

Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin
Tübingen
Abteilung Kinderchirurgie und Kinderurologie mit Poliklinik

**Evaluierung immuntherapeutischer Ansätze beim
kindlichen Rhabdomyosarkom**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
Tübingen

vorgelegt von
Johler, Sarah Maria

2019

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. S. Armeanu-Ebinger

2. Berichterstatter:

Professor Dr. R. Handgretinger

Tag der Disputation:

30.07.2019

Für meine Eltern Sabine und Alois

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1. EINLEITUNG	1
1.1 Prävalenz und Klassifizierung des Rhabdomyosarkoms	1
1.1.1 Definition und Klassifikation des embryonalen Rhabdomyosarkoms	2
1.1.2 Definition und Klassifikation des alveolären Rhabdomyosarkoms	4
1.1.3 Risikofaktoren	5
1.2 Therapiemöglichkeiten des Rhabdomyosarkoms	6
1.3 Tumorgenese in Zusammenhang mit dem Immunsystem	10
1.3.1 Tumorgenese in Zusammenhang mit <i>immunosurveillance</i> , <i>immunoediting</i> , <i>immunevasion</i> und <i>immune escape</i>	13
1.3.2 Tumorgenese im Zusammenhang mit veränderten Immunantworten beim alveolären und embryonalen Rhabdomyosarkom	20
1.3.3 Tumorgenese in Zusammenhang mit dem <i>macrophage migration inhibitory</i> <i>factor</i>	21
1.3.4 Verändertes Immunsystem nach Chemotherapie	29
1.4 Zielsetzung der Arbeit	37
2. MATERIAL UND METHODEN	38
2.1 Material	38
2.1.1 Chemikalien	38
2.1.2 Lösungen und Puffer	40
2.1.3 Zellkulturlösungen und verwendete Zelllinien	41
2.1.4 Antikörper und Inhibitoren	42
2.1.3 Reagenziensysteme und Fertiglösungen	43
2.1.4 Zytostatika	44
2.1.5 Geräte und Hilfsmittel	45
2.1.6 Verbrauchsmittel	46
2.1.7 Computerprogramme	48
2.2 Methoden	49
2.2.1 Zellkultur	49
2.2.2 Zelllinien	49
2.2.3 Kultivierung von Tumorzellen und Fibroblasten	49
2.2.4 Passagieren	50
2.2.5 Bestimmung der Zellzahl	51
2.2.6 Langzeitlagerung von humanen Zellen	52
2.2.7 Auftauen von humanen Zellen	52
2.2.8 Isolierung von humanen peripheren mononukleären Zellen	53
2.2.9 Durchflusszytometrie	53

2.2.10 Immunfluoreszenzanalyse	58
2.2.11 Zytotoxizitätsassays	59
2.2.12 Enzyme-linked Immunosorbent Assay	61
2.2.13 Migrations-Assay	63
2.2.14 T Zell Proliferationsanalyse	63
2.2.15 Immunhistochemie	64
2.2.16 Isolierung von RNA aus Zelllinien	66
2.2.17 Reverse Transkription	67
2.2.18 Real Time PCR	68
3. ERGEBNISSE	70
3.1 Identifizierung und Charakterisierung differentiell exprimierter immunaktiver Proteine im humanem Rhabdomyosarkom Gewebe	70
3.1.1 Differentiell exprimierte Gene aus Microarray-Genexpressionsanalyse.....	70
3.1.2 Vorstellung identifizierter immunmodulatorischer Gene und Proteine.....	70
3.1.3 Selektion und Vorstellung des <i>macrophage migration inhibitory factor</i> als putatives differentiell exprimiertes Gen im Rhabdomyosarkom.....	71
3.2 Analyse des Expressionsprofils von <i>macrophage migration inhibitory factor</i> in humanem Rhabdomyosarkom Zellmaterial	73
3.2.1 Expressionsanalyse von <i>macrophage migration inhibitory factor</i> Protein in humanen Rhabdomyosarkom Biopsien	73
3.2.2 Expressionsanalyse von <i>macrophage migration inhibitory factor</i> Protein <i>in vitro</i> mittels Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz.....	74
3.3 Analyse der Wirkung von Zytostatika auf die Expression von <i>macrophage migration inhibitory factor</i>	77
3.3.1 Zytostatikawirkung auf die Expression von <i>macrophage migration inhibitory factor</i> in humanen Rhabdomyosarkom Zelllinien	77
3.3.2 Zytostatikawirkung auf das Sekretionsverhalten von <i>macrophage migration inhibitory factor</i> in humanen Rhabdomyosarkom Zelllinien	82
3.3.3 Zytostatikawirkung auf die RNA Produktion von <i>macrophage migration inhibitory factor</i> in humanen Rhabdomyosarkom-Zelllinien	85
3.4. Wirkung von <i>macrophage migration inhibitory factor</i> auf die Viabilität und Migration von Rhabdomyosarkom Zellen.....	87
3.4.1 Analyse der Blockade von <i>macrophage migration inhibitory factor</i> auf die Zellviabilität von humanen Rhabdomyosarkom Zellen	87
3.4.2 Analyse der Migration humaner Rhabdomyosarkom Zellen nach Inhibierung des <i>macrophage migration inhibitory factor</i>	90
3.5. Wirkung von <i>macrophage migration inhibitory factor</i> -haltigem Zellüberstand von Rhabdomyosarkom Zellen auf das Immunverhalten von Zellen <i>in vitro</i>	93
3.5.1 Wirkung von <i>macrophage migration inhibitory factor</i> -haltigem Zellüberstand von Rhabdomyosarkom Zellen auf die T Zell Proliferation	93
3.5.2 Wirkung von <i>macrophage migration inhibitory factor</i> -haltigem Zellüberstand von Rhabdomyosarkom Zellen auf T Zell supprimierende <i>myeloid derived suppressor cells</i>	96
3.5.3 Einfluss von <i>macrophage migration inhibitory factor</i> auf die Zell-vermittelte Zytotoxizität von <i>peripheral blood mononuclear cells</i> auf die humane Rhabdomyosarkom Zelllinie Rh30	100

4. DISKUSSION	102
4.1 Identifizierung und Charakterisierung <i>des macrophage migration inhibitory factor</i> als differentiell exprimiertes immunaktives Protein aus humanem Rhabdomyosarkom Gewebe.....	103
4.2 Analyse des Expressionsprofils von <i>macrophage migration inhibitory factor</i> in humanem Rhabdomyosarkom Zellmaterial	105
4.3 Erhöhte Expression und Sekretion von <i>macrophage migration inhibitory factor</i> durch die Wirkung von Zytostatika	106
4.4 Einfluss auf die Viabilität und Migration von Rhabdomyosarkom Zellen durch die Blockade der Aktivitäten von <i>macrophage migration inhibitory factor</i>	110
4.5 <i>Macrophage migration inhibitory factor</i> -haltiger Zellüberstand von Rhabdomyosarkom Zellen führt zu einem veränderten Immunverhalten von Zellen <i>in vitro</i>	115
4.6 Schlussfolgerung	122
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	124
6. LITERATUR	125
7. ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL.....	150
8. VERÖFFENTLICHUNGEN	152
9. DANKSAGUNG.....	153

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
7-AAD	7-Aminoactinomycin D
A204	humane Rhabdomyosarkom Zelllinie, embryonaler Typ
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
ADCC	engl. <i>antibody dependent cell mediated cytotoxicity</i> , antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
AK	Antikörper
Akt	Protein Kinase 3
ANOVA	engl. <i>analysis of variation</i> , Zweiweg-Varianzanalyse
Ant.	Antagonist
Ant. III, 4-IPP	4-Iodo-6-phenylpyrimidine
Ant. V, p425	Sodium 6,6'-(1E,1'E)-(3,3'-dimethoxybiphenyl-4,4'- diyl)bis(diazene-2,1-diyl)bis(4-amino-5-hydroxynaphthalene- 1,3-disulfonate)
ANXA1	Annexin 1
APC (FACS)	Allophycocyanin
APC	engl. <i>antigen presenting cell</i> , Antigen-präsentierende Zelle
ARMS	Alveoläres Rhabdomyosarkom
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	engl. <i>Bcl-2-Antagonist of Cell Death</i>
Bax	engl. <i>bcl-2-like protein 4</i>
Bcl-2	engl. <i>B-cell lymphoma 2</i>
BCR	engl. <i>B cell receptor</i> , B Zell Rezeptor
BrdU	Bromdesoxyuridin
CAR	engl. <i>Chimeric Antigen Receptor</i>
CD25	engl. <i>Cluster of Differentiation 25</i> , Unterscheidungsgruppe 25

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

CALR	Calreticulin
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i> , Unterscheidungsgruppen
CD11	engl. <i>Cluster of Differentiation 11</i> , Unterscheidungsgruppe 11
CD14	engl. <i>Cluster of Differentiation 14</i> , Unterscheidungsgruppe 14
CD20	engl. <i>Cluster of Differentiation 20</i> , Unterscheidungsgruppe 20
CD226	engl. <i>Cluster of Differentiation 226</i> , Unterscheidungsgruppe 226
CD3	engl. <i>Cluster of Differentiation 3</i> , Unterscheidungsgruppe 3
CD33	engl. <i>Cluster of Differentiation 33</i> , Unterscheidungsgruppe 33
CD4	engl. <i>Cluster of Differentiation 4</i> , Unterscheidungsgruppe 4
CD44	engl. <i>Cluster of Differentiation 44</i> , Unterscheidungsgruppe 44
CD56	engl. <i>Cluster of Differentiation 56</i> , Unterscheidungsgruppe 56
CD74	engl. <i>Cluster of Differentiation 75</i> , Unterscheidungsgruppe 75
CD8	engl. <i>Cluster of Differentiation 8</i> , Unterscheidungsgruppe 8
CD80	engl. <i>Cluster of Differentiation 80</i> , Unterscheidungsgruppe 80; auch: B7-1
CD86	engl. <i>Cluster of Differentiation 86</i> , Unterscheidungsgruppe 86; auch: B7-2
CDK4	engl. <i>Cyclin-dependent kinase 4</i> , Cyclin-abhängige Kinase 4
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
cm	engl. <i>centimeter</i> , Zentimeter
cm²	engl. <i>cubic centimeter</i> , Quadratzentimeter
CO₂	Kohlenstoffdioxid
COG	Children's Oncology Group
Col5a1	Kollagen Typ V, alpha 1
COP9	engl. <i>constitutive photomorphogenesis 9</i>
COX-2	Cyclooxygenase-2
CSN	engl. <i>COP9 signalosome</i>
CSN5	engl. <i>COP9 signalosome subunit 5</i>
CTGF	engl. <i>connective tissue growth factor</i>
CTL	engl. <i>cytotoxic T cells</i> , zytotoxische T Zellen
CTLA4	engl. <i>cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4</i>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

CWS	Cooperative Weichteilsarkom Studiengruppe
CXCL10	engl. <i>C-X-C motif chemokine ligand 10</i>
CXCR2	engl. <i>C-X-C motif chemokine receptor type 2</i> , C-X-C Motiv Chemokinrezeptor 2
CXCR3	engl. <i>C-X-C motif chemokine receptor type 3</i> , C-X-C Motiv Chemokinrezeptor 3
CXCR4	engl. <i>C-X-C motif chemokine receptor type 4</i> , C-X-C Motiv Chemokinrezeptor 4
CXCR7	engl. <i>C-X-C motif chemokine receptor type 7</i> , C-X-C Motiv Chemokinrezeptor 7
d	engl. <i>days</i> , Tage
DAB	Diaminobenzidin
DAMP	engl. <i>damage-associated molecular patterns</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DC	engl. <i>dendritic cell</i> , dendritische Zellen
D-DT	D-dopachrome Tautomerase, auch MIF2
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. <i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNAM-1	engl. <i>DNAX Accessory Molecule-1</i> , auch: CD226
Doxo	Doxorubicin
DPE	engl. <i>delayed primary excision</i> , "verzögerte primäre Exzision"
E-Zellen	Effektor-Zellen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFS	engl. <i>event free survival</i> , ereignisfreies Überleben
EGFR	engl. <i>epidermal growth factor receptor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
engl.	Englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK1/2	engl. <i>extracellular signal-regulated kinase 1/2</i> , extrazellulär Signal-regulierte Kinase 1/2

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ERMS	Embryonales Rhabdomyosarkom
et al.	lat. <i>et alii</i> , und andere
Etopo	Etoposid
Fab	engl. <i>antigen binding fragment</i> , Fragment der Antigenbindung
FACS	engl. <i>fluorescence activated cell sorting</i>
Fc	engl. <i>constant fragment</i> , konstante Region
FCS	Fötale Kälberserum
Fcγ Rezeptor	Fc gamma Rezeptor
FGFR1	engl. <i>fibroblast growth factor receptor 1</i> , Fibroblasten-Wachstumsrezeptor 1
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKHR	auch: FOXO1, engl. <i>forkhead box protein O1</i>
FOXO1	engl. <i>forkhead box protein O1</i>
Foxo3	engl. <i>forkhead box protein O3</i>
FOXP3	engl. <i>forkhead box protein P3</i>
FPR1	engl. <i>formyl peptide receptor 1</i>
FSC	engl. <i>forward scatter</i> , Vorwärtsstreulicht
g	Erdbeschleunigung
GITR	engl. <i>glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related protein</i>
Gluc	engl. <i>Gaussia Luciferase</i>
GM-CSF	engl. <i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i> , Granulozyten Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
GPOH	Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie
h	engl. <i>hour</i> , Stunde(n)
HCl	Salzsäure
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HER2	engl. <i>human epidermal growth factor receptor 2</i> , humaner epidermaler Wachstumsfaktor 2
HIF1α	engl. <i>hypoxia inducible factor 1-alpha</i>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

HLA	engl. <i>human leukocyte antigen</i> , humanes Leukozytenantigen
HMGB1	High-Mobility-Group-Protein B1
HRP	engl. <i>horseradish peroxidase</i>
HSP1A1	engl. <i>heat shock protein family A member 1A</i>
HSP70	engl. <i>heat shock protein 70</i>
HSP90	engl. <i>heat shock protein 90</i>
HSP90AA1	engl. <i>heat shock protein 90kDa alpha family class A member 1</i>
HSP90B1	engl. <i>heat shock protein 90kDa beta member 1</i>
IC₅₀	engl. <i>half minimal inhibitory concentration</i> , mittlere inhibitorische Konzentration
ICD	engl. <i>immunogenic cell death</i> , immunogener Zelltod
ICG	Italian Cooperative Group
iDC	engl. <i>immature dendritic cell</i> , unreife dendritische Zelle(n)
IDO1	engl. <i>indoleamine 2,3-dioxygenase 1</i>
IFN- γ	Interferon γ
IFN	Interferon
IFNAR1	engl. <i>interferon α/β-receptor subunit 1</i>
Ig	Immunglobulin
IGF-II	Insulin Growth Factor II
IL-10	Interleukin 10
IL-1β	Interleukin 1 β
IL-2	Interleukin 2
IL-4	Interleukin 4
IL-5	Interleukin 5
IL-6	Interleukin 6
ISO-1	4,5-Dihydro-3-(4-hydroxyphenyl)-5 isoxazoleacetic acid methyl ester
JAB1	engl. <i>Jun activation domain-binding protein 1</i>
KLRK1	engl. <i>killer cell lectin-like receptor subfamily K, member 1</i>
lat.	lateinisch
LGS	Large for gestational age

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

LOH	loss of heterozygosity
LOX	engl. <i>lysyl oxidase</i>
LRP1	engl. <i>LDL receptor related protein 1</i>
M	Molar
MACS	engl. <i>Magnetic-activated cell sorting</i>
MAPK	engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i> , Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mDC	engl. <i>mature dendritic cell</i> , reife dendritische Zelle(n)
MDSC	engl. <i>myeloid derived suppressor cells</i> , Myeloide Suppressorzellen
MHC	engl. <i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
MIF	engl. <i>macrophage migration inhibitory factor</i>
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mm²	Quadratmillimeter
mm³	Kubikmillimeter
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
MTT Assay	(3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid) Tetrazolium Reduktions Assay
MYCN	MYCN Gen, codierend für engl. <i>N-myc proto-oncogene protein</i> , <i>N-Myc</i>
MyD88	engl. <i>myeloid differentiation primary response 88</i>
n	Anzahl
NAD⁺/NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP⁺/NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaN₃	Natriumazid
NK Zellen	Natürliche Killerzellen
NKG2D	engl. <i>natural killer group 2 member D</i>
nm	Nanometer

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

N-Myc	engl. <i>N-myc proto-oncogene protein</i> , <i>N-Myc</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NRAS	engl. <i>Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog</i>
O.D.	engl. <i>optical density</i> , Optische Dichte
OKT3	Anti-CD3 Antikörper
p	Signifikanzwert
p115	Golgi Protein p115
P2RX7	engl. <i>purinergic receptor P2rx7</i>
P2RY2	engl. <i>purinergic receptor P2Y2</i>
p53	Protein p53
PAX3	engl. <i>paired box gene 3</i>
PAX7	engl. <i>paired box gene 7</i>
PBMC	engl.: <i>peripheral blood mononuclear cell</i> , Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat gepufferte Salzlösung
PBST	PBS mit Tween®
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	engl. <i>programmed cell death 1</i>
PDCD1	engl. <i>programmed cell death 1</i>
PD-L1	PD-1 Ligand CD274
PE	Phycoerythrin
PE/CF 594	Phycoerythrin/CF 594
PE/Cy7	Phycoerythrin-cyanine 7
PerCP	Peridinin-chlorophyll-protein
PFA	Paraformaldehyd
pg	Picogramm
PGE-2	Prostoglandin E2
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
PI3K	engl. <i>phosphatidylinositol-3-kinase</i>
PLA2	Phospholipase A2

