird. Daraus wurde dann für jeden Sondensatz eine *False discovery rate* (FDR) abgeleitet (Tusher et al. 2001). Die Grenzen wurden so gewählt, dass 322 Sondensätze (1 % der 32.195 Sondensätze) als Regulationsereignisse bezeichnet werden. Die durchschnittliche FDR betrug 1,10 %, sodass nicht mehr als 4 der 322 Sondensätze fälschlicherweise als reguliert betrachtet wurden. Damit waren die gewählten Grenzen sehr konservativ und es wurden einige tatsächliche Regulationsereignisse nicht registriert. Andererseits konnte so eine hohe Wahrscheinlichkeit für ein tatsächliches Regulationsereignis erreicht werden. Bei einer Erhöhung der als reguliert akzeptierten Beobachtungen auf 2 % ergab sich eine maximale FDR von 1,28 %, was etwa 8 Falschpositiven aus 644 Beobachtungen entspräche.

Für 1 % der ERG regulierten Transkripte ergab sich eine FDR von 3,36 %, sodass nicht mehr als 9 der 267 durch EWS-ERG regulierten Sondensätze als fälschlicherweise reguliert betrachtet

wurden. Die EWS-ERG und EWS-FLI1 regulierten Gene wurden bezüglich ihrer Identität als bekanntes oder möglicherweise neues, hier erstmals so benanntes CTA geprüft.

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Bioinformatische Analyse der CTA-Expression in ESFT**

##### **3.1.1 Identifikation potentieller CTA in ESFT**

In der vorliegenden Arbeit wurden Microarray-Datensätze analysiert, um ESFT-assoziierte CTA zu identifizieren. Dabei wurde mittels der oben beschriebenen Methoden berechnet, welche Gene im Ewingtumorgewebe überexprimiert sind. Dabei wiesen zahlreiche Gene jedoch keine gleichzeitige und keine eindeutige Überexpression im Hoden auf. Einige schon von anderen Autoren publizierte und durch PCR-Analysen bestätigte CTA zeigten sich in früheren Microarray-Analysen jedoch ebenfalls nicht konsequent im Hoden nachweisbar (Staeger et al. 2004b; Hofmann et al. 2008). Aus diesem Grund wurde für die Gene mit ausschließlicher Überexpression im Ewingtumorgewebe in der SOURCE-Datenbank (Diehn et al. 2003) nach Expressionsdaten in Normalgeweben, einschließlich Hoden, Plazenta und Ovar gesucht. Die Gene, die bei dieser Suche in maximal 6 Normalgeweben, ausgenommen Stammzellen, Keimzellen und embryonales Gewebe, exprimiert waren und bei denen zusätzlich eine Expression im Hoden, im Ovar oder in der Plazenta vorlag, wurden in Tabelle A1 und A2 aufgelistet (siehe Anhang). Es handelte sich nach diesen Analysen um mögliche neue CTA in ESFT. Auf dem HG\_U133Plus2.0-Microarray entsprachen den so ermittelten möglichen neuen CTA 128 Gene, die bei mindestens einem der aufgeführten Sondensätze in den Microarraydatensätzen im Ewingtumorgewebe überexprimiert waren, deren Expression im Hoden sich aber nur durch die Suche in der Datenbank SOURCE feststellen ließ. Außerdem war auch die im ESFT-Gewebe beschriebene LIPI (Foell et al. 2008) als CTA in ESFT so erneut zu identifizieren. Auf dem kleineren HG\_U133A-Microarray entsprechen 33 Gene den so ermittelten möglichen CTA.

Gene, die in wenigstens einem der aufgeführten Sondensätze der Microarraydaten gleichzeitige Überexpression im Hoden und im Ewingtumorgewebe aufwiesen, wurden ebenfalls als mögliche neue CTA in den Tabellen A3 und A4 (im Anhang) aufgelistet. In den Daten des HG\_U133Plus2.0-Microarray fanden sich nach diesem Vorgehen 133 potentielle neue CTA und 16 schon bekannte CTA der CTA-Datenbank des Ludwig-Instituts für Krebsforschung (Almeida et al. 2009). Es handelt sich um CDCA1, CEP55, OIP5, PBK, PRAME, SSX1, SSX2, SSX3, SSX4, SSX4B, SSX7, SSX9, SYCP1, TEX15, TTK und XAGE1, wobei nur die CTA XAGE1 und TEX15 schon im ESFT beschrieben wurden. Es konnte mittels der SOURCE-Datenbank (Diehn et al. 2003) bei 95 der 133 Gene eine Expression im Hoden bestätigt werden.

In den Daten des HG\_U133A-Microarrays waren 73 Gene (darunter die bekannten CTA XAGE1, PBK und ODF2) bei mindestens einem Sondensatz gleichzeitig in Hoden und

Ewinggewebe überexprimiert, die somit ebenfalls neuen CTA-Kandidaten entsprachen. Hier konnten 49 der 73 potentiellen neuen CTA in der SOURCE-Datenbank (Diehn et al. 2003) als im Hoden exprimiert bestätigt werden. Bei den möglichen neuen CTA mit Überexpression in Hoden und Ewingtumorgewebe in den Daten des HG\_U133A-Microarrays, die nach der SOURCE-Datenbank nicht im Hoden exprimiert waren, war noch 10 Mal eine Expression im Ovar ausgewiesen.

Es gab für beide Microarray-Datensätze eine Überschneidung von 102 Genen, die ein CTA-Expressionsprofil aufweisen und / oder deren Expression im Hoden bei SOURCE (Diehn et al. 2003) bestätigt werden konnte. Diese Gene wurden in den Tabellen A1 bis A4 (im Anhang) fett gedruckt dargestellt.

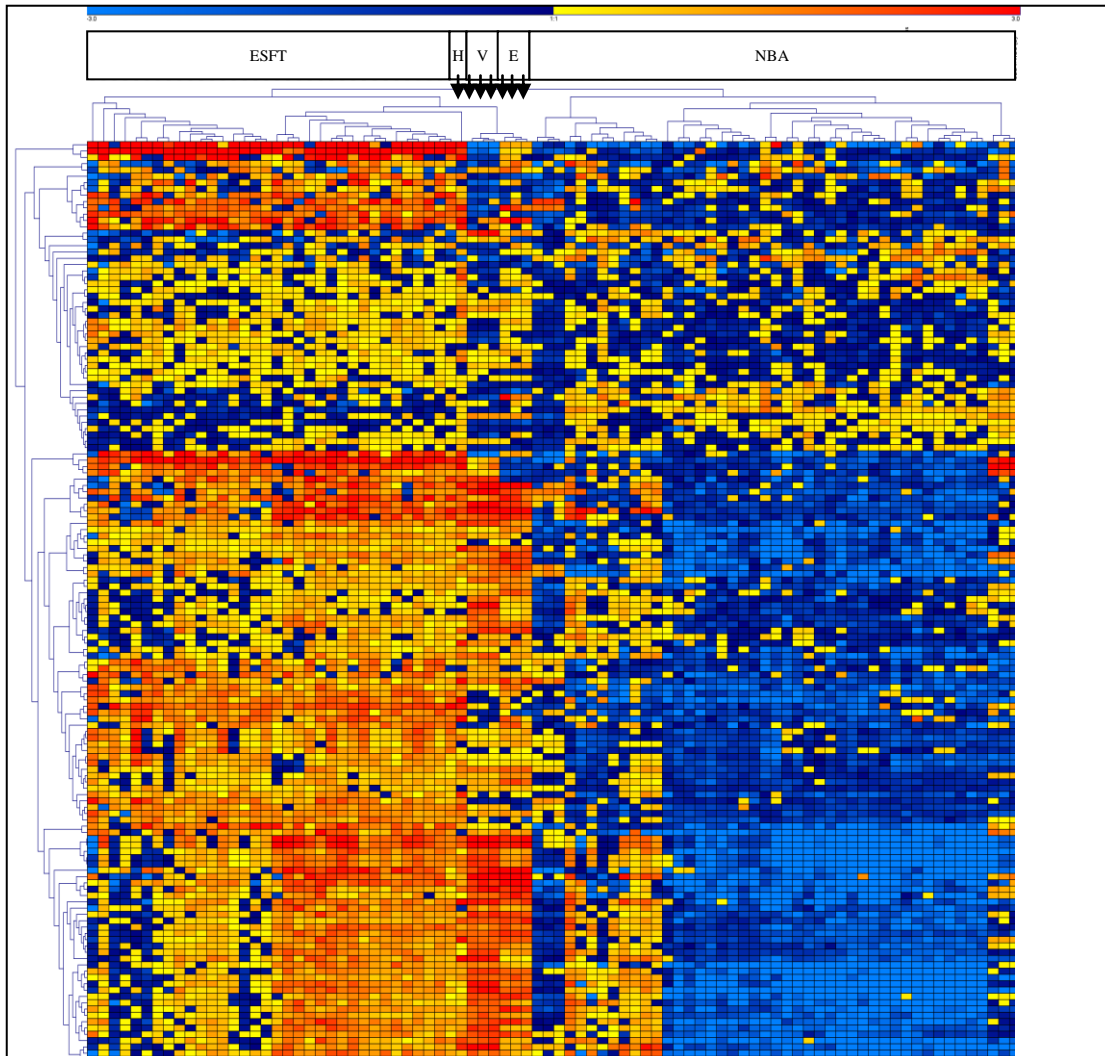
Im Folgenden wurden die Microarray-Datensätze der Ewingtumor-Proben jeweils auf eine Expression von beschriebenen CTA der CTA-Datenbank des Ludwig-Instituts für Krebsforschung hin untersucht. Die Datenbank auf der Homepage [www.cta.lncc.br](http://www.cta.lncc.br) vom Ludwig-Institut für Krebsforschung (Almeida et al. 2009) umfasst 136 beschriebene CTA, die in 83 Genfamilien eingeteilt werden.

Es ist in den Tabellen A5 und A6 (im Anhang) aufgeführt, in wie viel Prozent der Ewingtumor-Proben jeweils eine Expression eines beschriebenen CTA vorlag. In mehr als 80 % der Ewingtumor-Proben exprimiert fanden sich in den Daten des HG\_U133A-Microarrays PBK, TTK und ODF2, in 50 bis 80 % der Ewingtumor-Proben waren 8 weitere bekannte CTA, darunter XAGE1, exprimiert. Auf dem Microarray HG\_U133Plus2.0 fanden sich 24 bekannte CTA in über 80 % der Ewingtumor-Proben exprimiert, darunter auch die im ESFT beschriebenen CTA LIPI, TEX15, sowie erneut XAGE1. Weitere 10 bekannte CTA waren in 50 bis 80 % der Ewingtumor-Proben exprimiert.

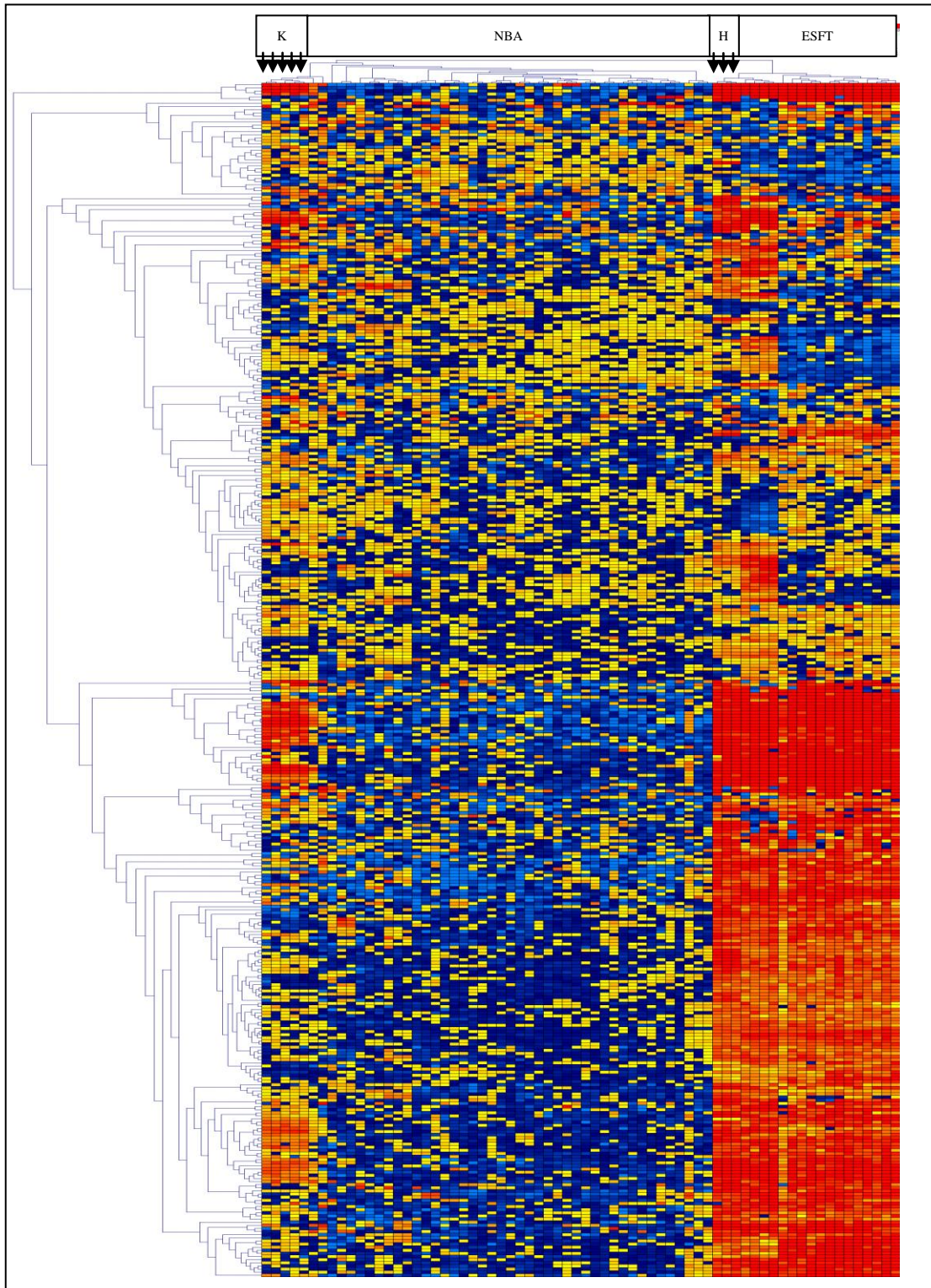
Insgesamt 8 bekannte CTA waren bei beiden Microarray-Datensätzen überlappend in über 50% der Ewingtumor-Proben exprimiert. Dazu zählen DDX43, JARID1B, LDHC, ODF2, PBK, SSX4, TTK und XAGE1. Dabei war LIPI auf dem HG\_U133A-Microarray nicht analysierbar, da keine entsprechenden Sondensätze vorhanden waren. Insgesamt waren in mehr als 30% der Ewingtumor-Proben 50 verschiedene CTA exprimiert bei mindestens einem Sondensatz in einem der beiden Microarraydatensätze.

In der hierarchischen Clusteranalyse (Abb. 1 und 2) unter Verwendung von Sondensätzen (Spalte 2 in Tabelle A3 und A4) der Gene mit Überexpression in ESFT und Hoden bildeten ESFT-Gewebe und Hoden und in Abb. 1 auch embryonale Stammzellen (ESC) und humane mikrovaskuläre Endothelzellen (HMEC) zusammen einen separaten Cluster und sind gelb-orange bis rot hinterlegt für moderate bis hohe Expressionswerte der entsprechenden Sondensätze gegenüber den anderen blau hinterlegten Geweben des *normal body atlas* (NBA). Dunkelblaue bis hellblaue Felder stehen für eine sehr geringe bzw. fehlende Expression eines Gens in einem bestimmten Gewebe. Senkrechte Spalten entsprechen verschiedenen Geweben. Waagerechte

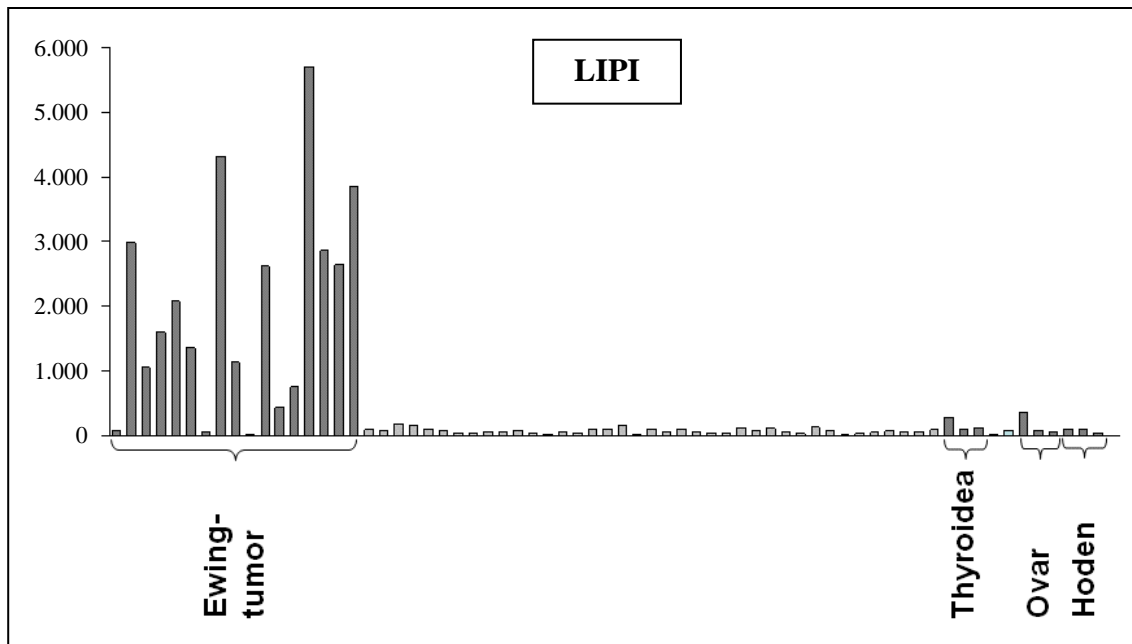
Zeilen entsprechen einem einzelnen Gen. Die ESFT-Proben zerfallen jeweils in zwei Cluster, wobei der eine ESFT-Cluster in Abb. 1 einen gemeinsamen Cluster-Baum mit Hoden, ESC und HMEC gegenüber dem anderen ESFT-Cluster bildet. In Abb. 2 bildet ein ESFT-Cluster einen gemeinsamen Cluster-Baum mit dem Hoden gegenüber dem anderen ESFT-Cluster. Wie in Abb. 2 zu sehen ist, zeigte sich eine erhöhte Expression für einige der ESFT/Hoden-assoziierten SONDENSÄTZE auch im Knochenmark.



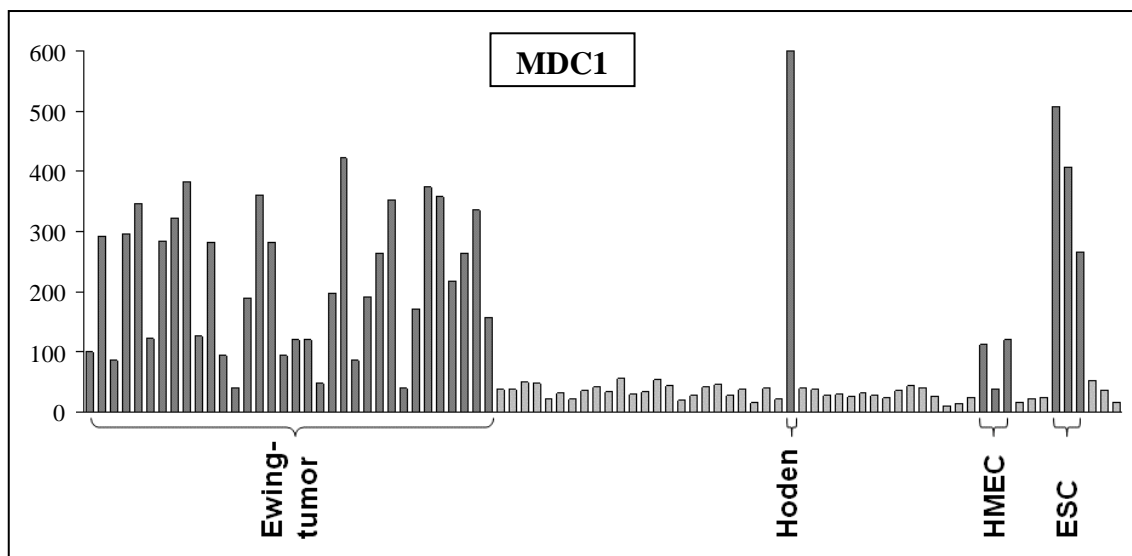
**Abb. 1. Heat map 1.** In Hoden und ESFT-Proben überexprimierte Gene (HG\_U133A-Datensätze der GEO-Datenbank; (Barrett und Edgar 2006) in den HG\_U133A-Microarray-Daten wurden mit dem Programm Genesis (Sturn et al. 2002) visualisiert. Die Gene wurden wie im Kapitel 2 „Material und Methoden“ beschrieben, hinsichtlich ihres CTA-typischen Expressionsmusters mit gleichzeitiger Überexpression der SONDENSÄTZE in Hoden und ESFT identifiziert. Waagerechte Zeilen entsprechen einem einzelnen SONDENSÄTZE, senkrechte Spalten einem Gewebe. Die Spalten der rechten Bildhälfte entsprechen Geweben des *normal body atlas* (NBA), die in der linken Hälfte den ESFT-Proben. Extra gekennzeichnet sind des Weiteren die Spalten für die Expressionsdaten im Hoden (H), in ESC (E) und HMEC (V). Gelb-orange bis rote Felder = moderate bis hohe Expressionswerte, dunkelblaue bis hellblaue Felder = sehr geringe bzw. fehlende Expression.



**Abb. 2. Heat map 2.** In Hoden und ESFT-Proben überexprimierte Gene (HG\_U133Plus2-Datensätze der GEO-Datenbank;(Barrett und Edgar 2006) wurden mit dem Programm Genesis (Sturn et al. 2002) visualisiert. Die Gene wurden, wie in Kapitel 2 „Material und Methoden“ beschrieben hinsichtlich ihrer Überexpression der Sondensätze in Hoden und ESFT identifiziert. Waagerechte Zeilen entsprechen einem einzelnen Sondensatz, senkrechte Spalten einem Gewebe. Die Spalten der linken Bildhälfte entsprechen Geweben des *normal body atlas* (NBA), die in der rechten Hälfte den ESFT-Proben. Extra gekennzeichnet sind des Weiteren die Spalten für die Expressionsdaten im Hoden (H) und im Knochenmark (K). Gelb-orange bis rote Felder = moderate bis hohe Expressionswerte, dunkelblaue bis hellblaue Felder = sehr geringe bzw. fehlende Expression.



**Abb. 3. Expressionsprofil von LIPI.** Es sind Signalintensitäten von Microarray-Expressionsdaten (HG\_U133Plus2.0-Datensätze der GEO-Datenbank; (Barrett und Edgar 2006) von LIPI in den verschiedenen Geweben und in ESFT dargestellt. Die sehr niedrigen Säulen ohne Beschriftung entsprechen Geweben des *normal body atlas* (NBA), in denen eine Expression demnach nicht anzunehmen wäre. Neben einer Überexpression im Ewingtumor fand sich eine geringe Expression in Ovar und Thyroidea.



**Abb. 4. CTA-Expressionsprofil von MDC1.** Es sind Signalintensitäten von Microarray-Expressionsdaten (HG\_U133A-Datensätze der GEO-Datenbank;(Barrett und Edgar 2006) von MDC1 in den verschiedenen Geweben dargestellt. Die sehr niedrigen Säulen ohne Beschriftung entsprechen Geweben des *normal body atlas* (NBA), in denen eine Expression demnach nicht anzunehmen wäre. Höhere Expression fand sich auch in HMEC und ESC.

Beispiele für Signalintensitäten von (potentiellen) CTA in den verwendeten Mikroarray-Datensätzen sind in Abb. 3 und 4. gezeigt. Es zeigte sich für LIPI (Abb. 3) eine Expression in über 80 % der Ewingtumor-Proben des HG\_U133Plus2.0-Microarrays. Auf dem HG\_U133A-Microarray fand sich kein entsprechender Sondensatz für LIPI. In den HG\_U133Plus2.0-

Datensätzen lag auch eine niedrige Expression in der Thyroidea vor. Im Hoden fand sich keine relevante Expression. Eine höhere Expression zeigte sich im Ovar.

Ein weiteres repräsentatives Gen mit CTA-typischer Expression war *Mediator of DNA damage checkpoint 1* (MDC1) (Abb. 4), das in den Ewingtumor-Biopsien überexprimiert war, sowie deutlich im Hoden. Niedrige Expression war in humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC) und Überexpression in embryonalen Stammzellen (ESC) zu beobachten.

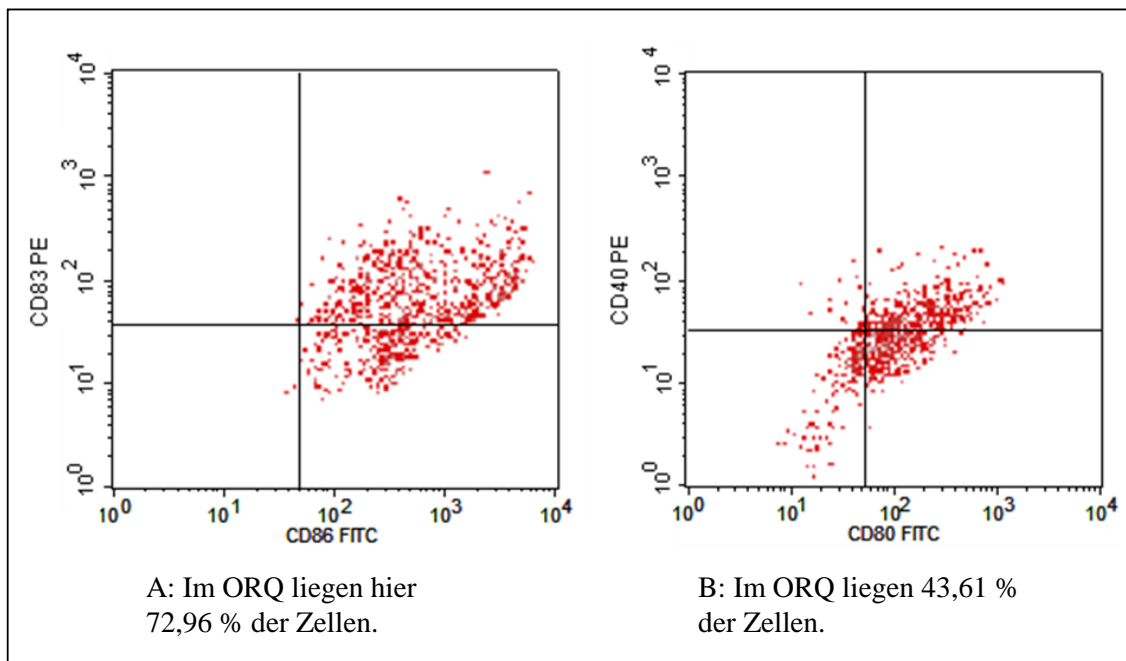
### **3.1.2 Expressionsanalyse EWS-ETS transgener MSC**

Es konnten 9 EWS-ERG-regulierte Gene mit 12 Sondensätzen und 24 EWS-FLI1 regulierte Gene mit 24 Sondensätzen gefunden werden, die nach den vorliegenden Ergebnissen bekannte oder mögliche neue CTA im ESFT sind. EWS-FLI1-reguliert waren beispielsweise die bekannten, hier in ESFT-Proben exprimierten CTA SPAG9 und PCM1 und EWS-ERG-reguliert der hier identifizierte neue CTA-Kandidat im ESFT IGF2BP3 (Tabelle A7 im Anhang). Doppelt reguliert war LGALS8 (Tabelle A7), das auch nach den Ergebnissen dieser Arbeit als möglicher neuer CTA-Kandidat im ESFT identifiziert wurde. Die Daten der übrigen doppelt regulierten Gene werden nicht gezeigt, da diese Gene nicht die in der Arbeit zu untersuchenden Kriterien einer hochspezifischen CTA-Expression im ESFT erfüllten. Zwischen den 1 % am deutlichsten regulierten Sondensätzen aus beiden Experimenten gab es eine Überlappung von 35 Sondensätzen, die durch beide Faktoren reguliert wurden, die aber nicht unbedingt ein CTA-Expressionsmuster aufwiesen. Weitere 37 einfach regulierte Sondensätze detektierten ein Gen als von einem Faktor reguliert, wobei ein anderer Sondensatz desselben Gens eine Regulation durch den anderen Faktor zeigte. Insgesamt lagen auf diese Weise 47 doppelt regulierte Gene vor.

## **3.2 Generierung ESFT-spezifischer CTL**

### **3.2.1 Phänotypische Identifizierung von DC**

Zunächst wurden die zur Generierung spezifischer T-Zellen verwendeten DC und T-Zell-Ausgangspopulationen phänotypisch charakterisiert. Da die phänotypische Identifizierung von DC ausschließlich über ein spezielles Expressionsmuster unspezifischer Marker erfolgt, wurden diese mittels FACScan analysiert. Die DC waren nach Exposition mit LPS- und INF $\gamma$ -Exposition zu ausgereiften CD11c<sup>+</sup>ven DC differenziert. Typischerweise fanden sich sowohl MHC-Klasse-I und -II-Moleküle als auch CD83 und die T-Zell-kostimulierenden Moleküle CD40, CD80 und CD86 (Abb. 5). Die DC entwickelten die typische Morphologie mit zytoplasmatischen Ausläufern. Die Expression von doppelt positiven Zellen für CD86 und CD83 verschiedener Spender rangierte zwischen 49,21 % und 72,96 %, sowie für doppelt positive Zellen für CD80 und CD40 zwischen 31,04 % und 43,61 %.