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PRE	engl. <i>pre-treatment re-excision</i> , "Vor-Behandlung Re-Exzision"
Pro	Prolin
PRR	engl. <i>pattern recognition receptor(s)</i>
PTGS2	engl. <i>prostaglandin-endoperoxide synthase 2</i>
Ras	engl. <i>rat sarcoma</i>
RD	humane Rhabdomyosarkom-Zelllinie, embryonaler Typ
Rh30 Gluc	humane Rhabdomyosarkom-Zelllinie, alveolärer Typ, mit stabiler Expression von Gaussia Luziferase
Rh30	humane Rhabdomyosarkom-Zelllinie, alveolärer Typ
RMS	Rhabdomyosarkom
RMS33-2	humane Rhabdomyosarkom-Zelllinie, embryonaler Typ
RNA	engl. <i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
rpm	engl. <i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute-1640 Medium
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real Time PCR
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SEM	engl. <i>standard error of the mean</i> , Standardfehler des Mittelwerts
SF	Sulforaphane
SIOP	Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique
SSC	engl. <i>side scatter</i> , Seitwärtsstreulicht
TAA	Tumorassoziierte Antigene
TAM	engl. <i>tumor associated macrophages</i> , Tumor-assoziierte Makrophagen
TBP	engl. <i>TATA-box-binding protein</i>
TCR	engl. <i>T cell receptor</i> , T Zell Rezeptor
TGF-β	engl. <i>transforming growth factor beta</i> , transformierender Wachstumsfaktor beta

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

T_H1	T Helferzellen vom Typ 1, Subpopulation der CD4+ T Zellen
T_H17	T Helferzellen vom Typ 17, Subpopulation der CD4+ T Zellen
TLR	engl. <i>toll like receptor</i> , Toll-like Rezeptor
TLR3	engl. <i>toll-like receptor 3</i> , Toll-like Rezeptor 3
TLR4	engl. <i>toll-like receptor 4</i> , Toll-like Rezeptor 4
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
T_m	engl. <i>melting temperature</i> , Schmelztemperatur
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
TNM	Tumor-Node-Metastasis
Treg	CD4+CD25+FOXP3+ regulatorische T Zelle(n)
VEGF	engl. <i>vascular endothelial growth factor</i>
Vin	Vincristin
VLE-RPMI-1640	Very-Low-Endotoxin Roswell Park Memorial Institute-1640 Medium
vs.	versus
YWHAZ	14-3-3 protein zeta/delta (14-3-3 ζ)

1. EINLEITUNG

1.1 Prävalenz und Klassifizierung des Rhabdomyosarkoms

Das Rhabdomyosarkom (RMS) ist der häufigste kindliche Weichteiltumor und hat eine Häufigkeit von 3-4 % aller pädiatrischen Tumorerkrankungen (Pastore et al., 2006) sowie einen Anteil von 7-8% aller malignen soliden Tumoren im Kindesalter (McDowell, 2003). Die Inzidenz beträgt 4,5 pro 1.000.000 Personen-Jahre, altersangepasst an die 2000 US Standardpopulation (Ognjanovic et al., 2009), wobei 61 % der Fälle in den ersten neun Lebensjahren auftreten (Ognjanovic et al., 2009). In Deutschland wird die auf das Alter standardisierte Inzidenzrate auf 0,9 pro 100.000/Jahr für alle Weichteiltumore und 0,7 für Rhabdomyosarkome angegeben (Weihkopf et al., 2008). Abhängig des Alters ist eine zweigipflige Verteilung mit einem Peak um das 2. – 6. Lebensjahr (insbesondere das embryonale RMS) und erneut zwischen dem 10. – 18. Lebensjahr (insbesondere das alveoläre RMS) zu beobachten (Dasgupta et al., 2016). Das RMS mit seinem mesenchymalen Ursprung entsteht hauptsächlich aus entarteten Vorläuferzellen des Muskelgewebes (Merlino and Helman, 1999) und stellt eine sehr heterogene Gruppe von Tumoren dar, welche histologischen und molekularerbiologisch klassifiziert werden (Parham, 2001). Davon leiten sich die zwei Haupttypen ab, das alveoläre (ARMS, ca. 25 %) und das embryonale Rhabdomyosarkom (ERMS, ca. 75 %) (Sun et al., 2015, Wachtel et al., 2006). Diese unterscheiden sich nicht nur hinsichtlich ihrer Histopathologie und Tumorbilogie, sondern auch in ihrem therapeutischen Ansprechen (Pappo et al., 1995, McCarthy, 2014). Daher fließt diese histopathologische Eingruppierung der kindlichen Rhabdomyosarkome in die Einteilung der Prognosegruppen ein, welche in drei Subgruppen klassifiziert werden (Tabelle 1) und als Grundlage für das heutige übliche Therapieschema dienen (Gadener et al., 2006).

EINLEITUNG

Tabelle 1: Klassifikation und Prognose der Rhabdomyosarkome.

Günstige Prognose	Embryonales Rhabdomyosarkom vom botryoiden Subtyp Embryonales Rhabdomyosarkom vom Spindelzelltyp
Intermediäre Prognose	„Klassische“ embryonale Rhabdomyosarkome (alle ERMS außer botryoides und spindelzelliges RMS)
Ungünstige Prognose	Alveoläres Rhabdomyosarkom Anaplastisches Rhabdomyosarkom

1.1.1 Definition und Klassifikation des embryonalen Rhabdomyosarkoms

Unter den Begriff „Embryonales RMS“ fallen sowohl die Subtypen spindelzelliges und botryoides embryonales RMS als auch das „klassische“ RMS. Der botryoide Typ macht hierbei ca. 7% aller RMS aus und findet sich aufgrund seines polypoiden, traubenförmigen Wachstums ausschließlich in Hohlorganen. Lokalisiert ist diese Tumorentität daher insbesondere in den Nasen- bzw. Nasennebenhöhlen, Nasopharynx, Harnblase, Vagina, Gallenwege und selten in der Anusregion. Ca. 3-8% aller RMS fallen auf den Spindelzelltyp des embryonalen RMS zurück, welcher hauptsächlich in der paratestikulären Region vorkommt und zu 75% aus Spindelzellen besteht. Sarkome mit skelettmuskulärer Differenzierung ohne Zuordnung zu den soeben genannten Subtypen oder dem ARMS werden zum „klassischen“ embryonalen RMS, einschließlich des pleomorphen RMS, gezählt. Hierdurch entsteht histologisch ein sehr heterogenes Muster, wobei sich insbesondere spindelartige bis ovoide Zellen mit eher unklarer Abgrenzung zur Umgebung darstellen (Abbildung 1). In der Silberfärbung fällt im Gegensatz zum alveolären RMS ein diffus verteiltes, feines Retikulinfasernetzwerk auf. Hauptlokalisation dieser Gruppe ist der Kopf-Hals-Bereich mit ca. 46% sowie der Urogenitaltrakt mit ca. 28%, seltener treten sie im Bereich der Extremitäten auf (8%) (Newton et al., 1988). Prinzipiell können sich „klassische“ ERMS jedoch im gesamten Körper manifestieren, wobei in Harnblase und Prostata ausschließlich diese Entität nachweisbar ist (Newton et al., 1988). Charakteristisch für das

EINLEITUNG

„klassische“ ERMS ist das Manifestationsalter < 15 Jahre mit einem Höhepunkt zwischen dem 1.-5. Lebensjahr (Gadener et al., 2006). Genetisch ist das ERMS mit einer 11p15.5 *loss of heterozygosity* (LOH) in bis zu 80% der Patienten assoziiert (Davicioni et al., 2009, Dasgupta et al., 2016). Innerhalb dieses Genlocus liegt das Insulin Growth Factor II (IGF-II) Gen (Dasgupta et al., 2016, Scrable et al., 1989, Huang et al., 2010). Weitere genetische Aberrationen im ERMS beinhalten *TP53*, *FGFR1* sowie *NRAS* Mutationen (Dasgupta et al., 2016, Martinelli et al., 2009).

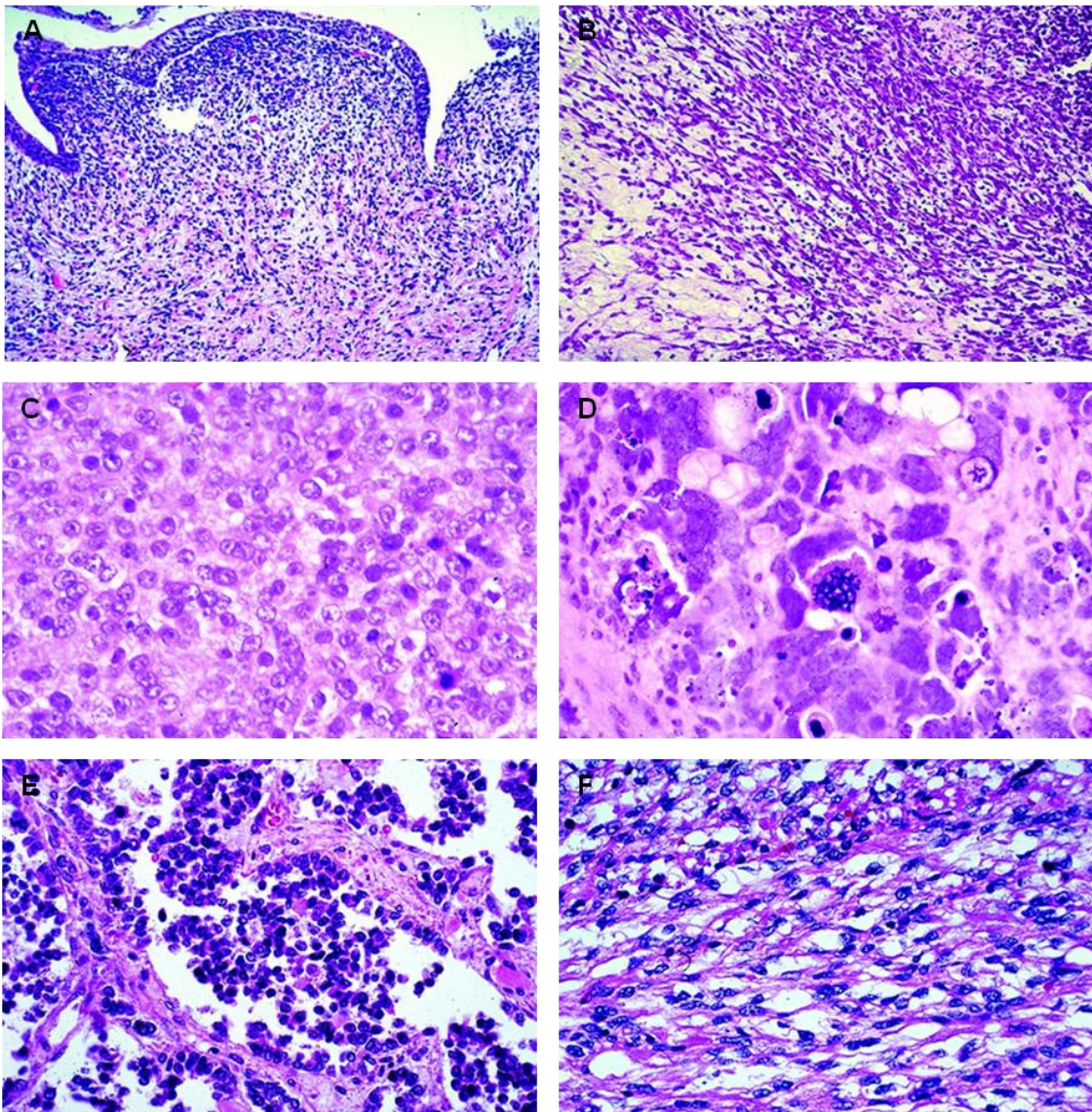


Abbildung 1: Histopathologie der Rhabdomyosarkome. Botryoides RMS (A), embryonales RMS (B), solide Form eines alveolären RMS (C), diffuses anaplastisches RMS (D), alveoläres RMS (E), ERMS vom Spindelzelltyp (F). HE-Färbungen, Abbildungen aus (Parham, 2001).

1.1.2 Definition und Klassifikation des alveolären Rhabdomyosarkoms

Bereits der Name alveoläres RMS lässt Rückschlüsse auf das histologische Bild mit entsprechenden „alveolenartigen“ Regressionsräumen schließen. Typisch sind hierbei rundliche Zellen mit großem runden Zellkern und schmalem Zytoplasmasaum, welche in großen soliden Komplexen mit Hohlraumbildung und möglicherweise darin enthaltenen Tumoriesenzellen angeordnet sind (Abbildung 1). Im sogenannten „lining“ befindet sich auf fibrösen Septen eine einreihige Lage von RMS Zellen, wodurch sich insgesamt das charakteristische histologische Bild ergibt (Abbildung 1). Des Weiteren gibt es eine „solide Variante“ des alveolären RMS, bei der zunächst keine Ausbildung von Hohlräumen vorhanden ist. Bei beiden Varianten werden nur die fibrösen Septen in der Silberfärbung dargestellt, im Vergleich zum embryonalen RMS sind die ARMS praktisch frei von Retikulinfasern, wodurch sich diese gut voneinander abgrenzen lassen. Dieser Tumor mit ungünstiger Prognose aufgrund seiner frühen (lymphogenen) Metastasierung (Gadener et al., 2006) unterscheidet sich nicht nur histologisch, sondern auch in seinem biologischen Verhalten, der Lokalisation sowie der Altersverteilung gegenüber dem embryonalen RMS. Selten treten alveoläre RMS unter dem 1. Lebensjahr auf (4,7% aller RMS), danach wird jedoch eine Zunahme der Inzidenz bis zum 5. Lebensjahr beobachtet. Insbesondere treten ARMS jedoch bei älteren Patienten während des zweiten Altersgipfels um das 10. – 18. Lebensjahr auf (Dasgupta et al., 2016). Die Hauptlokalisierung der alveolären Tumore befindet sich im Gegensatz zu den ERMS an den Extremitäten (ca. 45%), zu ca. 22% allerdings auch im Kopf-Hals-Bereich und zu 12% am Stamm. Eine geringfügig höhere Inzidenz ist beim männlichen Geschlecht zu beobachten (m:w = 1,17:1). Ungefähr 80% der ARMS zeigen eine charakteristische Translokation zwischen den *forkhead* Transkriptionsfaktor (FKHR/FOXO1) auf Chromosom 13 und einer Fusion entweder mit dem PAX3 oder PAX7 Transkriptionsfaktor, welche jeweils auf Chromosom 2 und 1 lokalisiert sind (Sorensen et al., 2002, Parham et al., 2007). Bei dieser Fusion wird die DNA-Bindedomäne von PAX mit der regulatorischen Domäne von FOXO kombiniert, woraus eine erhöhte Aktivität von PAX resultiert, die wiederum zu einer Proliferation myogener Zellen und

einer Entdifferenzierung führt (Davicioni et al., 2009). Hierbei zeigt insbesondere die häufigere PAX3-FKHR Fusion (55% vs 23% PAX7-FOXO) einen sehr schlechten Behandlungserfolg mit einer 4-Jahres-Überlebensrate von 8% und einem erhöhten Risiko einer Metastasierung sowie eines Therapieversagens (Sorensen et al., 2002, Davicioni et al., 2010). Fusionsnegative ARMS ähneln laut Genexpressionsmuster eher dem ERMS und zeigen auch eine ähnliche Prognose wie Patienten mit ERMS (Williamson et al., 2010). Weitere Mutationen bei ARMS zeigen sich im TP53 Gen, MYCN und CDK4 (Martinelli et al., 2009, Dasgupta et al., 2016).

1.1.3 Risikofaktoren

Im Kindesalter tritt das Rhabdomyosarkom in den meisten Fällen sporadisch auf, bisher sind nur wenige Risikofaktoren bekannt. Hierzu gehören insbesondere genetische Erkrankungen, aber auch ein erhöhtes Geburtsgewicht sowie „large for gestational age“ scheinen mit einer erhöhten Inzidenz eines embryonalen RMS einherzugehen (Ognjanovic et al., 2010). Ein gehäuftes Auftreten von RMS ist bei Li Fraumeni-Syndrom (mit TP53 Mutation) (Trahair et al., 2007, Li and Fraumeni, 1969, Diller et al., 1995), Neurofibromatose I (Ferrari et al., 2007, Crucis et al., 2015), Costello-Syndrom (Kratz et al., 2011, Gripp et al., 2006, Aoki et al., 2005, Gripp, 2005), Beckwith-Wiedemann-Syndrom (Samuel et al., 1999, DeBaun and Tucker, 1998), Noonan-Syndrom (Kratz et al., 2011, Moschovi et al., 2007, Hasle, 2009), Rubinstein-Taybi-Syndrom (Miller and Rubinstein, 1995) sowie dem Roberts-Syndrom (Wenger et al., 1988) zu beobachten.

1.2 Therapiemöglichkeiten des Rhabdomyosarkoms

Die aktuelle multimodale und multidisziplinäre Behandlung basiert auf der Risikostratifizierung und beinhaltet die chirurgische Tumorentfernung in Kombination mit Chemo- und Radiotherapien (Huh and Skapek, 2010, Seitz et al., 2011). Die Risikostratifizierung der Children's Oncology Group (COG) beinhaltet das Staging vor Therapiebeginn, basierend auf der anatomischen Lokalisation sowie der Tumor-Node-Metastasis (TNM) Klassifikation, dem Ausmaß der Erkrankung nach der chirurgischen Entfernung, der primären Tumorlokalisierung sowie der Histologie und dem Fusionsstatus und bringt dies in ein umfassendes Risiko-basiertes System ein (Tabelle 2) (Dasgupta et al., 2016). Weitere Studiengruppen wurden in Europa mit der Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique (SIOP) und der Cooperative Weichteilsarkom Studiengruppe (CWS) gegründet. In Deutschland erfolgt die Risikostratifizierung sowie Therapie nach dem CWS Studienprotokoll der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH). Anhand der Histologie, dem Status nach der Tumorsektion, der Lokalisation, der Größe des Tumors, dem Alter des Patienten, den befallenen Lymphknoten und der Metastasierung werden die Patienten in eine Niedrige-, Standard-, Hoch-, sehr hohe Risikogruppe oder in das Stadium IV eingeteilt (Tabelle 3) (Dasgupta et al., 2016, Gadener et al., 2006). Dies lässt bereits erkennen, dass die lokale Behandlung einer der Kernpunkte sowie den wichtigsten prognostischen Faktor im RMS darstellt (Dasgupta et al., 2016). Die Qualität der Resektion wird eingeteilt in eine mikroskopisch komplette, mikroskopisch inkomplette oder makroskopisch vollständige Resektion und ist einer der essentiellen Punkte für die Risikostratifizierung (Dasgupta et al., 2016). Die Bedeutung der Chirurgie kristallisiert sich auch im Hinblick auf die Rezidiventstehung aus, die bei initial lokalisierten RMS insbesondere einen lokalen Rückfall beinhaltet (Dasgupta et al., 2016). Des Weiteren ist die initiale Tumorexzision ein äußerst wichtiger bestimmender Faktor für das Outcome (Dasgupta et al., 2016). Daher sollte initial eine Resektion des gesamten Tumors angestrebt werden, jedoch bestenfalls ohne einen funktionellen oder kosmetischen Verlust (Dasgupta et al., 2016). Ein wesentlicher Punkt ist hierbei die Lokalisation des Tumors, der

EINLEITUNG

aufgrund seines mesenchymalen Ursprungs im gesamten Körper entstehen kann (Dasgupta et al., 2016). Abhängig von der Lokalisation können sich die Tumore unterschiedlich verhalten und benötigen verschiedenartige Interventionen bezüglich der lokalen Therapie (Dasgupta et al., 2016). Das Ziel der chirurgischen Resektion sollte dabei generell die komplette Entfernung des Tumors mit einem Umgebungssaum von normalem Gewebe ohne Funktionsbeeinträchtigung für den Patienten sein (Dasgupta et al., 2016). Eine chirurgische Resektion sollte jedoch nur unternommen werden, wenn tumorfreie Ränder ohne signifikante Morbidität antizipiert werden können (Dasgupta et al., 2016). Ist der Status der chirurgischen Ränder unklar oder wurde zunächst eine Biopsie oder eine nicht-onkologische Tumorentfernung durchgeführt, dennoch fühlt sich der Operateur in der Lage eine komplette Tumorexzision vor der Initiierung einer Chemotherapie zu erreichen, ist eine sogenannte *pre-treatment re-excision* (PRE, „Vor-Behandlung Re-Exzision“) angezeigt (Dasgupta et al., 2016). Dies beinhaltet eine weite Re-Exzision der Operationsseite mit ausreichenden Rändern normalen Gewebes vor der adjuvanten Chemotherapie (Dasgupta et al., 2016). Das Intervall zwischen der initialen chirurgischen Intervention und der PRE sollte nicht mehr als vier Wochen betragen (Dasgupta et al., 2016). In Abhängigkeit der Resektabilität des Primärtumors kann jedoch eine neo-adjuvante Chemotherapie erforderlich sein. Nach Komplettierung der Induktions-Chemotherapie um die 12. Woche werden die Patienten mittels CT oder MRT Bildgebung evaluiert, um das Therapieansprechen zu ermitteln (Dasgupta et al., 2016). Falls ein Residualtumor zurückbleibt und der Operateur erwartet, dass eine komplette Resektion des Tumors ohne einen Form- oder Funktionsverlust durchführbar ist, sollte eine sogenannte *delayed primary excision* (DPE, „verzögerte primäre Exzision“) erwogen werden (Dasgupta et al., 2016). Eine DPE kann durchgeführt werden, um das Ansprechen zu bestätigen und zu evaluieren sowie Resttumor zu entfernen, um die lokale Kontrolle zu verbessern (Dasgupta et al., 2016). Weiterhin zählt zur lokalen Kontrolle ebenso die Radiotherapie, die häufig abhängig von der Vollständigkeit der Tumorexzision mit entsprechenden Bestrahlungsdosen folgt (Dasgupta et al., 2016).

EINLEITUNG

Ein weiterer wichtiger Teil des Stagings vor Behandlungsbeginn sowie der klinischen Eingruppierung stellt der Lymphknotenstatus dar, welcher die Risiko-basierte Behandlungsstrategie im RMS beeinflusst (Dasgupta et al., 2016). 23% aller RMS Patienten präsentieren sich mit positiven Lymphknotenstatus und sind vorrangig in Bezug zur primären Tumorlokalisierung wie beispielsweise dem Perineum, Retroperitoneum, Extremitäten, Blase/Prostata, Parameningeal und Paratestikulär anzutreffen (Dasgupta et al., 2016). Ein positiver Lymphknotenstatus ist ein unabhängiger Faktor für eine schlechte Prognose sowohl für das Therapieansprechen/-versagen als auch für das Gesamtüberleben (Dasgupta et al., 2016). Dies gilt insbesondere für Patienten mit Fusions-positivem ARMS, ist jedoch nicht so sehr ausschlaggebend für Patienten mit Fusions-negativem ERMS, welche eine adäquate radiotherapeutische Behandlung erhalten (Dasgupta et al., 2016, Rodeberg et al., 2011). Die nodale Evaluation sollte in der *sentinel node technique* erfolgen (Dasgupta et al., 2016).

Eine aggressive lokale Kontrolle mittels chirurgischer Resektion in Kombination mit einer Radiotherapie scheint das Outcome von Patienten mit metastasierter Erkrankung zu verbessern (Ben Arush et al., 2015), weshalb eine aggressive Behandlung trotz Metastasierung im RMS ernsthaft in Erwägung gezogen werden sollte (Dasgupta et al., 2016). Die chirurgische Entfernung von Metastasen ist für die Biopsie, um die Diagnose zu bestätigen, sowie für persistierende Metastasen nach Chemotherapie empfohlen (Dantonello et al., 2011), dennoch ist die Rolle der kompletten Resektion distaler Metastasen im RMS aufgrund von fehlenden Daten bisher nicht geklärt (Dasgupta et al., 2016).

Abhängig von der jeweiligen Einteilung der Tumorerkrankung kommen unterschiedliche Zytostatika zum Einsatz, darunter Vincristin, Actinomycin-D, Ifosfamid und Adriamycin. Bei primär metastasierten Weichteiltumoren werden außerdem Etoposid, Epirubicin und Carboplatin verwendet (Dantonello et al., 2009, Oberlin et al., 2012, Gadener et al., 2006). Obwohl bei einigen Patienten ein adäquates Ansprechen auf diese Behandlung zu verzeichnen ist, insbesondere beim embryonalen Subtyp (Wolden et al., 1999), ist das Outcome von Patienten in fortgeschrittenen Stadien weiterhin schlecht. Darüber hinaus

EINLEITUNG

kommen weitere Probleme wie Metastasierung, Resistenzen gegenüber mehreren Therapeutika sowie Tumorrezidive hinzu (Koscielniak et al., 2002). Die Prognose eines RMS Rezidivs zeigt trotz chirurgischer Intervention eine 5-Jahres-Überlebensrate von nur 37% (vs. 8% ohne Resektion) (Hayes-Jordan et al., 2006).

Daher ist es unerlässlich, nach spezifischeren, effektiveren und nebenwirkungsärmeren Therapiemöglichkeiten zu suchen. Neue Chemotherapeutika und molekulare Therapien werden in Studien getestet, zudem gewinnt die Immuntherapie an zunehmender Bedeutung und liefert vielversprechende Ansätze (Ma and Adjei, 2009, Hawkins et al., 2014).

Tabelle 2: Risikostratifizierung der COG RMS Studien. Einteilung in Risikogruppen anhand der COG Studie als Prädiktor des Patientenoutcomes. ARMS: alveoläres Rhabdomyosarkom; ERMS: embryonales Rhabdomyosarkom; EFS: event free survival. Tabelle verändert nach (Dasgupta et al., 2016).

M-Status	Initiale Resektion	Histologie	Lokalisation	Risikogruppe	% der Patienten	EFS (%)
M0	Alle	ERMS	Günstig	Gering	32	70-95
M0	Ja		Ungünstig			
M0	Nein	ERMS	Ungünstig	Mittel	27	73
M0	Alle	ARMS	Alle		25	65
Vorhanden	Alle	ERMS	Alle	Hoch	8	35
Vorhanden	Alle	ARMS	Alle		8	15

Tabelle 3: Risikostratifizierung und Prognose der europäischen Rhabdomyosarkom Studien (ohne Stadium IV). % der Patienten und 3-Jahres Event-free-survival (EFS) anhand CWS/ICG (Italian Cooperative Group für pädiatrische Weichteiltumore) RMS-96. ORB: Orbita; UG ohne BP: Urogenital ohne Blase oder Prostata; KH ohne PM: Kopf-Hals ohne parameningealem Befall; KH mit PM: Kopf-Hals mit parameningealem Befall; UG mit BP: Urogenital mit Blase oder Prostata; EXT: Extremitäten. EFS: Event-free-survival. Tabelle verändert nach (Dasgupta et al., 2016).

M-Status	N-Status	Pathologie	Lokalisation	Größe/Alter	Subgruppe	Risikogruppe	% der Patienten	3-Jahres EFS (%)
M0	N0	ERMS	Alle	≤ 5cm und < 10 Jahre	A	Gering	7	93
	N0	ERMS	Alle	>5cm oder ≥10 Jahre	B	Standard	6	73
	N0	ERMS	ORB, UG ohne BP, KH ohne PM	Alle	C	Standard	18	81
	N0		EXT, UG mit BP, KH mit PM, andere	≤ 5cm und < 10 Jahre	D	Standard	11	77
	N0	ERMS		>5cm oder ≥10 Jahre	E	Hoch	27	59
	N1	ERMS	Alle		F	Hoch	10	43
	N0	ARMS	Alle		G	Hoch	15	64
	N1	ARMS	Alle		H	Sehr hoch	6	25

1.3 Tumorgenese in Zusammenhang mit dem Immunsystem

Das äußerst komplex aufgebaute Immunsystem ist ein Abwehrsystem höherer Organismen zur Erkennung und dem Schutz vor fremden, toxischen und pathogenen Substanzen. Hierzu gehören Bakterien, Pilze, Viren, Protozoen und Toxine, ferner auch körpereigene, entartete Tumorzellen. Über verschiedenste Rezeptoren und Botenstoffe (Zytokine) kann das Immunsystem Bestandteile des Pathogens sowie zelluläre Moleküle erkennen und zwischen körpereigenen und körperfremden als auch zwischen gesunden und anormalen Körperzellen unterscheiden. Dadurch ist das Immunsystem in der Lage, während der mehrschichtigen Tumorgenese zu schützen, indem Tumorzellen gezielt eliminiert werden. Dies wird wiederum im Rahmen der Immuntherapie onkologischer Erkrankungen genutzt: das körpereigene Immunsystem verstärkt zu stimulieren, um Tumorzellen zu erkennen und zu bekämpfen.

Eingeteilt wird das humane Immunsystem in das angeborene und adaptive Immunsystem sowie in eine zelluläre und humorale Immunreaktion. Zum angeborenen Immunsystem zählt die unspezifische Immunabwehr, welche durch dendritischen Zellen, Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, Mastzellen und natürliche Killerzellen (NK Zellen), aber auch durch physiologische Barrieren wie Epithelien, entzündlichen Reaktionen und dem Komplementsystem erfolgt.

Hierbei spielen dendritische Zellen (DCs, engl. *dendritic cell*), welche sogenannte tumorassoziierte Antigene (TAA) aufnehmen, bei der Erkennung von Tumorzellen eine bedeutende Rolle. Parallel zur Aufnahme dieser tumorassoziierten Antigene, die mutierte Proteine darstellen können, benötigen die dendritischen Zellen außerdem ein Signal, wie beispielsweise über Toll-like Rezeptoren (TLR) oder über Faktoren, welche von sterbenden Tumorzellen sezerniert werden, um die Prozessierung und Präsentation der von den Tumorantigenen stammenden Peptide zu fördern (Gotwals et al., 2017). Die mit dem Tumorantigen beladenen DCs wandern anschließend in die lymphatischen Organe, um dort die Proliferation von CD8+ T Zellen mit zytotoxischem Potential zu stimulieren. Außerdem können DCs die humorale Immunantwort

EINLEITUNG

sowie die Antwort von NK Zellen fördern und so zur Tumormunität beitragen. Anschließend können die tumorspezifischen T Zellen von den Lymphknoten zum Tumor gelangen, wo sie jedoch einer immunsuppressiven Umgebung ausgesetzt sein können (Gotwals et al., 2017).

Im Gegensatz dazu erkennt das adaptive Immunsystem spezifische Aminosäuresequenzen, wodurch zielgerichtete B und T Zellen gegen individuelle Tumorantigene entstehen. Über den B Zellrezeptor (BCR, engl. *B cell receptor*), der sich in der Membran der B Zelle befindet, werden die spezifischen Epitope gebunden und anschließend das Antigen internalisiert, um dieses den T Helferzellen (CD4+ T Zellen) zu präsentieren. Dies erfolgt mittels MHC Klasse II-Molekülen (engl. *major histocompatibility complex*, Haupthistokompatibilitätskomplex; auf B Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen), die mit dem T Zellrezeptor (TCR, engl. *T cell receptor*) in Interaktion treten. Daraufhin wird die T Zelle aktiviert und verschiedenste Zytokine wie Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-5 (IL-5) werden sezerniert. Die B Zelle wiederum proliferiert und differenziert sich in eine Antikörper produzierende Plasmazelle, welche spezifische Immunglobuline (Ig) mit den Merkmalen des zuvor membranständigen B Zellrezeptors im Rahmen der humoralen Immunantwort sezerniert. Mittels Antigen-Antikörper Reaktion binden diese Immunglobuline an die speziellen Zielstrukturen, welche beispielsweise auf Tumorzellen zu finden sind. Dadurch werden diese markiert und über den konstanten Teil des gebundenen Antikörpers (Fc-Teil) für phagozytierende Zellen kenntlich gemacht. Diese binden über ihren Fc γ -Rezeptor an den Fc-Teil des Antikörpers, internalisieren den Komplex und verdauen diesen über die Bildung eines Phagolysosoms. An diesem Vorgang sind unter anderem Makrophagen beteiligt, welche aktivierte, in das Gewebe migrierte Monozyten sowie professionelle antigenpräsentierende Zellen (engl. *antigen presenting cell*, APC) darstellen. Eine Aktivierung der Makrophagen und somit Steigerung der Effizienz der Lyse kann durch die Ausschüttung von Zytokinen wie Interferon γ (INF- γ) und Tumornekrosefaktor α (TNF- α) erreicht werden. Diese erfolgt durch die Interaktion des TCR auf den T Helferzellen mit dem MHC-II-Komplex, welcher Peptide zur Präsentation gebunden hat.

EINLEITUNG

Darüber hinaus wird zusätzlich das Komplementsystem über den klassischen Weg der Antigen-Antikörper Reaktion eingeschaltet. Das Prinzip besteht in einer Reihe von Reaktionen, bei denen mehrere, inaktive Plasmaproteine in aktive, proteolytische Enzyme umgewandelt werden. Zunächst bindet das Komplementprotein C1 an den aus IgG oder IgM gebildeten Antigen-Antikörper-Komplex und wird dadurch aktiviert. Im Anschluss folgen mehrere Bindungen, Aktivierungen und Abspaltungen, woraus letztendlich die Entstehung einer C3-Konvertase (C4bC2a) resultiert. Diese wiederum spaltet den Komplementfaktor C3, woraufhin das sogenannte Opsonin C3b entsteht. Die C5-Konvertase (C4b2a3b), bestehend aus der C3-Konvertase und dem Opsonin C3b, katalysiert die Entstehung des aktiven Komplementfaktors C5b aus der inaktiven Form C5. Ersterer fungiert als Mediator zur Einleitung des lytischen Komplexes. C5a dagegen bindet an einen speziellen Rezeptor, wodurch Makrophagen stimuliert werden, die mit dem Opsonin C3b beladene Tumorzelle zu phagozytieren. Mit Hilfe des Komplementrezeptors 1 (C3b-Rezeptor) auf der Oberfläche der Makrophagen erfolgt die Bindung sowie Internalisierung.

Eine weitere wichtige Funktion erfüllen Antikörper durch die Markierung von Tumorzellen, welche dadurch mit Hilfe des auf den NK Zellen befindlichen Fcγ-Rezeptors erkannt werden können. Durch die Quervernetzung der Rezeptoren kommt es zu einer Freisetzung zytotoxischer Granula mit Perforin und Granzyme. Dabei perforiert das zytolytische Protein Perforin die Zellmembran und bildet eine Pore, durch die die Protease Granzyme in die Tumorzelle gelangen und dort die Apoptose auslösen kann. Dieser Vorgang einer Zelllyse mittels Antikörper wird auch als antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (engl. *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC) bezeichnet.