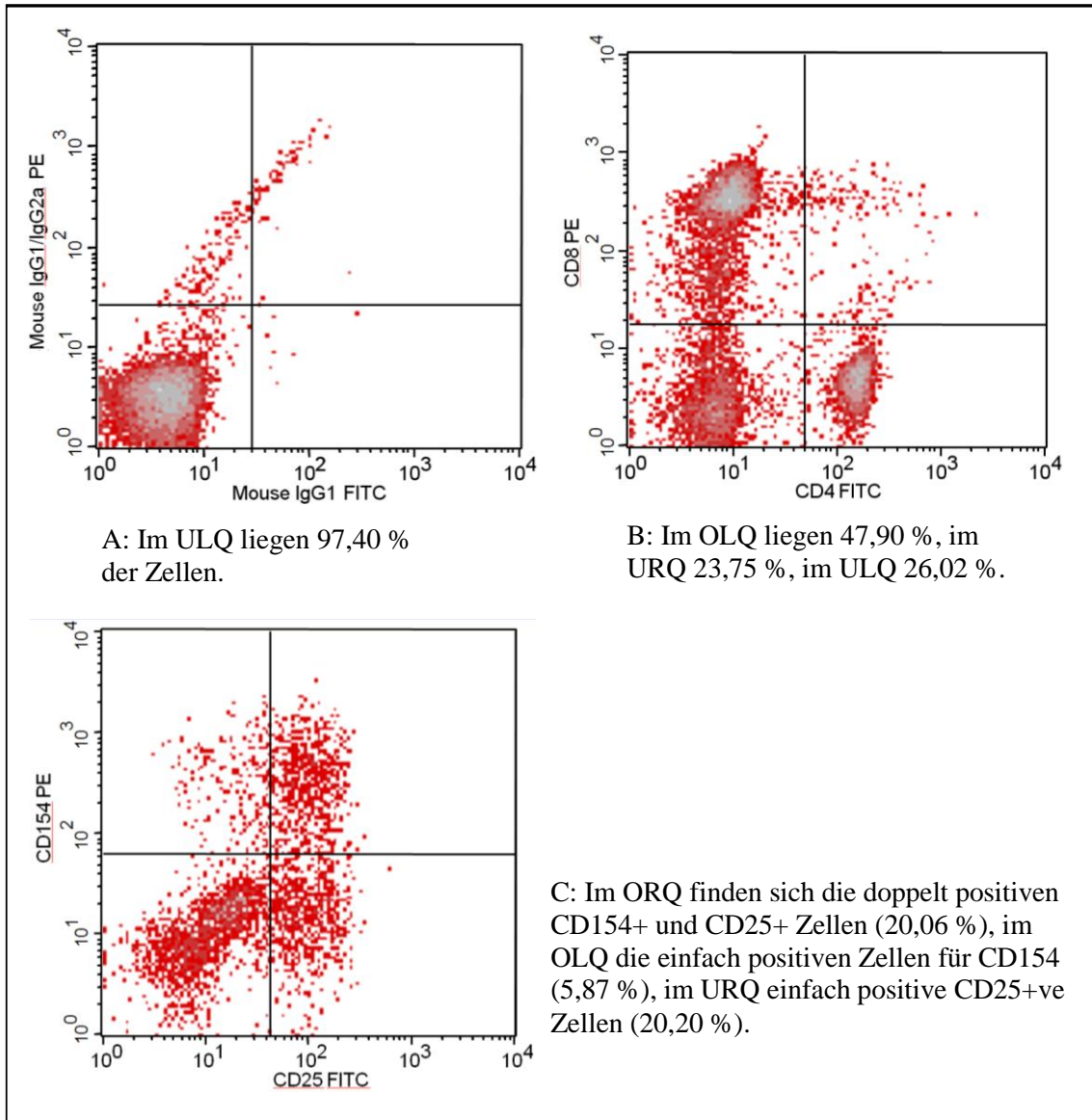
**Abb. 5. Durchflusszytometrie von DC.** Phänotypische Identifizierung von reifen DC, die gereift wurden, wie in Kapitel 2 „Material und Methoden“ beschrieben, und mit fluoreszierenden Antikörpern im Durchflusszytometer charakterisiert wurden. Gezeigt ist die Expression von CD86 und CD83 (Ergebnisse doppelt positiver Zellen verschiedener Spender rangierten zwischen 49,21 % und 72,96 %), sowie von CD80 und CD40 (doppelt positive Zellen verschiedener Spender rangierten zwischen 31,04 % und 43,61 %). Im ORQ lagen die doppelt positiven Zellen für CD86 und CD83 bzw. CD80 und CD40. ORQ = Oberer rechter Quadrant.

### 3.2.2 Phänotypische Charakterisierung der stimulierten T-Zellen

T-Zellen wurden entweder mithilfe von Tumorzell-Lysat oder Peptiden aus LIPI mithilfe von DC (siehe Kapitel 2 „Material und Methoden“) als APC stimuliert und nach der ersten Restimulation mit dem jeweiligen Antigen mithilfe von LCL als APC phänotypisch mittels Durchflusszytometrie charakterisiert. In Abb. 6 ist ein Beispiel einer durchflusszytometrischen Phänotypisierung gezeigt. Dabei hatte sich das initiale Verhältnis von CD8+ven Zellen zu CD4+ven Zellen von etwa zwei zu eins nicht wesentlich verändert. Es fand sich aber eine Expression von CD25, was der IL-2-Rezeptor- $\alpha$ -Kette entspricht, und eine Expression des kostimulatorischen CD154-Moleküls, das als CD40-Ligand auf aktivierten T-Zellen vorkommt. Die restimulierten Zellen proliferierten bis zum 4-fachen Wert ihrer Ausgangszahl und wurden weiter charakterisiert, sofern in mindestens einem Ansatz, eine 2-fache Proliferation erfolgt war (Daten nicht gezeigt). Doppelt positive Zellen für CD25 und CD154 rangierten bei sechs durchflusszytometrisch untersuchten Spendern, deren Zellen proliferiert waren, zwischen 6,03 % und 20,06 %. CTL des einen der sechs Spender zeigten im Elispot ESFT-spezifische Immunantwort. Die Ergebnisse bezüglich der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CTL dieses Spenders sind in Abb. 6 gezeigt mit 20,06 % doppelt positiven Zellen, welche mit SK-N-MC-Lysat geprimt worden waren. Die proliferierten Zellen der übrigen fünf untersuchten Spen-



der ohne eine relevante ESFT-spezifische Reaktion im Elispot oder LDH assay rangierten für doppelt positive Zellen zwischen 6,03 % und 13,47 %. Hierunter waren sowohl Zellen, welche mit SK-N-MC-Lysat oder A673-Lysat als auch solche, die mit den Peptiden aus LIPI geprimt worden waren. Die Zellen der zwei Spender, die im LDH assay ESFT-spezifisch reagierten, waren zuvor durchflusszytometrisch nicht charakterisiert worden.



**Abb. 6. Durchflusszytometrie von aktivierten T-Zellen.** Die hier gezeigten Zellen wurden mit DC nach Puls mit SK-N-MC-Lysat primärstimuliert, mit LCL nach Puls mit SK-N-MC-Lysat restimuliert und für den erfolgreichen Nachweis der T-Zell-Aktivierung im  $\text{INF}\gamma$ -Elispot eingesetzt. Gezeigt ist die Expression von CD8 und CD4 (B), CD25 und CD154 (C) sowie die Isotypenkontrollen (A). Im ORQ sind die doppelt positiven Zellen, im URQ und OLQ die jeweils einfach positiven Zellen dargestellt. OLQ = Oberer linker Quadrant, ORQ = Oberer rechter Quadrant, ULQ = Unterer linker Quadrant, URQ = Unterer rechter Quadrant.

### 3.2.3 IFN $\gamma$ -Elispot assay

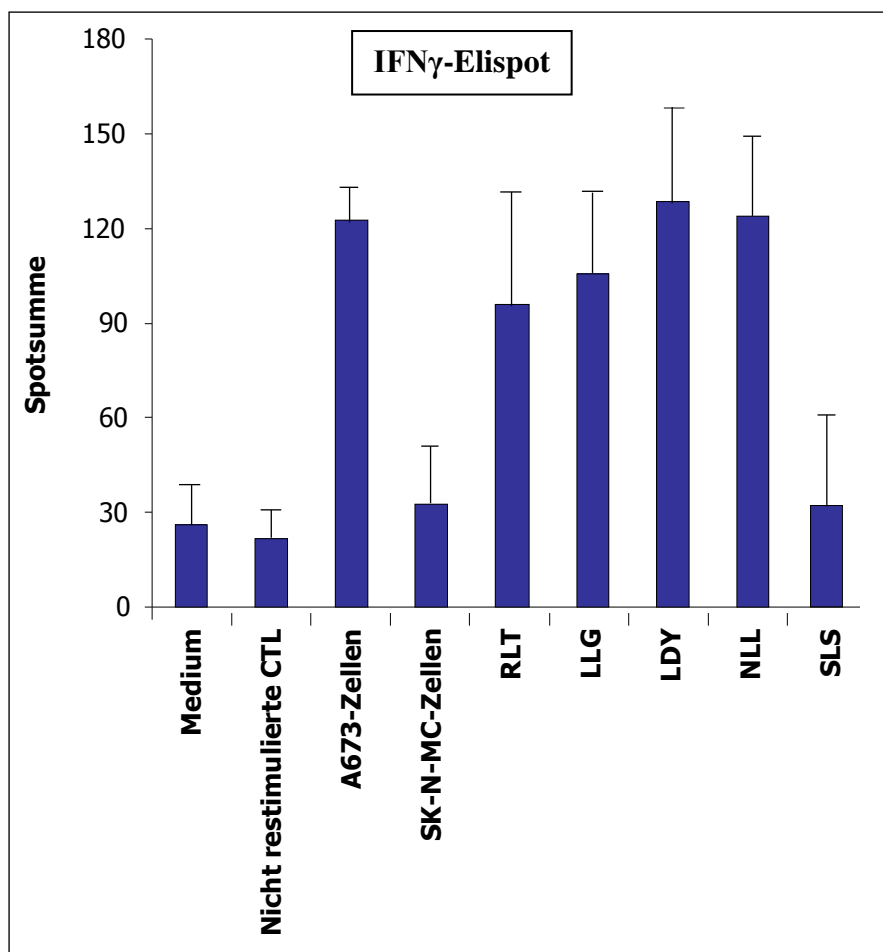
Bei 13 von 34 gesunden Spendern proliferierten die stimulierten Zellen so stark (mindestens um das 2-fache in mindestens einem Probenansatz eines Spenders), dass die Zellen dieser Spender weiter charakterisiert werden konnten. Es wurden 5 HLA-A2+ve Spender im Elispot und 8 HLA-A2+ve Spender im LDH assay, insgesamt 13 Spender, wie jeweils in den Methoden beschrieben, untersucht. Für den Elispot wurden nur T-Zellen, die mit SK-N-MC-Lysat geprimt waren, benutzt und für den LDH assay auch T-Zellen, die mit LIPI- oder Cyclin D1-Peptiden oder A673-Lysat geprimt waren. Insgesamt wurde nach diesem Ansatz versucht, T-Zellen von 11 von 34 Spendern für eine Elispot-Untersuchung zur Proliferation zu bringen und T-Zellen von 23 von 34 Spendern für den LDH assay. Somit wurden alle DC bei 34 Spendern mit SK-N-MC-Lysat gepulst, unabhängig davon, ob für den LDH assay oder Elispot vorgesehen. Bei 11 von 34 mit SK-N-MC-Lysat geprimten Spendern, kam es zur Proliferation bei den T-Zellen durch primen mit SK-N-MC-Lysat. Zellen von 23 von 34 Spendern wurden mit den Pepiden und jeweils beiden Lysaten geprimt und sollten im LDH assay charakterisiert werden im Falle einer Proliferation, zu welcher es in 8 Fällen von 23 so behandelten Spendern kam. Bei 4 Spendern von 23 mit A673-Lysat geprimten Zellen, war eine Proliferation zu erkennen, bei 8 Spendern von 23 mit LDY geprimten Zellen, bei 5 Spendern von 23 mit NLL geprimten Zellen und bei keinem Spender mit dem Peptid SLS. Bei den 8 der 23 mit Pepiden und beiden Lysaten geprimten Spendern mit T-Zell-Proliferation, die für den LDH assay vorgesehenen waren, kam es somit in Reaktion auf verschiedene der dargebotenen Antigene zu einer Zellvermehrung oder es kam in den übrigen 15 Fällen zu keiner Proliferation unabhängig vom dargebotenen Antigen. Dabei war bei insgesamt 3 von 13 Spendern, bei denen es zu einer Proliferation kam, eine Ewingtumor-spezifische Aktivierung der T-Zellen zu beobachten (23 %). In diesen Fällen proliferierten die Zellen bis zum 3 bis 4-fache ihres Ausgangswertes, bei Exposition mit den Epitopen, die zur spezifischen Immunantwort führten. Bei einem Spender wurde eine signifikante Ewingtumor-spezifische IFN $\gamma$ -Freisetzung im Elispot gemessen (Tabelle 7 und Abb. 7).

**Tabelle 7. Stimulationsindizes für LIPI-Peptide im Elispot.** Es wurden die Stimulationsindizes der fünf im Elispot untersuchten gesunden Spender errechnet als Verhältnis der IFN $\gamma$ -Freisetzung von SK-N-MC-Lysat spezifischen T-Zellen in Reaktion auf LIPI-Peptid beladene LCL zu der IFN $\gamma$ -Freisetzung von SK-N-MC-Lysat spezifischen T-Zellen, die während des Elislots nicht restimuliert wurden. Nur bei Spender A konnte signifikante Ewingtumor-spezifische IFN $\gamma$ -Freisetzung im Elispot gemessen werden für die Peptide LDY und NLL. Alle T-Zellen waren vor der Durchführung eines Elislots stets mit SK-N-MC-Lysat-gepulsten DC geprimt und einmal mit SK-N-MC-Lysat-gepulsten LCL restimuliert worden.

Peptid	Spender A	Spender B	Spender C	Spender D	Spender E
NLL	5,76	0,93	1,42	1,03	0,89
LDY	5,97	1,14	1,29	0,83	1,46
SLS	1,45	1,33	1,46	0,94	1,57

Bei zwei weiteren Spendern konnte eine Lyse von A673-Zellen durch aktivierte spezifische T-Zellen im Laktatdehydrogenaseassay (LDH assay) nachgewiesen werden (Tabelle 8 und Abb. 8). Bei den anderen Spendern zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse (Tabellen 7 und 8).

Im Elispot wurden zum einen lebende HLA-A2-ve SK-N-MC-Tumorzellen (Meuter et al. 2010) und HLA-A2+ve A673-Tumorzellen (Staege et al. 2004a) zur Restimulation verwendet (Abb. 7). Zum anderen dienten als APC im Elispot HLA-A2+ve LCL. Diese waren gepulst mit den Peptiden von LIPI (NLL, LDY und SLS) oder von CCND1 (RLT und LLG). Besonders hohe Spotsummen ergaben sich für T-Zellen, die im Elispot mit lebenden A673-Tumorzellen restimuliert wurden, nämlich mehr als 6-fach erhöhte Werte im Vergleich zu den Wells, in denen sich die selben T-Zellen ohne A673-Tumorzellen befanden ( $p = 0,01$ ).



**Abb.7: IFN $\gamma$ -Elispot.** Die CTL eines HLA-A2+ven Spenders (Spender A aus Tabelle 7) waren alle mit SK-N-MC-Lysat-gepulsten DC stimuliert und einmal mit SK-N-MC-Lysat-gepulsten HLA-A2+ven LCL restimuliert worden. So behandelte CTL, die während des Elispots kein 2. Mal restimuliert wurden, dienten auch als Kontrolle. Die IFN $\gamma$ -Freisetzung wurde im Elispot als Indikator für eine CTL-Aktivierung gemessen. Nicht signifikant erhöhte IFN $\gamma$ -Freisetzung lag für lebende HLA-A2-ve SK-N-MC-Zellen ( $p = 0,16$ ) als APC für die CTL vor. Nicht signifikant waren auch mit LIPI-Peptid SLS ( $p = 0,26$ ) beladene LCL als APC. Signifikant erhöht waren die Werte für CCND1-Peptide LLG ( $p = 0,02$ ) und RLT ( $p = 0,02$ ) und für LIPI-Peptide LDY ( $p = 0,03$ ) und NLL ( $p = 0,03$ ) und für lebende HLA-A2+ve A673-Zellen ( $p = 0,01$ ) im Vergleich zu während des Elispots nicht zum 2. Mal restimulierten CTL im Medium allein.

Auch bei den LCL als APC, die die Peptide aus CCND1 LLG ( $p = 0,02$ ) und RLT ( $p = 0,02$ ) präsentierten, waren rund 5-fach erhöhte Spotsummen zu beobachten. Ähnlich hohe Werte zeigten auch T-Zellen, die mit LIPI-Peptiden LDY ( $p = 0,03$ ) oder NLL ( $p = 0,03$ ) beladenen LCL stimuliert wurden (mehr als 6-fach erhöhte Werte) im Vergleich zu den CTL, die im Elispot nicht zum 2. Mal restimuliert wurden. Keine signifikant erhöhten Werte waren bei den CTL zu beobachten, die mit den lebenden HLA-A2-ven SK-N-MC-Tumorzellen ( $p = 0,16$ ) und mit dem LIPI-Peptid SLS ( $p = 0,26$ ) gepulsten LCL restimuliert wurden.

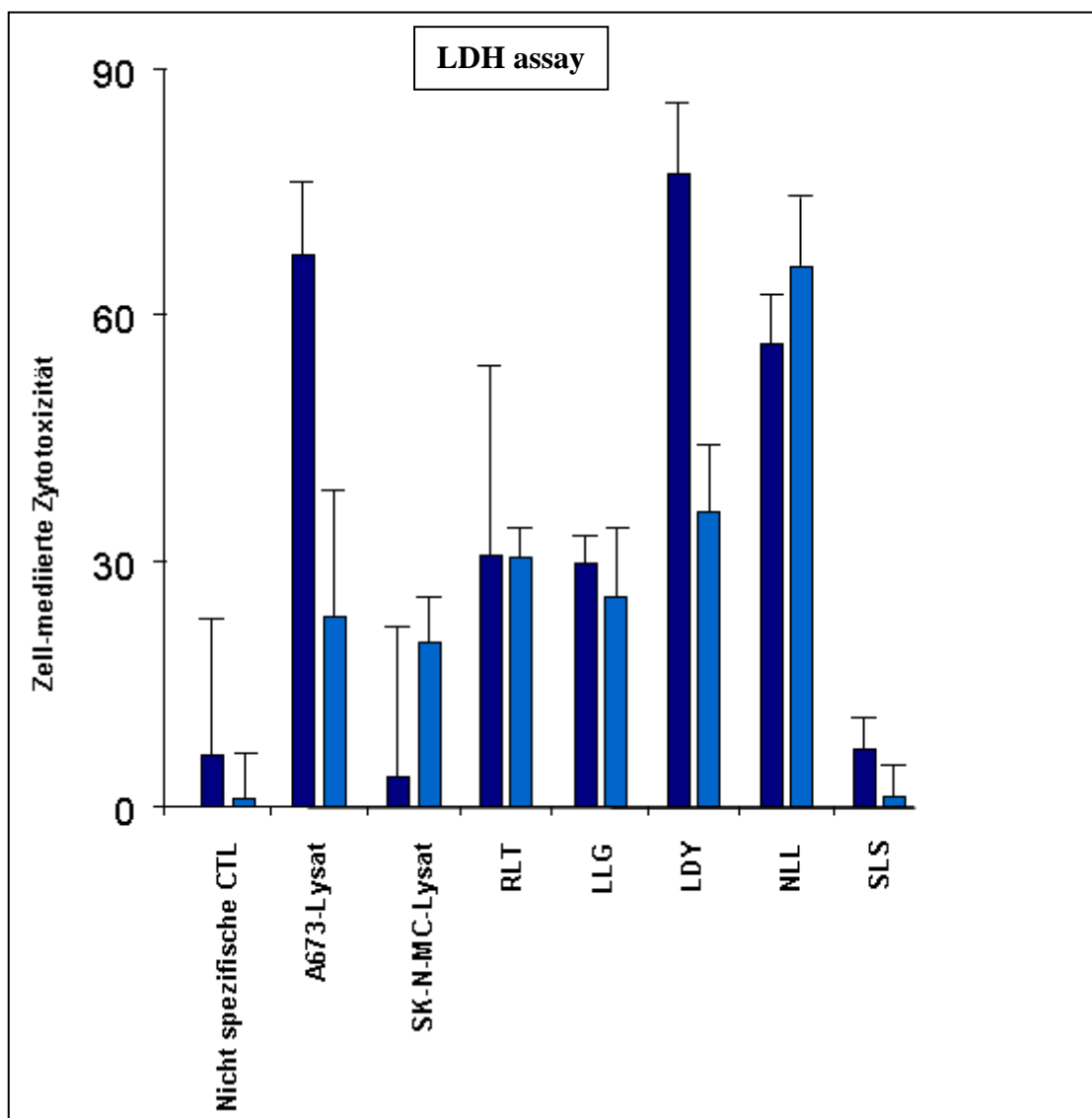
### 3.2.4 Nachweis der Zell-medierten Zytotoxizität im Laktatdehydrogenaseassay (LDH assay)

Im LDH assay diente die Menge der freigesetzten zytoplasmatischen Laktatdehydrogenase (LDH) als Maß für die Zell-medierte Zytotoxizität. LDH wird bei der Lyse von Zellen freigesetzt. Die T-Zellen wurden vor Durchführung der LDH assays jeweils mit Tumorzelllysate, LIPI-Peptiden oder CCND1-Peptiden und DC stimuliert und mit LCL und entsprechendem Antigen restimuliert. Statistisch signifikant erhöhte LDH-Freisetzung in Reaktion auf lebende HLA-A2+ve A673-Tumorzellen (Staege et al. 2004a) lag bei Spender 5 (Tabelle 8 und Abb. 8) für die mit A673-Lysat ( $p = 0,02$ ) geprimten und für die mit den LIPI-Peptiden LDY ( $p = 0,01$ ) und NLL ( $p = 0,03$ ) sowie dem CCND1-Peptid RLT ( $p = 0,03$ ) geprimten T-Zellen vor. Die mit dem anderen LIPI-Peptid SLS ( $p = 0,5$ ) sowie dem CCND1-Peptid LLG ( $p = 0,08$ ) oder mit SK-NM-C-Lysat ( $p = 0,31$ ) geprimten T-Zellen führten alle zu statistisch nicht signifikanter Zell-mediierter Zytotoxizität in Reaktion auf A673-Zellen im Vergleich zu den T-Zellen, die mit nicht beladenen DC geprimt und nicht beladenen LCL restimuliert wurden.

**Tabelle 8. Prozentuale Zell-medierte Zytotoxizität von LIPI-Peptid spezifischen CTL und von nicht spezifischen CTL.** Die prozentuale Zell-medierte Zytotoxizität für alle acht im LDH assay untersuchten gesunden Spender wurde aus den Rohdaten nach den Angaben des Herstellers für LIPI Peptid-spezifische CTL und nicht spezifische CTL berechnet. Für Spender 5 und 6 sind die p-Werte für NLL und LDY  $< 0,05$  als Hinweis auf signifikant erhöhte prozentuale Zell-medierte Zytotoxizität der NLL- und LDY-spezifischen CTL gegenüber den gleich behandelten nicht spezifischen CTL in Reaktion auf lebende A673-Tumorzellen. Die Ergebnisse der anderen Spender zeigten keine signifikant höhere prozentuale Zell-medierte Zytotoxizität der LIPI-Peptid spezifischen CTL ( $p > 0,05$ ). Mit LIPI-Peptid SLS geprimte CTL wiesen bei keinem der Spender eine signifikant erhöhte LDH-Freisetzung auf ( $p > 0,05$ ).

Peptid	Spender 1	Spender 2	Spender 3	Spender 4	Spender 5	Spender 6	Spender 7	Spender 8
NLL	1,86	2,98	3,19	4,19	56,44	65,86	3,51	8,01
LDY	2,36	1,68	7,81	1,53	77,17	36,03	2,16	5,44
SLS	1,86	0,65	1,83	2,29	7,12	1,43	7,31	6,92
kein Peptid	7,78	3,16	1,37	5,46	6,31	0,94	5,82	7,28

Für Spender 6 (Tabelle 8 und Abb. 8) war statistisch nicht signifikant erhöhte LDH-Freisetzung in Reaktion auf lebende A673-Tumorzellen wieder für die mit LIPI-Peptid SLS ( $p = 0,46$ ) geprimten und restimulierten T-Zellen vorhanden. Statistische Signifikanz in der Zell-medierten Zytotoxizität lag vor für die mit A673-Lysat ( $p = 0,04$ ) geprimten CTL und für die LIPI-Peptid LDY- ( $p = 0,004$ ) und NLL-spezifischen CTL ( $p = 0,003$ ) sowie für die CCND1-Peptid LLG- ( $p = 0,003$ ) und RLT- ( $p = 0,01$ ) spezifischen CTL und für die SK-N-MC-Lysat spezifischen CTL ( $p = 0,005$ ). Bei beiden Spendern war eine Überschneidung im LDH assay für die LIPI-Peptide LDY und NLL, das CCND1-Peptid RLT und für A673-Lysat spezifischen CTL mit signifikanter Zell-mediierter Zytotoxizität gegen A673-Zellen zu beobachten.



**Abb. 8: LDH assay.** Naive CD8<sup>+</sup> angereicherte PBMC zweier verschiedener HLA-A2<sup>+</sup>ver Spender wurden mit DC geprimt, die gepulst waren mit A673-Lysat, SK-N-MC-Lysat, den CCND1-Peptiden RLT oder LLG oder mit den LIPI-Peptiden NLL, LDY oder SLS. Nach zwei Restimulationen mit LCL als APC für das jeweilige Antigen erfolgte die Messung der Zell-medierten Zytotoxizität der CTL gegenüber lebenden HLA-A2<sup>+</sup>ven A673-Tumorzellen mittels LDH assay. Als Negativkontrolle dienten CTL, die mit nicht gepulsten DC geprimt wurden.

Zwischen Elispot und LDH assay gab es eine Überschneidung bei allen 3 Spendern mit einer induzierbaren Immunantwort durch CCND1-Peptid RLT und LIPI-Peptid LDY und NLL spezifische CTL. Eine spezifische Immunantwort durch LIPI-Peptid SLS spezifische CTL konnte bei keinem der Spender erzielt werden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Microarrays

Oligonukleotid-Microarrays messen die Bindung von Gen-spezifischen Oligonukleotid-Sonden an die zu untersuchenden, fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide einer Probe. Dafür wird jedes Gen durch mindestens einen SONDENSATZ sich überlappenden Sonden repräsentiert, da einzelne 25-mer-Oligonukleotide nicht zur eindeutigen Detektion eines Gens genügen. Mehrere verschiedene SONDENSATZE können dabei für die Detektion eines Gens anhand von Teilsequenzen ausgelegt sein. Unterschiede zwischen den detektierten Expressionsdaten verschiedener SONDENSATZE, die ein Gen detektieren sollten, können durch unterschiedliche Splicevarianten bedingt sein, die von einem SONDENSATZ erkannt werden, von einem anderen nicht. Die Annotation der SONDENSATZE von Affymetrix-Microarrays gibt Auskunft über deren Spezifität. SONDENSATZE, die mit der Annotation `_at` gekennzeichnet sind, gelten als spezifischer für ein Gen als solche, die mit `_s_at` oder `_x_at` gekennzeichnet sind (Dallas et al. 2005). Die Annotationen `_x_at` und `_s_at` können eher zu Kreuzhybridisierung zwischen verschiedenen Genfamilien und Splicevarianten führen, mit geringeren Leveln der Spezifität für die mRNA-Detektion. Durch die unterschiedliche Qualität von SONDENSATZEN eines Gens, lassen sich somit auch die hier aufgetretenen Unterschiede der Expressionsdaten zu einem Gen in den Microarray-Datensätzen erklären.

Die unterschiedliche Anzahl und Art der überexprimierten Gene, die in den Datensätzen beider Microarrays gefunden wurden, ist natürlich auch durch die viel geringere Zahl von 22.216 SONDENSATZEN in den Datensätzen des Microarrays HG\_U133A, verglichen mit 54.614 SONDENSATZEN des HG\_U133Plus2.0-Microarrays, begründet. Des Weiteren sind die Unterschiede mit der Art und der Anzahl der Referenzgewebe zu erklären. In den Datensätzen des Microarrays HG\_U133A befanden sich 31 verschiedene Normalgewebe als Referenz, darunter Koronararterie und unterschiedliche neuronale Gewebe sowie Haut. Die verwendeten Datensätze des Microarrays HG\_U133Plus2.0 umfassten nur 19 Referenzgewebe, darunter waren zahlreiche neuronale Gewebe, jedoch keine Gewebe endothelialer Herkunft oder Haut. Da der ESFT in Genexpressionsprofilen eine starke Ähnlichkeit nicht nur zu neuronalen Geweben, sondern auch zu Endothel (Staege et al. 2004a) aufweist, ist ein Vergleich auch mit diesen ähnlichen Geweben als Referenz sinnvoll, damit die Analyse nicht durch Gene gestört wird, die auch für die eventuelle Progenitorzelle des ESFT typisch sind, aber nicht ausschließlich in den malignen

Zellen exprimiert werden. Aus diesen Gründen sind die überexprimierten Gene in den Datensätzen des Microarrays HG\_U133A als spezifischer für den ESFT anzusehen.