Eine Sekretion zytotoxischer Granula mit nachfolgender Apoptose der Zielzelle erfolgt neben den NK Zellen auch durch zytotoxische T Zellen (engl. *cytotoxic T cells*, CTL, CD8+ T Zellen). Hierbei erfolgt die Erkennung und Lyse der Tumorzellen jedoch nicht mittels Antikörper, sondern wie bei den T Helferzellen über MHC-Moleküle. Über den T Zell Rezeptor erkennen CD8+ T Zellen die zu Peptiden prozessierten Proteine des Tumors, welche auf Molekülen der MHC Klasse-I präsentiert werden. Um die Tumorzelle jedoch als „fremd“ zu

erkennen, sind meistens Mutationen im Tumorgenom notwendig, die in der Aminosäuresequenz des präsentierten Peptids erscheint. Ist dies der Fall, erfolgt eine klonale Expansion der spezifischen T Zelle, es entstehen zytotoxische T Zellen (CTL) und die Tumorzelle wird mittels oben genannter zytotoxischer Granula lysiert (Janeway et al., 2008). CTLs sind insbesondere effizient in der Kontrolle der Tumorprogression durch die Produktion hoher Mengen an IFN- γ (Zytokin mit breiten immunstimulatorischen Effekten, zytotoxische Effekte auf Endothelzellen des vaskularisierten Tumors) (Vesely et al., 2011). Der TCR wird überdies auch auf T_H1 CD4⁺ T Zellen exprimiert, der zusammen mit CD4 genutzt wird, um die auf MHC Klasse-II präsentierten Antigene auf der Zelloberfläche von Tumorzellen zu erkennen. Des Weiteren produzieren T_H1 CD4⁺ T Zellen mehrere immunstimulatorische Zytokine einschließlich IFN- γ und Interleukine (Fridman et al., 2012).

Eine weitere Aktivierung der NK Zellen erfolgt durch den Verlust inhibitorischer Signale auf den Zielzellen wie MHC Klasse-I und der Expression von Liganden wie *killer cell lectin-like receptor subfamily K, member 1* (KLRK1, besser bekannt als NKG2D (*natural killer group 2 member D*)) und *cluster of differentiation 226* (CD226) (auch DNAM-1 (*DNAX Accessory Molecule-1*)) (Vivier et al., 2011). NKG2D und DNAM-1 werden beispielsweise im Zuge verschiedener Störungen wie DNA Schäden hochreguliert und dienen als Gefahrensignale (Vivier et al., 2011). NK Zellen scheinen dementsprechend vorrangig in der Kontrolle der Metastasierung involviert zu sein (nach Verlust der MHC Klasse-I Moleküle), wohingegen CTLs und T_H1 CD4⁺ T Zellen die lokale *immunosurveillance* sicherstellen. Im besten Fall wird der Tumor durch eine Kombination von CTLs (inklusive Gedächtniszellen), T_H1 CD4⁺ T Zellen und NK Zellen infiltriert (Galluzzi et al., 2015).

1.3.1 Tumorgenese in Zusammenhang mit *immunosurveillance*, *immunoediting*, *immunevasion* und *immune escape*

Das Immunsystem spielt demzufolge eine kritische Rolle in der Erkennung sowie in der Entwicklung und Abwehr von soliden Tumoren und kann in diesem

EINLEITUNG

Rahmen eine bivalente Funktion innehaben, sowohl das Tumorwachstum zu fördern als auch zu supprimieren (Vinay et al., 2015, Vesely et al., 2011). Unter anderem kann eine chronische Inflammation oder auch Autoimmunerkrankung die Tumorentstehung fördern, beispielsweise durch eine virale Infektion mit Hepatits B oder C, welche zur Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms beiträgt (Vinay et al., 2015). Um dieser bivalenten Funktion des Immunsystems, zum einen den Wirt zu schützen, zum anderen jedoch Neoplasien zu entwickeln, wurde der Begriff „*cancer immunoediting*“ neben „*immunosurveillance*“ eingeführt (Vinay et al., 2015, Dunn et al., 2002). Im Normalfall ist das Immunsystem in der Lage, die meisten immunologisch vulnerablen Tumorzellen, unter anderem aufgrund der Präsentation ihrer Tumorantigene, zu erkennen und zu zerstören (*elimination*; prä maligne Läsionen, die durch Effektorzellen des Immunsystems eliminiert werden) (Abbildung 2) (Vinay et al., 2015, Dunn et al., 2004). Dennoch kann es während der konstanten Tumorzellteilung aufgrund genetischer Instabilität und vermehrten Mutationen zu neuen, heterogenen Tumorzellvarianten kommen, entweder durch zufällige Akkumulation von Mutationen oder als Antwort auf eine immun-induzierte Inflammation. Die Immunantwort nimmt an Kompetenz ab, Tumorantigene können aufgrund reduzierter Immunogenität der mutierten malignen Zellen nicht mehr von T Zellen erkannt werden, woraufhin kleine Tumore gebildet werden - das System befindet sich im sogenannten *equilibrium* (Abbildung 2) (Zitvogel et al., 2013). Durch diesen Selektionsdruck entsteht ein Selektionsvorteil dieser mutierten malignen Zellen, die sich aufgrund dessen einer Immunantwort entziehen. Letztendlich können neoplastische Zellen durch diese Entwicklung der Elimination sowie Kontrolle des Immunsystems entgehen und erhebliche Läsionen formen (*immune escape*) (Abbildung 2) (Vinay et al., 2015, Zitvogel et al., 2013, Schreiber et al., 2011).

EINLEITUNG

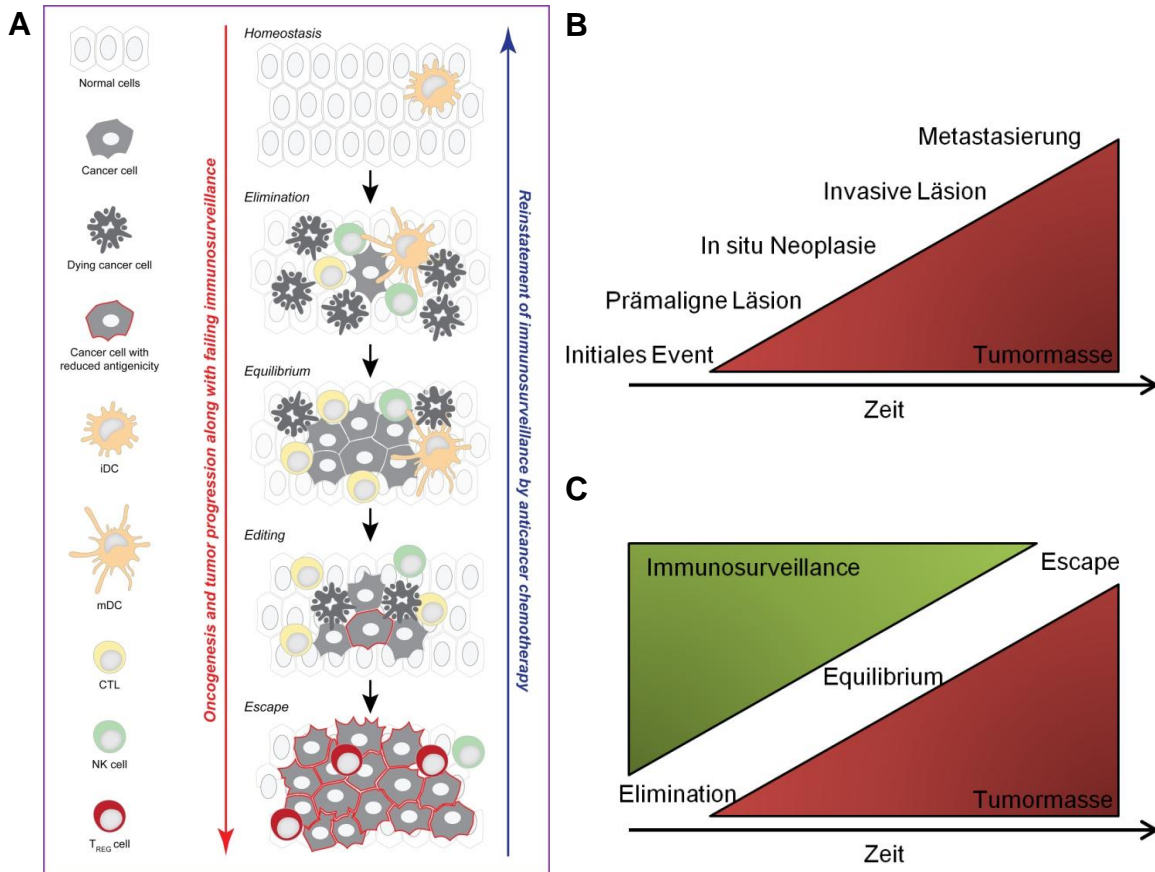


Abbildung 2: Prinzipien der Tumorentstehung im Rahmen der Immunüberwachung. Das Immunsystem ist generell in der Lage, prä-maligne Zellen zu erkennen und zu zerstören (*elimination*). Dennoch können maligne Zellen dieser Elimination durch das Immunsystem entgehen und proliferieren. Mit Hilfe der fortbestehenden Immunantwort kann diese Expansion noch zurückgehalten werden (*equilibrium*). Jedoch können in diesem Stadium Tumorzellen mit reduzierter Immunogenität oder der Kapazität, immunsuppressive Netzwerke zu etablieren, im Rahmen eines Selektionsvorteils unter dem Druck des Immunsystems (*immunoediting*) wachsen und klinisch manifeste Neoplasien bilden (*escape*). Zunehmende Daten weisen darauf hin, dass klinisch erfolgreiche Therapeutika gegen Tumore die *immunosurveillance* ein- oder zurücksetzen können, entweder indem die Immunogenität oder *adjuvanticity* maligner Zellen (ein „on-target“ Effekt) erhöht wird, welche dadurch dem Immunsystem zugänglich werden, oder weil sie direkt die Aktivität immunstimulatorischer oder immunsuppressiver zellulärer Netzwerke beeinflussen („off-target“ Effekte). CTL: CD8+ zytotoxische T Zellen; iDC: unreife (engl. *immature*) dendritische Zellen; mDC: reife (engl. *mature*) dendritische Zellen; NK: natürliche Killerzellen; Treg: CD4+CD25+FOXP3+ regulatorische T Zellen. Abbildungen aus (A) (Galluzzi et al., 2015); (B, C) verändert nach (Zitvogel et al., 2013).

Folglich werden Tumore häufig während der *escape* Phase diagnostiziert, welche durch zwei unterschiedliche, sich jedoch nicht gegenseitig ausschließende Mechanismen entsteht: (1) Durch Verminderung der Immunogenität und/oder dem Verlust der Antigenpräsentation (Reduktion der *adjuvanticity*) wird die Detektion maligner Zellen durch das Immunsystem erschwert (Matsushita et al., 2012, Senovilla et al., 2012b); darüber hinaus erfolgt (2) eine Induktion einer Fülle von lokalen und systemischen

EINLEITUNG

immunsuppressiven Mechanismen, darunter die Sekretion spezifischer Zytokine wie Interleukin-10 (IL-10) sowie die Akkumulation immunsuppressiver Zelltypen einschließlich FOXP3+ regulatorischer T Zellen, *myeloid derived suppressor cells* (MDSC) und M2 Makrophagen (Coussens et al., 2013) (Abbildung 3c).

Der zuletzt genannte, indirekte Mechanismus, dem Immunsystem mittels Beeinflussung immunsuppressiver zellulärer Netzwerke zu entgehen, findet lokal im sogenannten Mikromilieu des Tumors (*tumor microenvironment*) statt. Innerhalb dieses Mikromilieus entsteht eine immunsuppressive Umgebung (damit einhergehend eine Suppression der Immunantwort gegen Tumorzellen), welche unter anderem durch die bereits genannten immunsuppressiven Zelltypen wie CD4+CD25+FoxP3+ regulatorische T Zellen (Tregs), MDSCs und Typ M2 Makrophagen generiert wird und zu einer lokalen Progression des Tumorstwachstums sowie durch die Entwicklung einer Immuntoleranz zu einer systemischen lymphogenen und hämatogenen Metastasierung beiträgt (Bhatia and Kumar, 2014, Gajewski et al., 2013). Mittels metabolischer, autokriner oder parakriner intratumoraler sowie systemischer Netzwerke interagieren diese immunsuppressiven Zellen mit Effektorzellen des Immunsystems, um diese zu inhibieren. Im Rahmen der Immunantworten sind neben stimulatorischen auch inhibitorischen Rezeptoren vorhanden (unter anderem um autoimmunem Phänomenen entgegenzuwirken), beispielsweise auf zytotoxischen T Zellen. Diese tragen den *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* (CTLA4) sowie den *programmed cell death 1* (PDCD1 oder PD-1) Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche, die nach Bindung an ihre entsprechenden Liganden immunsupprimierende Effekte generieren, um vor exzessiver Aktivierung zu schützen (Zarour, 2016). Treten diese Rezeptoren jedoch mit immunsuppressiven Zellen wie MDSCs in Kontakt, kommt es zu einer Inhibierung dieser Effektorzellen (Galluzzi et al., 2015). Eine Blockade dieser Rezeptoren mittels Antikörper (Checkpoint Inhibitoren) führte zu einer erfolgreichen Reaktivierung Tumor-infiltrierender T Zellen und zu persistierendem klinischen Benefit bei Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren, beispielsweise im Malignen Melanom, nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom sowie Nierenzellkarzinom (Zarour, 2016, Sharma and Allison, 2015). Damit

EINLEITUNG

einhergehend wurde intratumoral eine Erhöhung immunsuppressiver Moleküle wie PD-1 Ligand CD274 (auch PD-L1), *prostaglandin-endoperoxide synthase 2* (PTGS2 oder COX-2 (Cyclooxygenase-2)) sowie *indoleamine 2,3-dioxygenase 1* (IDO1) nachgewiesen, welche eine Assoziation mit einem schlechten klinischen Outcome zeigten (Fridman et al., 2012, Senovilla et al., 2012a, Galluzzi et al., 2015). Diese Mechanismen demonstrieren, dass eine sowohl lokal als auch systemisch immunsuppressive Umgebung des Tumors ein wesentlicher, limitierender Faktor in der Immuntherapie darstellt (Jacobs et al., 2012), verdeutlicht jedoch gleichzeitig die Möglichkeit einer indirekten Immunstimulation durch Inhibierung dieser immunsuppressiven Netzwerke. Weiterhin wird im Rahmen dieser Netzwerke eine Sekretion von Zytokinen hervorgerufen, darunter IL-10, IL-4, *transforming growth factor beta* (TGF- β) und *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (Galluzzi et al., 2015, Rabinovich et al., 2007), die wiederum zu einer Immunsuppression sowie Inhibierung einer Antigenpräsentation beitragen können (Abbildung 3c).

Ein weiterer Mechanismus des *immune escapes* stellt die Reduktion der Immunogenität durch Verlust der Antigenexpression und -präsentation (*antigenicity*) dar, wodurch ein Tumorwachstum erreicht werden kann. Dies zeichnet sich durch die Störung des sehr komplexen Prozesses der Präsentation von Tumorantigenen auf der Zelloberfläche aus. Beispielsweise sind insbesondere in fortgeschrittenen, metastasierten Krankheitsstadien MHC-I-Moleküle auf der Tumorzelloberfläche deutlich reduziert oder sogar vollständig fehlend, wodurch eine Erkennung der Tumorantigene durch das Immunsystem, insbesondere zytotoxischer T Zellen, nicht mehr möglich ist (Cabrera et al., 2003). Überdies kann es zu einem Defekt der Prozessierung der Antigene kommen oder zu einer geringen Expression kostimulatorischer Moleküle wie beispielsweise CD80 (B7-1) oder CD86 (B7-2), welche von T Zellen für eine effektive Aktivierung benötigt werden (Coyle and Gutierrez-Ramos, 2001).

Ein essentieller Grund der Tumorprogression sowie des ungenügenden Ansprechens auf therapeutische Interventionen stellt demnach die Umgehung der Immunabwehr durch Tumore dar, welche durch die oben genannten, mannigfaltigen Faktoren hervorgerufen werden kann. Demzufolge ist es

EINLEITUNG

notwendig, neue therapeutische Strategien zu entwickeln, dem *immune escape* des Tumors entgegenzuwirken und eine gesteigerte Aktivität der Immunantwort zu erreichen, damit Tumore effektiver bekämpft werden können (Abbildung 3).

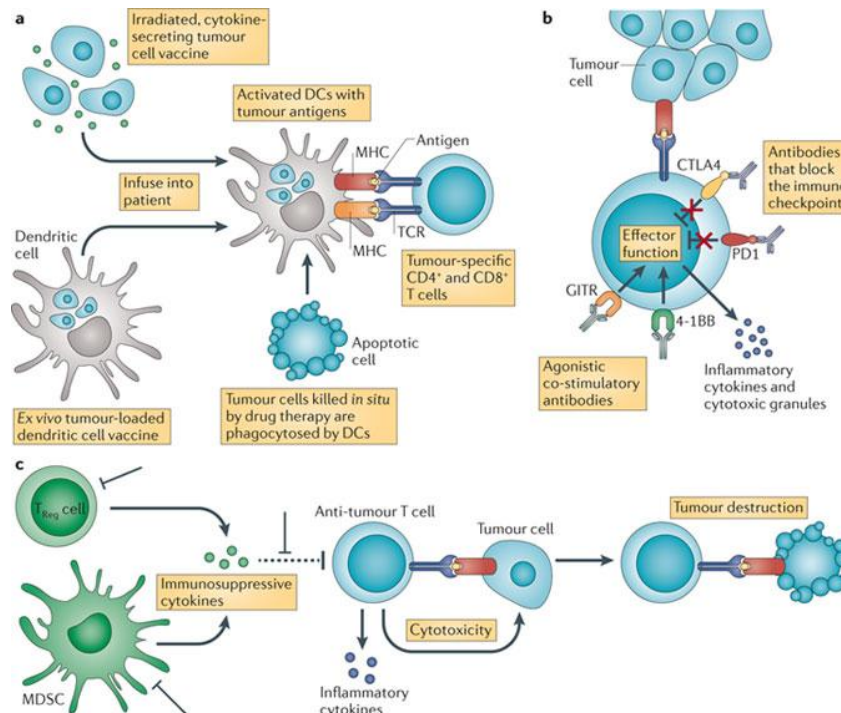


Abbildung 3: Generierung einer Immunantwort gegen Tumore. (a) Eine Aktivierung dendritischer Zellen (DC) kann über mehrere Wege erfolgen. Zum einen können bestrahlte, Zytokin-produzierende Tumorzellen injiziert werden, woraufhin die DC die Tumorzellen phagozytieren und Tumorantigene den T Zellen präsentieren. Auch *ex vivo* kann eine Reifung der DC erreicht werden, indem diese mit Tumorzellen geprimt und im Anschluss dem Patienten zurück infundiert werden. Zusätzlich können apoptotische Tumorzellen, welche durch Chemo- oder zielgerichteter Therapie zerstört wurden, das Priming und die Aktivierung von DC fördern. All diese Ansätze führen zu einer durch DC Zellen geförderten Generierung Tumor-spezifischer T Zellen *in vivo*. (b) Eine Aktivierung von T Zellen kann durch exogene stimulatorische Signale oder der Blockade inhibitorischer Signalwege erreicht werden. Antikörper gegen 4-1BB und *glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related protein* (GITR) wirken agonistisch und verstärken die T Zell Antwort. Im Gegensatz hierzu verhindern blockierende Antikörper gegen inhibitorische Rezeptoren wie *cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4* (CTLA4) und *programmed cell death protein 1* (PD1) die Transduktion negativer Signalwege und somit das „Herunterfahren“ der T Zelle. Beide Wege resultieren in einer verstärkten T Zell Funktion, sowohl in der Freisetzung von Zytokinen als auch der Zytotoxizität. (c) Eine Inhibition der Immunantwort gegen Tumore erfolgt darüber hinaus auch über indirekte, immunsuppressive Mechanismen. Hierbei produzieren immunsuppressive regulatorische T Zellen (Tregs) sowie *myeloid derived suppressor cells* (MDSCs) Zytokine wie Interleukin-10 (IL-10) und *transforming growth factor-β* (TGFβ), welche zu einer Unterdrückung der Immunantwort führen. Um diese Immunsuppression zu verringern und dadurch die Destruktion von Tumorzellen zu begünstigen, sind Strategien notwendig, die Sekretion der Zytokine und/oder die Differenzierung und Entstehung von Tregs und MDSCs zu unterdrücken oder gezielt die immunsuppressiven Zellen zu zerstören. Abbildung aus: (Vanneman and Dranoff, 2012).

EINLEITUNG

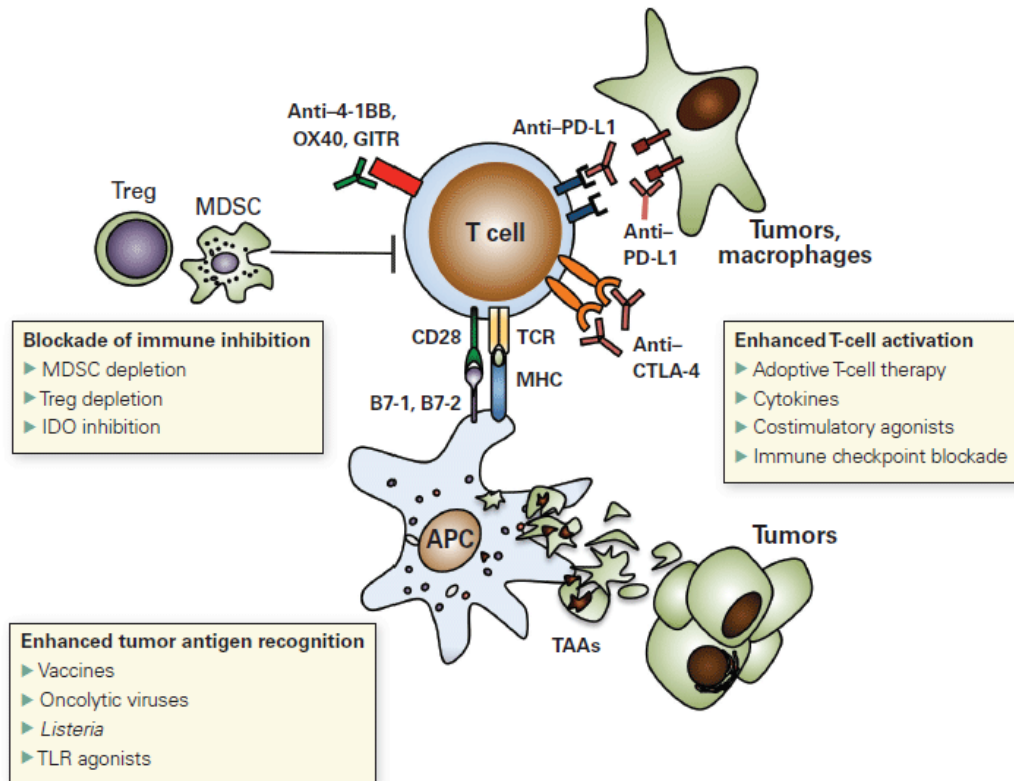


Abbildung 4: Möglichkeiten der Immuntherapie bei Tumorerkrankungen. Immuntherapeutische Ansätze können sowohl über eine direkte als auch indirekte Weise zu einer Stimulation der Immunantwort gegen Tumore führen. Um dem indirekten Mechanismus des *immune escapes* entgegenzuwirken, werden immunsuppressive Netzwerke durch eine Blockade immunsuppressiver Zellen und Moleküle (MDSC, Tregs, IDO) reduziert. Darüber hinaus können T Zellen vermehrt aktiviert werden, indem ein adoptiver T Zell Transfer durchgeführt wird, Co-stimulatorische Agonisten oder Checkpoint Inhibitoren zum Einsatz kommen. Eine direkte Art, die Erkennung von Tumorantigenen zu fördern, besteht in der Durchführung von Vakzinierungen oder auch dem Transfer von onkolytischen Viren. APC: Antigen-präsentierende Zelle (engl. *antigen-presenting cell*); CTLA-4: zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Antigen 4 (engl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*); GITR: engl. *glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related protein*; IDO: engl. *indoleamine 2,3-dioxygenase*; MDSC: engl. *myeloid derived suppressor cell*; MHC: engl. *major histocompatibility complex*; TAAs: Tumorassoziierte Antigene; TCR: T Zell Rezeptor; Treg: CD4+CD25+FOXP3+ regulatorische T Zellen. Abbildung aus: (Bourla and Zamarin, 2016).

Immuntherapeutische Ansätze gewinnen in der Tumorthherapie immer größere Bedeutung, welche sowohl in präklinischen Modellen als auch klinischen Studien vielversprechende Resultate liefern. Darunter finden sich, wie in Abbildung 3 und 4 dargestellt, unter anderem:

(1) gezielte Antikörper Therapien und *small molecules* (Stadler et al., 2017, Zarour, 2016, Sharma and Allison, 2015, Topalian et al., 2011, Farkona et al., 2016)

(2) Tumorstimmung mit Peptiden, mRNA, DC, viralen Vektoren o.ä. (Itoh and Yamada, 2006, Hinz et al., 2017, Rittig et al., 2011, Kreiter et al., 2015, Diken et

al., 2015, Kranz et al., 2016, Tureci et al., 2016, Nelde et al., 2017, Topalian et al., 2011, Farkona et al., 2016)

(3) *Chimeric Antigen Receptor* (CAR) T Zellen (Maude, 2017, Maude et al., 2015, Farkona et al., 2016)

(4) Adoptive Zelltherapie (Farkona et al., 2016, Topalian et al., 2011)

(5) Onkolytische Viren (Farkona et al., 2016).

1.3.2 Tumorgenese im Zusammenhang mit veränderten Immunantworten beim alveolären und embryonalen Rhabdomyosarkom

Auch im RMS scheint das Immunsystem eine Rolle in der Tumorgenese inne zu haben, jedoch sind die Studien bezüglich der Immunogenität und des Ansprechens des Immunsystems beim RMS bisher limitiert. Meadors *et al.* etablierten eine neue RMS Zelllinie (M3-9-M) aus einem murinen ERMS, injizierten die Tumorzellen in immunkompetente Mäuse und führten eine Vakzinierung mit bestrahlten M3-9-M Zellen oder M3-9-M-gepulsten dendritischen Zellen durch, woraufhin eine Tumor-spezifische T Zell Antwort sowie eine Unterdrückung beziehungsweise Verlangsamung des Tumorzellwachstums beobachtet werden konnte (Meadors et al., 2011). Darüber hinaus führte eine zuvor durchgeführte Depletion CD4+CD25+FoxP3+ regulatorischer T Zellen zu Potenzsteigerung der ERMS Tumorzellvakzinierung und eine adoptive Immuntherapie mit M3-9-M vorbehandelter T Zellen plus DC-basierte Vakzinierung zu einer kompletten Eradikation der Tumore (Meadors et al., 2011). Dies deutet darauf hin, dass regulatorische T Zellen zu einer Immunevasion in einem präklinischen RMS-Modell beitragen und immuntherapeutische Ansätze vielversprechende neue Therapiemöglichkeiten im humanen RMS liefern könnten.

Im Gegensatz hierzu führte eine Vakzinierung mit Peptiden der Bruchstelle der Fusionsproteine bei Patienten eines rezidierten Ewing Sarkoms oder ARMS zu keiner Besserung des schlechten Outcomes, sie zeigten keine signifikante Immunsuppression und sehr große Tumore (Dagher et al., 2002).

Insgesamt verdeutlichen diese Beispiele dennoch das enorme Potenzial sowie die Dringlichkeit, die Rolle des Immunsystems in der Tumorgenese des RMS und mögliche immuntherapeutische Strategien zu analysieren und evaluieren.

1.3.3 Tumorgenese in Zusammenhang mit dem *macrophage migration inhibitory factor*

Das in den letzten Jahren immer bedeutender werdende multifunktionale immunmodulatorische Protein *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) wird in vielen Körperzellen produziert und sezerniert und trägt über mehrere Signalwege zu zahlreichen pro-inflammatorischen Prozessen bei (O'Reilly et al., 2016). Hierbei spielt MIF eine zentrale Rolle und repräsentiert einen signifikanten Mediator in der Inflammation-Tumor Achse (O'Reilly et al., 2016), wobei MIF mit der Tumorgenese, Angiogenese und Metastasierung vieler Tumorentitäten in Zusammenhang gebracht wird (O'Reilly et al., 2016). Zudem ist MIF nicht nur in der onkogenen Transformation, Tumorprogression und der Beeinträchtigung des Immunsystems involviert (Tarnowski et al., 2010a, Repp et al., 2000, Bach et al., 2008), sondern auch im Tumorzellwachstum, der Angiogenese sowie der Migration von Tumorzellen (Shimizu et al., 1999, Rendon et al., 2007, Dessein et al., 2010). Eine Überexpression von MIF wurde in zahlreichen Tumorentitäten identifiziert, darunter das Plattenepithelkarzinom (Nagarajan et al., 2014), Kolonkarzinom (Dessein et al., 2010, Gordon-Weeks et al., 2015, Choi et al., 2012), Lungenkarzinom (Tomiyasu et al., 2002, Rendon et al., 2007, Kamimura et al., 2000), Mammakarzinom (Xu et al., 2008), Prostatakarzinom (Meyer-Siegler et al., 2002, Hussain et al., 2013), Glioblastom (Mittelbronn et al., 2011, Munaut et al., 2002), Maligne Melanom (Shimizu et al., 1999, Kobold et al., 2014, Repp et al., 2000, Yaddanapudi et al., 2015, Oliveira et al., 2014), Nasopharynxkarzinom (Liao et al., 2010), Neuroblastom (Ren et al., 2004) sowie das Rhabdomyosarkom (Tarnowski et al., 2010a), wobei eine direkte Korrelation zwischen einer erhöhten MIF Expression und eines aggressiveren Phenotyps des Tumors beobachtet wurde (O'Reilly et al., 2016).

MIF trägt über verschiedene Signalwege zur Tumorentstehung bei, insbesondere durch die Herunterregulierung des Tumorsuppressorproteins p53

EINLEITUNG

(Hudson et al., 1999, Mitchell et al., 2002). Daraus folgt eine Verhinderung der p53-induzierten Apoptose, was wiederum ein erhöhtes Überleben sowie eine vermehrte Proliferation von malignen Zellen hervorruft. Weiterhin wurde eine Aktivierung des *phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase 3* (PI3K/Akt) Signalwegs durch MIF über die Phosphorylierung der proapoptotischen Proteine *Bcl-2-Antagonist of Cell Death* (BAD) und *forkhead box protein O3a* (Foxo3a) mit daraus resultierender Begünstigung des Überlebens von Tumorzellen demonstriert (Lue et al., 2007). Diese Ergebnisse wurden durch einen MIF knock-down in zervikalen Adenokarzinomzellen unterstrichen, bei dem es zu einer Hochregulierung proapoptotischer Proteine wie Bax (*bcl-2-like protein 4*) und caspase-3 sowie zu einer Herunterregulierung antiapoptotischer Proteine der *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) Familie kam, mit konsekutiver Induktion der Apoptose und Inhibierung der Zellproliferation (Guo et al., 2015). Der zweite äußerst wichtige Signalweg stellt die dauerhafte Aktivierung von *extracellular signal-regulated kinase 1/2/mitogen-activated protein kinase* (ERK1/2/MAPK) durch MIF dar (Abbildung 5, 6), welche ein typisches Merkmal in Prozessen repräsentiert, in denen das onkogene Protein Ras involviert ist, dessen Mutation wiederum zu einem hohen Prozentsatz in vielen Tumoren auftritt (O'Reilly et al., 2016). Ferner wird die Produktion von MIF unter hypoxischen Bedingungen, welche häufig mit Tumorentwicklung sowie -progression assoziiert sind, hochreguliert (O'Reilly et al., 2016), und trägt dabei zu einer Stabilisierung des *hypoxia inducible factor 1-alpha* (HIF1 α) bei (Winner et al., 2007, Oda et al., 2008, No et al., 2015) (Abbildung 5). HIF1 α ist als Transkriptionsfaktor in der Expression angiogener Proteine wie *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *lysyl oxidase* (LOX) sowie *connective tissue growth factor* (CTGF) involviert (O'Reilly et al., 2016). Innerhalb der Zelle kann MIF an *Jun activation domain-binding protein 1/COP9 signalosome subunit 5* (JAB1/CSN5) binden und hat folglich eine Schlüsselrolle in der Zellantwort gegenüber DNA Schädigung und Reparatur inne (Nemajerova et al., 2007).

Zu den Rezeptoren, mit denen MIF in Interaktion tritt, gehört unter anderem CD74/CD44 (Leng et al., 2003) ((Shi et al., 2006), welcher zu der oben beschriebenen Aktivierung von ERK1/2 MAPK führt (Abbildung 5). Nicht nur die

EINLEITUNG

Zellproliferation wird dadurch gefördert, sondern auch eine Immunantwort über die Induktion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-1 β , IL-6, Stickstoffmonoxid (NO), COX-2 und IFN- γ (O'Reilly et al., 2016) (Abbildung 5, 6). Demnach demonstriert MIF auch Eigenschaften eines Zytokins. Hinzukommend wurde eine Affinität des nicht-verwandten Liganden MIF an C-X-C motif chemokine receptor (CXCR) Rezeptoren (CXCR2, CXCR4) entdeckt, wodurch chemotaktische Antworten hervorgerufen werden (Bernhagen et al., 2007) (Abbildung 5). Unter anderem wurde dies mit der Rekrutierung von Monozyten und Lymphozyten in der Pathogenese der Atherosklerose in Zusammenhang gebracht (Schober et al., 2008), jedoch auch mit der Invasion und Metastasierung im Kolonkarzinom über die MIF-CXCR4 Achse (Dessein et al., 2010) (Abbildung 5, 6).