Es gibt Publikationen, die davon ausgehen, dass DNA-Microarrays nur eine geringe Sensitivität haben, die es erlaubt, näherungsweise 30 % der Transkripte zu erfassen, darunter nur solche mit starker oder mittlerer Expression (Evans et al. 2002). Andere Autoren kommen jedoch zu dem Ergebnis, dass eine starke Korrelation zwischen quantitativer RT-PCR und Microarraydaten besteht, wenn identische Transkripte mit beiden Methoden gesucht werden (Dallas et al. 2005). Zudem gibt es wie erwähnt zahlreiche Arbeiten, die charakteristische Expressionsprofile von Tumoren im Vergleich zu anderen Geweben aufdeckten (Staege et al. 2003b; Staege et al. 2004b; Baird et al. 2005; Staege et al. 2008) und es konnten auch Patientengruppen, deren Prognose mit bestimmten Microarray-Expressionsmustern einhergeht, definiert werden (Beer et al. 2002; Yeoh et al. 2002). Die mittels Microarray-Technik hier identifizierten neuen CTA-Kandidaten könnten neben der möglichen Immuntherapie dazu dienen, diagnostische Kriterien zu verbessern und prognostische Aussagen zu treffen. So ist eine Überexpression des potentiellen CTA EZH2 mit einer schlechten Prognose für Prostata- und Brustkrebs assoziiert (Varambally et al. 2002).

Nachteile einer routinemäßigen Anwendung von DNA-Microarrays im klinischen Alltag sind hohe Kosten, relativ hohe Mengen diagnostischen Materials und Ansprüche an dessen Qualität. Deshalb liegen die Aufgaben von Microarray-Analysen eher in der Identifikation spezifischer Tumor-assoziiertes Gene, die therapeutisch, diagnostisch oder prognostisch wichtig sind und routinemäßig mit anderen Verfahren nachgewiesen werden müssten.

Zusätzlich zur Überexpression im Hoden können CTA RNA-Transkripte auf niedrigem Niveau in sehr wenigen anderen Normalgeweben durchaus aufweisen, ohne dass dies relevante Auswirkung auf das immunogene Potential des CTA haben muss. Meistens handelt es sich um Expressionswerte, die weniger als 1 % des Werts im Hoden ausmachen (Caballero und Chen 2009). So wird beispielsweise XAGE1, für das eine humorale und zelluläre Immunogenität bekannt ist (Morishita et al. 2007; Sato et al. 2007; Shimono et al. 2007; Kikuchi et al. 2008; Zhou et al. 2008), als in 5 nicht-gametogenen Geweben differentiell exprimiertes CTA beschrieben (Scanlan et al. 2004). Es bleibt zudem unklar, ob mRNA-Expression auf niedrigem Niveau mit signifikanten Mengen des Proteins korrespondiert und ob immunologisch relevante MHC-Peptid-Komplexe in Normalgeweben vorhanden sind. Niedrige Expressionswerte in nicht-gametogenen Geweben von CTA-Kandidaten sollten auf der RNA-Ebene mittels PCR oder *northern blotting* und gegebenenfalls auf der MHC-Peptid-Komplex-Ebene validiert werden. Denkberg und Mitarbeiter (Denkberg et al. 2002) führten eine Methode ein, mit der MHC/CTA-Peptid-Komplexe direkt visualisiert werden können, die hier anwendbar wäre. Andere Möglichkeiten wären die der Immunhistochemie oder der Versuch, direkt zelluläre Immunogenität nachzuweisen.

## 4.2 CTA in der Onkogenese und Gametogenese

Maligne Zellen teilen mit Keimzellen verschiedene Eigenschaften, die wichtige Aspekte für die maligne Potenz eines Tumors darstellen können. Dazu gehören der undifferenzierte Phänotyp, die Implantation des Trophoblasten einerseits und die Invasivität der entarteten Zelle andererseits, die Migration der primordialen Keimzelle und die metastatische Kapazität der neoplastischen Zelle, sowie die Meiose der Spermatozyten einerseits und die Aneuploidie des Tumors andererseits. Weitere gemeinsame Eigenschaften der Keimzelle und der malignen Zelle sind die Immortalität der primordialen Keimzelle und der transformierten Tumorstammzelle, die Immunevasion, die mögliche Induktion von Angiogenese, globale Hypomethylierung, regionale Hypermethylierung, manchmal die Produktion von humanem Choriongonadotropin und die häufige spezifische CTA-Expression (Simpson et al. 2005). Der letzte Aspekt der selektiven CTA-Expression in Tumorzellen und Keimzellen spricht für die Beteiligung der CTA an den eben aufgezählten Eigenschaften, die Keimzellen und transformierte Tumorstammzellen teilen. Auf dem X-Chromosom kodierte CTA werden mittels immunhistologischer Marker ausschließlich in Tumorstammzellen (Simpson et al. 2005) beobachtet. Für Non-X-CTA gibt es keine äquivalenten Untersuchungen. Für CTA wurde weiterhin eine Expression in physiologischen humanen MSC und eine Expression während der Embryogenese beschrieben (Costa et al. 2007), wobei auch hier in den Microarray-Analysen für einige CTA eine niedrige bis moderate Expression in MSC vorhanden war und eine höhere Expression in HMEC und ESC. HMEC sind wichtig für die Angiogenese, die physiologisch nur in der Embryogenese, in fetalem Gewebe und im adulten Organismus in zyklischen Prozessen des Ovars, der Placenta oder der laktierenden Mamma vorkommt. Alle anderen Formen der Angiogenese finden sich nur in pathologischen Prozessen wieder (Kaessmeyer und Plendl 2009), sodass die bevorzugte Expression der CTA-Kandidaten auch in HMEC und ESC ebenfalls für eine wesentliche Funktion der CTA an der malignen Transformation und am Erhalt des undifferenzierten Stammzellcharakters der ESFT-Zellen spricht. Es wird angenommen, dass die Subpopulation der Krebsstammzellen sich aus normalen, genetisch defekten Stammzellen entwickelt. Dabei bewahren einige charakteristische Gene den Stammzell-Charakter einerseits in physiologischen Stammzellen und werden andererseits aberrant in der Tumorstammzell-Subpopulation exprimiert. Tumorstammzellen weisen oft therapieresistente Eigenschaften auf und sind die treibende Kraft für Fortbestehen und Progression des Tumors (Suva et al. 2009), sodass sie auch als hauptverantwortlich für Rezidiverkrankungen angesehen werden. Die X-CTA-exprimierenden Tumorstammzellen sollen eine erhöhte Resistenz gegenüber konventionellen Therapiestrategien aufweisen (Sparmann und van Lohuizen 2006), wobei ein großer Anteil der bisher gefundenen CTA auf dem X-Chromosom kodiert wird. In Tumorstammzellen exprimierte CTA als therapeutische Zielstruktur zu wählen, könnte demnach den Pool von Ewingtumor-Stammzellen erschöpfen und so den aggressiven Phänotyp des Ewingtumors aufheben. Suva et al. 2009 wie-



sen im Mausmodell für den Ewingtumor nach, dass ein Überleben des Tumors ohne Tumorstammzellen unmöglich ist. Ein Fortbestehen eines Ewing-Xenotransplantats in Mäusen war von der Anwesenheit von CD133+ven Ewingtumorstammzellen abhängig. In der vorliegenden Arbeit als mögliche neue CTA identifizierte Gene, die als wesentlich für den Erhalt der Stammzell-ähnlichen und gametogenen Eigenschaften in neoplastischen Geweben gelten, sind beispielsweise EZH2 (*enhancer of zeste homolog 2*) (Richter et al. 2009), NANOG (*homeobox transcription factor Nanog*), aber auch MBD1 (*methyl-CpG-binding protein*) (Sakamoto et al. 2007) und die neuen, auf dem X-Chromosom kodierten CTA-Kandidaten. Letztere sind in den Tabellen A2 bis A4 (im Anhang) mit einem + gekennzeichnet.

Bei der Nutzung von CTA wird immer wieder das Risiko einer Autoimmunreaktion für normale adulte Stammzellen erwähnt, in denen CTA eventuell niedrig exprimiert sind. In verschiedenen klinischen Anwendungen konnte bisher jedoch keine signifikante Toxizität festgestellt werden (Geiger et al. 2001; Ridgway 2003; Suminoe et al. 2009).

### **4.3 Bekannte und potentielle CTA im ESFT**

Der große Anteil von 50 der 136 bekannten CTA (Almeida et al. 2009), die möglicherweise in mehr als 30 % der hier untersuchten ESFT-Proben exprimiert werden, spricht für den sehr malignen Phänotyp des ESFT. Eine hohe Frequenz von Expression verschiedener CTA korreliert mit einer schlechten Prognose. Zudem ist bekannt, dass mehrere CTA sehr häufig in einem Tumor simultan exprimiert werden (Caballero und Chen 2009).

Bekannte CTA, die das ihnen eigene Expressionsprofil in den Microarray-Analysen aufwiesen, d. h. eine Überexpression in Hoden und ESFT gleichzeitig, waren SSX1, SSX2, SSX4, SSX7, SSX9, SSX4B, SSX3 und TTK, SYCP1, TEX15, OIP5, XAGE1, PBK, CDCA1, CEP55, PRAME, ODF2, wobei bisher nur XAGE1 (Brinkmann et al. 1999) und TEX15 (Foell et al. 2008) als CTA im ESFT beschrieben sind. LIPI war in den Analysen der Arbeit nur im ESFT überexprimiert und nicht im Hoden, wobei dieses Microarray-Expressionsmuster von LIPI, trotz Nachweises von LIPI im Hoden mittels anderer Methoden wie PCR, auch von anderen Autoren beobachtet wurde (Foell et al. 2008, Staeger et al. 2004b). Auch berichten Hofmann und Mitarbeiter (Hofmann et al. 2008) von dem Auftreten dieses Sachverhalts für andere CTA.

Zahlreiche weitere Gene wurden hier erstmals mit einem CTA-Expressionsprofil (Überexpression in Hoden und ESFT) in Zusammenhang gebracht (Abb. 1 und 2, Tabelle A3 und A4 im Anhang). Darunter sind einige Gene, die von Staeger und Mitarbeitern (Staeger et al. 2004a) als hochspezifisch für den ESFT im Vergleich zu Normalgeweben in Microarray-Analysen klassifiziert werden konnten. Diese hochspezifischen Gene konnten auch mittels quantitativer und konventioneller RT-PCR im ESFT nachgewiesen werden (Staeger et al. 2004b). Ein CTA-Expressionsprofil dieser ESFT-spezifischen Gene konnte in der vorliegenden Arbeit für RNF141, EZH2, DDK2, CCK und PAPP A gefunden werden. Die Gene mit CTA-typischer

Überexpression in Hoden und ESFT, dargestellt als *heat maps* (Abb. 1 und 2) lassen die ESFT-Gewebe in zwei Cluster zerfallen. Der eine der beiden ESFT-Cluster in Abb. 1 bildet einen gemeinsamen Cluster mit Hoden, ESC und HMEC gegenüber dem anderen ESFT-Cluster und in Abb. 2 bildet einer der beiden ESFT-Cluster einen gemeinsamen Cluster mit dem Hoden gegenüber dem anderen ESFT-Cluster. Es ist daher davon auszugehen, dass bestimmte ESFT-Proben eine stärkere Stammzellsignatur aufweisen als andere. Diese Tatsache könnte auch prognostische Bedeutung haben, was in künftigen Untersuchungen zu erforschen wäre.

#### **4.3.1 Für das Überleben von Tumorzellen essentielle Signalwege von CTA**

Ein Antigenverlust bei der Nutzung von CTA als therapeutische Zielstruktur ist relativ unwahrscheinlich, wenn diese entscheidenden Anteil am aggressiven Phänotyp haben.

Eine Suche bei SOURCE (Diehn et al. 2003) nach zellbiologischen Funktionen der hier im ESFT identifizierten, bekannten CTA der CTA-Datenbank (Almeida et al. 2009) des Ludwig-Instituts für Krebsforschung, die in über 30 % der ESFT-Proben exprimiert waren, ergab u. a. folgende bekannte Funktionen: Am häufigsten regulierten die Gene Transkription (14-mal) und Zellzyklus (11-mal). Zwei Gene waren an der Formation des Zytoskeletts beteiligt und jeweils ein Gen am WNT-Signalweg, Apoptose, oxidativem Stress, Insulinsignalweg und Axonwachstum. Diese zellbiologischen Funktionen korrelieren alle mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Chemotherapie oder mit einer erhöhten Metastasierungsfähigkeit im ESFT (Schaefer et al. 2008). Ein Gen zeigte eine Beteiligung an der Meiose. 12 Gene waren in Spermatozyten oder Spermatiden exprimiert, ein Gen auf dem X-Chromosom in Spermatogonien. Dieses Expressionsmuster während der Meiose, in Spermatozyten und während der Spermatogonienendifferenzierung ist charakteristisch für CTA (Simpson et al. 2005).

Beispielhafte Signalwege, an denen in dieser Arbeit erstmals aufgrund ihres Expressionsprofils so benannte CTA-Kandidaten beteiligt sind, überschneiden sich mit denen schon bekannter CTA, die in dieser Arbeit im ESFT gefunden wurden. Bis auf eine Beteiligung in der Meiose und an der DNA-Reparatur gehen die beschriebenen, hier gezeigten Signalwege (Tabelle A8 im Anhang) wiederum mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Chemotherapie oder mit einer erhöhten Metastasierungsfähigkeit im ESFT einher (Schaefer et al. 2008). Die Deregulierung des WNT-Signalwegs ist zudem mit der Entwicklung verschiedener Neoplasien assoziiert, wobei WNT im Ewingtumor als neuroektodermaler Differenzierungsmarker hochreguliert ist (Baird et al. 2005; Sparmann und van Lohuizen 2006). In den folgenden Abschnitten wird auf einige CTA-Kandidaten eingegangen, deren essentielle Funktion in der malignen Transformation beschrieben wurde.

#### **4.3.2 NR0B1 (DAX1)**

Der neue CTA-Kandidat DAX1 alias NR0B1 (*Nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1*) gehört nach Kauer (Kauer et al. 2009) zu den Top 20 EWS-FLI1 regulierten Genen. Damit

erscheint es sehr spezifisch für den ESFT zu sein. 10 % der Gene, die durch EWS-FLI-1 reguliert werden, sollen ihrerseits DAX1 Zielgene sein. Jedoch ließ sich eine Regulation durch EWS-ETS in den Ergebnissen hier nicht bestätigen.

Mit den in dieser Arbeit gewonnenen Daten konnte jedoch ein CTA-Expressionsmuster von NR0B1 in Ewingtumorgewebe bestätigt werden. Bei Hofmann et al. 2008 wurde NR0B1 erstmals als neuer CTA-Kandidat auf dem X-Chromosom angeführt, wobei auch andere Autoren (Lalli und Sassone-Corsi 2003) eine selektive Hodenexpression fanden. Nach einem kürzlich publizierten Versuch (Garcia-Aragoncillo et al. 2008) führt der Einsatz von siRNA gegen NR0B1 und sein Protein in einer Ewingtumor-Zelllinie zu keiner Verringerung der EWS-FLI1-Expression, aber zum Wachstumsstillstand der Tumorzellen. NR0B1 hat demnach keinen Einfluss auf die Tumorzelltransformation, sondern ist hauptverantwortlich für die Proliferation (Garcia-Aragoncillo et al. 2008).

NR0B1 wird auch in anderen Karzinomen hochreguliert, z. B. im Prostatakarzinom (Nakamura et al. 2009), im Ovarialkarzinom (Abd-Elaziz et al. 2005), im adrenokortikalen Karzinom (Kaneko et al. 2008) und im Adenokarzinom der Lunge (Seo et al. 2007). Aufgrund seiner selektiven Expression und seiner wichtigen Rolle für die Proliferation des ESFT und seiner breiten Expression in anderen Karzinomen wird NR0B1 hier als neuer und therapeutisch nutzbarer CTA-Kandidat bestätigt.

#### **4.3.3 EZH2**

EZH2 (*enhancer of zeste homolog 2*) ist laut Literaturangaben in mehreren Tumoren heraufreguliert, so z. B. in verschiedenen Lymphomen, Blasenkrebs, Kolonkarzinom, Melanom (Sparmann und van Lohuizen 2006), Leberkrebs (Sasaki et al. 2008; Yonemitsu et al. 2009), fortgeschrittenem Prostatakarzinom (Varambally et al. 2002) und Brustkrebs (Kleer et al. 2003). Der aggressive Charakter eines Malignoms korreliert mit der Höhe der EZH2-Expression was mit einer schlechten Prognose und einem metastatischen Charakter der Erkrankung assoziiert ist. Richter und Mitarbeiter (Richter et al. 2009) fanden eine direkte Bindung des chimären Transkriptionsfaktors EWS-FLI1 an die Promotorregion von EZH2 *in vivo*. Hier konnte nun auch die EWS-ERG-Induktion gezeigt werden. Ein Fortschreiten des Ewingtumors und die metastatische Potenz in immundefizienten Mäusen konnten durch RNA-Interferenz, die EZH2 betraf, signifikant gesenkt werden (Richter et al. 2009), sodass EZH2 ein therapeutisch sehr interessantes neues CTA sein könnte.

#### **4.3.4 CENPE und andere neue CTA mit wichtigen Funktionen in Malignomen**

Der neue CTA-Kandidat CENPE (*Centromere Protein E*) wird bereits als therapeutische Zielstruktur in unterschiedlichen Karzinomen in Betracht gezogen. Ein gegen CENPE gerichteter Farnesyl-Transferase-Inhibitor führt zu einem Stop des Zellzyklus (Ashar et al. 2000). Somit scheint auch CENPE für das Überleben der Tumorzellen essentiell zu sein.

CDC45L (*cell division cycle 45 homolog*) kann als Proliferationsmarker in neoplastischem Gewebe dienen (Pollok et al. 2007). Das TSN (*Translin*)-Protein spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der chromosomalen Translokation bei lymphoiden Neoplasien, beim Rhabdomyosarkom und Liposarkom (Kasai et al. 1994; Chalk et al. 1997; Hosaka et al. 2000) und möglicherweise auch beim ESFT.

HELLS (*lymphoid specific helicase*) und WIZ (*widely interspaced zinc finger motifs*) sind an onkogener Transformation beteiligt (Lee et al. 2000; Shi et al. 2003). GRP64 (*G protein-coupled receptor 64*) werden wichtige Funktionen für die metastatische Potenz solider Tumoren zugeschrieben (Rozenfurt 2002; Hart et al. 2005).

#### **4.3.5 Beschriebene Immunantworten gegen CTA**

Immunogenität ist für einige der hier im ESFT identifizierten Gene mit CTA-Expressionsmuster bekannt. Für die 50 der 136 gelisteten CTA der CTA-Datenbank des Ludwig-Instituts für Krebsforschung (Almeida et al. 2009), die mindestens mit einem SONDENSATZ in mehr als 30 % der Ewingtumor-Proben vorkamen, sind nach der verwendeten CTA-Datenbank für 23 CTA Ergebnisse zu einer spontanen zellulären / humoralen oder induzierten Immunantwort publiziert worden, davon ist 17-mal eine spontane zelluläre Antwort, 21-mal eine spontane humorale Antwort und 6-mal eine induzierbare Immunantwort beobachtet worden. Zu 27 CTA, die hier im ESFT exprimiert waren, gibt es keine publizierten Daten bezüglich einer Immunantwort. Humorale und zelluläre Immunogenität bei einer Tumorerkrankung besitzen beispielsweise die bekannten CTA XAGE1 (Kikuchi et al. 2008, Zhou et al. 2008) und SSX2 (Scanlan et al. 2004). XAGE1 wurde zuerst von Brinkmann (Brinkmann et al. 1999) als CTA im ESFT beschrieben. Eine humorale (Sato et al. 2007) und eine zelluläre spontane Immunantwort gegen XAGE1 durch zytotoxische CD8+ve T-Zellen und dadurch verlängertes Überleben ist bekannt. Das längere Überleben betraf Patienten mit Tumorresten nach chirurgischer Behandlung bei Adenokarzinom der Lunge (Kikuchi et al. 2008). Auch eine induzierbare Immunantwort mit DC wurde gegen XAGE1 erreicht (Zhou et al. 2008).

Zelluläre Immunogenität bei einer Tumorerkrankung ist weiterhin für das bekannte CTA CDCA1 nachgewiesen (Harao et al. 2008). CCDC34, ein hier neu vorgeschlagener CTA-Kandidat, wird als Antigen durch Antikörper von Patienten mit Nierenzellkarzinom erkannt (Scanlan et al. 1999). EXOSC4 wurde als eine Komponente identifiziert, gegen die die Autoantikörper der Polymyostis/Sklerodermie PM/Scl-100 und PM/Scl 75 unter anderem gerichtet sind (Brouwer et al. 2002). Hier würde durch die Induktion einer spezifischen Immunantwort die Gefahr einer Autoimmunerkrankung bestehen.

Bisher ist nicht geklärt, welche CTA bis auf das hier untersuchte CTA LIPI auf der MHC-Peptid-Ebene von CTL im ESFT erkannt werden können. Die Ergebnisse der Arbeit legen eine Präsentation immunogener Epitope aus LIPI auf ESFT nahe. Die Ergebnisse dieser Arbeit zur

Expression von CTA im ESFT decken außerdem zahlreiche potentielle immuntherapeutische Zielstrukturen im ESFT auf, gegen die zum Teil spontane oder induzierte Immunantworten beobachtet wurden.

#### **4.3.6 EWS-FLI1-Induktion von CTA**

In jüngerer Vergangenheit wurden wesentliche Untersuchungen dazu durchgeführt, welche Zellpopulationen sich hinter den ESFT-Progenitorzellen verbergen. Kauer et al. 2009 gingen davon aus, dass die Mehrzahl der aberranten Genexpressionen des ESFT durch EWS-FLI1 reguliert werden, mit Ausnahme derer, die der Ursprungszelle zuzuordnen sind. Aus dieser Überlegung heraus prüften Kauer und Mitarbeiter, bei welchem Referenzgewebe sich die größte inverse Korrelation der Änderung des Genexpressionsprofils zwischen ESFT und Referenzgewebe und zwischen EWS-FLI1-knockdown-ESFT und ESFT-Kontrolle einstellte. Die höchste inverse Korrelation zeigte sich für mesenchymale Progenitorzellen (MPC), sodass die MPC von den untersuchten Referenzgeweben der Progenitorzelle des ESFT am ähnlichsten zu sein schien. Allerdings konnten mit dieser Methode 7034 Gene gefunden werden, die EWS-FLI1-aktiviert waren. Bei den hier untersuchten EWS-FLI1 und EWS-ERG transgenen mesenchymalen Stammzellen (MSC) wurden sehr strenge Berechnungskriterien verwendet, sodass nur die statistisch signifikantesten Gene angezeigt werden. Auch Riggi et al. 2008 nahmen an, dass die MPC der Progenitorzelle des ESFT am ähnlichsten sei. Staeger et al. 2004b beschrieben auch, eine mögliche Progenitorzelle sei eine von der Neuralleiste abstammende Zelle, die ein beginnendes mesenchymales und endotheliales Differenzierungsmuster aufweist. Es wurde in den hier beschriebenen Experimenten in MSC EWS-FLI1 oder EWS-ERG eingeschaltet, was den Bedingungen der Entstehung des ESFT nahe kommen dürfte. Manchmal sind die EWS-ETS-Fusionsgene die einzige genetische Aberration, die in den ESFT detektiert werden kann. So wird davon ausgegangen, dass EWS-ETS-Fusionsgene hauptverantwortlich für die maligne Transformation und den hoch aggressiven Phänotyp des ESFT sind (Kovar 2003). Der wichtige Einfluss der CTA auf die Onkogenese würde demnach umso wahrscheinlicher, wenn es sich dabei um Zielgene von EWS-ETS handelte. In den vorgestellten Ergebnissen (Tabelle A7 im Anhang) waren SPAG9 und PCM1 durch EWS-FLI1 reguliert, die als bekannte CTA (Almeida et al. 2009) gelten und in den Microarray-Analysen hier im ESFT überexprimiert waren. PHOSPHO1 und TAF9B, die erstmals so benannte neue CTA-Kandidaten nach den Microarray-Analysen dieser Arbeit und nach Hofmann et al. 2008 sind, und 28 weitere erstmals so benannte neue CTA-Kandidaten in den Datensätzen der beiden untersuchten Microarrays waren EWS-ETS-reguliert, davon 7-mal EWS-ERG und 21-mal EWS-FLI1, wobei LGALS8 doppelt reguliert war und für EZH2 auch schon eine Regulation durch EWS-FLI1 beschrieben wurde (Richter et al. 2009). EZH2 und PAPPA gehören zu den 37 Genen, die Staeger et al. 2004b als hochspezifisch für den ESFT herausfanden und die hier sowohl EWS-ERG reguliert

waren als auch ein CTA-Expressionsprofil aufwiesen. Weiterhin wurden STEAP und JAK1 durch beide Faktoren in den transgenen MSC reguliert (Daten hier nicht gezeigt) und werden zu den hochspezifisch exprimierten Genen im ESFT gerechnet (Staege et al. 2004b), zeigten hier jedoch keine CTA-Expressionsprofile.

In der Datenbank SOURCE (Diehn et al. 2003) wurde nach molekularbiologischen Funktionen der hier gefundenen EWS-ETS-regulierten bekannten CTA und erstmals so benannten CTA-Kandidaten gesucht. Am häufigsten war eine Einbindung in den Zellzyklus (10-mal) und in die Transkription (7-mal), gefolgt von der Insulin/IGF-Proteinkinase-B-Signalkaskade (5-mal) und je 4-mal einer Funktion bei der Apoptose und im Ubiquitin/Proteasom-Komplex. Je einmal trat eine Funktion beim WNT-Signalweg, bei der Zytoskelettformation, der T-Zell-Aktivierung und beim p53-Signalweg auf. Die genannten Funktionen haben alle eine Assoziation mit Chemotherapieresistenz oder Metastasierungsfähigkeit (Schaefer et al. 2008). Viermal waren die Gene während der Meiose exprimiert und zweimal in Spermatozoen, wie das für CTA typisch ist. Die durch EWS-ETS in MSC induzierten bekannten CTA und neuen CTA-Kandidaten sind für den malignen Phänotyp sehr wahrscheinlich essentiell und sind deshalb als therapeutische Zielstrukturen bevorzugt zu verfolgen.

Einige CTA wurden in der vorliegenden Arbeit auch als in physiologischen humanen MSC exprimiert identifiziert. Diese sind also schon in der wahrscheinlichen Ursprungszelle des ESFT exprimiert und werden nicht erst im ESFT durch EWS-ETS induziert, wobei eine vorhandene Expression der EWS-ETS-induzierten Gene vielleicht verstärkt wird. Eine Expression in MSC ist dabei für einige CTA beschrieben (Costa et al. 2007). Eine Stammzellexpression scheint keinen zwingend hemmenden Einfluss auf eine Immunantwort zu haben. Für das hier identifizierte möglicherweise neue CTA C14orf131 ist eine spontane humorale Immunantwort als NY-RN-50 Antigen bei Patienten mit Nierenzellkarzinom bekannt (Scanlan et al. 1999), obwohl es in den vorliegenden Untersuchungen in embryonalen Stammzellen (ESC) und CD34+ven hämatopoetischen Stammzellen (CD34+HSC) exprimiert war.

#### **4.4 Das Ewingtumor-spezifische *Cancer-Testis*-Antigen LIPI**

LIPI (membranassoziierte Phospholipase A1  $\beta$ , Lipase member I) ist ein bekanntes CTA und wird bei Almeida et al. 2009 als CTA 17 aufgeführt. Es ist ein im ESFT beschriebenes CTA (Foell et al. 2008, Staege et al. 2004b). Für LIPI war nur ein SONDENSATZ in den Datensätzen des Microarrays HG\_U133Plus2.0 vorhanden, mit dem eine starke Überexpression im ESFT, jedoch nicht im Hoden detektiert wurde. Eine Suche in der Datenbank SOURCE (Diehn et al. 2003) und PCR-Analysen von Foell et al. 2008 bestätigten jedoch eine Expression von LIPI im Hoden. In den Microarray-Analysen der genannten Autoren fand sich jedoch wie auch in den Microarray-Ergebnissen dieser Arbeit keine Expression im Hoden. Eine Expression in der Glandula thyroidea lag in den Microarray-Ergebnissen der Arbeit schwach vor. Diese konnte

durch Foell et al. 2008 mittels PCR ebenfalls gefunden werden. Interessanterweise exprimieren Hoden und Schilddrüse auch andere ESFT-assoziierte Gene. Die C-Zellpopulation der Schilddrüse enthält molekulare Merkmale von ESFT (Foell et al. 2008). In den Ergebnissen dieser Arbeit fand sich weiterhin eine niedrige LIPI-Expression im Ovar, wobei eine Expression eines Non-X-CTA in den meiotischen Keimzellen des Ovars, ähnlich wie im Hoden, vorstellbar ist. LIPI produziert durch seine enzymatische Aktivität Lysophosphatidylsäure (LPA), die die onkogenen Prozesse im Tumor wie Invasivität und Metastasenbildung initiieren und fördern kann. LIPI selbst ist neben seinem Auftreten im ESFT auch im Myelom (Atanackovic et al. 2007), Brust- und Nierenkrebs (Scanlan et al. 2004) beobachtet worden. Außerdem sind in verschiedenen Tumoren LPA-Rezeptoren und Autotaxin aberrant exprimiert (Mills und Moolenaar 2003). LPA ist ein einfaches Phospholipid, das sehr unterschiedliche Funktionen in der Zellbiologie über Transmembranrezeptoren und Nuklearhormonrezeptoren initiiert. Bisher sind sechs verschiedene G-Protein-gekoppelte Transmembranrezeptoren für LPA bekannt (LPAR1-5 und P2Y5/LPA6), die entsprechende intrazelluläre Signalkaskaden auslösen. Zusätzlich gibt es Hinweise auf einen siebten Rezeptor für LPA (GPR87, LPAR7) (Tabata et al. 2007).

Kürzlich wurde die Expression der LPAR 1-6 im ESFT nachgewiesen (Schmiedel et al. 2010). Welche Signalkaskade in welcher Zelle ausgelöst wird, hängt von der Lokalisation des Rezeptors ab. So wirkt LPA auf die Hirnentwicklung physiologischerweise über den LPA1-Rezeptor, während über denselben Rezeptor Lungenfibrose und renale Fibrose pathologischerweise beeinflusst werden.

LPA wird in Zellen und biologischen Flüssigkeiten enzymatisch produziert. Im Serum wird LPA aus Lysophospholipiden durch das Plasmaenzym Autotaxin (Lysophospholipase D) produziert, katalysiert durch Phospholipase A1/A2. Auf einem zweiten Weg, vorwiegend in Karzinomzellen und Thrombozyten, entsteht LPA durch Deacylierung von Phosphatidylsäure, katalysiert durch Phospholipase A1/A2 und Phospholipase D (Autotaxin) (Aoki 2004; van Meeteren et al. 2006; Aoki et al. 2008). Autotaxin wurde ursprünglich als Tumormotilitätsfaktor entdeckt, wobei es z. B. in Lungen-, Brust-, Prostata-, Nieren-, Schilddrüsenkarzinomen, Glioblastom und Neuroblastom überexprimiert ist. Die Motilitätssteigerung durch Autotaxin wirkt nur, wenn LPA1-Rezeptoren vorhanden sind. LPA-Rezeptoren wirken über verschiedene Signalkaskaden auf die GTPasen RAS, RHO und RAC. Dabei haben RHO/RAC eine dominante Rolle bei der Tumorzellmigration und -invasion und der RAS-Signalweg wirkt stimulierend auf das Wachstum. LPA hat auch Effekte auf das Gefäßsystem. Die Stimulation der LPA1-Rezeptoren schaltet die Gene AngFq3, Enpp2 und Agpt (Angiopoietin1) an und erhöht die Produktion der parakrin wirkenden Interleukine 6 und 8, die physiologischerweise Wundheilungsprozesse fördern. Sie begünstigen aber auch Tumorgenese und -effizienz, indem sie eine Neoangiogenese und eine Permeabilitätssteigerung von Endothelzellen bewirken. Neben der erwähnten Motilitätssteigerung der Tumorzellen erleichtern diese Vorgänge die Metastasenbildung (van Meeteren und

Moolenaar 2007). Daneben ist erwähnenswert, dass LPA auch zur Kontraktion der glatten Muskulatur der Gefäße führt, damit zu Blutdruckerhöhungen, und wahrscheinlich an der Entstehung der Arteriosklerose beteiligt ist (Mills und Moolenaar 2003; Moolenaar et al. 2004).

Die Einbindung von LIPI in die Onkogenese und Metastasenbildung unterstreicht die Identität von LIPI als CTA, denn nach Simpson et al. 2005 sind CTA typischerweise wesentlich an dem aggressiven Phänotyp eines Malignoms beteiligt. Diese Eigenschaften machen LIPI zu einer interessanten therapeutischen Zielstruktur. Ein Antigen-Verlust von LIPI durch therapeutische Selektion würde für den Tumor eventuell auch den Verlust seiner Metastasierungsfähigkeit bedeuten können. Zudem bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit die beschriebene hohe Spezifität von LIPI für den ESFT (Foell et al. 2008, Staeger et al. 2004b). Deshalb wurde LIPI in dieser Arbeit als immuntherapeutische Zielstruktur ausgewählt. In den durchgeführten Experimenten konnte bei drei Spendern gezeigt werden, dass gegen die Epitope LDY und NLL aus LIPI zelluläre Immunantworten induzierbar sind. Die Epitope NLL und LDY scheinen von A673-Zellen auf MHC-Molekülen präsentiert zu werden, wobei eine Lyse von A673-Zellen durch NLL- und LDY-spezifische CTL erreicht werden konnte.

Wegen der wenn auch niedrigen hier bestätigten Thyroidea-Expression von LIPI muss die Gefahr von Autoimmunreaktionen bedacht werden. Aber das niedrige Niveau muss nicht unbedingt mit einem immunogenen Proteinlevel korreliert sein (Caballero und Chen 2009).

#### **4.4.1 Immunantwort durch Lipase I (LIPI)-T-Zell-Epitope versus Cyclin D1 (CCND1)-T-Zell-Epitope versus Tumorzell-Lysat**

Die Stimulation der PBMC mit den Peptiden aus LIPI führte bei 13 gesunden Spendern zu einer Proliferatnion der PBMC bis zum ca. Zwei- bis Vierfachen der Ausgangszahl. Spezifische zelluläre Immunantworten für LIPI waren in den Zellkultur-Experimenten für drei Spender insgesamt zweimal im LDH assay und einmal im Elispot zu beobachten und bei den drei Spendern überlappend gegen LIPI-Peptide LDY und NLL und das CCND1-Peptid RLT gerichtet. LDY weist mit 12 den niedrigsten vorausgesagten Bindungsscore nach der Voraussage mittels der Datenbank SYFPEITHI auf (Rammensee et al. 1999). In der Arbeit von Meyer-Wentrup und Mitarbeitern (Meyer-Wentrup et al. 2005) konnten ebenfalls T-Zell-Epitope mit niedrig vorausgesagten Bindungsscores Immunantworten induzieren, was die Tatsache unterstreicht, dass niedrig vorausgesagte Bindungsscores nicht von einer experimentellen Evaluierung dieser T-Zell-Epitope abhalten sollten. Die LIPI-Epitope LDY und NLL und das CCND1-Epitop RLT, die bei allen drei Spendern spezifische Immunantworten induzierten, werden offensichtlich auch auf der Oberfläche von der Ewingtumor-Zelllinie A673 präsentiert. Dies folgt aus der Fähigkeit der LDY-, NLL- und RLT-spezifischen CTL HLA-A2+ver Spender, die A673-Tumorzelllinien *in vitro* zu lysieren, wie im LDH assay gezeigt werden konnte. A673-Zellen sind ebenfalls posi-



tiv für HLA-A2 (Staeger et al. 2004a), sodass eine HLA-A2-restringierte Immunantwort in Reaktion auf diese HLA-A2-Molekül bindenden Peptid-Epitope anzunehmen ist.

Ob eine Präsentation von immunogenen LIPI-Epitopen oder CCND1-Epitopen auf ESFT *in vivo* vorliegt, müsste untersucht werden. Möglich wäre der Versuch, mit LIPI-spezifischen autologen CTL einen apoptiven T-Zell-Transfer in einer klinischen Studie oder eine Vakzinierung von Patienten mit DC, die LIPI-Epitope präsentieren, durchzuführen. Eine dritte Möglichkeit besteht in der direkten Vakzinierung mit einem immunstimulatorischen Adjuvanz und einem rekombinanten Protein, das am besten mehrere immunogene CTA-Epitope enthalten sollte. Nur ein Teil der Patienten, der HLA-A2 positiv ist bzw. deren MHC-Moleküle die gefundenen, immunogenen Epitope präsentieren können, wäre nach den hier durchgeführten Experimenten einer Immuntherapie mit LIPI-Epitopen LDY und NLL zugänglich. Für andere HLA-Haplotypen müssten alternative Peptide gefunden werden. Zu beachten ist auch, dass es nur bei insgesamt 13 von 34 HLA-A2+ven Patienten gelang, eine Proliferation der T-Zellen zu induzieren, sodass diese weiter im LDH assay oder Elispot charakterisiert werden konnten. Es ließ sich dabei in den durchgeführten Zellkultur-Experimenten eine signifikante Ewingtumor-spezifische Immunantwort bei 3 von 13 HLA-A2+ven Spendern mit ausreichender T-Zell-Proliferation beobachten. Bei einigen Patienten könnte eine Immuntoleranz generell oder gegen bestimmte Epitope leichter zu durchbrechen sein, auch in Abhängigkeit vom individuellen T-Zell-Rezeptor-Repertoire. Bei den untersuchten Spendern handelte es sich um gesunde Individuen. Bei Patienten mit ESFT könnte hingegen auch schon eine Vorstimulation entnommener T-Zellen gegen verschiedene CTA des ESFT bestehen, sodass es bei diesen Patienten leichter sein könnte, Zellen mit dem passenden T-Zell-Rezeptor gegen das Autoantigen eines CTA zu aktivieren. So fanden Quintarelli et al. 2008 keine spezifischen T-Zellen gegen das CTA PRAME bei gesunden Spendern, jedoch fanden sie diese bei Patienten mit PRAME-exprimierendem Melanom. Die eher geringe Rate einer induzierbaren Immunantwort in den hier vorgestellten Zellkulturarbeiten passt aber zu den Ergebnissen vieler bisher publizierter klinischen Studien mit DC. In 35 verschiedenen Publikationen konnte eine Tumorregression oder -stagnation unter einer Therapie mit DC nur bei insgesamt 7,1 % der Patienten festgestellt werden (Rosenberg et al. 2004).

Es kann nach den Ergebnissen dieser Arbeit davon ausgegangen werden, dass für das LIPI-Peptid SLS entweder eine immunologische Toleranz besteht bzw. dass es nicht als T-Zell-Epitop an entsprechende MHC-Klasse-I-Moleküle binden kann. Die durch das CCND1-Peptid RLT induzierte spezifische Immunantwort sollte bei der Verwendung in der klinischen Immuntherapie zurückstehen. Mutationen und Überexpressionen von CCND1, die zu einer Zellzyklus-Progression führen, sind in verschiedenen Tumoren zu beobachten und tragen möglicherweise zur Onkogenese bei (Holley et al. 2001; Simpson et al. 2001; Jiang et al. 2006). Für CCND1 ist jedoch keine selektive Expression in Normalgeweben bekannt, sodass es beim Einsatz von CCND1-Peptiden als immunologischer Zielstruktur zu Kreuzreaktionen durch reaktivierte T-

Zellen kommen könnte. Aus diesem Grund sollten CCND1-Peptide nicht in der Immuntherapie Anwendung finden. Die Immunogenität geht eventuell auf dominant negative Mutationen zurück oder hängt mit der starken Überexpression und dem Primen durch professionelle APC zusammen.

Unterschiedlich sind die Ergebnisse zwischen den mit CCND1-Peptid LLG und SK-N-MC-Lysat geprimten T-Zellen bei den drei Spendern mit induzierbarer Immunantwort. Im LDH assay und Elispot konnten nur bei zwei der drei HLA-A2+ven Spender die mit SK-N-MC-Lysat geprimten CTL lebende HLA-A2+ve A673-Zellen erkennen. Beim Primen mit Lysat handelt es sich eventuell um andere Restriktionselemente als um HLA-A2 und um andere immundominante Peptide als die aus LIPI, sodass diese fehlende Standardisierung zu unterschiedlichen Ergebnissen zwischen den Spendern führte. Die variierenden Ergebnisse könnten auch in dem unterschiedlichen T-Zell-Rezeptor-Repertoire der drei Spender begründet sein, wobei bei den Lysat-spezifischen CTL wegen der nicht standardisierten Antigen-Zusammensetzung der jeweiligen Lysate hierzu keine konkreteren Aussagen zu den Epitopen gemacht werden können. Die im Lysat enthaltene große Menge immunologisch tolerierter Antigenstrukturen könnte auch zur Toleranz gegenüber sonst immunogenen Tumor-assoziierten Antigenen (TAA) führen. Möglicherweise sind regulatorische T-Suppressor-Zellen an diesem Prozess beteiligt. Eine andere Möglichkeit ist, dass bestimmte TAA in zu hohen oder zu niedrigen Konzentrationen präsentiert wurden, sodass dafür spezifische T-Zellen deletiert wurden und in Apoptose gingen bzw. nicht reagierten.

Im Elispot konnten mit SK-N-MC-Lysat geprimte CTL lebende SK-N-MC-Zellen nicht erkennen. Eine fehlende Expression von HLA-A2 auf SK-N-MC wird von Meuter und Mitarbeitern eindeutig beschrieben (Meuter et al. 2010). Die fehlende Immunreaktion der mit SK-N-MC-Lysat geprimten CTL auf SK-N-MC ist am ehesten damit zu erklären, dass SK-N-MC negativ (Meuter et al. 2010) für HLA-A2 sind, sodass der T-Zell-Rezeptor der HLA-A2+ven CTL keine entsprechenden Epitope erkennen konnte.

#### **4.4.2 Lysat versus Peptid versus Protein**

Die Methode der Tumorzell-Lysat-Vakzinierung ist individuell auf einen einzelnen Patienten ausgerichtet und setzt voraus, dass autologe Tumorzellen zur Herstellung des Lysats vorhanden sind. Ein Nachteil ist somit, dass eine solche nicht standardisierte Vakzine für jeden Patienten separat angefertigt werden muss. Es ist jedoch keine Identifizierung von TAA notwendig. Das Tumorzell-Lysat enthält das vollständige undefinierte Repertoire relevanter TAA, einschließlich derer, die einzigartigen Mutationen des individuellen Tumors entsprechen. Jedoch könnte es zu einer nachteiligen Kreuzreaktion mit ubiquitär exprimierten Antigenen kommen, die auch im Tumorzell-Lysat enthalten sind. Das Risiko unerwünschter Kreuzreaktionen sinkt, je restringierter das Expressionsmuster der TAA im Normalgewebe ist. CTA erfüllen diese Eigenschaft wesentlich

besser als das undefinierte Repertoire von TAA des Tumorlysats. Deshalb sollten Epitope der restringiert exprimierten CTA in der Immuntherapie eine bevorzugte Anwendung finden. Die Immunisierung von Krebspatienten mit CTA-Epitopen bietet weiterhin den Vorteil einer standardisierten Therapie-Methode für ein breiteres Patientengut. Dazu sollte das immunogene Peptid in möglichst vielen Krebsarten exprimiert sein. Für das CTA LIPI ist neben der Expression in ESFT auch eine Expression in verschiedenen anderen Malignomen beschrieben (Atanackovic et al. 2007). Die Immunisierung gegen ein bestimmtes TAA könnte zur Selektion von Zellen führen, die dieses Antigen nicht präsentieren. Darum sollte ein TAA für das Überleben und den malignen Phänotyp einer Tumorzelle möglichst essentiell sein, was für LIPI der Fall sein könnte (van Meeteren und Moolenaar 2007) und für die oben beschriebenen CTA oder CTA-Kandidaten ebenfalls nahezuliegen scheint, wie aus den beschrittenen Signalwegen in Tabelle A8 (im Anhang) ersichtlich, die nach Schaefer et al. 2008 an einen malignen Phänotyp im ESFT gekoppelt sind. Umgangen werden könnte das Problem des potentiellen Antigenverlusts der Tumorzelle auch, indem gegen verschiedene CTL-Epitope von unterschiedlichen TAA abstammend, gleichzeitig immunisiert wird, also ein polyvalenter Impfstoff entwickelt wird (Kessler und Melief 2007).

Ein weiteres Argument für die Immunisierung mit Tumorzell-Lysat wäre, dass keine Limitierung der Therapiestrategie auf Individuen vorliegt, die ein bestimmtes korrespondierendes MHC-Molekül tragen, wie das bei den synthetischen Tumorpeptid-Epitopen der Fall ist. Längere Peptide und rekombinante Proteine wären jedoch ebenfalls nicht unbedingt auf nur eine MHC-Klasse restringiert und für eine breitere Patientengruppe einsetzbar. Die Vakzinierung mit längeren Peptiden (35-mer), die CTL- und T-Helferzell-Epitope im natürlichen Proteinkontext enthalten, führten dabei im Mausmodell zu effektiveren CTL-Antworten (Zwaveling et al. 2002). Dies ist damit zu erklären, dass längere Peptide nur von professionellen Antigenpräsentierenden Zellen (APC) prozessiert und präsentiert werden. Immunisierung mit minimalen CTL-Peptid-Epitopen könnte T-Zell-Toleranz durch Präsentation auf nicht-APC hervorrufen (Toes et al. 1996). Der ideale Impfstoff für die Generierung spezifischer CTL sollte daher mit möglichst verschiedenen Tumor-spezifischen Epitopen im Proteinkontext arbeiten, die durch unterschiedliche HLA-Klasse-Moleküle präsentiert werden sollten (Kessler und Melief 2007). Eine Immunisierung wäre mit Hilfe längerer Peptide oder rekombinanter Proteine, die beispielsweise gleichzeitig LIPI-Epitope und XAGE1-Epitope enthalten, sinnvoller als eine Immunisierung mit Hilfe einzelner Peptid-Epitopen. Ein solches Vakzin wäre nicht unbedingt auf Träger bestimmter MHC-Klassen beschränkt und somit standardisiert einsetzbar. Es wäre trotz einzelner Antigenverluste der Tumorzelle noch wirksam und würde durch ausschließliche Präsentation auf professionellen APC eher eine Immuntoleranz durchbrechen können. Die Methode der Tumor-spezifischen RNA-Transfektion in DC könnte allerdings auch die ausschließliche Präsentation auf professionellen APC sichern. Auch bei dieser Methode sollte eher RNA, die für

längere Peptide oder rekombinante Proteine kodiert, eingesetzt werden, damit das Vakzin nicht auf einzelne HLA-Molekül-Träger beschränkt bleibt. DC können zudem auch mit RNA, die zur Expression immunstimulatorischer Moleküle führt, beladen werden. Kritisch ist bei der Methode der RNA-Transfektion jedoch immer noch ein effektives Einschleusen der gewünschten Antigene in die Prozessierung der HLA-Klasse-I- und Klasse-II-Moleküle, d. h. eine effektive Transfektion und Translation (Boczkowski und Nair 2010). In der vorliegenden Arbeit konnten einzelne immunogene LIPI-Epitope, die in rekombinanten Proteinen oder für RNA-Transfektion von DC verwendet werden könnten, identifiziert werden.

#### **4.4.3 Dendritische Zellen**

Die Immunantwort ist nicht nur von der Qualität des TAA, abhängig sondern entscheidend auch vom optimierten immunstimulatorischen Kontext. Meyer-Wentrup et al. 2005 konnten das erste ESFT-spezifische immunogene Peptid des chimären Transkriptionsfaktors EWS-FLI1 identifizieren und mit Hilfe von DC die Stimulation von CTL erreichen. Die DC ist als der effektivste Stimulator naiver T-Zellen anerkannt (Banchereau und Steinman 1998), wodurch eine potente Typ1-Immunantwort initiiert werden kann. Aus den erwähnten Gründen wurden DC auch in der vorliegenden Arbeit verwendet, nach der Methode von Hokey et al. 2005 gepulst und anschließend ausgereift. Typischerweise schwächt sich nach Ausreifung die Kapazität zur Antigenaufnahme ab (Hokey et al. 2005). Deshalb erfolgte erst 2 bis 3 Stunden nach Pulsen mit Peptid oder Lysat das Ausreifen durch die Zugabe von dem proinflammatorischen Zytokin  $IFN\gamma$  und dem mikrobiellen Wandbestandteil LPS. Die phänotypische Charakterisierung der DC erfolgt ausschließlich über ein spezielles Expressionsmuster von Oberflächenmarkern, das nachgewiesen werden konnte.

Aus verschiedenen Studien sind LPS, ein TLR4-Agonist und  $IFN\gamma$  zur Generierung von DC, die zur Typ1-Immunantwort polarisieren (DC1), bekannt (Hokey et al. 2005). LPS und  $IFN\gamma$  wurden deshalb auch in den hier vorgestellten Experimenten verwendet um DC1 auszureifen. Die durch DC1 induzierte Typ1-Immunantwort spielt eine wesentliche Rolle bei der Tumorthherapie (Hokey et al. 2005). Effektorzellen, die durch DC1 induziert werden, sind  $CD8+ve$  CTL,  $CD4+ve$  T-Helfer-Zellen und Makrophagen. Alle diese Zellen, einschließlich DC1, sind nach Aktivierung zur  $IFN\gamma$ -Sekretion befähigt. Dieses hat in einer positiv rückgekoppelten Schleife aktivierende Potenz auf Zellen der Typ1-polarisierten Immunantwort, außerdem direkte antitumoröse und antiangiogenetische Wirkung (Hokey et al. 2005). Es ist bekannt, dass  $CD4+ve$  T-Helfer-Zellen eine andauernde und effektive  $CD8+ve$  T-Zell-Antwort unterstützen sowie Makrophagen-aktivierend sind (Janssen et al. 2003; Kumaraguru et al. 2004; Hamilton et al. 2006). Diese Erkenntnisse legen nahe,  $CD4+ve$  T-Zellen neben  $CD8+ve$  T-Zellen zur Induktion von Typ1-polarisierten Immunantworten in der Tumorthherapie einzusetzen. Auch in den hier vorgestellten Experimenten wurden deshalb  $CD4+ve$  T-Zellen mitverwendet. In nicht dargestellten

Ergebnissen konnte zudem eine spezifischere Immunantwort beobachtet werden, wenn neben CD8<sup>+</sup>-T-Zellen auch CD4<sup>+</sup>-T-Zellen verwendet wurden.

#### 4.4.4 Klinische Effektivität von Immuntherapien

Für den ESFT gibt es bisher nur wenige Publikationen einer klinisch erfolgreichen Immuntherapie. Eine Komplettremission bei einem Patienten mit Residual-ESFT konnte für 77+ Monate erreicht werden unter einer Immuntherapie mit DC, die mit einem synthetischen Peptid gepulst waren (Suminoe et al. 2009). Das Peptid enthielt die Fusionsregion des chimären Transkriptionsfaktors EWS-FLI1. Es ist jedoch ungeklärt, ob der Effekt auf der DC-Therapie beruhte. In einer anderen Studie wurde ein Patient, der an metastasiertem ESFT litt, mit Tumorlysat-gepulsten DC behandelt, wobei eine partielle Regression der Erkrankung beobachtet werden konnte (Geiger et al. 2000; Geiger et al. 2001). Ein Vergleich zwischen DC-ESFT-Hybrid-Zellen mit Lysat- oder EWS-FLI1-Peptid-beladenen DC in der Induktion von CTL gegen A673-Zellen wurde von Guo und Mitarbeitern (Guo et al. 2008) durchgeführt. In SCID-Mäusen mit rekonstituiertem humanem Immunsystem erzielten die Hybrid-Zellen die stärkste Inhibition des Tumorwachstums, sodass gezeigt wurde, dass A673-Zellen einer Immuntherapie mit Dendritischen Zellen prinzipiell zugänglich sind, was auch hier nachvollzogen werden konnte.

Für andere Malignome sind zahlreiche Ansätze einer Immuntherapie untersucht worden. Peptidepitop-basierte Vakzine des CTA NY-ESO-1, gemischt mit den Adjuvanzen CpG 7909 ODN (*deoxycytidyl-deoxyguanosin oligodeoxy-nucleotides*) und *incomplete Freund's adjuvants* (Montanide(R) ISA-51) führte zu einem günstigen klinischen Outcome bei 6 von 9 Patienten mit NY-ESO-1-positiven Tumoren (Karbach et al. 2010). Eine andere Studie verwendete *his-tagged* rekombinantes NY-ESO-1-Protein zusammen mit dem Adjuvanz ISCOMATRIX® bei Melanom-Patienten nach kompletter Tumoresektion und konnte dadurch das Risiko eines Rezidivs deutlich senken (Davis et al. 2004). Die gleiche Vakzination bei Patienten mit Melanom im Stadium III/IV zeigte hingegen nur einen sehr geringen klinischen Effekt in Form eines stabilen Krankheitszustandes bei einem von 27 Patienten (Nicholaou et al. 2009). Die Datenlage zeigt demnach bei der direkten *in vivo*-Anwendung rekombinanter Proteine oder Peptidepitoper zusammen mit unterschiedlichen immunstimulatorischen Substanzen in neueren Studien sehr unterschiedliche Ergebnisse. In verschiedenen klinischen Studien konnte durch die Anwendung Lysat-gepulster DC bei einer Tumorerkrankung eine Immunantwort induziert werden (Fong und Engleman 2000). Zudem erwies sich diese Methode als nebenwirkungsarm. Insgesamt aber zeigten sich bisher nur geringe klinische Effekte der meisten Ansätze einer Immuntherapie. So untersuchten Rosenberg et al. 2004 35 Berichte über Antitumor-Immuntherapien, 765 Patienten einschließend und wendeten konventionelle klinische Kriterien an, die für das Ansprechen eines Tumors auf eine bestimmte Therapie gelten. Klinische Effekte einer Immuntherapie mit immunogenen Peptiden mit oder ohne Adjuvanz fanden sich in 4 % der Fälle, auf eine Therapie mit

modifizierten oder nativen Tumorzellen sprachen klinisch 4,2 % der Patienten an und klinische Effekte einer Therapie mit DC fanden sich demnach bei 7,1 % der Patienten. Eine andere klinische Studie (Banchereau und Palucka 2005) zeigte bei metastasiertem Melanom ein klinisches Ansprechen auf die Injektion von DC, die mit TAA beladen waren, bei 9,5 % der Patienten. Die bisherigen Publikationen sprechen dafür, dass das bisher stärkste klinische Benefit eine adoptive Immuntherapie mit T-Zellen hat. So bestätigen einige klinische Studien die hohe Effektivität der adoptiven Immuntherapie (Hanson et al. 2000; Hunder et al. 2008). Bei der adoptiven Immuntherapie werden *in vitro* aktivierte und expandierte autologe Antitumor-T-Zell-Klone dem Patienten reinfundiert. Bei Patienten mit metastasiertem Melanom, die nicht auf eine Kombination von Chemotherapie und IL-2 ansprechen, konnte eine objektive Regression bei 6 von 13 Patienten mit dieser Methode erreicht werden (Dudley et al. 2002). Rosenberg et al. 2004 wendeten diese Methode erneut bei einer größeren Gruppe desselben Patientenguts an und konnten bei 18 von 35 Patienten (51 %) eine objektivierbare Regression der Erkrankung beobachten. Die expandierten CD4<sup>+</sup>-ven und CD8<sup>+</sup>-ven T-Zell-Klone mit Spezifität für die immunogenen LIPI-Peptid-Epitope könnten in der klinischen Anwendung den Patienten also direkt infundiert werden, um größtmögliche klinische Effektivität zu erhalten.

## 5 Zusammenfassung

Die konventionellen Therapiestrategien gegen den ESFT gehen immer noch mit einer nicht befriedigenden Prognose einher, sodass nach neuen Strategien beispielsweise in der Immuntherapie gesucht wird. Um effektive Immunantworten induzieren zu können, werden *Cancer-Testis*-Antigene (CTA) als sehr vielversprechende immunologische Zielstrukturen angesehen. Da CTA normalerweise ausschließlich in Keimzellen, embryonalem Gewebe und Stammzellen exprimiert (Costa et al. 2007) werden, jedoch auch in verschiedenen malignen Zellen aberrant exprimiert sind, könnten CTA zur Induktion von Tumor-spezifischen Immunantworten genutzt werden. Zur Identifikation neuer Ewingtumor-assoziierter CTA wurden öffentlich verfügbare Microarray-Datensätze analysiert. Durch ein charakteristisches CTA-Expressionsmuster (Hoden und ESFT) und die Suche nach CTA-typischen Expressionsdaten in der Datenbank SOURCE (Diehn et al. 2003) konnten zahlreiche neue Gene erstmals als CTA-Kandidaten identifiziert werden (siehe Tabellen A1 bis A4 im Anhang). Es konnte für viele schon bekannte CTA erstmals eine Expression im ESFT beschrieben werden (siehe Tabellen A5 und A6 im Anhang). Insgesamt 8 bekannte CTA waren bei beiden Microarray-Datensätzen überlappend in über 50 % der Ewingtumor-Proben exprimiert. Dazu zählen DDX43, JARID1B, LDHC, ODF2, PBK, SSX4, TTK und XAGE1. Bekannte CTA, die das ihnen eigene Expressionsprofil in den Microarray-Analysen aufwiesen, d. h. eine Überexpression in Hoden und ESFT gleichzeitig, waren SSX1, SSX2, SSX4, SSX7, SSX9, SSX4B, SSX3 und TTK, SYCP1, TEX15, OIP5, XAGE1, PBK, CDCA1, CEP55, PRAME, ODF2, wobei bisher nur XAGE1 (Brinkmann et al.

1999) und TEX15 (Foell et al. 2008) als CTA im ESFT beschrieben sind. Die Ergebnisse der Microarraytechnik sollten mit anderen Methoden validiert und kombiniert werden. Die zellbiologischen Signalwege sowohl der bekannten CTA im ESFT als auch der erstmals so benannten neuen CTA-Kandidaten gehen häufig mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Chemotherapie oder mit einer erhöhten Metastasierungsfähigkeit im ESFT (Schaefer et al. 2008) einher (siehe Tabelle A8 im Anhang). Wenn CTA aber entscheidenden Anteil an dem malignen Phänotyp haben, ist ein Antigenverlust durch die Nutzung von CTA als therapeutische Zielstruktur, relativ unwahrscheinlich. Es fand sich in den Microarray-Analysen auch eine bevorzugte Expression der CTA-Kandidaten in HMEC und ESC, was ebenfalls für eine wesentliche Funktion der CTA an der malignen Transformation und am Erhalt eines undifferenzierten Stammzellcharakters der ESFT-Zellen spricht. Die ESFT-Gewebe zerfielen in zwei Cluster in den *heat maps* bei Darstellung der Gene mit CTA-Expressionsprofilen (Abb. 1), wobei der eine Cluster gemeinsam mit Hoden, ESC und HMEC gegenüber dem anderen ESFT-Cluster separat war und in Abb. 2 bildet einer der beiden ESFT-Cluster einen gemeinsamen Cluster mit dem Hoden gegenüber dem anderen ESFT-Cluster. Es ist daher davon auszugehen, dass bestimmte ESFT-Proben eine stärkere Stammzellsignatur aufweisen als andere mit eventuell prognostischer Bedeutung.