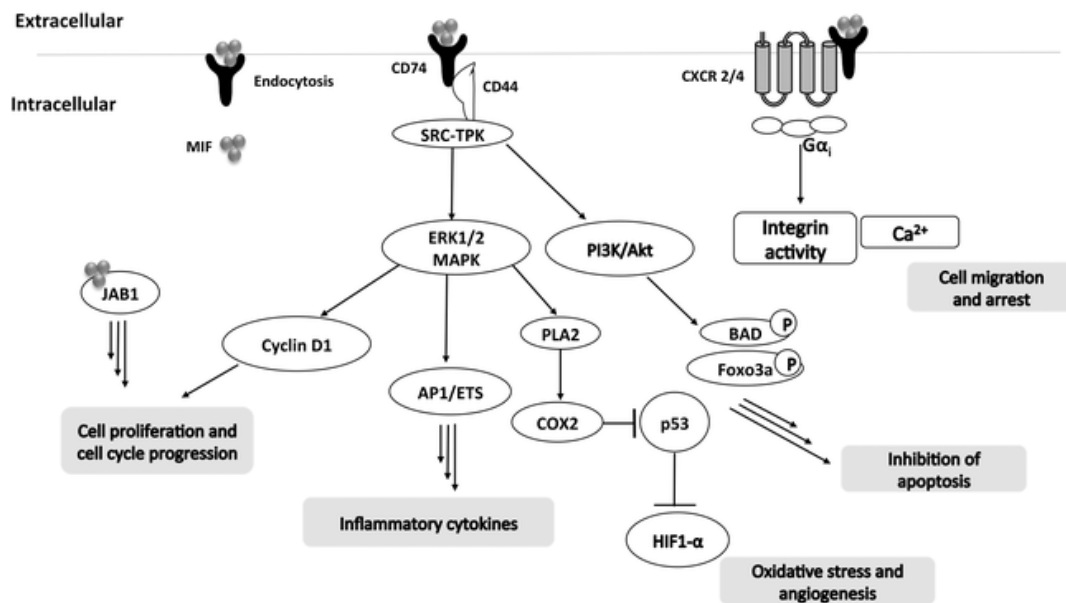


Abbildung 5: Macrophage migration inhibitory factor und dessen Signalkaskaden. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) trägt sowohl über Rezeptor-vermittelte als auch intrazelluläre Interaktionen zu nachfolgenden zellulären Signalwegen bei. Extrazelluläres MIF bindet an den *cluster of differentiation* 74 (CD74) Rezeptor, der wiederum einen Komplex mit intrazellulärem CD44 bildet, was zu einer Phosphorylierung von *extracellular signal-regulated kinase 1/2* (ERK1/2) und daraus resultierender *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) Aktivierung führt. Die folgende Kaskade triggert daraufhin unter anderem die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine sowie die Zellproliferation und Zellzyklusprogression. Letzteres kann auch durch direkte intrazelluläre Interaktion mit MIF erfolgen. Des Weiteren wird die Phospholipase A2 (PLA2) und anschließend die Cyclooxygenase 2 (COX-2) aktiviert, was zu einer Herunterregulierung des Tumorsuppressorproteins p53 und konsekutiv zu einer Inhibierung der Apoptose führt. Die *phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase 3* (PI3K/Akt) Signalkaskade wird ebenfalls über den CD74 Rezeptor aktiviert, was eine Phosphorylierung proapoptotischer Proteine wie *Bcl-2-Antagonist of Cell Death* (BAD) und daraufhin eine Inhibierung der Apoptose sowie ein Überleben der Tumorzellen zur Folge hat. Über einen p53-abhängigen Mechanismus kann MIF auch zur Stabilisierung von *hypoxia inducible factor 1-alpha* (HIF-1 α) und somit zur Angiogenese beitragen. Über die Bindung an den C-X-C motif chemokine receptor 2/4 (CXCR2/4) kann MIF Zellen an die Stelle der Inflammation rekrutieren. Abbildungen aus (O'Reilly et al., 2016).

EINLEITUNG

Darüber hinaus zeigt MIF eine enge Interaktion mit dem Immunsystem, unter anderem durch die Inhibierung Tumor-spezifischer NK und CTL Aktivitäten (Yan et al., 2006, Apte et al., 1998, Krockenberger et al., 2008).

Insgesamt wurde die Bedeutung von MIF in verschiedenen Tumormodellen evaluiert, in denen eine Deletion von MIF eine signifikante Abnahme in der Progression sowie Mortalität der Erkrankungen erkennen ließ. So führte diese Deletion in E μ -Myc Mäusen zu einem Schutz vor Lymphomkrankungen (Talos et al., 2005), zu einer weniger progressiven Erkrankung im Fibrosarkom (Fingerle-Rowson et al., 2003), Lungenkarzinom (Rendon et al., 2007) sowie Hautkrebs (Martin et al., 2009).

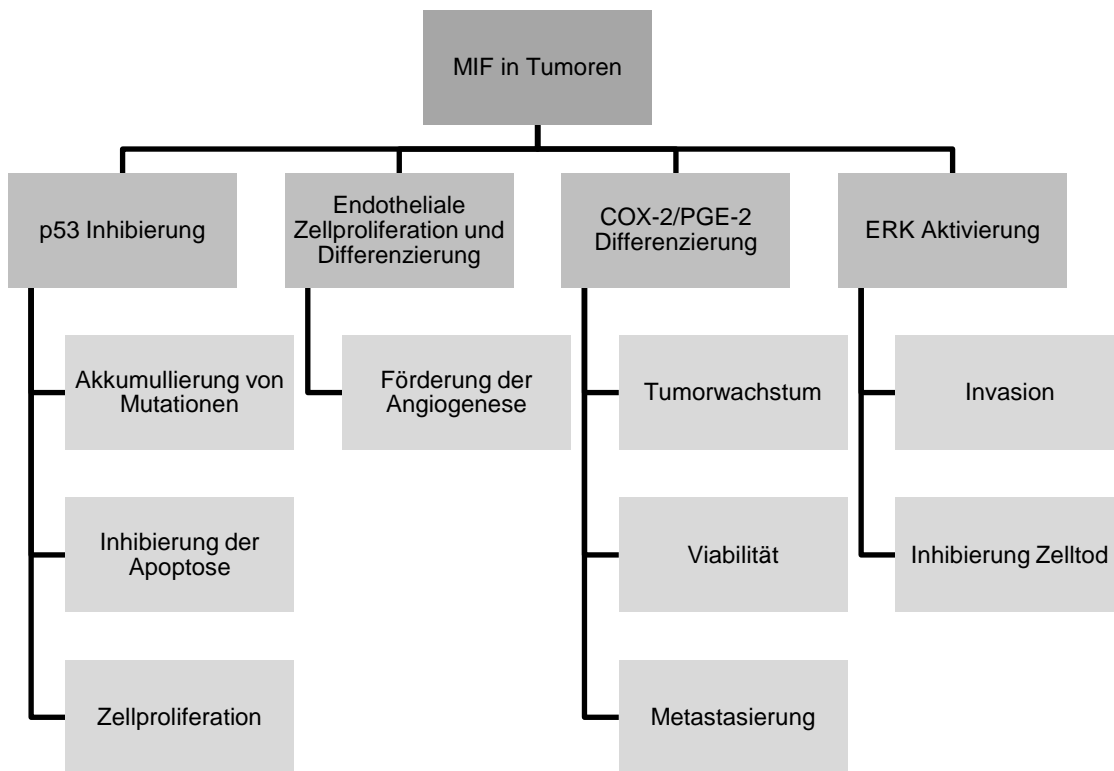


Abbildung 6: Die Rolle von *macrophage migration inhibitory factor* in Tumoren. *Macrophage migration inhibitory factor* (MIF) fördert die Tumorgenese, Tumorzellproliferation, Metastasierung, Invasion, Angiogenese und inhibiert die Apoptose. Dies erfolgt über eine Herunterregulierung der p53 Expression, einer Stimulierung der *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) Aktivität sowie einer Induktion der Cyclooxygenase-2/Prostaglandin E2 (COX-2/PGE-2) Produktion. Abbildungen verändert nach (O'Reilly et al., 2016).

MIF – Struktur und enzymatische Funktion

Von der strukturellen Perspektive bleibt MIF in seiner eigenen strukturellen Familie, ist evolutionär über alle Arten hoch konserviert und zeigt homologe Sequenzen von > 80% zwischen Ratte, Maus, Huhn, Rind und Mensch (O'Reilly et al., 2016). Die strukturellen Motive zeigen Charakteristika, die analog zu einem anderen humanen Protein sind, der D-dopachrome Tautomerase (D-DT oder MIF2) (Sugimoto et al., 1999) (Abbildung 7).

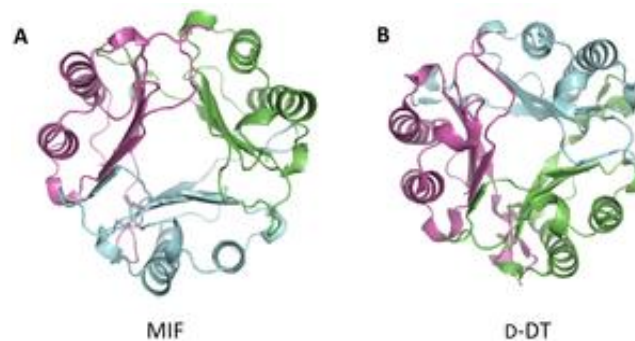


Abbildung 7: Struktur von *macrophage migration inhibitory factor* und seine Funktion. Die Kristallstruktur des Proteins *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) (A) zeigt eine auffallende Ähnlichkeit mit dem humanen D-dopachrome Tautomerase (D-DT/MIF2) (B). Trotz dieser strukturellen Ähnlichkeit produzieren MIF (Tautomerisierung) und D-DT (Decarboxylierung) unterschiedliche Produkte des Substrats D/L-Dopachrom. Abbildung aus (O'Reilly et al., 2016).

Möglichkeiten der Inhibierung von MIF

Aufgrund der vielfältigen Mechanismen, in die MIF im Rahmen der Tumorgenese involviert ist, bietet dessen Inhibierung einen vielversprechenden Angriffspunkt einer gezielten Therapie gegen Tumore. Hierfür stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung, die biologische Funktion von MIF zu inhibieren, darunter (1) *small molecules*, (2) anti-MIF Antikörper oder (3) indirekte Destabilisation von MIF (Abbildung 8).

EINLEITUNG

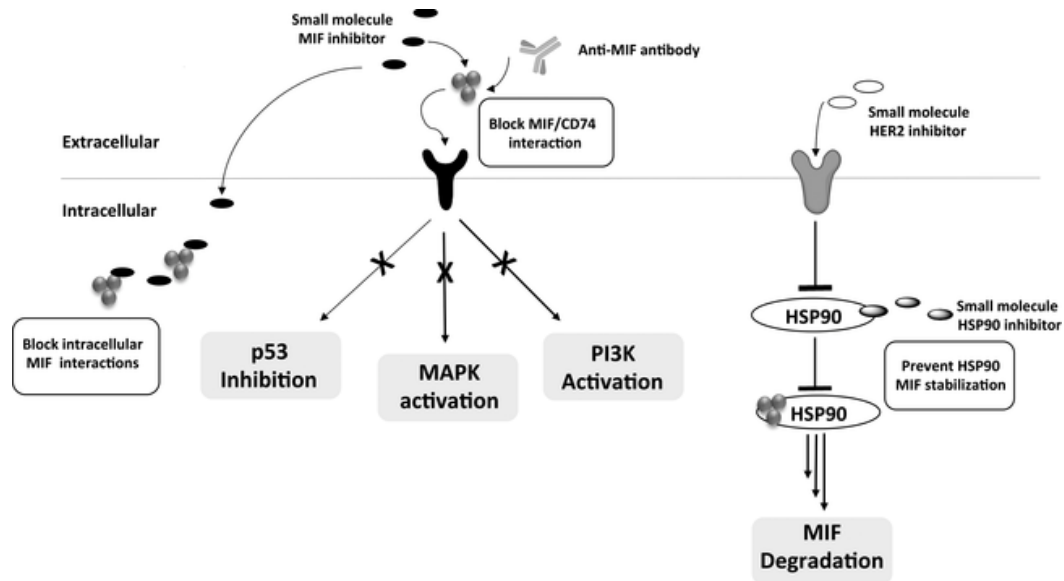


Abbildung 8: Möglichkeiten der Inhibition von *macrophage migration inhibitory factor*. Die Aktivität von *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) kann auf mehreren Wegen inhibiert werden. Zum einen besteht die Möglichkeit, anti-MIF Antikörper einzusetzen, welche ausschließlich extrazellulär wirken und die Interaktion mit dem MIF Rezeptor *cluster of differentiation 74* (CD74) blockieren. Dadurch werden die nachfolgenden Signalwege inaktiviert, darunter die Aktivierung von *phosphatidylinositol-3-kinase* (PI3K), *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) sowie die Inhibition von p53. *Small molecule* MIF Inhibitoren, welche allosterisch, kovalent oder kompetitiv die enzymatische Aktivität von MIF blockieren, wirken auf demselben Weg der Rezeptorblockade, können darüber hinaus jedoch die Zellmembran penetrieren und zusätzlich intrazelluläre Interaktionen von MIF inhibieren, beispielsweise die Interaktion mit *Jun activation domain-binding protein 1* (JAB1) und folgender Blockierung der Zellproliferation. Eine indirekte Inhibition kann durch den MIF Stabilisator *heat shock protein 90* (HSP90) erfolgen, indem HSP90 blockiert wird und dadurch eine Degradierung von MIF erfolgt. Indirekt kann dieser Weg durch *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2) Inhibitoren erreicht werden, die die HSP90 Expression reduzieren. Abbildung aus (O'Reilly et al., 2016).

Mittels *small molecules* besteht die Möglichkeit, die enzymatische Aktivität von MIF über die Interaktion mit dessen Tautomerase zu blockieren. Dies kann durch eine kompetitive Blockade im aktiven Zentrum, einer kovalenten und dadurch irreversiblen Inhibierung (über eine kovalente Bindung an die Aminosäure Pro1) oder einer allosterischen Antagonisierung erfolgen (Ouertatani-Sakouhi et al., 2010, O'Reilly et al., 2016). Ferner existiert über die Zerstörung oder Beeinträchtigung der trimeren Struktur von MIF eine weitere Option, die Aktivität von MIF zu beeinträchtigen (Ouertatani-Sakouhi et al., 2010). Am häufigsten wurden bisher kompetitive oder kovalente Inhibitoren *in vitro* sowie *in vivo* eingesetzt (O'Reilly et al., 2016). Unter den wenigen allosterischen Antagonisten befindet sich p425, bei dem eine Blockade der Rezeptorinteraktion mit CD74, Effekte im Rahmen der Zytokin-Signalwege sowie die Wiederherstellung der p53 abhängigen Apoptose nachgewiesen

wurde, bisher jedoch nicht in Tumormodellen *in vivo* eingesetzt wurde (Bai et al., 2012, O'Reilly et al., 2016).

Zu der Klasse der Isoxazoline gehört der kompetitive MIF Inhibitor 4,5-Dihydro-3-(4-hydroxyphenyl)-5 isoxazoleacetic acid methyl ester (ISO-1) (Lubetsky et al., 2002, Al-Abed and VanPatten, 2011), der in den humanen Tumorzelllinien A549 (Rendon et al., 2007), DU145 (Meyer-Siegler et al., 2006), LN229 (Schrader et al., 2009) und HS683e (Piette et al., 2009) eine Reduktion der Zellmigration und Proliferation zeigte sowie eine Reduktion des Tumorwachstums und der Vaskularisierung *in vivo* (Prostatakarzinom, kolorektales Karzinom) (O'Reilly et al., 2016).

Irreversible Inhibitoren sind generell für ihre Prädisposition gegenüber off-target sowie toxischen Effekten bekannt (O'Reilly et al., 2016). Dennoch demonstrieren irreversible MIF Inhibitoren wie 4-Iodo-6-phenylpyrimidine (4-IPP) durch Bindung an den Pro1 Rest von MIF über eine nucleophile Verlagerung eine potente Blockade der Aktivität der MIF Tautomerase mit einer IC₅₀, die 5-10 mal potenter ausfällt verglichen mit ISO-1, sowie eine Reduktion der Zellmigration und des Tumorwachstums im Adenokarzinom der Lunge (Winner et al., 2008), dem Melanom (Yaddanapudi et al., 2013) sowie dem Plattenepithelkarzinom (Kindt et al., 2013).

Isothiocyanate, zu denen Sulforaphane gezählt wird und welche unter anderem in Brokkoli, Blumenkohl, Rosenkohl, Brunnenkreise, Grünkohl und Wasabi vorkommen, wurden als weitere kovalente und potente Inhibitoren von MIF identifiziert (O'Reilly et al., 2016). Obwohl die Zielstrukturen lange nicht bekannt waren, wurden diese Bestandteile mit signifikanten anti-tumoralen und anti-inflammatorischen Eigenschaften in Verbindung gebracht (Wu et al., 2009). Letztendlich wurde unter anderen Mechanismen der N-terminale Prolinrest von MIF als Schlüsselpunkt für eine kovalente Bindung mit Isothiocyanaten identifiziert (Cross et al., 2009) und eine Inhibierung der MIF Tautomerase durch kovalente Modifikation von Pro1 mittels Sulforaphane (SF) demonstriert (Healy et al., 2011).

Vielversprechende Ansätze in der Therapie gegen Tumore liefern monoklonale Antikörper, wie unter anderem durch Rituximab oder Checkpoint Inhibitoren, die sich bereits in klinischer Anwendung befinden, gezeigt. Eine potente Inhibierung von MIF wurde von Hussain *et. al* im Prostatakarzinom mittels verschiedener anti-MIF Antikörper *in vitro* sowie *in vivo* nachgewiesen, die sowohl zu einer Reduktion des Zellwachstums sowie der Viabilität über die Inhibierung der MAPK/ERK1/2 Aktivität führten, als auch zu einer Verminderung der zellulären Invasion und Chemotaxis (Hussain et al., 2013). Aktuell wird eine Phase 1 Studie mit anti-MIF Antikörpern in Patienten mit soliden Tumoren durchgeführt (clinicaltrials.gov.NCT01765790).

MIF und das Immunsystem in Zusammenhang mit der Tumorgenese

MIF fördert das Wachstum von Tumorzellen, die Angiogenese sowie die Migration von Tumorzellen (Shimizu et al., 1999, Rendon et al., 2007, Dessein et al., 2010), möglicherweise über dessen funktionelle Rezeptoren CXCR2, CXCR4 und CD74 (Dessein et al., 2010, Bernhagen et al., 2007, Leng et al., 2003), wovon CXCR4 auch im RMS exprimiert wird (Tarnowski et al., 2010b).

Zudem zeigt das Protein MIF einen ausgeprägten Einfluss auf das Immunsystem (Bach et al., 2008) mittels Inhibierung der Lyse von Melanomzellen durch Natürliche Killerzellen (Bach et al., 2008), Anreicherung von Tumor-assoziierten CD4+ regulatorischen T-Zellen sowie CD8+ regulatorischer T-Zellen (einhergehend mit einer Verminderung CD8+-induzierter Tumorzytotoxizität) im CT26 Kolonkarzinom, einhergehend mit einem signifikant geringeren Tumorwachstum in MIF knockout Mäusen verglichen mit Wildtyp Mäusen, dadurch eine Progression des Tumors durch Erhöhung immunsuppressiver regulatorischer T Zellen (unter anderem durch eine Hochregulation der IL-2 Produktion) nahelegend (Choi et al., 2012), sowie durch Induktion von MDSCs in der Mikroumgebung des Tumors (Simpson et al., 2012). Nicht nur MDSCs, sondern auch Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) aus MIF-defizienten Mäusen weisen geringere immunsuppressive Effekte im Vergleich zu Wildtyp Mäusen auf, einhergehend mit einem Schutz einer Progression s.c. injizierter Melanomzellen (Yaddanapudi et al., 2013).

Eine Bestätigung dieser Ergebnisse erfolgte durch den Einsatz des MIF Inhibitors 4-IPP, der dazu beitrug, die Immunsuppression, Angiogenese, das Tumorwachstum sowie die Aktivierung Tumor-polarisierter Makrophagen im Melanom *in vitro* und *in vivo* abzuschwächen (Yaddanapudi et al., 2013). Hinzukommend scheint das von Tumoren stammende MIF in der Umgehung der Immunabwehr in verschiedenen malignen Tumoren beizutragen (Mittelbronn et al., 2011, Krockenberger et al., 2008). Beispielsweise konnten Choi *et al.* durch die Inhibierung von MIF mittels eines anti-MIF Antikörpers oder des MIF Inhibitors Debio1036 die Blockade einer IL-2 Produktion von Splenozyten MIF(+/+) Mäuse und die Supprimierung der induzierten Generation regulatorischer T Zellen demonstrieren. Die Wiederherstellung dieser sowie ein Tumorwachstum wurde damit einhergehend mit einer Administration von IL-2 in Tumor-tragenden MIF(-/-) Mäusen beobachtet (Choi et al., 2012).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das von Tumoren stammende Protein MIF einen starken Einfluss auf die Tumorgenese durch die Regulation des Immunsystems zu haben scheint, unter anderem durch indirekte immunsuppressive Mechanismen. Demzufolge liegt eine Involvierung von MIF im Rahmen des *immune escapes* nahe.

1.3.4 Verändertes Immunsystem nach Chemotherapie

Lange war die Annahme weit verbreitet, dass antineoplastische Stoffe ihre Wirkung ausschließlich durch zytostatische oder zytotoxische Weise auf maligne Zellen ausüben (Zitvogel et al., 2013). Heutzutage sind jedoch zunehmende präklinische sowie klinische Hinweise vorhanden, die darauf hinweisen, dass der therapeutische Effekt sowie die Effizienz der meisten erfolgreichen antineoplastischen Stoffe, zu denen sowohl konventionelle Chemotherapeutika als auch gezielte anti-Tumor Therapien und spezielle Formen der Radiotherapie gezählt werden, darüber hinaus auf einer Aktivierung oder Reaktivierung einer bereits vorhandenen, gegen den Tumor gerichteten Immunantwort beruht (Zitvogel et al., 2011, Galluzzi et al., 2012) und demnach auch von dem wünschenswerten „Nebeneffekt“ abhängt, die Immunantwort gegen Tumore zu stimulieren (Galluzzi et al., 2016). Solche

EINLEITUNG

immunstimulatorische Effekte können durch direkte Erhöhung der Immunogenität maligner Zellen (*increased antigenicity*, „on-target“) oder durch Inhibierung vom Tumor gebildeter immunsuppressiver Netzwerke entstehen („off-target“), sowohl durch die Aktivierung von Effektorzellen (direkte Immunstimulation) als auch durch die Inhibierung immunsupprimierender Zellpopulationen (indirekte Immunstimulation) (Galluzzi et al., 2016, Galluzzi et al., 2015) (Abbildung 9).

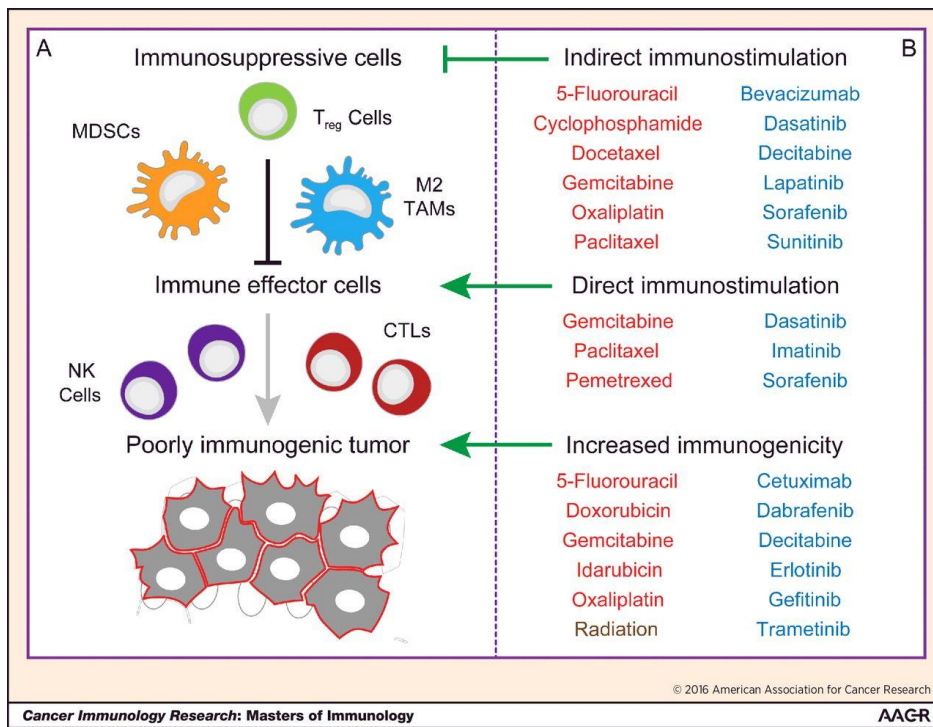


Abbildung 9: Immunologische Effekte der anti-Tumor Therapie. Neoplasien entwickeln sich in einem bidirektionalem Verhältnis mit dem Immunsystem des Wirts, was möglicherweise in einer Selektion von Tumorvarianten resultiert, die sich dem Immunsystem sowohl mittels reduzierter *antigenicity* und *adjuvanticity*, als auch durch die Etablierung lokaler und systemischer immunsuppressiver Netzwerke entziehen. (A) Der klinische Erfolg der aktuell verwendeten Therapiemöglichkeiten gegen maligne Tumoren (konventionelle Chemotherapien in rot, gezielte anti-Tumor Therapien in blau, sowie Radiotherapie) hängen zum Teil von ihrer Eigenschaft ab, therapeutisch relevante, gegen den Tumor gerichtete Immunantworten auszulösen. Dies kann sowohl durch die Erhöhung der Immunogenität (*antigenicity* oder *adjuvanticity*) maligner Zellen („on-target“ Immunstimulation) oder durch die Interaktion mit Effektorzellen des Immunsystems oder immunsuppressiver Zellpopulationen („off-target“ Immunstimulation; B) entstehen. CTL: CD8+ zytotoxische T Zellen; MDSC: myeloid-derived suppressor cell; NK: Natürliche Killerzelle; TAM: tumor-associated macrophage; Treg: CD4+CD25+FOXP3+ regulatorische T Zelle. Abbildung aus (Galluzzi et al., 2016).

Tumorreduktion mittels Operation, Radiotherapie oder Chemotherapie reduziert generell die systemische immunsuppressive Aktivität von malignen Zellen (Zitvogel et al., 2013, Zitvogel et al., 2011). Über solch einen generellen Effekt hinaus können klinisch eingesetzte antineoplastische Stoffe die

EINLEITUNG

immunosurveillance durch die Wirkung auf Tumorzellen auf verschiedenen Wegen stimulieren, beispielsweise (1) durch die Erhöhung der Expression oder Präsentation von tumor-assoziierten Antigenen auf der Oberfläche von Tumorzellen („*antigenicity*“), (2) indem die Ausschüttung von Gefahrensignalen aus Tumorzellen ausgelöst wird, welche die angeborene Immunantwort durch Wirkung als Adjuvanz stimulieren („*immunogenicity*“), oder (3) durch Verstärkung der Erkennung von Tumorzellen durch Immuneffektoren und konsekutiver Zerstörung der Tumorzellen („*susceptibility*“) (Zitvogel et al., 2013).

Eine Förderung der *antigenicity*, größtenteils als Konsequenz einer wiederhergestellten MHC-I Expression, wurde für bestimmte Therapeutika in humanen oder aus Mäusen stammenden Tumorzellen *in vitro* oder immunkompetenten Wirten gezeigt (Galluzzi et al., 2016). Darunter fallen konventionelle Chemotherapeutika wie 5-Fluorouracil und Gemcitabin (Khallouf et al., 2012, Liu et al., 2010, Xu et al., 2011), aber auch zielgerichtete Therapien wie beispielsweise der *epidermal growth factor receptor* (EGFR) Inhibitor Gefitinib (Galluzzi et al., 2016). Allerdings ist bis heute noch unklar, ob die Wiederherstellung der Antigenität im Zuge der Therapie von Tumorpatienten eine prognostische Signifikanz beinhaltet.

Eine Antigenität ist zwar notwendig, jedoch nicht ausreichend für die Etablierung einer Immunantwort, unabhängig von dessen Ziel. Im Rahmen der Tumortherapie gibt es ähnlich wie bei Infektionen immunstimulatorische Signale, die sogenannten *damage-associated molecular patterns* (DAMP) (Abbildung 10). DAMPs stellen endogene Moleküle dar, die immunmodulatorische Effekte über die Freisetzung oder deren Exposition auf der Zelloberfläche gestresster oder sterbender Tumorzellen vermitteln (Krysko et al., 2012). Dabei binden DAMPs an *pattern recognition receptors* (PRR), welche sowohl auf myeloischen als auch lymphatischen Immunzellen exprimiert werden (Krysko et al., 2012). Demzufolge warnen DAMPs den Organismus vor einem Gefahrensignal und liegen dadurch der Immunogenität des Tumorzelltods im Rahmen des sogenannten *immunogenic cell death* (ICD) zugrunde (Galluzzi et al., 2016) (Abbildung 10). Zu den DAMPs werden unter anderem Calreticulin

EINLEITUNG

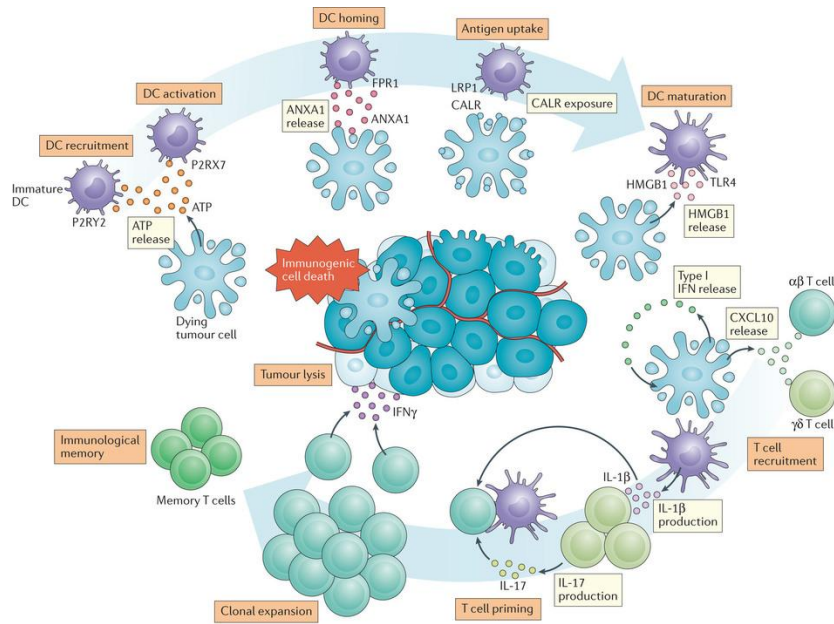
(CALR), *heat shock* Proteine wie *heat shock protein 70* (HSP70), *heat shock protein family A member 1A* (HSP1A1) und *heat shock protein 90* (HSP90), *heat shock protein 90kDa alpha family class A member 1* (HSP90AA1) sowie drei Chaperone des endoplasmatischen Retikulums (ER) gezählt, die die Phagozytose stimulieren, sobald sie auf der Zelloberfläche exponiert werden (Galluzzi et al., 2016, Obeid et al., 2007) (Abbildung 10). Auch im RMS konnte dieser Effekt im Rahmen der Hochregulation von Calreticulin während des zellulären Stresses nachgewiesen werden. Diese Induktion wiederum erhöhte die Suszeptibilität gegenüber einem Angriff durch Makrophagen (Herrmann et al., 2012). Chemotaktische und immunstimulatorische Effekte auf Antigen-präsentierenden Zellen zeigen Adenosintriphosphat (ATP) und Annexin 1 (ANXA1) sobald sie in die extrazelluläre Mikroumgebung sezerniert werden (Michaud et al., 2011, Vacchelli et al., 2015) (Abbildung 10). *High mobility group box 1* (HMGB1) stellt als nukleäres Protein ein DAMP dar, das eine stark prolongierte immunstimulatorische Aktivität nach Freisetzung aus sterbenden Tumorzellen ausübt und eine Interaktion mit dem Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) auf dendritischen Zellen (DC) demonstriert, welcher wiederum von DC für die effiziente Prozessierung und Präsentation von Antigenen sterbender Tumorzellen benötigt wird. Hierzu passend zeigten Patienten mit einem TLR4 loss-of-function Allel im Mammakarzinom ein früheres Rezidiv nach Chemo- und Radiotherapie (Apetoh et al., 2007). Hinzukommend wird Typ I Interferon (IFN) über die Aktivierung von Toll-like Rezeptor 3 (TLR3) aus Tumorzellen durch die Therapie mit Anthrazyklinen freigesetzt, welches die Sekretion von *C-X-C motif chemokine ligand 10* (CXCL10) aus Tumorzellen begünstigt, ein chemischer Signalstoff (*Chemoattractant*) für T Zellen (Sistigu et al., 2014) (Abbildung 10). In Mäusen wurde nachgewiesen, dass mehrere Chemotherapeutika sowie Radiotherapie eine suboptimale Effektivität aufweisen, wenn entweder die Emission spezifischer DAMPs durch maligne Zellen oder die normale Detektion von DAMPs durch den Wirt genetisch inaktiviert wird (Galluzzi et al., 2017). Dementsprechend demonstrieren Maustumore, welche in syngeneten Wirten mit fehlendem *purinergic receptor P2x7* (*P2rx7*, einer der Hauptrezeptoren für extrazelluläres ATP (Ghiringhelli et

EINLEITUNG

al., 2009)), TLR4 (*Tlr4*, extrazelluläres HMGB1 Signal (Apetoh et al., 2007)) oder *formyl peptide receptor 1* (*Fpr1*, codiert für den ANXA1 Rezeptor (Vacchelli et al., 2015)) wachsen, ein limitiertes therapeutisches Ansprechen auf die antitumorale Therapie, welche maligne Zellen in einer immunogenen Weise tötet, verglichen mit denselben Tumoren, die in Wildtyp Mäuse etabliert wurden (Galluzzi et al., 2016). In Tumorpatienten war ein schlechtes klinisches Outcome mit einer defizienten DAMP Emission in Tumorbiopsien sowie Polymorphismen, die den PRR Signalweg betreffen in mehreren unabhängigen Kohorten assoziiert (Fucikova et al., 2015). Beispielsweise wurde in verschiedenen Studien nachgewiesen, dass loss-of-function Allele von P2RX7, TLR4, FPR1 sowie TLR3 (im Typ I IFN Signalweg involviert) mit einer geringeren Zeit bis zur Metastasierung und/oder reduziertem Gesamtüberleben in Kohorten von Patienten mit Mammakarzinom, die eine Chemotherapie mit Anthrazyklinen erhielten, in Zusammenhang gebracht werden konnte (Galluzzi et al., 2016).

Konventionelle Chemotherapie, einschließlich Doxorubicin, Idarubicin und Oxaliplatin sowie spezifische Therapien wie der gegen EGFR gerichtete monoklonale Antikörper Cetuximab sowie Radiotherapie sind besonders effizient, maligne Zellen zu eliminieren. Dies geschieht in einer Weise, die mit der optimalen Freisetzung von DAMPs und der nachfolgenden Aktivierung einer therapeutisch relevanten Immunantwort gegen Tumore im Rahmen eines *immunogenic cell death* zusammenpasst (Galluzzi et al., 2016).