Der Einfluss der aberranten Transkriptionsfaktoren EWS-ERG und EWS-FLI1 auf die Expression von CTA in transgenen mesenchymalen Stammzellen (MSC) wurde anhand weiterer Microarray-Expressionsdaten analysiert. Es konnten 9 EWS-ERG-regulierte Gene mit 12 Sondensätzen und 24 EWS-FLI-regulierte Gene mit 24 Sondensätzen gefunden werden, die nach den vorliegenden Ergebnissen ein CTA-Expressionsmuster im ESFT aufwiesen oder nach der Datenbank SOURCE (Diehn et al. 2003) CTA-Eigenschaften haben. Die durch EWS-ETS in MSC induzierten bekannten CTA und neuen CTA-Kandidaten (Tabelle A7 im Anhang) sind für den malignen Phänotyp sehr wahrscheinlich essentiell und deshalb als therapeutische Zielstrukturen bevorzugt zu verfolgen. Das Auftreten der chimären EWS-ETS-Transkriptionsfaktoren und das Anschalten ihrer *Zielgene* werden als grundlegende Ereignisse in der malignen Transformation des ESFT (Kovar 2003) angesehen.

Aufgrund der hohen Spezifität des CTA Lipase I (LIPI) für den Ewingtumor (Foell et al. 2008, Staeger et al. 2004b), die in den Microarray-Analysen hier erneute Bestätigung fand und der Rolle von LIPI für die Tumorgenese und -progression wurde LIPI als geeignete Zielstruktur für die Entwicklung einer Immuntherapie ausgewählt. LIPI könnte die Metastasenbildung unterstützen, indem Neoangiogenese, Proliferation, die Motilität der Tumorzellen und die Permeabilitätssteigerung von Endothelzellen gefördert wird (van Meeteren und Moolenaar 2007). Mit Hilfe von Dendritischen Zellen vom Typ 1 konnten LIPI-spezifische zytotoxische T-Zellen (CTL) induziert werden. Eine für LIPI spezifische induzierbare Immunantwort wurde bei insgesamt 13 HLA-A2+ven Spendern untersucht. Dabei war bei 3 Spendern eine Ewingtumorspezifische Aktivierung der T-Zellen zu beobachten. Bei einem Spender konnte eine signifikante

te Ewingtumor-spezifische IFN $\gamma$ -Freisetzung im Elispot gemessen werden. Bei zwei weiteren Spendern konnte eine Lyse von A673-Zellen durch aktivierte spezifische T-Zellen im Laktatdehydrogenaseassay (LDH assay) nachgewiesen werden. In den übrigen Fällen ließen sich keine spezifischen T-Zellen generieren. Die spezifischen Immunantworten waren gegen die LIPI-Peptide LDY und NLL und das CCND1-Peptid RLT gerichtet. Gegen das LIPI-Peptid SLS konnten bei keinem Spender spezifische T-Zellen generiert werden. Das CCND1-Peptid RLT wird ubiquitär exprimiert und sollte deshalb nicht in der klinischen Therapie eingesetzt werden. Ob eine Präsentation immunogener LIPI-Epitope auf ESFT *in vivo* vorliegt, müsste anhand von Ewingtumor-Biopsien sowie immunhistochemischen Verfahren oder MHC-Peptid-Komplex-Visualisierung (Denkberg et al. 2002) untersucht werden. Eine Immunisierung mithilfe längerer Peptide oder rekombinanter Proteine, die Epitope aus unterschiedlichen CTA enthalten, ist sinnvoller als eine Immunisierung mithilfe einzelner Peptid-Epitope (Kessler und Melief 2007). Ein solches Vakzin müsste nicht auf Träger bestimmter MHC-Klassen beschränkt sein und wäre somit standardisiert für viele Patienten einsetzbar. Es wäre trotz einzelner Antigenverluste der Tumorzelle noch wirksam und würde durch ausschließliche Prozessierung und Präsentation durch professionelle APC am ehesten eine Immuntoleranz durchbrechen können. Die bisherigen Publikationen sprechen dafür, dass das bisher stärkste klinische Benefit eine adoptive Immuntherapie mit T-Zellen hat. So bestätigen einige klinische Studien die hohe Effektivität der adoptiven Immuntherapie (Hanson et al. 2000; Hunder et al. 2008). Am wirkungsvollsten wäre demnach der adoptive Transfer autologer CTL mit Spezifität gegen Epitope verschiedener CTA. In der vorliegenden Arbeit konnten einzelne immunogene LIPI-Epitope identifiziert werden. Für die 50 der 136 gelisteten CTA in der CTA-Datenbank des Ludwig-Instituts für Krebsforschung (Almeida et al. 2009), für die eine Expression in mehr als einem Drittel der untersuchten Ewingtumor-Proben hier erstmals gefunden oder aber schon von anderen Autoren beobachtet werden konnte, ist sehr häufig eine spontane oder induzierbare Immunantwort (Almeida et al. 2009) vermerkt worden. Weitere immunogene Epitope könnten sich hinter den zahlreichen hier im ESFT identifizierten neuen CTA-Kandidaten verbergen, was in der Zukunft zu untersuchen wäre.



## 6 Literaturverzeichnis

- Abd-Elaziz, M., T. Moriya, J. Akahira, Y. Nakamura, T. Suzuki und H. Sasano (2005). "Immunolocalization of nuclear transcription factors, DAX-1 and Ad4BP/SF-1, in human common epithelial ovarian tumors: correlations with StAR and steroidogenic enzymes in epithelial ovarian carcinoma." *Int J Gynecol Pathol* **24**: 153-163.
- Al-Faris, N., T. Al Harbi, C. Goia, A. Pappo, J. Doyle und A. Gassas (2007). "Does consolidation with autologous stem cell transplantation improve the outcome of children with metastatic or relapsed Ewing sarcoma?" *Pediatr Blood Cancer* **49**: 190-195.
- Albino, D., P. Scaruffi, S. Moretti, S. Coco, M. Truini, C. Di Cristofano, A. Cavazzana, S. Stigliani, S. Bonassi und G. P. Tonini (2008). "Identification of low intratumoral gene expression heterogeneity in neuroblastic tumors by genome-wide expression analysis and game theory." *Cancer* **113**: 1412-1422.
- Almeida, L. G., N. J. Sakabe, A. R. deOliveira, M. C. Silva, A. S. Mundstein, T. Cohen, Y. T. Chen, R. Chua, S. Gurung, S. Gnjatic, A. A. Jungbluth, O. L. Caballero, A. Bairoch, E. Kiesler, S. L. White, A. J. Simpson, L. J. Old, A. A. Camargo und A. T. Vasconcelos (2009). "CTdatabase: a knowledge-base of high-throughput and curated data on cancer-testis antigens." *Nucleic Acids Res* **37**: D816-819.
- Aoki, J. (2004). "Mechanisms of lysophosphatidic acid production." *Semin Cell Dev Biol* **15**: 477-489.
- Aoki, J., A. Inoue und S. Okudaira (2008). "Two pathways for lysophosphatidic acid production." *Biochim Biophys Acta* **1781**: 513-518.
- Arvand, A. und C. T. Denny (2001). "Biology of EWS/ETS fusions in Ewing's family tumors." *Oncogene* **20**: 5747-5754.
- Ashar, H. R., L. James, K. Gray, D. Carr, S. Black, L. Armstrong, W. R. Bishop und P. Kirschmeier (2000). "Farnesyl transferase inhibitors block the farnesylation of CENP-E and CENP-F and alter the association of CENP-E with the microtubules." *J Biol Chem* **275**: 30451-30457.
- Atanackovic, D., J. Arfsten, Y. Cao, S. Gnjatic, F. Schnieders, K. Bartels, G. Schilling, C. Faltz, C. Wolschke, J. Dierlamm, G. Ritter, T. Eiermann, D. K. Hossfeld, A. R. Zander, A. A. Jungbluth, L. J. Old, C. Bokemeyer und N. Kroger (2007). "Cancer-testis antigens are commonly expressed in multiple myeloma and induce systemic immunity following allogeneic stem cell transplantation." *Blood* **109**: 1103-1112.
- Baird, K., S. Davis, C. R. Antonescu, U. L. Harper, R. L. Walker, Y. Chen, A. A. Glatfelter, P. H. Duray und P. S. Meltzer (2005). "Gene expression profiling of human sarcomas: insights into sarcoma biology." *Cancer Res* **65**: 9226-9235.
- Banchereau, J. und A. K. Palucka (2005). "Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer." *Nat Rev Immunol* **5**: 296-306.
- Banchereau, J. und R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." *Nature* **392**: 245-252.
- Barberi, T., L. M. Willis, N. D. Socci und L. Studer (2005). "Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells." *PLoS Med* **2**: e161.
- Barrett, T. und R. Edgar (2006). "Gene expression omnibus: microarray data storage, submission, retrieval, and analysis." *Methods Enzymol* **411**: 352-369.
- Beer, D. G., S. L. Kardia, C. C. Huang, T. J. Giordano, A. M. Levin, D. E. Misek, L. Lin, G. Chen, T. G. Gharib, D. G. Thomas, M. L. Lizyness, R. Kuick, S. Hayasaka, J. M. Taylor, M. D. Iannettoni, M. B. Orringer und S. Hanash (2002). "Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma." *Nat Med* **8**: 816-824.
- Biedler, J. L., L. Helson und B. A. Spengler (1973). "Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture." *Cancer Res* **33**: 2643-2652.
- Boczkowski, D. und S. Nair (2010). "RNA as performance-enhancers for dendritic cells." *Expert Opin Biol Ther* **10**: 563-574.

- Brinkmann, U., G. Vasmatzis, B. Lee und I. Pastan (1999). "Novel genes in the PAGE and GAGE family of tumor antigens found by homology walking in the dbEST database." *Cancer Res* **59**: 1445-1448.
- Brouwer, R., W. T. Vree Egberts, G. J. Hengstman, R. Raijmakers, B. G. van Engelen, H. P. Seelig, M. Renz, R. Mierau, E. Genth, G. J. Pruijn und W. J. van Venrooij (2002). "Autoantibodies directed to novel components of the PM/Scl complex, the human exosome." *Arthritis Res* **4**: 134-138.
- Burdach, S. und H. Jürgens (2002). "High-dose chemoradiotherapy (HDC) in the Ewing family of tumors (EFT)." *Crit Rev Oncol Hematol* **41**: 169-189.
- Burdach, S., B. van Kaick, H. J. Laws, S. Ahrens, R. Haase, D. Körholz, H. Pape, J. Dunst, T. Kahn, R. Willers, B. Engel, U. Dirksen, C. Kramm, W. Nürnberger, A. Heyll, R. Ladenstein, H. Gadner, H. Jürgens und U. Göbel (2000). "Allogeneic and autologous stem-cell transplantation in advanced Ewing tumors. An update after long-term follow-up from two centers of the European Intergroup study EICESS. Stem-Cell Transplant Programs at Dusseldorf University Medical Center, Germany and St. Anna Kinderspital, Vienna, Austria." *Ann Oncol* **11**: 1451-1462.
- Caballero, O. L. und Y. T. Chen (2009). "Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy." *Cancer Sci* **100**: 2014-2021.
- Chalk, J. G., F. G. Barr und C. D. Mitchell (1997). "Translin recognition site sequences flank chromosome translocation breakpoints in alveolar rhabdomyosarcoma cell lines." *Oncogene* **15**: 1199-1205.
- Costa, F. F., K. Le Blanc und B. Brodin (2007). "Concise review: cancer/testis antigens, stem cells, and cancer." *Stem Cells* **25**: 707-711.
- Dallas, P. B., N. G. Gottardo, M. J. Firth, A. H. Beesley, K. Hoffmann, P. A. Terry, J. R. Freitas, J. M. Boag, A. J. Cummings und U. R. Kees (2005). "Gene expression levels assessed by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time RT-PCR—how well do they correlate?" *BMC Genomics* **6**: 59.
- Davis, I. D., W. Chen, H. Jackson, P. Parente, M. Shackleton, W. Hopkins, Q. Chen, N. Dimopoulos, T. Luke, R. Murphy, A. M. Scott, E. Maraskovsky, G. McArthur, D. MacGregor, S. Sturrock, T. Y. Tai, S. Green, A. Cuthbertson, D. Maher, L. Miloradovic, S. V. Mitchell, G. Ritter, A. A. Jungbluth, Y. T. Chen, S. Gnjatic, E. W. Hoffman, L. J. Old und J. S. Cebon (2004). "Recombinant NY-ESO-1 protein with ISCOMATRIX adjuvant induces broad integrated antibody and CD4(+) and CD8(+) T cell responses in humans." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 10697-10702.
- Denkberg, G., C. J. Cohen, A. Lev, P. Chames, H. R. Hoogenboom und Y. Reiter (2002). "Direct visualization of distinct T cell epitopes derived from a melanoma tumor-associated antigen by using human recombinant antibodies with MHC-restricted T cell receptor-like specificity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 9421-9426.
- Diehn, M., G. Sherlock, G. Binkley, H. Jin, J. C. Matese, T. Hernandez-Boussard, C. A. Rees, J. M. Cherry, D. Botstein, P. O. Brown und A. A. Alizadeh (2003). "SOURCE: a unified genomic resource of functional annotations, ontologies, and gene expression data." *Nucleic Acids Res* **31**: 219-223.
- Dobke, J. (2010). "Ewing 2008", URL: [http://www.kinderkrebsinfo.de/e1676/e9032/e1758/e78199/index\\_ger.html](http://www.kinderkrebsinfo.de/e1676/e9032/e1758/e78199/index_ger.html), zuletzt aktualisiert am 23.06.2010, abgerufen am 15.10.2010.
- Dudley, M. E., J. R. Wunderlich, P. F. Robbins, J. C. Yang, P. Hwu, D. J. Schwartzentruber, S. L. Topalian, R. Sherry, N. P. Restifo, A. M. Hubicki, M. R. Robinson, M. Raffeld, P. Duray, C. A. Seipp, L. Rogers-Freezer, K. E. Morton, S. A. Mavroukakis, D. E. White und S. A. Rosenberg (2002). "Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes." *Science* **298**: 850-854.
- Evans, S. J., N. A. Datson, M. Kabbaj, R. C. Thompson, E. Vreugdenhil, E. R. De Kloet, S. J. Watson und H. Akil (2002). "Evaluation of Affymetrix Gene Chip sensitivity in rat hippocampal tissue using SAGE analysis. Serial Analysis of Gene Expression." *Eur J Neurosci* **16**: 409-413.

- Foell, J. L., M. Hesse, I. Volkmer, B. J. Schmiedel, I. Neumann und M. S. Staege (2008). "Membrane-associated phospholipase A1 beta (LIPI) Is an Ewing tumour-associated cancer/testis antigen." *Pediatr Blood Cancer* **51**: 228-234.
- Fong, L. und E. G. Engleman (2000). "Dendritic cells in cancer immunotherapy." *Annu Rev Immunol* **18**: 245-273.
- Garcia-Aragoncillo, E., J. Carrillo, E. Lalli, N. Agra, G. Gomez-Lopez, A. Pestana und J. Alonso (2008). "DAX1, a direct target of EWS/FLI1 oncoprotein, is a principal regulator of cell-cycle progression in Ewing's tumor cells." *Oncogene* **27**: 6034-6043.
- Ge, X., S. Yamamoto, S. Tsutsumi, Y. Midorikawa, S. Ihara, S. M. Wang und H. Aburatani (2005). "Interpreting expression profiles of cancers by genome-wide survey of breadth of expression in normal tissues." *Genomics* **86**: 127-141.
- Geiger, J., R. Hutchinson, L. Hohenkirk, E. McKenna, A. Chang und J. Mule (2000). "Treatment of solid tumours in children with tumour-lysate-pulsed dendritic cells." *Lancet* **356**: 1163-1165.
- Geiger, J. D., R. J. Hutchinson, L. F. Hohenkirk, E. A. McKenna, G. A. Yanik, J. E. Levine, A. E. Chang, T. M. Braun und J. J. Mule (2001). "Vaccination of pediatric solid tumor patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells can expand specific T cells and mediate tumor regression." *Cancer Res* **61**: 8513-8519.
- Georgantas, R. W., 3rd, V. Tanadve, M. Malehorn, S. Heimfeld, C. Chen, L. Carr, F. Martinez-Murillo, G. Riggins, J. Kowalski und C. I. Civin (2004). "Microarray and serial analysis of gene expression analyses identify known and novel transcripts overexpressed in hematopoietic stem cells." *Cancer Res* **64**: 4434-4441.
- Giard, D. J., S. A. Aaronson, G. J. Todaro, P. Arnstein, J. H. Kersey, H. Dosik und W. P. Parks (1973). "In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors." *J Natl Cancer Inst* **51**: 1417-1423.
- Guo, W., Y. Guo, S. Tang, H. Qu und H. Zhao (2008). "Dendritic cell-Ewing's sarcoma cell hybrids enhance antitumor immunity." *Clin Orthop Relat Res* **466**: 2176-2183.
- Hamilton, S. E., M. C. Wolkers, S. P. Schoenberger und S. C. Jameson (2006). "The generation of protective memory-like CD8+ T cells during homeostatic proliferation requires CD4+ T cells." *Nat Immunol* **7**: 475-481.
- Hanson, H. L., D. L. Donermeyer, H. Ikeda, J. M. White, V. Shankaran, L. J. Old, H. Shiku, R. D. Schreiber und P. M. Allen (2000). "Eradication of established tumors by CD8+ T cell adoptive immunotherapy." *Immunity* **13**: 265-276.
- Harao, M., S. Hirata, A. Irie, S. Senju, T. Nakatsura, H. Komori, Y. Ikuta, K. Yokomine, K. Imai, M. Inoue, K. Harada, T. Mori, T. Tsunoda, S. Nakatsuru, Y. Daigo, H. Nomori, Y. Nakamura, H. Baba und Y. Nishimura (2008). "HLA-A2-restricted CTL epitopes of a novel lung cancer-associated cancer testis antigen, cell division cycle associated 1, can induce tumor-reactive CTL." *Int J Cancer* **123**: 2616-2625.
- Hart, S., O. M. Fischer, N. Prenzel, E. Zwick-Wallasch, M. Schneider, L. Hennighausen und A. Ullrich (2005). "GPCR-induced migration of breast carcinoma cells depends on both EGFR signal transactivation and EGFR-independent pathways." *Biol Chem* **386**: 845-855.
- Hoennscheidt, C., D. Max, N. Richter und M. S. Staege (2009). "Expression of CD4 on Epstein-Barr virus-immortalized B cells." *Scand J Immunol* **70**: 216-225.
- Hofmann, O., O. L. Caballero, B. J. Stevenson, Y. T. Chen, T. Cohen, R. Chua, C. A. Maher, S. Panji, U. Schaefer, A. Kruger, M. Lehtvaslaiho, P. Carninci, Y. Hayashizaki, C. V. Jongeneel, A. J. Simpson, L. J. Old und W. Hide (2008). "Genome-wide analysis of cancer/testis gene expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 20422-20427.
- Hokey, D. A., A. T. Larregina, G. Erdos, S. C. Watkins und L. D. Falo, Jr. (2005). "Tumor cell loaded type-1 polarized dendritic cells induce Th1-mediated tumor immunity." *Cancer Res* **65**: 10059-10067.
- Holley, S. L., G. Parkes, C. Matthias, U. Bockmuhl, V. Jahnke, K. Leder, R. C. Strange, A. A. Fryer und P. R. Hoban (2001). "Cyclin D1 polymorphism and expression in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck." *Am J Pathol* **159**: 1917-1924.
- Hosaka, T., H. Kanoe, T. Nakayama, H. Murakami, H. Yamamoto, T. Nakamata, T. Tsuboyama, M. Oka, M. Kasai, M. S. Sasaki, T. Nakamura und J. Toguchida (2000).

- "Translin binds to the sequences adjacent to the breakpoints of the TLS and CHOP genes in liposarcomas with translocation t(12;6)." *Oncogene* **19**: 5821-5825.
- Hunder, N. N., H. Wallen, J. Cao, D. W. Hendricks, J. Z. Reilly, R. Rodmyre, A. Jungbluth, S. Gnjatic, J. A. Thompson und C. Yee (2008). "Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1." *N Engl J Med* **358**: 2698-2703.
- Janssen, E. M., E. E. Lemmens, T. Wolfe, U. Christen, M. G. von Herrath und S. P. Schoenberger (2003). "CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes." *Nature* **421**: 852-856.
- Jiang, J., J. Wang, S. Suzuki, V. Gajalakshmi, K. Kuriki, Y. Zhao, S. Nakamura, S. Akasaka, H. Ishikawa und S. Tokudome (2006). "Elevated risk of colorectal cancer associated with the AA genotype of the cyclin D1 A870G polymorphism in an Indian population." *J Cancer Res Clin Oncol* **132**: 193-199.
- Kaessmeyer, S. und J. Plendl (2009). "Angiogenesis and vasculogenesis in the corpus luteum in vitro." *Clin Hemorheol Microcirc* **41**: 83-101.
- Kaneko, T., Y. Kojima, Y. Umemoto, S. Sasaki, Y. Hayashi und K. Kohri (2008). "Usefulness of transcription factors Ad4BP/SF-1 and DAX-1 as immunohistologic markers for diagnosis of advanced adrenocortical carcinoma." *Horm Res* **70**: 294-299.
- Karbach, J., S. Gnjatic, A. Bender, A. Neumann, E. Weidmann, J. Yuan, C. A. Ferrara, E. Hoffmann, L. J. Old, N. K. Altorki und E. Jager (2010). "Tumor-reactive CD8+ T-cell responses after vaccination with NY-ESO-1 peptide, CpG 7909 and Montanide ISA-51: association with survival." *Int J Cancer* **126**: 909-918.
- Kasai, M., K. Aoki, Y. Matsuo, J. Minowada, R. T. Maziarz und J. L. Strominger (1994). "Recombination hotspot associated factors specifically recognize novel target sequences at the site of interchromosomal rearrangements in T-ALL patients with t(8;14)(q24;q11) and t(1;14)(p32;q11)." *Int Immunol* **6**: 1017-1025.
- Kauer, M., J. Ban, R. Kofler, B. Walker, S. Davis, P. Meltzer und H. Kovar (2009). "A molecular function map of Ewing's sarcoma." *PLoS ONE* **4**: e5415.
- Kessler, J. H. und C. J. Melief (2007). "Identification of T-cell epitopes for cancer immunotherapy." *Leukemia* **21**: 1859-1874.
- Kikuchi, E., K. Yamazaki, E. Nakayama, S. Sato, A. Uenaka, N. Yamada, S. Oizumi, H. Dosaka-Akita und M. Nishimura (2008). "Prolonged survival of patients with lung adenocarcinoma expressing XAGE-1b and HLA class I antigens." *Cancer Immun* **8**: 13.
- Kleer, C. G., Q. Cao, S. Varambally, R. Shen, I. Ota, S. A. Tomlins, D. Ghosh, R. G. Sewalt, A. P. Otte, D. F. Hayes, M. S. Sabel, D. Livant, S. J. Weiss, M. A. Rubin und A. M. Chinnaiyan (2003). "EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 11606-11611.
- Kovar, H. (2003). "Ewing tumor biology: perspectives for innovative treatment approaches." *Adv Exp Med Biol* **532**: 27-37.
- Kumaraguru, U., S. Suvas, P. S. Biswas, A. K. Azkur und B. T. Rouse (2004). "Concomitant helper response rescues otherwise low avidity CD8+ memory CTLs to become efficient effectors in vivo." *J Immunol* **172**: 3719-3724.
- Ladenstein, R., U. Potschger, M. C. Le Deley, J. Whelan, M. Paulussen, O. Oberlin, H. van den Berg, U. Dirksen, L. Hjorth, J. Michon, I. Lewis, A. Craft und H. Jurgens (2010). "Primary disseminated multifocal Ewing sarcoma: results of the Euro-EWING 99 trial." *J Clin Oncol* **28**: 3284-3291.
- Lalli, E. und P. Sassone-Corsi (2003). "DAX-1, an unusual orphan receptor at the crossroads of steroidogenic function and sexual differentiation." *Mol Endocrinol* **17**: 1445-1453.
- Laurence, V., J. Y. Pierga, S. Barthier, A. Babinet, C. Alapetite, T. Palangie, G. de Pinieux, P. Anract und P. Pouillart (2005). "Long-term follow up of high-dose chemotherapy with autologous stem cell rescue in adults with Ewing tumor." *Am J Clin Oncol* **28**: 301-309.
- Lee, D. W., K. Zhang, Z. Q. Ning, E. H. Raabe, S. Tintner, R. Wieland, B. J. Wilkins, J. M. Kim, R. I. Blough und R. J. Arceci (2000). "Proliferation-associated SNF2-like gene (PASG): a SNF2 family member altered in leukemia." *Cancer Res* **60**: 3612-3622.
- Liu, X. F., L. J. Helman, C. Yeung, T. K. Bera, B. Lee und I. Pastan (2000). "XAGE-1, a new gene that is frequently expressed in Ewing's sarcoma." *Cancer Res* **60**: 4752-4755.

- Mager, A. M., A. Grapin-Botton, K. Ladjali, D. Meyer, C. M. Wolff, P. Stiegler, M. A. Bonnin und P. Remy (1998). "The avian fli gene is specifically expressed during embryogenesis in a subset of neural crest cells giving rise to mesenchyme." *Int J Dev Biol* **42**: 561-572.
- Maksimenko, A., G. Lambert, J. R. Bertrand, E. Fattal, P. Couvreur und C. Malvy (2003). "Therapeutic potentialities of EWS-Fli-1 mRNA-targeted vectorized antisense oligonucleotides." *Ann N Y Acad Sci* **1002**: 72-77.
- Markov, V., K. Kusumi, M. G. Tadesse, D. A. William, D. M. Hall, V. Lounev, A. Carlton, J. Leonard, R. I. Cohen, E. F. Rappaport und B. Saitta (2007). "Identification of cord blood-derived mesenchymal stem/stromal cell populations with distinct growth kinetics, differentiation potentials, and gene expression profiles." *Stem Cells Dev* **16**: 53-73.
- Meyer-Wentrup, F., G. Richter und S. Burdach (2005). "Identification of an immunogenic EWS-FLI1-derived HLA-DR-restricted T helper cell epitope." *Pediatr Hematol Oncol* **22**: 297-308.
- Mills, G. B. und W. H. Moolenaar (2003). "The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer." *Nat Rev Cancer* **3**: 582-591.
- Miyagawa, Y., H. Okita, H. Nakaijima, Y. Horiuchi, B. Sato, T. Taguchi, M. Toyoda, Y. U. Katagiri, J. Fujimoto, J. Hata, A. Umezawa und N. Kiyokawa (2008). "Inducible expression of chimeric EWS/ETS proteins confers Ewing's family tumor-like phenotypes to human mesenchymal progenitor cells." *Mol Cell Biol* **28**: 2125-2137.
- Moolenaar, W. H., L. A. van Meeteren und B. N. Giepmans (2004). "The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling." *Bioessays* **26**: 870-881.
- Morishita, Y., A. Uenaka, S. Kaya, S. Sato, T. Aji und E. Nakayama (2007). "HLA-DRB1\*0410-restricted recognition of XAGE-1b37-48 peptide by CD4 T cells." *Microbiol Immunol* **51**: 755-762.
- Nakamura, Y., T. Suzuki, Y. Arai und H. Sasano (2009). "Nuclear receptor DAX1 in human prostate cancer: a novel independent biological modulator." *Endocr J* **56**: 39-44.
- Nicholaou, T., L. M. Ebert, I. D. Davis, G. A. McArthur, H. Jackson, N. Dimopoulos, B. Tan, E. Maraskovsky, L. Miloradovic, W. Hopkins, L. Pan, R. Venhaus, E. W. Hoffman, W. Chen und J. Cebon (2009). "Regulatory T-cell-mediated attenuation of T-cell responses to the NY-ESO-1 ISCOMATRIX vaccine in patients with advanced malignant melanoma." *Clin Cancer Res* **15**: 2166-2173.
- Paulussen, M., S. Ahrens, S. Burdach, A. Craft, B. Döckhorn-Dworniczak, J. Dunst, B. Fröhlich, W. Winkelmann, A. Zoubek und H. Jürgens (1998). "Primary metastatic (stage IV) Ewing tumor: survival analysis of 171 patients from the EICESS studies. European Intergroup Cooperative Ewing Sarcoma Studies." *Ann Oncol* **9**: 275-281.
- Pfeifle, C., K. Reinhardt, S. Heins, S. Burdach und M. S. Staeger (2009). "Development and characterization of HAT-sensitive Ewing tumour cells for immunotherapy." *Anticancer Res* **29**: 4489-4496.
- Platts, A. E., D. J. Dix, H. E. Chemes, K. E. Thompson, R. Goodrich, J. C. Rockett, V. Y. Rawe, S. Quintana, M. P. Diamond, L. F. Strader und S. A. Krawetz (2007). "Success and failure in human spermatogenesis as revealed by teratozoospermic RNAs." *Hum Mol Genet* **16**: 763-773.
- Pollok, S., C. Bauerschmidt, J. Sanger, H. P. Nasheuer und F. Grosse (2007). "Human Cdc45 is a proliferation-associated antigen." *FEBS J* **274**: 3669-3684.
- Quintarelli, C., G. Dotti, B. De Angelis, V. Hoyos, M. Mims, L. Luciano, H. E. Heslop, C. M. Rooney, F. Pane und B. Savoldo (2008). "Cytotoxic T lymphocytes directed to the preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) target chronic myeloid leukemia." *Blood* **112**: 1876-1885.
- Rammensee, H., J. Bachmann, N. P. Emmerich, O. A. Bachor und S. Stevanovic (1999). "SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs." *Immunogenetics* **50**: 213-219.
- Richter, G. H., S. Plehm, A. Fasan, S. Rossler, R. Unland, I. M. Bennani-Baiti, M. Hotfilder, D. Lowel, I. von Luettichau, I. Mossbrugger, L. Quintanilla-Martinez, H. Kovar, M. S. Staeger, C. Müller-Tidow und S. Burdach (2009). "EZH2 is a mediator of EWS/FLI1 driven tumor

- growth and metastasis blocking endothelial and neuro-ectodermal differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **106**: 5324-5329.
- Ridgway, D. (2003). "The first 1000 dendritic cell vaccinees." Cancer Invest **21**: 873-886.
- Riggi, N., M. L. Suva, D. Suva, L. Cironi, P. Provero, S. Tercier, J. M. Joseph, J. C. Stehle, K. Baumer, V. Kindler und I. Stamenkovic (2008). "EWS-FLI-1 expression triggers a Ewing's sarcoma initiation program in primary human mesenchymal stem cells." Cancer Res **68**: 2176-2185.
- Rosenberg, S. A., J. C. Yang und N. P. Restifo (2004). "Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines." Nat Med **10**: 909-915.
- Roth, R. B., P. Hevezi, J. Lee, D. Willhite, S. M. Lechner, A. C. Foster und A. Zlotnik (2006). "Gene expression analyses reveal molecular relationships among 20 regions of the human CNS." Neurogenetics **7**: 67-80.
- Rozengurt, E. (2002). "Neuropeptides as growth factors for normal and cancerous cells." Trends Endocrinol Metab **13**: 128-134.
- Sakamoto, Y., S. Watanabe, T. Ichimura, M. Kawasuji, H. Koseki, H. Baba und M. Nakao (2007). "Overlapping roles of the methylated DNA-binding protein MBD1 and polycomb group proteins in transcriptional repression of HOXA genes and heterochromatin foci formation." J Biol Chem **282**: 16391-16400.
- Sasaki, M., H. Ikeda, K. Itatsu, J. Yamaguchi, S. Sawada, H. Minato, T. Ohta und Y. Nakanuma (2008). "The overexpression of polycomb group proteins Bmi1 and EZH2 is associated with the progression and aggressive biological behavior of hepatocellular carcinoma." Lab Invest **88**: 873-882.
- Sato, S., Y. Noguchi, N. Ohara, A. Uenaka, M. Shimono, K. Nakagawa, F. Koizumi, T. Ishida, T. Yoshino, Y. Shiratori und E. Nakayama (2007). "Identification of XAGE-1 isoforms: predominant expression of XAGE-1b in testis and tumors." Cancer Immun **7**: 5.
- Scanlan, M. J., J. D. Gordan, B. Williamson, E. Stockert, N. H. Bander, V. Jongeneel, A. O. Gure, D. Jager, E. Jager, A. Knuth, Y. T. Chen und L. J. Old (1999). "Antigens recognized by autologous antibody in patients with renal-cell carcinoma." Int J Cancer **83**: 456-464.
- Scanlan, M. J., A. J. Simpson und L. J. Old (2004). "The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary." Cancer Immun **4**: 1.
- Schaefer, K. L., M. Eisenacher, Y. Braun, K. Brachwitz, D. H. Wai, U. Dirksen, C. Lanvers-Kaminsky, H. Juergens, D. Herrero, S. Stegmaier, E. Koscielniak, A. Eggert, M. Nathrath, G. Gosheger, D. T. Schneider, C. Bury, R. Diallo-Danebrock, L. Ottaviano, H. E. Gabbert und C. Poremba (2008). "Microarray analysis of Ewing's sarcoma family of tumours reveals characteristic gene expression signatures associated with metastasis and resistance to chemotherapy." Eur J Cancer **44**: 699-709.
- Schleiermacher, G., M. Peter, O. Oberlin, T. Philip, H. Rubie, F. Mechinaud, D. Sommelet-Olive, J. Landman-Parker, D. Bours, J. Michon und O. Delattre (2003). "Increased risk of systemic relapses associated with bone marrow micrometastasis and circulating tumor cells in localized ewing tumor." J Clin Oncol **21**: 85-91.
- Schmiedel, B. J., C. Hutter, M. Hesse und M. S. Staeger (2010). "Expression of multiple membrane-associated phospholipase A1 beta transcript variants and lysophosphatidic acid receptors in Ewing tumor cells." Mol Biol Rep **51**: 228-234.
- Seo, D. C., J. M. Sung, H. J. Cho, H. Yi, K. H. Seo, I. S. Choi, D. K. Kim, J. S. Kim, A. A. El-Aty und H. C. Shin (2007). "Gene expression profiling of cancer stem cell in human lung adenocarcinoma A549 cells." Mol Cancer **6**: 75.
- Shi, Y., J. Sawada, G. Sui, B. Affar el, J. R. Whetstine, F. Lan, H. Ogawa, M. P. Luke, Y. Nakatani und Y. Shi (2003). "Coordinated histone modifications mediated by a CtBP co-repressor complex." Nature **422**: 735-738.
- Shimono, M., A. Uenaka, Y. Noguchi, S. Sato, H. Okumura, K. Nakagawa, K. Kiura, M. Tanimoto und E. Nakayama (2007). "Identification of DR9-restricted XAGE antigen on lung adenocarcinoma recognized by autologous CD4 T-cells." Int J Oncol **30**: 835-840.
- Simpson, A. J., O. L. Caballero, A. Jungbluth, Y. T. Chen und L. J. Old (2005). "Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer." Nat Rev Cancer **5**: 615-625.

- Simpson, D. J., A. A. Fryer, A. B. Grossman, J. A. Wass, M. Pfeifer, J. M. Kros, R. N. Clayton und W. E. Farrell (2001). "Cyclin D1 (CCND1) genotype is associated with tumour grade in sporadic pituitary adenomas." Carcinogenesis **22**: 1801-1807.
- Sparmann, A. und M. van Lohuizen (2006). "Polycomb silencers control cell fate, development and cancer." Nat Rev Cancer **6**: 846-856.
- Staeger, M. S., U. Banning-Eichenseer, G. Weissflog, I. Volkmer, S. Burdach, G. Richter, C. Mauz-Korholz, J. Foll und D. Korholz (2008). "Gene expression profiles of Hodgkin's lymphoma cell lines with different sensitivity to cytotoxic drugs." Exp Hematol **36**: 886-896.
- Staeger, M. S., V. Gorelov, A. Bulankin, U. Fischer, K. Dumon, L. Hohndorf, U. Hattenhorst, C. Kramm und S. Burdach (2003a). "Stable transgenic expression of IL-2 and HSV1-tk by single and fusion tumor cell lines bearing EWS/FLI-1 chimeric genes." Pediatr Hematol Oncol **20**: 119-140.
- Staeger, M. S., G. Hansen, G. Baersch und S. Burdach (2004a). "Functional and molecular characterization of interleukin-2 transgenic Ewing tumor cells for in vivo immunotherapy." Pediatr Blood Cancer **43**: 23-34.
- Staeger, M. S., U. E. Hattenhorst, U. E. Neumann, C. Hutter, S. Foja und S. Burdach (2003b). "DNA-microarrays as tools for the identification of tumor specific gene expression profiles: applications in tumor biology, diagnosis and therapy." Klin Padiatr **215**: 135-139.
- Staeger, M. S., C. Hutter, I. Neumann, S. Foja, U. E. Hattenhorst, G. Hansen, D. Afar und S. E. Burdach (2004b). "DNA microarrays reveal relationship of Ewing family tumors to both endothelial and fetal neural crest-derived cells and define novel targets." Cancer Res **64**: 8213-8221.
- Sturn, A., J. Quackenbush und Z. Trajanoski (2002). "Genesis: cluster analysis of microarray data." Bioinformatics **18**: 207-208.
- Su, A. I., T. Wiltshire, S. Batalov, H. Lapp, K. A. Ching, D. Block, J. Zhang, R. Soden, M. Hayakawa, G. Kreiman, M. P. Cooke, J. R. Walker und J. B. Hogenesch (2004). "A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes." Proc Natl Acad Sci USA **101**: 6062-6067.
- Suminoe, A., A. Matsuzaki, H. Hattori, Y. Koga und T. Hara (2009). "Immunotherapy with autologous dendritic cells and tumor antigens for children with refractory malignant solid tumors." Pediatr Transplant **13**: 746-753.
- Suva, M. L., N. Riggi, J. C. Stehle, K. Baumer, S. Tercier, J. M. Joseph, D. Suva, V. Clement, P. Provero, L. Cironi, M. C. Osterheld, L. Guillou und I. Stamenkovic (2009). "Identification of cancer stem cells in Ewing's sarcoma." Cancer Res **69**: 1776-1781.
- Tabata, K., K. Baba, A. Shiraishi, M. Ito und N. Fujita (2007). "The orphan GPCR GPR87 was deorphanized and shown to be a lysophosphatidic acid receptor." Biochem Biophys Res Commun **363**: 861-866.
- Tirode, F., K. Laud-Duval, A. Prieur, B. Delorme, P. Charbord und O. Delattre (2007). "Mesenchymal stem cell features of Ewing tumors." Cancer Cell **11**: 421-429.
- Toes, R. E., R. Offringa, R. J. Blom, C. J. Melief und W. M. Kast (1996). "Peptide vaccination can lead to enhanced tumor growth through specific T-cell tolerance induction." Proc Natl Acad Sci U S A **93**: 7855-7860.
- Toub, N., J. R. Bertrand, A. Tamaddon, H. Elhames, H. Hillaireau, A. Maksimenko, J. Maccario, C. Malvy, E. Fattal und P. Couvreur (2006). "Efficacy of siRNA nanocapsules targeted against the EWS-Fli1 oncogene in Ewing sarcoma." Pharm Res **23**: 892-900.
- Truong, A. H. und Y. Ben-David (2000). "The role of Fli-1 in normal cell function and malignant transformation." Oncogene **19**: 6482-6489.
- Tusher, V. G., R. Tibshirani und G. Chu (2001). "Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response." Proc Natl Acad Sci U S A **98**: 5116-5121.
- van Doorninck, J. A., L. Ji, B. Schaub, H. Shimada, M. R. Wing, M. D. Krailo, S. L. Lessnick, N. Marina, T. J. Triche, R. Sposto, R. B. Womer und E. R. Lawlor (2010). "Current treatment protocols have eliminated the prognostic advantage of type 1 fusions in Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group." J Clin Oncol **28**: 1989-1994.

- van Meeteren, L. A. und W. H. Moolenaar (2007). "Regulation and biological activities of the autotaxin-LPA axis." *Prog Lipid Res* **46**: 145-160.
- van Meeteren, L. A., P. Ruurs, C. Stortelers, P. Bouwman, M. A. van Rooijen, J. P. Pradere, T. R. Pettit, M. J. Wakelam, J. S. Saulnier-Blache, C. L. Mummery, W. H. Moolenaar und J. Jonkers (2006). "Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development." *Mol Cell Biol* **26**: 5015-5022.
- Varambally, S., S. M. Dhanasekaran, M. Zhou, T. R. Barrette, C. Kumar-Sinha, M. G. Sanda, D. Ghosh, K. J. Pienta, R. G. Sewalt, A. P. Otte, M. A. Rubin und A. M. Chinnaiyan (2002). "The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer." *Nature* **419**: 624-629.
- Verhoeven, D. H., A. S. de Hooge, E. C. Mooiman, S. J. Santos, M. M. ten Dam, H. Gelderblom, C. J. Melief, P. C. Hogendoorn, R. M. Egeler, M. J. van Tol, M. W. Schilham und A. C. Lankester (2008). "NK cells recognize and lyse Ewing sarcoma cells through NKG2D and DNAM-1 receptor dependent pathways." *Mol Immunol* **45**: 3917-3925.
- Viemann, D., M. Goebeler, S. Schmid, U. Nordhues, K. Klimmek, C. Sorg und J. Roth (2006). "TNF induces distinct gene expression programs in microvascular and macrovascular human endothelial cells." *J Leukoc Biol* **80**: 174-185.
- Wai, D. H., K. L. Schaefer, A. Schramm, E. Korsching, F. Van Valen, T. Ozaki, W. Boecker, L. Schweigerer, B. Dockhorn-Dworniczak und C. Poremba (2002). "Expression analysis of pediatric solid tumor cell lines using oligonucleotide microarrays." *Int J Oncol* **20**: 441-451.
- Yeoh, E. J., M. E. Ross, S. A. Shurtleff, W. K. Williams, D. Patel, R. Mahfouz, F. G. Behm, S. C. Raimondi, M. V. Relling, A. Patel, C. Cheng, D. Campana, D. Wilkins, X. Zhou, J. Li, H. Liu, C. H. Pui, W. E. Evans, C. Naeve, L. Wong und J. R. Downing (2002). "Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling." *Cancer Cell* **1**: 133-143.
- Yonemitsu, Y., F. Imazeki, T. Chiba, K. Fukai, Y. Nagai, S. Miyagi, M. Arai, R. Aoki, M. Miyazaki, Y. Nakatani, A. Iwama und O. Yokosuka (2009). "Distinct expression of polycomb group proteins EZH2 and BMI1 in hepatocellular carcinoma." *Hum Pathol* **40**: 1304-1311.
- Zhou, Q., A. L. Guo, C. R. Xu, S. J. An, Z. Wang, S. Q. Yang und Y. L. Wu (2008). "A dendritic cell-based tumour vaccine for lung cancer: full-length XAGE-1b protein-pulsed dendritic cells induce specific cytotoxic T lymphocytes in vitro." *Clin Exp Immunol* **153**: 392-400.
- Zou, W. (2005). "Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance." *Nat Rev Cancer* **5**: 263-274.
- Zwaveling, S., M. P. Vierboom, S. C. Ferreira Mota, J. A. Hendriks, M. E. Ooms, R. P. Suttmuller, K. L. Franken, H. W. Nijman, F. Ossendorp, S. H. Van Der Burg, R. Offringa und C. J. Melief (2002). "Antitumor efficacy of wild-type p53-specific CD4(+) T-helper cells." *Cancer Res* **62**: 6187-6193.



## 7 Anhang

**Tabelle A1. Überexpression in ESFT ohne Überexpression im Hoden (HG\_U133Plus2.0).**

Nach Microarraydaten überexprimierte Gene im ESFT ohne gleichzeitige Überexpression im Hoden, die nach der SOURCE-Datenbank (Dien et al. 2003) jedoch im Hoden, in Ovarien oder Plazenta Expression aufwiesen und in höchstens 6 zusätzlichen Geweben des Normal body atlas (NBA) nach SOURCE exprimiert werden, sind hier als mögliche neue CTA aufgelistet. Dabei wurden Stammzellen, Hoden, Ovar und Plazenta aus dem NBA ausgenommen. Alle SONDENSÄTZE der Gene sind angeführt. Fett gedruckte Gene wurden auch in den Datensätzen des Microarrays HG\_U133A als CTA identifiziert. Auf dem X-Chromosom kodierte Gene sind mit einem + gekennzeichnet.

Gen-Symbol	SONDENSÄTZE	Anzahl NBA-Gewebe mit Expression nach SOURCE	Expression nach SOURCE in Hoden (H), Ovar (O) und Plazenta (P)
IMP5	1563367_at, 231253_at, 237536_at	1, Gehirn	H
LIPI	242178_at	1, Knochen	H
NKX6-1	221366_at	1, Pankreas	O
DEPDC1B	226980_at, 1558437_at, 233115_at	1, Leber	P
<b>CALCB</b>	214636_at	2, Knochen, Gehirn	H
TWIST1	213943_at	2, Ohr, Uterus	O
KMO	211138_s_at, 205306_x_at, 205307_s_at	2, Leber, Niere	P
NEUROD6	220045_at	3	H
SFPQ	201586_s_at, 201585_s_at, 214016_s_at, 226898_s_at, 221768_at	3	H
FAM60A	223038_s_at, 220147_s_at	4	H, O, P
FLJ20105+	219650_at, 233253_at, 237707_at	4	H, O
E2F7	228033_at, 241725_at	4	H, P
LOC401074	1559827_at, 1559827_at, 1564175_at	4	H
PAX3	231666_at, 207679_at, 231490_at, 216059_at, 207680_x_at	4	H
PCDH8	206935_at	4	H
POU4F1	211341_at, 206940_s_at, 231354_at	4	H
SLC5A6	204087_s_at	4	H
TCERG1L	231257_at	4	H
TIMM10	1555764_s_at, 218408_at	4	O, P
BCAT1	214452_at, 225285_at, 214390_at, 226517_at	5	H, O
FBXO11	203255_at, 222119_s_at, 232364_at, 239603_x_at, 219208_at	5	H, O
GEMIN5	225712_at	5	H, O
MPHOSPH9	215731_s_at, 1558369_at, 206205_at, 221965_at, 237158_s_at	5	H, O
RKHD2	218247_s_at, 1556873_at, 1556874_at, 222567_s_at, 227275_at	5	H, O
SEC61A2	222824_at, 219499_at, 228747_at, 230215_at	5	H, O
GFRA2	205721_at, 205722_s_at	5	H, P
GSTCD	235387_at, 1554518_at, 220063_at,	5	H, P
<b>NASP</b>	201970_s_at, 201969_at, 242918_at	5	H, P
NUP107	218768_at	5	H, P
PAPPA	224941_at, 228128_x_at, 224940_s_at, 1558607_at, 1558608_at, 1559400_s_at, 1559928_at, 201981_at, 201982_s_at, 224942_at, 232748_at, 240295_at, 240450_at	5	H, P
TOPBP1	202633_at, 1561924_at	5	H, P
YEATS4	218911_at	5	H, P
<b>ATAD2</b>	218782_s_at, 235266_at, 222740_at, 228401_at	5	H

CDCA7	224428_s_at, 230060_at	5	H
CDH8	217574_at, 1564291_at, 210518_at	5	H
<b>EZH2</b>	203358_s_at, 215006_at	5	H
FAM29A	222685_at, 233655_s_at, 218602_s_at	5	H
FANCB+	1557218_s_at, 1553244_at, 1557217_at, 243597_at	5	H
GALNT2	217788_s_at, 223991_s_at, 239930_at, 217787_s_at	5	H
HDAC2	201833_at	5	H
PGLYRP2	242817_at	5	H
PPP2R5C	1554365_a_at, 213305_s_at, 237181_at, 214083_at, 201877_s_at, 1557718_at, 1554364_at	5	H
<b>SOX11</b>	204915_s_at, 204913_s_at, 204914_s_at	5	H
UGT3A1	236597_at, 237572_at, 235904_at	5	H
E2F5	221586_s_at, 231237_x_at	5	O
C1orf19	225400_at, 225399_at, 224147_at	5	P
C12orf48	220060_s_at, 227928_at, 224147_at	6	H, O
CCT7	200812_at	6	H, O
CDK3	226396_at, 229468_at, 207188_at	6	H, O
<b>KIF14</b>	206364_at, 236641_at	6	H, O
RPL26L1	218830_at	6	H, O
TMEM126A	223334_at	6	H, O
TNFRSF10B	209294_x_at, 209295_at, 210405_x_at	6	H, O
TRMT5	227653_at, 227653_at	6	H, O
ZIC2	223642_at	6	H, P
ACTR6	218395_at, 241794_at	6	H, P
ALDH18A1	222416_at, 217791_s_at	6	H, P
CYYR1	235044_at, 228665_at	5	H, P
<b>DKK2</b>	219908_at, 224199_at	6	H, P
DONSON	221677_s_at	6	H, P
PFAS	213302_at	6	H, P
PSPC1	222611_s_at, 243997_x_at, 226724_s_at, 226574_at, 222612_at, 218371_s_at	6	H, P
RNF182	230720_at	6	H, P
SLC6A15	232263_at, 206376_at, 240419_at, 239352_at, 1569916_at	6	H, P
TMEM135	222209_s_at, 1554866_at	6	H, P
<b>BUB1B</b>	203755_at	6	H
ALG6	219649_at	6	H
B3GALNT2	1553691_at, 226233_at, 1562391_at, 1561714_at	6	H
BTF3L4	226963_at, 225976_at	6	H
BUB3	201457_x_at, 201456_s_at, 201458_s_at, 209974_s_at, 229827_at	6	H
C12orf32	225836_s_at, 225837_at, 244020_at	6	H
CKAP2	218252_at, 1554264_at	6	H
DDX18	208897_s_at, 205763_s_at, 208895_s_at, 208896_at	6	H
<b>DTL</b>	222680_s_at, 218585_s_at	6	H
FARSLB	223035_s_at, 232063_x_at, 223036_at	6	H
FLJ14803	235158_at, 222267_at	6	H
<b>HELLS</b>	223556_at, 220085_at, 227350_at, 234040_at, 242890_at	6	H
HS2ST1	203283_s_at, 203284_s_at, 203285_s_at, 230465_at	6	H
JAKMIP2/MYT1L	205888_s_at	6	H
KIAA0179	212846_at, 212844_at	6	H
<b>KNTC1</b>	206316_s_at	6	H

LONRF1	226038_at, 242379_at, 236556_s_at, 236230_at, 215322_at	6	H
LRRC40	218577_at, 215063_x_at, 1566449_at	6	H
LSM8	219119_at	6	H
MDS025	218288_s_at, 222577_at, 1568834_s_at,	6	H
NUP205	212247_at, 222382_x_at	6	H
POLA2	204441_s_at, 244575_at, 236546_at	6	H
RAD51AP1	204146_at	6	H
RARSL	232902_s_at, 232901_at, 225264_at, 1561048_at	6	H
RBM11	232549_at	6	H
RSL1D1	212018_s_at, 212019_at	6	H
<b>SMARCC1</b>	201075_s_at, 239238_at, 201072_s_at, 201073_s_at, 201074_at	6	H
SQLC	209218_at, 213562_s_at, 1557352_at, 213577_at	6	H
TMEM48	218073_s_at, 234672_s_at	6	H
TMPO	203432_at, 209754_s_at, 209753_s_at, 224944_at	6	H
TPRKB	219030_at	6	H
<b>VRK1</b>	203856_at	6	H
WDHD1	216228_s_at, 204727_at, 204728_s_at	6	H
XRCC5	208642_s_at, 208643_s_at	6	H
XRN2	223002_s_at, 233878_s_at	6	H
ZRF1	213097_s_at	6	H, O, P
MFAP3	1552312_a_at	6	O, P
ACAT2	209608_s_at	6	O
CART1	206837_at	6	O
C12orf52	221777_at	6	O
C16orf72	1568954_s_at, 225183_at, 228373_at	6	O
CHEK2	210416_s_at	6	O
<b>H2AFY2</b>	218445_at, 1556815_at, 1563319_at	6	O
NPW	243110_x_at	6	O
SNRPD2	200826_at	6	O
SSSCA1	203114_at	6	O
CASP6	209790_s_at, 242323_at, 22808_at, 211464_x_at	6	P
CCK	205827_at	6	P
CENPH	231772_x_at	6	P
CYTL1	219837_s_at	6	P
GABPA/GABPAP	210188_at	6	P
HERC4	208055_s_at, 233509_at, 232026_at, 225989_at, 225988_at, 208054_at	6	P
HMG2L1	212597_s_at, 212596_s_at	6	P
MFAP2	203417_at	6	P
MRPL44	222555_s_at, 218202_x_at	6	P
MTMR1+	214975_s_at, 213511_s_at, 216095_x_at, 216303_s_at	6	P
PMAIP1	204286_s_at, 204285_s_at	6	P
PRSS35	235874_at	6	P
PSMD10+	1554577_a_at, 219485_s_at	6	P
RAD54B	219494_at, 235846_at, 220549_at,	6	P
SLC30A7	240277_at, 243524_at, 239596_at, 226601_at, 226217_at	6	P
SLFN11	226743_at	6	P
UCK2	209825_s_at	6	P

**Tabelle A2. Überexpression in ESFT ohne Überexpression im Hoden (HG\_U133A).** Nach Microarraydaten überexprimierte Gene in ESFT ohne gleichzeitige Überexpression im Hoden, die nach der SOURCE-Datenbank (Diehn et al. 2003) jedoch im Hoden, in Ovarien oder in Plazenta Expression aufwiesen und in höchstens 6 zusätzlichen Geweben des NBA nach SOURCE exprimiert werden, sind hier als mögliche neue CTA aufgelistet. Dabei wurden Stammzellen, Hoden, Ovar und Plazenta aus dem NBA ausgenommen. Alle SONDENSÄTZE der Gene sind angeführt. Fett gedruckte Gene wurden auch in den Daten des Microarrays HG\_U133Plus2.0 als CTA identifiziert.

Gen-Symbol	SONDENSÄTZE	Anzahl NBA-Gewebe mit Expression nach SOURCE	Expression nach SOURCE in Hoden (H), Ovar (O) und Plazenta (P)
NANOG	220184_at	0, embryonales Gewebe	H
POU4F2	207725_at	1, Auge	H
<b>CALCB</b>	214636_at	2, Knochen, Gehirn	H
SMA3/SMA5	215043_s_at	2, Tonsille, Uterus	H
SLC18A3	207150_at	3	H, P
PAX7	208060_at	3	H
GRM2	208465_at	4	H
HOXD10	207373_at	4	O
MPHOSPH9	215731_s_at, 206205_at, 221965_at	5	O
ZNF324	205182_s_at	5	H, O
<b>SOX11</b>	204913_s_at, 204915_s_at, 204914_s_at	5	H
ZNF696	220967_s_at	5	O
UTS2	220784_s_at	5	P
UTS3	220785_at	5	P
KIAA0892	217652_at, 212505_s_at, 216926_s_at	6	H, O
<b>DKK2</b>	219908_at	6	H, P
SMARCAL1	218452_at	6	H
<b>SMARCC1</b>	201073_s_at, 201073_s_at, 201074_at, 201075_at, 201072_s_at	6	H
VRK1	203856_at	6	H
TDRD3	208089_s_at	6	H
RAD52	205647_at, 210630_s_at, 211904_x_at, 211994_at,	6	H
KIAA0555	205889_s_at, 205888_s_at	6	H
RNF24	204669_s_at, 204668_at, 210706_s_at, 216179_x_at	6	H
ALDH7A1	208950_s_at, 208951_at, 213591_at	6	O, P
C21orf127	220311_at	6	O, P
RCN3	61734_at, 219102_at	6	O, P
H2AFY2	218445_at	6	O
FUS	200959_at, 217370_x_at	6	O
PDE9A	205593_s_at	6	O
MDFI	205375_at	6	O
HOXD11	214604_at	6	P
ENPP1	205066_s_at, 205065_at	6	P

**Tabelle A3. Überexpression in ESFT und Überexpression im Hoden in Microarraydaten (HG\_U133Plus2.0).** Überexprimierte Gene in ESFT mit gleichzeitiger Überexpression im Hoden. In der SOURCE-Datenbank (Diehn et al. 2003) wurde nach einer Bestätigung der Expression im Hoden gesucht und nach Anzahl der NBA-Gewebe mit Expression der neuen CTA-Kandidaten wurde bei SOURCE ebenfalls gesucht. Dabei wurden embryonale Zellen, Stammzellen, Hoden, Ovar und Plazenta aus den NBA ausgenommen. Expressionswerte im Hoden, der Median der Expressionswerte im ESFT und die 90. Perzentil der Expressionswerte des NBA sind angegeben. Fett gedruckte Gene wurden auch in den Daten des anderen Microarrays (HG\_U133Plus2.0) und ggf. nach der Suche bei SOURCE als CTA identifiziert. Auf dem X-Chromosom kodierte Gene sind mit einem + gekennzeichnet. n. a. = nicht analysierbar.

Gen-Symbol	Sondensatz	Median ESFT	Hoden-Mittelwert	90. Perzentil des NBA-Gewebes	Summe NBA-Gewebe mit Expression	Prozent ESFT mit Expression	Anzahl NBA-Gewebe mit Expression nach SOURCE	Expression nach SOURCE im Hoden
ABI2	209856_x_at	1061	1028	380	1	100 %	8	ja
ACP1	201629_s_at	4017	1612	420	1	100 %	7	
ACTL6A	202666_s_at	3402	2881	1049	0	100 %	7	ja
AKR1CL2	1555220_a_at	106	624	37	2	88 %	7	ja
AOF2	212348_s_at	3829	3782	1400	0	81 %	8	ja
BRAP	209922_at	341	1700	121	2	100 %	7	ja
BRRN1	212949_at	1098	1257	422	2	100 %	n. a.	
<b>BUB1</b>	209642_at	1985	1937	483	6	100 %	6	ja
C16orf73	237265_at	710	1173	92	5	100 %	3, Haut, Knochen, Hirn	ja
C18orf10	212055_at	11830	6367	1494	1	88 %	8	ja
C18orf10	213617_s_at	3287	3387	1140	1	100 %	8	ja
C19orf58	218260_at	1714	2488	641	2	100 %	8	
C1orf112	220840_s_at	852	685	188	5	100 %	7	ja
C1orf121	219875_s_at	281	310	67	1	100 %	7	ja
C1orf135	222946_s_at	305	450	103	3	100 %	7	ja
C3orf38	226524_at	1094	1496	358	0	100 %	5	
C9orf116	221946_at	453	963	32	0	100 %	7	ja
C9orf116	59437_at	817	1259	249	0	100 %	7	ja
<b>CARHSP1</b>	218384_at	7625	7953	1798	3	100 %	7	ja
CARS	240983_s_at	388	377	135	4	100 %	10	
CCDC34	226287_at	2138	3629	579	0	100 %	6	ja
CCNB2	202705_at	5650	5304	1772	2	100 %	9	
<b>CCT2</b>	201946_s_at	13874	6327	1328	0	100 %	6	ja
<b>CCT2</b>	201947_s_at	22528	18160	4315	0	100 %	6	ja
CDC25A	204695_at	707	573	57	2	100 %	7	
CDC25C	205167_s_at	872	1363	219	2	100 %	7	ja
<b>CDC45L</b>	204126_s_at	1289	640	44	1	100 %	8	ja
CDCA1	223381_at	2780	2213	594	2	100 %	5	ja
CDCA2	226661_at	1769	2158	459	4	100 %	5	ja
CDCA3	221436_s_at	1269	1076	398	5	100 %	10	
CDKN3	1555758_a_at	4406	11440	895	3	100 %	8	
CDKN3	209714_s_at	3460	12917	1162	2	100 %	8	
CDV3	213554_s_at	3053	3036	789	0	75 %	9	

CDV3	213548_s_at	694	956	195	3	100 %	9	
CENPL	1554271_a_at	970	813	259	1	100 %	8	
CEP55	218542_at	2192	1688	337	4	100 %	9	
CEP76	52285_f_at	2111	588	283	1	100 %	6	ja
CEP76	219311_at	1121	1249	205	2	100 %	6	ja
CKS2	204170_s_at	13699	6369	2678	4	100 %	8	
CLPB	221845_s_at	710	8422	271	4	94 %	8	ja
COIL	203653_s_at	3606	6438	722	0	75 %	5	ja
COIL	203654_s_at	2027	7545	703	0	100 %	5	ja
COMMD4	206441_s_at	1951	1863	738	0	88 %	9	
CPSF3	225082_at	3568	3038	869	0	100 %	7	ja
CSE1L	201112_s_at	15747	8030	2137	0	100 %	9	ja
CSE1L	210766_s_at	7762	4705	1446	0	100 %	9	ja
CTDSPL2	1555106_a_at	803	758	156	0	100 %	6	ja
CUL4B	215997_s_at	1625	634	201	0	100 %	8	ja
CUL4B	210257_x_at	919	989	320	0	94 %	8	ja
DBF4	204244_s_at	2710	4455	449	2	100 %	8	ja
DBF4B	1555378_at	77	55	64	1	50 %	8	ja
DBF4B	206661_at	67	535	248	1	0 %	8	ja
DCUN1D1	222678_s_at	782	12110	210	8	100 %	6	ja
DDX20	224315_at	1363	343	244	0	100 %	8	ja
DDX20	223331_s_at	2057	9988	737	0	100 %	8	ja
DDX39	201584_s_at	9831	10427	3203	2	100 %	8	ja
DEPDC1	220295_x_at	1635	1034	417	2	100 %	7	ja
DIAPH3	232596_at	362	1639	50	5	100 %	8	ja
DRG1	202810_at	7005	12770	2692	1	100 %	6	ja
DSCR2	203405_at	3645	9769	1042	0	100 %	7	ja
ELAVL1	201727_s_at	1647	2009	540	0	100 %	8	
EPB41/ MRPS15	221437_s_at	3101	3296	897	2	100 %	8	
EPB41	226296_s_at	15006	15723	4913	2	100 %	8	
EXOC5	218748_s_at	1039	1087	213	4	100 %	7	ja
EXOC5	225084_at	3396	5786	2873	0	31 %	7	ja
<b>EXOSC4</b>	218695_at	1405	2033	484	4	100 %	9	
<b>EXOSC4</b>	58696_at	2232	2317	799	0	100 %	9	
FAM54A	228069_at	800	1276	369	1	100 %	7	ja
FAM92A1	235391_at	3657	10038	1015	0	100 %	6	ja
FLJ32745	235644_at	354	477	75	5	100 %	6	ja
FLJ37034	229622_at	2013	1927	671	3	81 %	7	ja
GEMIN6	219539_at	1536	1670	439	0	100 %	8	
GINS1	206102_at	4517	1475	636	2	100 %	8	
GMPS	214431_at	4117	6120	1023	0	100 %	8	ja
GPIAP1	200722_s_at	7556	6214	1032	0	100 %	7	ja
GPIAP1	200723_s_at	4211	6922	2675	0	63 %	7	ja
GPIAP1	243370_at	315	413	262	0	31 %	7	ja
HMMR	207165_at	8786	2073	1285	3	100 %	1, Mamma	
HMMR	1557029_at	1079	444	187	2	75 %	1, Mamma	
HMMR	1562677_at	153	123	53	7	88 %	1, Mamma	
HMMR	209709_s_at	1667	1140	781	2	100 %	1, Mamma	

HN1	217755_at	6049	8424	1247	2	100 %	8	
IGF2BP1	227377_at	1019	306	74	0	100 %	5	ja
IGF2BP3	203819_s_at	2112	803	128	3	100 %	5	ja
IGF2BP3	203820_s_at	1755	518	222	0	100 %	5	ja
INTS7	222250_s_at	1368	1495	529	0	100 %	8	ja
KIAA1008	234660_s_at	1235	1220	395	0	94 %	7	ja
KIAA1211	227230_s_at	1636	1932	441	3	100 %	8	ja
KIAA1333	223254_s_at	5771	1877	766	0	81 %	8	ja
KIAA1333	223258_s_at	782	1750	259	0	100 %	8	ja
KIF2	203087_s_at	3113	3245	844	2	100 %	4	ja
KIF2	203086_at	1464	1059	398	2	100 %	4	ja
KIF2C	211519_s_at	2200	3466	565	1	100 %	7	ja
KLHL7	220238_s_at	847	1844	174	4	100 %	6	ja
KLHL7	220239_at	1092	3124	349	2	94 %	6	ja
KPNA2/LO C643995	211762_s_at	18809	11045	2272	2	100 %	6	ja
KPNA2/LO C643995	201088_at	12371	15810	3943	1	100 %	6	ja
LGALS8	210732_s_at	1144	1834	242	1	100 %	10	
LGALS8	208934_s_at	2106	2748	524	1	69 %	10	
LIN28B	229349_at	1006	421	142	5	69 %	4	ja
LOC201725	235088_at	1074	1004	253	1	100 %	n. a.	
LOC642705	228066_at	404	624	96	3	100 %	n. a.	
LOXHD1	241117_at	432	533	61	4	94 %	1, Gehirn	ja
LUZP5	219588_s_at	2028	1347	676	1	100 %	8	ja
<b>MCM4</b>	212141_at	3921	1994	643	6	100 %	7	ja
<b>MLF1IP</b>	218883_s_at	5809	11120	2040	2	100 %	6	ja
<b>MLF1IP</b>	229305_at	805	652	417	1	94 %	6	ja
MND1	223700_at	1276	517	210	3	100 %	7	
MPP6	205429_s_at	715	1101	173	1	100 %	7	
MRPL39	218558_s_at	3594	3238	1341	1	100 %	7	
MRPL42	217919_s_at	8182	3093	907	0	100 %	9	
MRPL47	223480_s_at	7956	6644	2367	0	100 %	9	
MTCH2	217772_s_at	6934	5770	1996	0	100 %	7	ja
MYL6B	204173_at	6403	6472	2315	3	100 %	9	
<b>NEK2</b>	211080_s_at	945	1372	231	2	100 %	7	ja
<b>NEK2</b>	204641_at	3735	6629	1070	5	100 %	7	ja
NOC4L	218860_at	594	609	173	2	100 %	8	
<b>NR0B1+</b>	206645_s_at	6991	1179	257	4	88 %	5	ja
NSBP1	221606_s_at	1695	2178	537	0	88 %	6	ja
NUDT11	219855_at	2987	2388	660	7	100 %	5	ja
NUDT21	202697_at	2569	3025	637	1	100 %	6	
<b>NUP155</b>	206550_s_at	1553	4529	406	0	100 %	7	ja
NUP88	202900_s_at	3206	5955	1057	0	100 %	9	ja
NXT2	209628_at	2074	2197	783	1	94 %	6	ja
OIP5	213599_at	1659	2396	541	3	100 %	5	ja
<b>PBK</b>	219148_at	9004	5188	443	2	100 %	7	ja
PCDHB2	231725_at	571	813	224	0	75 %	6	ja
PCDHB3	231394_at	3066	3077	74	3	75 %	6	

PCDHB3	221410_x_at	246	156	50	4	88 %	6	
PHOSPHO1	236218_at	623	572	100	7	100 %	2, Him, Knochen	ja
PLK4	211088_s_at	203	156	49	5	88 %	6	ja
PLK4	204887_s_at	1449	1770	376	2	100 %	6	ja
PRAME	204086_at	3701	1999	191	0	75 %	7	ja
PSME3	209853_s_at	1909	1387	436	2	100 %	9	
PSME3	200987_x_at	2215	1643	768	1	100 %	9	
PTTG1	203554_x_at	11132	9353	3737	3	100 %	6	ja
<b>RANBP5</b>	211955_at	11094	8601	943	1	100 %	8	ja
RDBP	209219_at	3473	5208	1239	1	100 %	7	
RIBC2	206526_at	253	2108	43	3	75 %	8	ja
<b>RNF141</b>	219104_at	1413	3301	553	2	100 %	8	ja
RNF6	210932_s_at	259	334	86	7	100 %	8	ja
RNF6	203403_s_at	3387	3176	1443	0	75 %	8	ja
RPL39L	210115_at	1761	5188	343	2	94 %	8	ja
RUVBL2	201459_at	5097	7921	949	0	100 %	7	ja
SAC3D1	205449_at	2169	3189	791	1	94 %	9	
SGOL2	230165_at	2040	2809	377	1	100 %	7	ja
SGOL2	235425_at	1491	3804	975	1	94 %	7	ja
SSX1/LOC6 52630+	206626_x_at	769	1712	289	1	81 %	6	ja
SSX2+	207493_x_at	719	1219	210	2	81 %	4	ja
SSX2/LOC6 53088+	210497_x_at	188	2192	120	2	75 %	4	ja
SSX2	215881_x_at	288	609	341	1	25 %	4	ja
SSX4/SSX4 B+	211425_x_at	554	915	206	0	69 %	4	
SURF2	205224_at	445	1339	172	4	94 %	10	
SUV39H2	1554572_a_at	1870	1753	337	0	100 %	8	ja
SYCP1	216917_s_at	343	2522	105	1	69 %	0	ja
TAF9	202168_at	5003	7514	1788	0	94 %	7	
TBRG4	220789_s_at	1095	479	183	3	100 %	9	
TEX15	232760_at	931	999	83	1	100 %	6	ja
TEX15	221448_s_at	2022	728	321	0	88 %	6	ja
THUMPD3	223804_s_at	1668	3884	633	1	100 %	8	ja
TIMM50	224913_s_at	3490	2004	768	2	100 %	8	
TIPIN	219258_at	1412	1077	313	1	100 %	7	
TMEM97	212281_s_at	6056	3901	1139	5	100 %	6	ja
TMEM97	212282_at	5930	3873	1145	3	100 %	6	ja
TP53RK	225402_at	1359	1368	355	0	100 %	8	
TRIP13	204033_at	3120	1776	597	1	100 %	7	ja
<b>TSN</b>	201504_s_at	1783	1371	283	6	100 %	7	ja
TSR1	221987_s_at	2846	597	407	1	100 %	9	ja
TSR1	218156_s_at	2333	1573	489	1	100 %	9	ja
TTK	204822_at	2687	2964	826	2	100 %	6	ja
TUBB2C	208977_x_at	15861	27675	6584	3	100 %	9	
TUBG1	201714_at	3862	7800	1261	2	100 %	8	ja
UBE2N	201523_x_at	4947	12506	1442	0	100 %	8	ja
<b>UBE2S/ LOC651816</b>	202779_s_at	8468	5321	1519	4	100 %	9	



USP1	202413_s_at	9486	5630	2223	0	100 %	7	ja
UTP18	203721_s_at	5970	4205	1304	0	100 %	7	
WDR51A	226355_at	584	657	223	4	100 %	5	
WDR54	225898_at	3110	3116	1103	0	100 %	6	ja
<b>WHSC1</b>	209052_s_at	683	786	257	2	100 %	8	
<b>WHSC1</b>	209053_s_at	1862	2497	793	3	100 %	8	
<b>XAGE1/LO C653048+</b>	220057_at	1505	856	76	3	100 %	0	ja
XPNPEP3	227910_at	167	216	60	3	75 %	7	ja
XRCC4	205071_x_at	260	160	54	3	100 %	7	ja
YWHAZ	200641_s_at	9291	8586	3088	1	100 %	8	
ZNF259	200054_at	3069	1411	780	0	94 %	9	
ZNF259	217185_s_at	916	1176	357	0	100 %	9	
<b>ZWILCH</b>	218349_s_at	1751	2281	300	2	100 %	6	ja

**Tabelle A4. Überexpression im ESFT und im Hoden (HG\_U133A).** In der SOURCE-Datenbank (Diehn et al. 2003) wurde nach einer Bestätigung der Expression im Hoden gesucht und nach Anzahl der NBA-Gewebe mit einer Expression der neuen CTA-Kandidaten wurde bei SOURCE ebenfalls gesucht. Dabei wurden Stammzellen, Hoden, Ovar und Plazenta aus den NBA ausgenommen. Expressionswerte im Hoden, der Median der Expressionswerte in ESFT und die 90. Perzentil der Expressionswerte des NBA sind angegeben. Fett gedruckte Gene wurden auch in den Daten des Microarrays HG\_U133Plus2.0 und ggf. nach der Suche bei SOURCE als CTA identifiziert. Auf dem X-Chromosom kodierte Gene sind mit einem + gekennzeichnet. n. a. = nicht analysierbar.

Gen-Symbol	Sondensatz	Median ESFT	Hoden-Mittelwert	90. Perzentil NBA-Gewebe	Summe NBA-Gewebe mit Expression	Prozent ESFT mit Expression	Anzahl NBA-Expression nach SOURCE	Expression nach SOURCE im Hoden
ASPM	219918_s_at	800	451	113	9	100 %	7	ja
<b>ATAD2</b>	218782_s_at	593	748	204	5	94 %	5	ja
BIRC5	202095_s_at	662	736	153	8	100 %	8	
BM039	219555_s_at	216	206	59	4	88 %	8	
<b>BUB1</b>	209642_at	321	922	178	5	97 %	6	ja
<b>BUB1</b>	215509_s_at	112	398	43	2	76 %	6	ja
<b>BUB1B</b>	203755_at	834	1418	263	3	91 %	10	
C10orf3	218542_at	285	1040	82	8	100 %	n. a.	
C14orf131	221709_s_at	298	448	59	5	100 %	7	
C22orf18	218741_at	309	240	96	8	97 %	8	
<b>CARHSP1</b>	218384_at	2342	2208	797	7	94 %	7	ja
<b>CCT2</b>	201947_s_at	4296	7091	2296	0	74 %	6	ja
<b>CCT2</b>	201946_s_at	2381	4226	873	0	94 %	6	ja
CDC20	202870_s_at	860	1061	282	7	100 %	7	ja
<b>CDC45L</b>	204126_s_at	175	242	46	2	94 %	7	ja
CDCA8	221520_s_at	330	521	96	3	82 %	5	ja
CENPE	205046_at	293	232	50	5	94 %	8	
CENPF	207828_s_at	920	897	331	7	97 %	8	
CHAF1A	214426_x_at	546	493	332	3	97 %	7	
CHAF1A	203976_s_at	224	145	26	6	94 %	7	

DALRD3	218808_at	190	213	76	5	100 %	8	ja
DHFR	202533_s_at	124	161	38	4	82 %	7	ja
<b>DTL</b>	218585_s_at	610	568	212	4	97 %	6	ja
DYRK1B	204954_s_at	179	190	60	5	94 %	7	ja
DZIP3	207232_s_at	203	614	80	5	97 %	7	ja
EPB41L2	201718_s_at	1396	1192	470	1	97 %	7	ja
<b>EXOSC4</b>	218695_at	731	917	143	6	100 %	9	
<b>EZH2</b>	203358_s_at	1224	706	230	9	100 %	5	ja
FLJ10719	213008_at	435	492	100	5	100 %	8	
FLJ10719	213007_at	489	609	277	2	74 %	8	
FLJ30656	212529_at	226	510	78	6	100 %	4	
FOXMI	202580_x_at	629	597	138	4	100 %	8	
GEMIN4	205527_s_at	383	988	97	9	100 %	8	ja
GPR64+	206002_at	8372	1366	336	3	100 %	7	ja
HCAP-G	218663_at	298	201	49	6	100 %	8	ja
<b>HELLS</b>	220085_at	256	246	89	6	97 %	6	ja
HOOK1	219976_at	920	943	189	6	94 %	7	ja
KIF20A	218755_at	603	916	212	9	100 %	7	ja
<b>KNTC1</b>	206316_s_at	528	881	163	7	97 %	6	ja
LOC339229	221797_at	310	223	68	3	97 %	8	
LOC90379	221849_s_at	298	410	116	6	100 %	6	
M11S1	200723_s_at	8613	5556	2838	7	100 %	7	ja
M11S1	200722_s_at	3540	4782	1226	4	91 %	7	ja
MBD1	208595_s_at	445	881	114	2	97 %	8	ja
<b>MCM4</b>	212141_at	466	827	114	4	97 %	7	ja
MDC1	203061_s_at	207	600	45	0	91 %	5	ja
<b>MLF1IP</b>	218883_s_at	1193	5201	397	3	94 %	8	ja
MSH5	210410_s_at	345	308	27	1	100 %	9	ja
<b>NASP</b>	201970_s_at	1867	1340	526	6	100 %	5	ja
<b>NEK2</b>	204641_at	316	2898	125	11	97 %	7	ja
NFYA	204108_at	678	586	270	8	100 %	6	ja
NFYA	215720_s_at	137	122	30	3	85 %	6	ja
NFYA	204109_s_at	369	1078	365	0	9 %	6	ja
<b>NR0B1+</b>	206645_s_at	3475	684	123	13	100 %	5	ja
NUDT1	204766_s_at	400	117	42	7	100 %	6	
<b>NUP155</b>	206550_s_at	330	1827	129	6	100 %	7	ja
NUP93	202188_at	555	678	205	7	97 %	7	ja
NUSAP1	219978_s_at	536	279	57	5	100 %	8	
NUSAP1	218039_at	1691	879	544	3	91 %	8	
<b>ODF2</b>	210415_s_at	113	6484	28	4	91 %	8	ja
<b>PBK</b>	219148_at	524	3218	200	5	100 %	7	ja
Pfs2	221521_s_at	418	429	128	7	100 %	6	
PKNOX1	204195_s_at	99	423	32	3	88 %	6	ja
PRC1	218009_s_at	1372	1604	386	4	100 %	8	
PRRX2	219729_at	292	235	89	1	85 %	7	ja
PTHB1	209958_s_at	196	442	71	1	82 %	8	ja
RAD54L	204558_at	188	188	64	1	79 %	7	ja
RANBP1	202483_s_at	2982	2768	1071	1	88 %	7	
RANBP3	202639_s_at	321	370	86	1	97 %	8	ja

<b>RANBP5</b>	211954_s_at	3594	2628	1504	3	97 %	8	ja
<b>RANBP5</b>	211955_at	3018	4420	863	3	97 %	8	ja
<b>RNF141</b>	219104_at	912	885	310	1	97 %	8	ja
SEPT6/N-PAC +	212414_s_at	1936	1756	647	3	91 %	7	ja
SHARPIN	220973_s_at	281	525	98	4	85 %	8	ja
TOP2A	201291_s_at	588	760	83	11	97 %	8	ja
TOP2A	201292_at	1404	1952	418	12	100 %	8	
TPX2	210052_s_at	1153	1746	377	3	100 %	8	
<b>TSN</b>	201504_s_at	602	736	109	4	100 %	7	ja
<b>UBE2S</b>	202779_s_at	2359	3726	708	4	100 %	9	
USP18	219211_at	276	806	83	2	100 %	7	
WDR10	220744_s_at	620	3397	244	7	100 %	9	ja
<b>WHSC1</b>	209053_s_at	390	1187	112	5	100 %	8	
WIZ	221783_at	601	641	169	2	97 %	8	
<b>XAGE1+</b>	220057_at	65	262	15	2	62 %	0	ja
<b>ZWILCH</b>	218349_s_at	345	1386	51	4	97 %	7	ja

**Tabelle A5. Bekannte CTA in den Microarraydaten (HG\_U133Plus2.0).** Für gelistete CTA der Datenbank des Ludwig-Instituts für Krebsforschung wurde analysiert, in wie viel Prozent der ESFT in den Microarraydaten eine Expression (ESFT / Median NBA > 2) vorlag. Es wurden alle SONDENSÄTZE eines Gens aufgelistet. Dazu wurden die Gene in Gruppen eingeteilt je nach Prozentzahl der ESFT-Proben, in denen sie exprimiert waren (letzte Spalte), und in entsprechenden Tabellenabschnitten angeführt. Es wird angegeben, in wie vielen NBA-Geweben eine Expression vorlag und welchen Expressionswert Hoden-Mittelwert, der Median der ESFT-Proben und die 90. Perzentil des NBA hatte. Dabei wurden Stammzellen, Ovar und Plazenta aus dem NBA ausgenommen. Fett gedruckte Gene wurden auch in den Daten des Microarrays HG\_U133Plus2.0 in über 50 % der ESFT exprimiert.

In > 80 % der ESFT, 25 Gene						
Gen-Symbol	Sondensatz	Median ESFT	Hoden-Mittelwert	90. Perzentil NBA-Gewebe	Summe NBA-Gewebe mit Expression	Prozent ESFT mit Expression
ARX	238878_at	1130	604	438	10	81 %
ARX	231020_at	72	77	214	9	25 %
CDCA1	223381_at	2780	2213	594	5	100 %
CEP55	218542_at	2192	1688	337	5	100 %
DLEU1/SPANXC	205677_s_at	1179	640	784	0	94 %
ELOVL4	219532_at	713	274	617	12	100 %
<b>JARID1B</b>	201549_x_at	1989	4475	850	0	88 %
<b>JARID1B</b>	201548_s_at	1384	6327	765	0	63 %
<b>JARID1B</b>	211202_s_at	1957	5253	1180	0	63 %
<b>JARID1B</b>	201547_at	14	77	147	0	0 %
<b>LDHC</b>	207022_s_at	128	14859	196	17	100 %
LIPI	242178_at	1479	44	140	0	81 %
LOC440934	238727_at	661	204	305	7	100 %
LOC440934	230844_at	114	7331	202	0	6 %
LOC440934	244159_at	122	65	199	0	6 %
<b>ODF2</b>	210415_s_at	379	13591	133	8	100 %
<b>ODF2</b>	225617_at	857	1414	1102	0	19 %
OIP5	213599_at	1659	2396	541	4	100 %

OIP5	1558947_at	16	66	67	7	31 %
OIP5	1558948_a_at	50	272	441	0	0 %
<b>PBK</b>	219148_at	9004	5188	443	5	100 %
RQCD1	1553510_s_at	1068	635	551	4	100 %
RQCD1	1554080_at	832	536	382	5	100 %
RQCD1	213903_s_at	55	79	213	6	13 %
RQCD1	236684_at	20	71	75	2	6 %
SPAG9	206748_s_at	812	550	413	0	81 %
SPAG9	212470_at	1921	3880	2317	0	13 %
SPAG9	1554543_at	120	900	1024	0	0 %
SPAG9	212468_at	452	1865	2071	0	0 %
SPANXC	220217_x_at	66	2882	305	0	0 %
SSX1	206627_s_at	30	78	50	8	56 %
SSX1/LOC652630	206626_x_at	769	1712	289	1	81 %
SSX2	207493_x_at	719	1219	210	4	81 %
SSX2/LOC653088	210497_x_at	651	2192	120	11	94 %
SSX2/LOC653088	216471_x_at	859	1706	166	0	88 %
SSX	215881_x_at	312	609	341	1	13 %
SSX3	207666_x_at	320	1595	206	4	88 %
SSX3	211670_x_at	271	698	201	4	75 %
SSX3	211731_x_at	113	465	406	0	0 %
<b>SSX4</b>	210394_x_at	505	1180	231	2	81 %
<b>SSX4</b>	211425_x_at	554	915	208	0	75 %
<b>SSX4</b>	208586_s_at	15	36	107	1	6 %
TEX15	232760_at	931	999	83	1	100 %
TEX15	221448_s_at	318	728	321	0	44 %
TMEFF1	205122_at	1940	182	1087	10	100 %
TMEFF1	205123_s_at	899	324	256	9	100 %
TMEFF2	223557_s_at	3891	141	1825	13	94 %
TMEFF2	233910_at	121	36	126	5	56 %
TMEFF2	241557_x_at	54	21	152	5	6 %
TMEFF2	224321_at	69	1218	2974	0	0 %
<b>TTK/CT96</b>	204822_at	2687	2964	826	5	100 %
<b>XAGE1</b>	220057_at	1505	856	76	2	100 %

In 50 bis 80 % der ESFT, 10 Gene

Gen-Symbol	Sondensatz	Median ESFT	Hoden-Mittelwert	90. Perzentil NBA-Gewebe	Summe NBA-Gewebe mit Expression	Prozent ESFT mit Expression
ANKRD45	236421_at	123	968	114	5	63 %
CASC5	228323_at	1535	2992	968	5	100 %
CASC5	1552680_a_at	309	955	421	5	63 %
CASC5	220247_at	17	31	94	14	13 %
CASC5	1552682_a_at	212	638	291	0	6 %
<b>DDX43/HAGE</b>	220004_at	15	1601	163	0	19 %
LOC374491 /	233675_s_at	172	1040	139	0	75 %
LOC374491	233879_at	44	908	176	2	6 %
MAGEA2	1553830_s_at	16	95	21	10	50 %
MAGEA2	214603_at	49	349	106	7	50 %
OTUB2	222878_s_at	129	3036	58	0	75 %

OTUB2	219369_s_at	224	113	172	0	56 %
OTUB2	240550_at	15	56	67	0	13 %
OTUB2	1555682_at	23	87	103	1	6 %
PCM1/TPTE	202174_s_at	5031	10649	2399	0	75 %
PCM1/TPTE	214118_x_at	2069	2063	2235	0	0 %
PRAME	204086_at	3701	1999	191	0	75 %
SPA17	205406_s_at	786	11579	394	0	69 %
SPA17	239515_at	200	671	395	0	13 %
SYCP1	216917_s_at	343	2522	101	1	69 %
SYCP1	206740_x_at	324	2362	275	0	56 %

In 30 bis 50 % der ESFT, 19 Gene

Gen-Symbol	Sondensatz	Median ESFT	Hoden-Mittelwert	90. Perzentil NBA-Gewebe	Summe NBA-Gewebe mit Expression	Prozent ESFT mit Expression
ACRBP	230833_at	16	213	138	13	25 %
ACRBP	223717_s_at	117	20521	665	4	0 %
ACRBP	223718_at	19	15118	168	0	0 %
ACTL8	214957_at	48	50	79	5	38 %
CABYR	224279_s_at	220	12803	301	0	31 %
CABYR	219928_s_at	219	14808	495	2	13 %
CTAG1A/ NY-ESO-1	211674_x_at	11	627	36	2	31 %
CTAG1B/ NY-ESO-1	210546_x_at	7	646	34	5	19 %
CTAG2/ NY-ESO-1	215733_x_at	16	233	36	8	31 %
CTAG2/ NY-ESO-1	207337_at	19	86	121	0	6 %
CTCF	1552368_at	85	644	117	3	38 %
DSCR8	241224_x_at	42	2883	104	5	38 %
LEMD1	232105_at	31	93	147	6	38 %
LEMD1	229927_at	52	3647	256	0	19 %
LEMD1	237197_at	13	54	88	7	19 %
MAGEA3	209942_x_at	49	1522	263	4	38 %
MAGEA6	214612_x_at	44	1345	93	1	44 %
MLL3/BAGE	1555409_a_at	51	84	146	5	38 %
MORC1	220850_at	10	357	31	11	31 %
PSMB1	214289_at	39	140	265	0	0 %
PSMB1/XAGE3	214288_s_at	15147	9195	12357	0	38 %
SAGE1	220793_at	11	98	47	4	31 %
SMEG1	206442_at	6	25	209	12	31 %
SSX5	208528_x_at	38	129	55	5	38 %
TAF7L	220325_at	73	1378	126	6	50 %
TAF7L	224380_s_at	33	653	77	0	13 %
TFDP3	207385_at	17	262	66	8	38 %
ZNF165	206683_at	46	1944	119	4	38 %

In 10 bis 30% der ESFT, 31 Gene

Gen-Symbol	Sondensatz	Median ESFT	Hoden-Mittelwert	90. Perzentil NBA-Gewebe	Summe NBA-Gewebe mit	Prozent ESFT mit
------------	------------	-------------	------------------	--------------------------	----------------------	------------------

					Expression	Expression
BRDT	206787_at	10	4990	97	9	13 %
C21orf99	1552895_a_at	77	1176	145	2	13 %
CALR3	1552421_a_at	13	3259	89	10	19 %
CEP290	205250_s_at	686	661	510	0	25 %
CEP290	221683_s_at	239	406	491	0	6 %
CEP290	1556850_at	31	283	223	0	0 %
CRISP2	210262_at	27	30557	732	5	19%
CSAG2	220445_s_at	6	41	34	4	13 %
GAGE2/	206640_x_at	19	9162	121	3	13 %
GAGE3	207663_x_at	9	4361	163	4	19 %
IGSF11	228375_at	33	572	535	11	13 %
IGSF11	237253_at	3	2103	75	10	0 %
LY6K	223687_s_at	46	1473	247	6	25 %
LY6K	223688_s_at	9	12	62	2	19 %
LY6K	230910_s_at	6	90	52	4	13 %
MAGEA1	207325_x_at	16	360	208	4	19 %
MAGEA10	210295_at	11	51	34	3	6 %
MAGEA11	210503_at	18	293	90	10	25 %
MAGEA12	210467_x_at	56	689	204	0	19 %
MAGEA5	214642_x_at	56	433	225	1	13 %
MAGEA5	1553585_a_at	17	131	175	2	0 %
MAGEA8	210274_at	32	226	169	0	0 %
MAGEA8	210274_at	32	226	169	0	0 %
MAGEA9	210437_at	76	770	284	1	25 %
MAGEB4	207580_at	11	161	34	10	19 %
NOL4	206045_s_at	30	1263	373	8	19 %
NOL4	241567_at	4	18	22	6	19 %
ODF4	1552409_a_at	41	1046	196	15	19 %
ODF4	1552408_at	22	620	182	2	0 %
PHF11	221816_s_at	175	817	2896	0	0 %
PIWIL2	220686_s_at	51	1161	298	0	19 %
PIWIL2	217421_at	10	21	45	7	6 %
PRM1	206358_at	40	79278	175	6	13 %
PTPN20B	215172_at	6	418	260	11	13 %
RBM46	242516_x_at	6	699	70	1	13 %
RBM46	244351_at	14	457	147	2	6 %
CT45-4	1567912_s_at	9	521	60	12	25 %
CT45-4	235700_at	28	1267	219	3	13 %
SPANXA1	224032_x_at	17	2674	160	12	0 %
SPANXA1	220922_s_at	16	4502	49	3	13 %
SPANXA2/ KCNRG	239098_at	103	507	358	8	25 %
SPANXA2/ KCNRG	240288_at	63	418	135	0	0 %
TEX14	221035_s_at	24	3725	132	9	19 %
TSPY1	217160_at	9	153	174	15	13 %
TSPY1	217162_at	17	82	97	2	0 %
TSPY1	207918_s_at	6	6659	42	6	0 %
TSSK6	230989_s_at	19	837	37	2	13 %

TSSK6	224409_s_at	9	1089	41	10	6 %
TSSK6	239524_at	13	181	126	6	0 %

In < 10% der ESFT, 84 Gene. Für 4 Gene (CT47, CT64, CT69, CT70) waren in den Microarraydaten keine Sondensätze vorhanden, sodass diese Gene unberücksichtigt blieben.

Gen-Symbol	Sondensatz	Median ESFT	Hoden Mittelwert	90. Perzentil NBA-Gewebe	Summe NBA- Gewebe mit Expression	Prozent ESFT mit Expression
ADAM2	207664_at	15	3162	104	4	0 %
ADAM29	221337_s_at	33	1919	185	0	6 %
AKAP3	207344_at	13	5761	64	6	0 %
AKAP4	207019_s_at	17	8749	251	0	0 %
AKAP4	207019_s_at	17	8749	251	0	0 %
ARMC3	240275_at	16	2722	159	0	0 %
BAGE	1555605_x_at	32	60	168	7	6 %
BAGE	207712_at	43	111	111	4	6 %
BAGE	1555369_at	31	31	100	4	0 %
BAGE	1555603_at	18	75	141	1	0 %
BAGE4/BAGE2	1555408_at	76	112	285	0	6 %
CAGE1	1563787_a_at	3	239	70	8	0 %
CAGE1/DDX53	1563787_a_at	3	239	70	8	0 %
CCDC33	1563090_at	200	378	705	0	0 %
CCDC33	220908_at	39	174	259	1	0 %
CCDC36	1554909_at	67	772	199	0	0 %
CCDC36	1564600_a_at	73	879	384	0	0 %
CCDC36	1569690_at	58	377	359	0	0 %
CCDC62	231567_s_at	97	6988	638	0	0 %
COX6B2	1553367_a_at	65	2059	502	1	0 %
CPXCR1	1560494_a_at	13	483	79	0	6 %
CPXCR1	1560493_a_at	48	352	175	0	0 %
CTAGE1/ NY-ESO-1	220957_at	44	637	227	0	0 %
CTAGE1/ NY-ESO-1	220957_at	44	637	227	0	0 %
CTAGE5	235790_at	15	42	95	5	6 %
CTAGE5	204055_s_at	36	163	495	0	0 %
CTAGE5	215930_s_at	189	432	943	0	0 %
CTNNA2	205373_at	30	1227	555	10	0 %
CTNNA2	243330_at	17	77	125	9	0 %
CXorf48	221121_at	24	281	190	0	0 %
Cxor61	1559258_a_at	33	2034	165	0	0 %
DDX53	1555357_at	17	322	78	2	0 %
DKKL1	220284_at	31	5164	89	0	6 %
DPPA2	240301_at	17	343	188	3	0 %
FAM46D	1552461_at	23	545	140	0	0 %
FATE1	231573_at	119	6361	367	0	0 %
FLJ36144	1560790_at	19	5026	154	4	6 %
FMR1NB	1552906_at	14	932	60	5	6 %
FMR1NB	1552906_at	14	932	60	5	6 %
FTHL17	224379_at	15	45	116	1	0 %
GAGE1	207739_s_at	33	10423	110	4	6 %

GAGE1	208283_at	9	154	96	10	6 %
GAGE1	207086_x_at	60	9717	245	4	6 %
GAGE1	208155_x_at	48	8281	311	0	6 %
HORMAD1	223861_at	13	5208	134	12	6 %
HSPB9	230510_at	18	879	193	2	0 %
IL13RA2	206172_at	10	2822	242	3	6 %
MAGEA4	204863_s_at	189	864	6546	2	0 %
KIAA0100	201729_s_at	2050	1235	2391	0	0 %
KIAA0100	201728_s_at	374	829	1915	0	0 %
Klkb4	231287_s_at	37	3510	188	3	0 %
KM-HN-1/ CCDC110	230900_at	6	6479	185	0	0 %
LOC196993	214418_at	10	2074	55	3	6 %
LOC400927	239715_at	77	79	257	0	6 %
LOC400927	236410_x_at	124	325	875	0	0 %
LUZP4	220665_at	21	436	274	2	0 %
LYPD6B/ LOC130576	228360_at	18	1798	636	0	0 %
MAEL	229475_at	37	12035	269	1	0 %
MAGEA10	210295_at	11	51	34	3	6 %
MAGEA4	214254_at	23	615	162	0	6 %
MAGEB1	207534_at	20	533	106	0	0 %
MAGEB2	206218_at	59	1633	304	2	0 %
MAGEB3	207579_at	11	176	113	0	0 %
MAGEB4	207581_s_at	11	161	35	3	6 %
MAGEB5	234412_at	7	15	31	4	0 %
MAGEB6	1552858_at	13	67	79	0	6 %
MAGEC1	206609_at	56	741	283	1	0 %
MPHOSPHO1	202974_at	604	712	4319	5	0 %
NALP4	242334_at	5	374	33	0	6 %
NXF2	220981_x_at	79	828	417	0	0 %
NXF2	234173_s_at	24	716	171	0	6 %
NXF2	220257_x_at	95	766	393	0	0 %
ODF1	214485_at	57	18334	419	3	0 %
ODF3	233795_at	41	777	380	8	6 %
ODF3	1553051_s_at	14	640	217	10	0 %
OTOA	1553432_s_at	22	246	155	6	0 %
PAGE1	206897_at	30	426	242	0	0 %
PAGE2	231307_at	4	601	44	8	6 %
PAGE4	205564_at	50	266	343	0	0 %
PAGE5	236152_at	6	21	47	4	0 %
PASD1	240687_at	60	717	259	5	6 %
PEPP-2	236920_at	10	1499	38	4	6 %
PEPP-2	236920_at	10	1499	38	4	6 %
PLAC1	219702_at	126	253	408	3	6 %
PRM2	210122_at	7	81929	51	5	0 %
ROPN1	224191_x_at	54	10808	257	0	0 %
ROPN1	231535_x_at	69	11745	293	0	0 %
ROPN1	233203_at	51	2603	218	0	0 %
SLCO6A1	1552745_at	24	3260	180	0	0 %



SPACA3	243621_at	56	3282	196	0	0 %
SPAG4	219888_at	55	1583	339	4	6 %
SPANXB1	220921_at	19	1228	107	4	0 %
SPATA19	1559138_a_at	17	4682	252	0	0 %
SPINLW1	206318_at	26	1600	215	0	0 %
SPINLW1	206319_s_at	32	6095	208	0	0 %
SPO11	222259_s_at	17	597	159	0	0 %
SYCE1	1554675_a_at	28	1088	167	6	6 %
SYCE1	233084_s_at	12	1411	114	10	0 %
TDRD1	221018_s_at	26	431	155	3	6 %
TDRD6	232692_at	8	2283	484	2	0 %
TDRD6	232692_at	8	2283	484	2	0 %
TEX101	223906_s_at	19	2605	85	8	0 %
THEG	220808_at	18	830	137	4	6 %
TMEM108	223523_at	14	87	385	12	0 %
TMEM108	223524_s_at	10	1595	971	9	0 %
TMEM108	234813_at	19	98	198	3	0 %
TMEM108	234818_at	72	196	316	0	0 %
TPTE	220205_at	44	10280	115	3	6 %
TSGA10	1555931_at	41	259	299	0	0 %
TSGA10	1555932_at	23	55	121	3	0 %
TSGA10	220623_s_at	35	2422	203	0	0 %
TSGA10	223838_at	7	795	180	0	0 %
TSGA10	237057_at	36	40	155	1	0 %
TSP50	220126_at	28	808	296	2	6 %
VENTXP1	216726_at	9	11	37	0	0 %
VENTXP1	216722_at	18	20	116	1	0 %
WDR40A	224789_at	1135	2491	3852	4	0 %
XAGE4	1565454_at	341	550	1144	4	0 %
XAGE2	229469_at	164	333	960	0	0 %
XAGE3	236040_at	36	124	196	1	0 %

**Tabelle A6. Bekannte CTA in den Microarraydaten (HG\_U133A).** Für gelistete CTA der Datenbank des Ludwig-Instituts für Krebsforschung wurde analysiert, in wie viel Prozent der ESFT-Proben der Microarraydaten eine Expression (ESFT/ Median NBA > 2) vorlag. Es wurden alle SONDENSÄTZE eines Gens aufgelistet. Dazu wurden die Gene in Gruppen eingeteilt je nach Prozentzahl der ESFT-Proben, in denen sie exprimiert waren (letzte Spalte) und in entsprechenden Tabellenabschnitten angeführt. Es wird angegeben, in wie vielen NBA-Geweben eine Expression vorlag und welchen Expressionswert der Hoden-Mittelwert, der Median der ESFT und die 90. Perzentil des NBA hatten. Dabei wurden Stammzellen, Ovar und Plazenta aus dem NBA ausgenommen. Fett gedruckte Gene wurden auch in den Daten des Microarrays HG\_U133Plus2.0 in über 50 % der ESFT exprimiert.

In > 80 % der ESFT, 3 Gene						
Gen-Symbol	SONDENSATZ	Median ESFT	Hoden-Mittelwert	90. Perzentil NBA-Gewebe	Summe NBA-Gewebe mit Expression	Prozent ESFT mit Expression
<b>PBK</b>	219148_at	524	3218	200	5	100 %

<b>ODF2</b>	210415_s_at	113	6484	28	4	91 %
<b>TTK</b>	204822_at	332	2310	138	2	82 %

In 50 bis 80 % der ESFT, 8 Gene

Gen-Symbol	Sondensatz	Median ESFT	Hoden-Mittelwert	90. Perzentil NBA-Gewebe	Summe NBA-Gewebe mit Expression	Prozent ESFT mit Expression
CTAGE5	204055_s_at	127	64	133	5	62 %
CTAGE5	215930_s_at	126	233	276	3	0 %
<b>DDX43</b>	220004_at	25	501	45	9	53 %
<b>JARID1B</b>	201547_at	17	49	111	9	15 %
<b>JARID1B</b>	201549_x_at	1061	3035	799	1	50 %
<b>JARID1B</b>	211202_s_at	1369	3355	1040	2	62 %
<b>JARID1B</b>	201548_s_at	636	2802	601	1	26 %
KIAA0100	201729_s_at	1377	501	901	1	76 %
KIAA0100	201728_s_at	263	347	552	1	0 %
<b>LDHC</b>	207022_s_at	88	7819	86	5	71 %
<b>SSX4</b>	208586_s_at	22	55	55	8	56 %
<b>SSX4</b>	211425_x_at	169	816	274	3	38 %
<b>SSX4</b>	210394_x_at	164	867	245	0	38 %
<b>XAGE1</b>	220057_at	65	262	15	2	62 %
ZNF165	206683_at	21	910	89	9	56 %

In 30 bis 50 % der ESFT, 14 Gene

Gen-Symbol	Sondensatz	Median ESFT	Hoden-Mittelwert	90. Perzentil NBA-Gewebe	Summe NBA-Gewebe mit Expression	Prozent ESFT mit Expression
CASC5	220247_at	20	99	61	11	50 %
CEP290	205250_s_at	239	352	227	2	38 %
CEP290	221683_s_at	52	87	45	1	53 %
MAGEA2/ MAGEA2B	214603_at	13	157	53	7	35 %
MPHOSPH1	205235_s_at	223	331	196	0	41 %
MPHOSPH10	212885_at	485	47	443	0	15 %
OIP5	213599_at	286	1302	398	4	32 %
SPAG9	206748_s_at	283	706	265	1	32 %
SPAG9	212470_at	783	2307	1619	3	3 %
SPAG9	212468_at	288	438	541	3	3 %
SPANXB1/ SPANXB2	220921_at	15	516	56	11	38 %
SSX1	206626_x_at	149	896	302	4	38 %
SSX1	206627_s_at	4	5	20	6	21 %
SSX2	210497_x_at	121	2007	108	0	50 %
SSX2	207493_x_at	47	707	60	6	44 %
SSX2	216471_x_at	67	964	101	2	44 %
SSX2	215881_x_at	147	350	244	0	26 %
SSX2	215881_x_at	147	350	244	0	26 %
SSX3	211670_x_at	86	345	117	4	44 %
SSX3	207666_x_at	107	886	193	6	41 %
SSX3	211731_x_at	108	385	213	1	9 %
SSX5	208528_x_at	30	77	73	2	24 %
SYCP1	216917_s_at	53	1026	108	4	38 %
SYCP1	206740_x_at	119	2037	211	0	32 %

TSP50	220126_at	79	515	117	7	59 %
-------	-----------	----	-----	-----	---	------

In 10 bis 30% der ESFT, 10 Gene

Gen-Symbol	Sondensatz	Median ESFT	Hoden-Mittelwert	90. Perzentil NBA-Gewebe	Summe NBA-Gewebe mit Expression	Prozent ESFT mit Expression
ADAM2	207664_at	6	1112	47	12	21 %
DKKL1	220284_at	21	1852	102	4	18 %
IMP-3	203819_s_at	42	267	84	6	21 %
IMP-3	216494_at	32	122	112	9	15 %
IMP-3	203820_s_at	75	363	164	3	9 %
IMP-3	216493_s_at	16	155	138	6	0 %
LOC196993	214418_at	13	840	41	6	18 %
MAGEA11	210503_at	7	183	32	8	21 %
MAGEA9	210437_at	56	604	78	5	26 %
MAGEB4	207581_s_at	16	172	121	9	26 %
MAGEB4	207580_at	8	388	87	9	9 %
MORC1	220850_at	7	181	30	5	21 %
NXF2	220981_x_at	63	508	158	5	26 %
NXF2	220257_x_at	123	711	291	0	0 %
SAGE1	220793_at	20	73	40	2	18 %

In < 10 % der ESFT, 56 Gene. Für 51 Gene waren in den Microarraydaten keine Sondensätze vorhanden und diese Gene blieben deshalb unberücksichtigt.

Gen-Symbol	Sondensatz	Median ESFT	Hoden-Mittelwert	90. Perzentil NBA-Gewebe	Summe NBA-Gewebe mit Expression	Prozent ESFT mit Expression
ACTL8	214957_at	28	76	71	3	0 %
BAGE	207712_at	22	62	90	1	0 %
SPA17	205406_s_at	172	4268	321	0	0 %
ADAM29	221337_s_at	22	1338	102	1	3 %
AKAP3	207344_at	25	2592	61	0	0 %
AKAP4	207019_s_at	18	2531	89	8	3 %
BRDT	206787_at	10	1340	73	4	6 %
CABYR	219928_s_at	158	5399	443	0	0 %
CRISP2	210262_at	18	11276	113	9	6 %
CSAG2	220445_s_at	6	17	13	0	3 %
CTAG1B	217339_x_at	13	123	33	4	6 %
CTAG1B/CTAG1A	210546_x_at	8	269	22	4	0 %
CTAG1B/CTAG1A	211674_x_at	9	487	29	0	0 %
CTAG2	207337_at	10	13	38	6	6 %
CTAG2	215733_x_at	11	231	30	0	0 %
CTAGE1	220957_at	69	465	286	0	0 %
CXorf48	221121_at	45	214	173	1	0 %
GAGE1	208283_at	9	75	55	4	9 %
GAGE	207739_s_at	31	4038	99	2	0 %
GAGE	206640_x_at	59	4803	144	1	0 %
GAGE	207086_x_at	116	5388	282	2	0 %
GAGE3	207663_x_at	79	2658	268	3	0 %
GAGE4	208155_x_at	110	5225	271	0	0 %
GAGE7	208235_x_at	59	4644	171	1	0 %
IL13RA2	206172_at	12	2456	362	9	3 %

MAGEA1	207325_x_at	14	186	70	5	6 %
MAGEA10	210295_at	12	55	48	0	0 %
MAGEA12	210467_x_at	70	516	201	0	0 %
MAGEA3	209942_x_at	64	1143	228	7	0 %
MAGEA4	214254_at	29	450	101	3	0 %
MAGEA5	214642_x_at	57	470	189	1	0 %
MAGEA6	214612_x_at	49	721	126	3	0 %
MAGEA8	210274_at	34	193	176	3	0 %
MAGEB1	207534_at	24	420	130	1	0 %
MAGEB2	206218_at	65	1121	255	1	0 %
MAGEB3	207579_at	9	104	63	1	0 %
MAGEC1	206609_at	69	586	228	1	0 %
MAGEC2	215932_at	44	184	253	2	0 %
MAGEC2	220062_s_at	77	657	203	1	0 %
MAGEC3	216592_at	20	46	191	1	0 %
PAGE1	206897_at	23	272	154	8	0 %
PAGE4	205564_at	45	328	216	6	0 %
PIWIL2	220686_s_at	145	528	275	1	3 %
PIWIL2	217421_at	15	67	73	3	0 %
PLAC1	219702_at	85	265	273	1	0 %
PRM1	206358_at	19	24598	77	6	6 %
PRM2	210122_at	5	18181	20	4	3 %
ROPN1B	220425_x_at	53	7357	381	6	0 %
SEMG1	206442_at	33	68	243	6	0 %
SPANXA1	220922_s_at	13	2534	48	1	0 %
SPANXC	220217_x_at	82	1882	313	1	0 %
SPINLW1	206319_s_at	72	3543	243	1	0 %
SPINLW1	206318_at	78	779	178	0	0 %
SPO11	222259_s_at	47	367	172	3	0 %
TAF7L	220325_at	79	952	186	2	0 %
TDRD1	221018_s_at	30	214	126	1	0 %
TEX15	221448_s_at	134	581	298	1	3 %
TFDP3	207385_at	11	224	51	4	6 %
THEG	220808_at	46	366	194	5	0 %
TPTE	220205_at	41	6862	100	2	0 %
TSGA10	220623_s_at	69	1524	170	1	3 %
TSPY1	217160_at	15	35	54	3	0 %
TSPY1	217162_at	18	40	90	2	0 %
TSPY1/TSPY2	207918_s_at	3	2464	13	2	3 %
TULP2	206733_at	89	1404	307	0	0 %
VENTXP1	216726_at	9	19	38	3	0 %
VENTXP1	216722_at	29	45	81	0	0 %

**Tabelle A7. EWS-ERG und EWS-FLI1-regulierte CTA.** Nach der Auswertung öffentlich zugänglicher Microarray-Datensätze durch EWS-ERG- und EWS-FLI1-induzierte Gene in MSC wurden auf ein CTA-spezifisches Expressionsprofil in Hoden und ESFT hin untersucht. Es wurden bekannte CTA nach der Datenbank des Ludwig-Instituts für Krebsforschung (Almeida et al. 2009), sowie auch nach der Datensätzen-Analyse neue CTA-Kandidaten (siehe Kapitel 2 „Material und Methoden“) mit gleichzeitiger Überexpression in Hoden und ESFT, des Weiteren nach Recherche in der SOURCE-Datenbank (Diehn et al. 2003) bestätigte neue CTA-Kandidaten, sowie CTA-Kandidaten, die bei Hofmann et al. 2008 genannt wurden, mit den EWS-ERG und EWS-FLI1 induzierten Genen verglichen.

Bekanntes CTA und neue CTA-Kandidaten	EWS-ERG-reguliert	EWS-FLI1-reguliert
---------------------------------------	-------------------	--------------------

Bekannte CTA (Almeida et al. 2009) HG_U133A	Keine Gene gefunden	SPAG9 (206748_s_at)
Bekannte CTA (Almeida et al. 2009) HG_U133PLUS2.0	Keine Gene gefunden	PCM1 (209997_x_at), SPAG9 (206748_s_at)
CTA-Kandidaten (Hofmann et al. 2008) HG_U133PLUS2.0	Keine Gene gefunden	PHOSPHO1(236218_at), TAF9B (s_at_221618)
Nach Berechnung mögliche neue CTA-Kandidaten im ESFT HG_U133A	EZH2 (203358_s_at)	ATAD2 (218782_s_at), BUB1 (215509_s_at), BIRC5 (210334_x_at), NUSAP1 (219978_s_at)
Nach Berechnung mögliche neue CTA-Kandidaten im ESFT HG_U133PLUS2.0	IGF2BP3 (203819_s_at), IGF2BP1 (227377_at), LGALS8 (208934_s_at, 210732_s_at, 208936_x_at ), FLJ37034 (229622_at)	CDCA2 (236957_at), NUDT21 (213461_at), LGALS8 (208934_s_at), DEPDC1 (232278_s_at), BUB1(215509_s_at), NEK2 (211080_s_at), DCUN1D1(222678_s_at), YWHAZ (200641_s_at), EPB41 (207793_s_at), CDC25C (217010_s_at), PLK4 (211088_s_at), TAF9B/LOC653068 (221618_s_at), CTDSPL2 (1555106_a_at), RNF6 (210932_s_at), C1orf121 (219875_s_at), PHOSPHO1 (236218_at)
Nach SOURCE mögliche neue CTA-Kandidaten im ESFT HG_U133A	RCN3 (219102_at), MDFI (205375_at)	TDRD3 (1569069_s_at), ENPP1(205066_s_at)
Nach SOURCE mögliche neue CTA-Kandidaten im ESFT HG_U133PLUS2.0	PAPPA (224941_at, 224940_s_at), EZH2 (203358_s_at)	ATAD2 (218782_s_at), TMEM48 (218073_s_at), BCAT1(214452_at, 214390_s_at), TMPO (209753_s_at, 209754_s_at), PRSS35 (235874_at)

**Tabelle A8. Signalwege potentieller CTA-Kandidaten.** Zellbiologische Funktionen der neuen, hier erstmals identifizierten CTA-Kandidaten mit CTA-typischen Expressionsprofilen (Überexpression in Ewingtumoren und im Hoden). Die Zuordnung zu Signalwegen erfolgte anhand der Source-Datenbank (Diehn et al. 2003).

Signalwege	Anzahl der CTA-Kandidaten
Zellzyklus	72
Transkription	57
Apoptose	21
Meiose	20
Ubiquitin/Proteasom	19
DNA-Reparation	19
Kohlenhydratstoffwechsel / Insulin	15
Zytoskelett	14
p53-Signalweg	13
Oxidativer Stress	8
Wnt-Signalweg	6
Axonwachstum	5
T-Zell-Aktivierung	2
Angiogenese	1
PDGF-Signalweg	1
Mit Huntington-Erkrankung assoziiert	1
Mit Parkinson assoziiert	1
Rezeptor für Corticotropin freisetzenden Faktor	1
TGF beta	1
D1-Dopamin-Rezeptor-Signalweg	1

## 8 Thesen

1. Es konnten durch die Analyse von Microarray-Datensätzen und durch Datenbank-Recherchen zahlreiche in Ewing-Tumoren und Hoden stark überexprimierte Gene erstmals als neue *Cancer-Testis*-Antigen-Kandidaten identifiziert werden.
2. Es konnte für viele bereits bekannte *Cancer-Testis*-Antigene hier erstmals auch eine Expression in Ewing-Tumoren (ESFT) nachgewiesen werden.
3. Die beschriebenen Funktionen der neuen *Cancer-Testis*-Antigen-Kandidaten könnten teilweise mit dem malignen Phänotyp von Ewing-Tumoren in Verbindung stehen.
4. Einige der in Ewing-Tumoren identifizierten *Cancer-Testis*-Antigene oder neuen *Cancer-Testis*-Antigen-Kandidaten erwiesen sich in der Analyse von Microarray-Expressionsdaten als Zielgene der aberranten Transkriptionsfaktoren EWS-FLI1 und EWS-ERG und könnten somit für den aggressiven Phänotyp des ESFT mitkonstituierend sein.
5. In den Clusteranalysen der Microarraydatensätze zerfielen die Ewing-Tumor-Gewebe nach ihrer *Cancer-Testis*-Antigen-Expression in zwei Untergruppen, wobei eine Gruppe eine größere Nähe zu Hoden, embryonalen Stammzellen und humanen mikrovaskulären Endothelzellen aufwies als zu der anderen Ewingtumor-Untergruppe. Es ist daher davon auszugehen, dass bestimmte Ewingtumor-Proben eine stärkere Stammzellsignatur aufweisen als andere mit eventuell prognostischer Relevanz.
6. Es konnte gezeigt werden, dass gegen zwei Peptide des in Ewing-Tumoren charakteristischerweise exprimierten *Cancer-Testis*-Antigens Lipase I eine zelluläre Immunantwort *in vitro* induzierbar ist.
7. Für die Lipase I-Peptide LDYTDKAFV und NLLKHGASL war bei drei von dreizehn auswertbaren Spendern (23 %) eine Immunantwort mit IFN $\gamma$ -Freisetzung bzw. mit Lyse von A673-Zellen induzierbar.
8. Bei keinem Spender konnten für das Lipase I-Peptid SLSVHIKNC spezifische T-Zellen generiert werden.
9. Die immunogenen T-Zell-Epitope aus Lipase I könnten in der klinischen Immuntherapie anwendbar sein.
10. Bei der Entwicklung eines Impfstoffs als therapeutische Option für Patienten mit ESFT kann möglicherweise auch auf Peptid-Epitope der neuen, hier identifizierten CTA-Kandidaten und der bekannten CTA im Ewing-Tumor zurückgegriffen werden.

Dorothea E. Mahlendorf  
Mallendarer Bachtal 14  
56182 Urbar  
Telefon: +49 - (0)179 -1464597  
e-mail: dorothea.mahlendorf@googlemail.com

Geburtsdatum: 12. März 1981  
Verheiratet, eine Tochter (\*18.03.2009)

---

<b>Seit Januar 2011</b>	<b>Assistenzärztin BDH Klinik für Neurologie</b>	<b>Vallendar</b>
<b>August 2010 bis Dezember 2010</b>	<b>Schriftliche Arbeit an meiner Promotion</b>	
<b>Mai 2010</b>	<b>2. Ärztliche Prüfung</b> Note 1,5	<b>Koblenz/Mainz</b>
<b>August 2008 bis Februar 2010</b>	<b>Johannes-Gutenberg-Universität Mainz</b> Studentin im Praktischen Jahr des Studiengangs Medizin	<b>Koblenz/Andernach</b>
<b>Seit Oktober 2005</b>	<b>Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Universität Halle/Wittenberg</b> Doktorandin der Arbeitsgruppe PD Dr. rer. nat., rer. medic. habil. Martin S. Staeger im Labor für krebskranke Kinder	<b>Halle an der Saale</b>
<b>Oktober 2002 bis Juli 2008</b>	<b>Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg</b> Studentin des Studiengangs Medizin, Physikum (September 2004, nach 4 Semestern): Note 2,0	<b>Halle an der Saale</b>
<b>Oktober 2000 bis September 2002</b>	<b>Technische Universität Berlin</b> Studentin der Studiengänge Musikwissenschaft und Kunstwissenschaft, Vordiplom in Musikwissenschaft (Juni 2002, nach 4 Semestern): Note 2,0	<b>Berlin</b>
<b>Juni 2000</b>	<b>Anne-Frank-Schule, Gymnasium</b> Abitur Note 1,9	<b>Berlin</b>
<b><u>Auslandserfahrung</u></b>		
<b>Februar bis März 2007</b>	<b>Besançon Université de France Comté</b> Famulatur auf der Diabeto-Endokrinologischen Station	<b>Besançon</b>
<b><u>Publikationen</u></b>		
<b>Mai 2011</b>	<b>9th Annual Meeting of CIMT Cancer Immunotherapy</b> Auf dem Kongress wurden Teile dieser Arbeit als Poster veröffentlicht. D. E. Mahlendorf und M. S. Staeger: „Characterization of Ewing tumor-associated Cancer/testis antigens“	<b>Mainz</b>

---

## **Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die darin angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit bisher noch an keiner anderen Universität oder Hochschule vorgelegt habe und dass ich keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Urbar, am 05. September 2011

---

Dorothea E. Mahlendorf



## **Danksagung**

Besonders herzlicher Dank gilt meinem Betreuer PD Dr. rer. nat., rer. medic. habil. Martin S. Staeger für die kontinuierliche Beratung und ständige Präsenz. Danken möchte ich auch Dr. rer. nat. Daniela Max, Dr. rer. nat. Manuela Hesse und Ines Volkmer für deren Einweisung an Geräten. Ohne den Einsatz meiner Schwiegereltern Detlef und Brigitte Mahlendorf, meiner Eltern Gerhard und PD Dr. med. Gisela Große und meines Ehemannes Jun.-Prof. Dr. Matthias Mahlendorf in der liebevollen Betreuung meiner Tochter Magdalena wäre diese Arbeit sicherlich nicht zustande gekommen, weshalb auch ihnen mein Dank gilt.