EINLEITUNG



Nature Reviews | Immunology

Abbildung 10: Mechanismen des Chemotherapie induzierten *immunogenic cell death* (ICD). Bestimmte Chemotherapeutika wie beispielsweise Doxorubicin oder Oxaliplatin können einen immunogenen Zelltod induzieren. Als Antwort darauf exponieren maligne Zellen Calreticulin (CALR) sowie andere Chaperone des endoplasmatischen Retikulums an ihrer Zelloberfläche, sezernieren ATP, initiieren eine Typ I Interferon (IFN) Antwort, die zu einer Produktion von CXC *chemokine ligand* 10 (CXCL10) führt, und setzen *high-mobility group box 1* (HMGB1) sowie Annexin A1 (ANXA1) frei. Diese *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) können an Rezeptoren auf der Oberfläche von myeloischen oder lymphatischen Zellen binden, fördern die Aufnahme von Zellbestandteilen durch Antigen-präsentierende Zellen einschließlich dendritische Zellen (DCs) im Rahmen von immunstimulatorischen Signalen und führen letztendlich zu einer antitumoralen Immunantwort. Zusätzlich ist eine Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses möglich, mit dem Potenzial maligne Zellen, die eine Chemotherapie überleben, mittels IFN- γ abhängiger Mechanismen zu eradizieren.

CXCR3: CXC-chemokine receptor 3; FPR1: *formyl peptide receptor 1*; IFNAR1: *interferon α/β -receptor subunit 1*; IL: *interleukin*; LRP1: *LDL receptor related protein 1*; P2RX7: *purinergic receptor P2X7*; P2RY2: *purinergic receptor P2Y2*; TLR4: *Toll-like receptor 4*. Abbildung aus (Galluzzi et al., 2017).

Ein weiterer Mechanismus des *immune escapes* ist die Etablierung robuster immunsuppressiver Netzwerke durch den Tumor, welche lokal sowie systemisch wirken (Galluzzi et al., 2016). Auch diese können sowohl direkt als auch indirekt durch antineoplastische Stoffe beeinflusst werden (Abbildung 9).

Zwischen zahlreichen anderen konventionellen Chemotherapeutika stimulieren folgende Substanzen direkt die Effektoraktivität von myeloischen oder lymphatischen Zellen (Abbildung 9): Cyclophosphamid, ein Alkylans, welches die T_{H17} und T_{H1} Gedächtnisantwort sowie die NK Zelle und CD8+ DC Expansion in mehreren Tumormausmodellen fördert (Viaud et al., 2013, Wu and Waxman, 2015); Oxaliplatin, welches die antitumorale Aktivität von Makrophagen und Neutrophilen in Mäusen begünstigt, die mehrere

EINLEITUNG

transplantierbare syngene Tumore tragen (Iida et al., 2013); Paclitaxel, welches die Ausreifung dendritischer Zellen (welche wiederum CD8⁺ Zellen mit größerer lytischer Potenz aktivieren) im Mausmodell stimuliert sowie die Infiltration von NK Zellen in den Tumor bei Patienten mit Mammakarzinom (Pfannenstiel et al., 2010, Demaria et al., 2001). Daneben sind noch zahlreiche weitere Therapeutika beschrieben, die zu einer direkten Immunstimulation beitragen, wie beispielsweise Pemetrexed, Imatinib (Expansion zirkulierender NK Zellen und CTLs, IFN- γ Sekretion) und Sorafenib (Galluzzi et al., 2016).

Weiterhin demonstrieren Tumore einen aktiven Prozess der Immunsuppression, die die Expansion von immunsupprimierenden Zellen wie regulatorische T Zellen, MDSCs und M2-polarisierte Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) beinhaltet (Joyce and Fearon, 2015, Talmadge and Gabrilovich, 2013), welche Effektorzellen des Immunsystems inhibieren. Demzufolge kann eine Immunstimulation auch indirekt über die Inhibition immunsuppressiver zellulärer Kreisläufe stimuliert werden (Abbildung 9). Solch ein immunologischer „off-target“ Effekt ist relativ verbreitet unter den konventionellen Chemotherapeutika, möglicherweise da immunsuppressive Zellen sensitiver auf zytotoxische Stoffe reagieren als Immuneffektorzellen (Galluzzi et al., 2016). Eine Depletion von Tumor-infiltrierenden oder aus dem Blut stammenden regulatorische T Zellen und/oder zirkulierender MDSCs wurde für verschiedene Zytostatika gezeigt, darunter Anthrazykline (Galluzzi et al., 2015, Alizadeh et al., 2014, Hannesdottir et al., 2013) 5-Fluorouracil (Vincent et al., 2010, Kanterman et al., 2014), Cyclophosphamid (Ghiringhelli et al., 2004, Ghiringhelli et al., 2007), Gemcitabin (Vincent et al., 2010, Suzuki et al., 2005, Homma et al., 2014), Oxaliplatin (Gonzalez-Aparicio et al., 2011) und Paclitaxel (Sevko et al., 2013). Dies wurde nicht nur in Tumormodellen von Ratten, sondern auch in Patienten mit verschiedensten Neoplasien, einschließlich des nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms, Pankreaskarzinoms und Kolorektales Karzinom, beobachtet (Galluzzi et al., 2015). Die Bedeutung des Immunsystems zeigt sich auch in Patienten mit Brustkrebs, welche neoadjuvant mit Anthrazyklinen oder Taxanen behandelt wurden und dadurch eine erhöhte Anzahl intratumoraler Immuneffektorzellen (mit oder ohne einer Abnahme immunsuppressiver Zellen)

EINLEITUNG

demonstrierten, korrelierend mit einem kompletten Ansprechen sowie progressionsfreiem Überleben und Gesamtüberleben (Issa-Nummer et al., 2013, Senovilla et al., 2012a). Eine ähnliche Aktivität wurde auch für gezielte antitumorale Therapien, beispielsweise Sorafenib oder Bevacizumab (anti-VEGF Antikörper) beschrieben (Galluzzi et al., 2016). Demzufolge scheinen vielzählige konventionelle Chemotherapeutika sowie spezifische Therapien indirekte „off-target“ immunstimulatorische Effekte vorzuweisen.

Aus diesen Berichten lässt sich schließen, dass eine Behandlung mit Chemotherapeutika zu einer Veränderung der *antigenicity*, *adjuvanticity* sowie *susceptibility* resultiert und dadurch die Effizienz der Behandlung mit Hilfe des Immunsystems, unter anderem im Rahmen des immunogenen Zelltods, begünstigt und gefördert werden kann. Demgegenüber ist jedoch auch eine Beeinträchtigung der Immunantwort denkbar, beispielsweise durch die Induktion einer Resistenz gegenüber mehreren Medikamenten oder der Förderung immunsupprimierender Faktoren. Die Mechanismen dieser Vorgänge sind bislang nur unzureichend bekannt, weshalb hier der Bedarf an weiteren Forschungsansätzen angezeigt ist, um eine optimale, multimodale Therapie maligner Neoplasien zu etablieren.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das kindliche Rhabdomyosarkom stellt einen hochmalignen Tumor im Kindes- und Jugendalter dar, der insbesondere in fortgeschrittenen und metastasierten Stadien trotz multimodaler Therapie mittels Chirurgie, Chemo- und Radiotherapie einen äußerst schlechten Therapieerfolg zeigt. Neue, innovative Therapien sind dringend notwendig und könnten im Rahmen einer Stimulierung des Immunsystems vielversprechende Ansätze liefern. Bisher ist jedoch nur wenig über die Interaktion und Bedeutung des Immunsystems mit dem Rhabdomyosarkom und möglichen immuntherapeutischen Ansätzen bekannt.

Die Forschungsgruppe der Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Tübingen führte bereits Genexpressionsstudien mittels Mikroarray Analysen im ERMS und ARMS durch, aus diesen es Hinweise auf eine Überexpression von Immunmodulatoren im RMS gibt. Hierunter wurde die immunmodulatorische und im RMS überexprimierte Zielstruktur *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) identifiziert. Entsprechend ist das Ziel der vorliegenden Arbeit:

- (1) Die Expression von MIF in humanen RMS Modellen *in vitro* unter Therapiebedingungen mit konventionellen Chemotherapeutika zu untersuchen.
- (2) Eine Charakterisierung der funktionellen Bedeutung von MIF auf humane RMS Zellen sowie auf die Interaktion von RMS mit Immunzellen in einem *in vitro* Modell anhand von Migrations- und Zytotoxizitätsstudien als auch mittels Durchflusszytometrie vorzunehmen.
- (3) Verschiedene Möglichkeiten der Inhibierung von MIF mittels *small molecules* und anti-MIF Antikörpern *in vitro* im Hinblick auf immuntherapeutische Ansätze im RMS zu evaluieren.

Zusammengefasst soll die Bedeutung des immunmodulatorischen Proteins MIF als therapeutisches Target im RMS eruiert werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Sämtliche Chemikalien waren in p. a. Qualität. Sofern nicht gesondert indiziert befindet sich der Firmensitz in Deutschland.

Accutase	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Biocoll Separating Solution	Biochrom AG, Berlin
DAKO Fluorescent Mounting Medium	DAKO North America Inc., Carpinteria, USA
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride), > 98%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DELFI [®] EuTDA Cytotoxicity Assay Reagents	PerkinElmer [™] Life Sciences, Boston, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethanol absolut	Merck KGaA, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Formaldehydlösung min. 37%	Merck, Darmstadt
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure), 1 M	Biochrom AG, Berlin
Interleukin-2 (IL-2), 2.000 IU/μl	Novartis AG, Basel, Schweiz
Magermilchpulver Sucofin	TSI, Zeven
MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumazid, >99%	Carl Roth GmbH & Co. KG,

MATERIAL UND METHODEN

	Karlsruhe
Natriumcitrat	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natronlauge 1 M	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA), 4,7%, Roti Histofix	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Paraformaldehydlösung, min. 37%	Merck KGaA, Darmstadt
PBS, 1x, für die Zellkultur	Biochrom AG, Berlin
<i>Phosphate buffered saline</i> (PBS)	Lonza, Vervier, Belgien
BioWhittacker®, 10x	
Salzsäure (HCl), 1 M	Merck, Darmstadt
Tris Hydrochlorid	Roth, Karlsruhe
Triton® X-100	AppliChem GmbH, Darmstadt
Trypanblau, 0,5%	Biochrom AG, Berlin
Trypsin/Ethylendiamintetraacetat- Lösung (10x)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Tween® 20	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim
Wasserstoffperoxid 30%	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt
Zitronensäure	Merck, Darmstadt

2.1.2 Lösungen und Puffer

Die hier angegebenen Konzentrationsangaben entsprechen der Endkonzentration der jeweiligen Lösung. Die Konzentrationen der entsprechenden Stammlösungen sind dem Kapitel 2.1.1 zu entnehmen.

MTT-Lösung (Lagerung bei -20°C)

Tetrazoliumsalz (5 mg/ml)	250 mg
ad 50 ml 1x PBS	

MTT-Stopp-Lösung

SDS-Pellets (10 % W/V)	1 g
Salzsäure (0,02 N)	200 µl
Aqua bidest	9,8 ml

IL-2 (Lagerung bei 4°C)

IL-2 (10.000 IU/ml)	10 µl
VLE RPMI-1640 mit Zusätzen	1.990 µl

FACS-Puffer (Lagerung bei 4°C)

10x PBS BioWhittacker®	100 ml
FCS (2 %)	20 ml
EDTA (2 mM)	585 mg
Natrium Azid	2-3 Kristalle
ad 1L Aqua bidest	

Waschlösung (PBS mit Tween® (PBST))

Tween® 20	1 ml
10x PBS BioWhittacker®	100 ml
ad 1 L Aqua bidest	

Blocking-Lösung (Lagerung 4°C)

5% Milchpulver	5 g
ad 100 ml Waschlösung	

2.1.3 Zellkulturlösungen und verwendete Zelllinien

2.1.3.1 Zellkulturmedien

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Biochrom AG, Berlin
Very-Low-Endotoxin Roswell Park Memorial Institute-1640 (VLE RPMI-1640)	Biochrom AG, Berlin

2.1.3.2 Medienzusätze

Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt
Fötiales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
Granulozyten Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF)	Becton Dickinson, Heidelberg
Interleukin-2 (IL-2)	Chiron, Ratingen
L-Glutamin, 200 mM	Biochrom AG, Berlin
Penicillin / Streptomycin, 10.000 IU/ml / 10 mg/ml	Biochrom AG, Berlin

2.1.3.3 Zelllinien

A204	embryonaler Typ	DSMZ, Braunschweig
Fibroblasten-3	Primärkulturen aus Präputium	Kinderchirurgie Tübingen
RD	embryonaler Typ	ATCC, Manassas, USA
Rh30	alveolärer Typ	ATCC, Manassas, USA
Rh30 GLuc	alveolärer Typ	Kinderchirurgie Tübingen (Armeanu-Ebinger et al., 2014, Herrmann, 2011)
RMS33-2	embryonaler Typ	Kinderchirurgie Tübingen

Alle verwendeten Zelllinien sind adhärent und wachsen einschichtig sowie epithelähnlich. Charakteristisch für die alveoläre Zelllinie Rh30, welche aus einem unbehandelten 17-jährigen Patienten mit Knochenmetastasen stammt, ist eine p53 Mutation sowie eine t(2;13)(q35;q14) Translokation. Die Chromosomenzahl wurde mit einer Anzahl zwischen 51 und 87 beschrieben (Hinson et al., 2013). Die Zelllinien RD und A204, beide vom embryonalen Typ, wurden aus Tumoren zweier Mädchen, jeweils 7- bzw. 1-jährig, gewonnen. Histologisch zeigt die RD Zelllinie, welche aus dem Beckenbereich der

behandelten und rückfälligen Patientin stammt, spindelförmige und mehrkernige Zellen mit einem Karyotyp von 51 Chromosomen. Bekannte Mutationen sind unter anderem im MYC-Onkogen und TP53 (Hinson et al., 2013). Bis auf die Zelllinie Rh30 mit einem PAX3-FOXO1 positiven Fusionsstatus repräsentieren die restlichen Zelllinien RD sowie A204 einen negativen bzw. einen unklassifizierten (RMS33-2) Fusionsstatus (Hinson et al., 2013). Die primären Fibroblasten-Kulturen wurden aus einer operativ entfernten Vorhaut eines fünfjährigen Jungen in der Abteilung für Kinderchirurgie- und urologie der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen im Februar 2011 gewonnen, es wurden unter 10 Passagen verwendet. Als Grundlage der Rh30 Gluc Zellen diente die Zelllinie Rh30, welche mit einem pCMV-Gluc-Plasmid transfiziert wurde. Aufgrund der Transfektion des Vektors erfolgt eine kontinuierliche Expression und Sekretion der Gaussia Luciferase (Herrmann, 2011).

2.1.3.4 Gewebeproben

Die in dieser Arbeit verwendeten Gewebeproben stammen von humanem Tumorgewebe aus der Abteilung für Kinderchirurgie des Universitätsklinikums für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen.

Tabelle 4: Tumorgewebe.

Patienten-ID	Diagnose	Alter	Lokalisation
RMS33	ERMS	4 Jahre	Bauchraum
RMS15	Desmoplastischer klein- und rundzelliger Tumor (hoch maligne)	11 Jahre	Bauchraum

2.1.4 Antikörper und Inhibitoren

2.1.4.1 anti-MIF Antikörper und MIF Inhibitoren

Antagonist III, 4-IPP (4-Iodo-6-phenylpyrimidine) Merck Millipore, Darmstadt

Antagonist V, p425 (Sodium 6,6'-(1E,1'E)-(3,3'-dimethoxybiphenyl-4,4'-diyl)bis(diazene-2,1-diyl)bis(4-amino-5-

MATERIAL UND METHODEN

hydroxynaphthalene-1,3-disulfonate))	
anti-human MIF, monoklonal, aus der Maus	KloneAbcam, Cambridge, UK
ISO-1(4,5-Dihydro-3-(4hydroxyphenyl)-5-isoxazoleacetic acid methyl ester)	Merck Millipore, Darmstadt
R,S-Sulforaphane (SF)	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach

2.1.4.2 Monoklonale Antikörper und Fluorochrome für die Durchflusszytometrie

7-AAD Viability Staining Solution	eBioscience Inc., San Diego, USA
APC anti-human CD25	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
APC anti-human CD56	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
FITC anti-human CD4	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
FITC anti-mouse (aus Ziege)	Sigma Aldrich, München
PE anti-human CD 3	BioLegend, San Diego, USA
PE anti-human CD33	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
PE FoxP3	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
PE/CF 594 anti-human CD56	BD Bioscience, Heidelberg
PE/Cy7 anti-human CD3	BioLegend, San Diego, USA
PerCP anti-human CD20	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
VioBlue anti-human CD8	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
VioBlue® anti-human CD14	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach

2.1.4.3 Antikörper für die Immunfluoreszenz

Alexa Fluor® 546 anti-mouse (aus Ziege)	Invitrogen, Darmstadt
---	-----------------------

2.1.4.4 Stimulierende Antikörper

anti-human CD3, Klon OKT3	eBioscience, Frankfurt
---------------------------	------------------------

2.1.3 Reagenziensysteme und Fertiglösungen

CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester)	Life Technologies GmbH, Invitrogen, Darmstadt
Coelenterazine	P.J.K., Kleinbittersdorf

MATERIAL UND METHODEN

DAB (Diaminobenzidin) SK-4100	Vecotr Laboratories Inc., Burlingame, CA 94010, USA
DePeX Eindeckmedium	Serva, Heidelberg
FACS-Flow	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Rinse	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Safe	Becton Dickinson, Heidelberg
Fluorescence Mounting Medium	DAKO Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Gaussia Glow Juice	P.J.K., Kleinbittersdorf
Go Taq® qPCR Master Mix (A600a)	Promega, Mannheim
High Capacity cDNA Reverse Transcription kit	Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Dreieich
HRP One Step polymer anti mouse/rabbit/rat	ZYTOMED Systems GmbH, Berlin
Mayers Hämalanlösung	Merck, Darmstadt
MIF ELISA human	Hölzel Diagnostika, Köln
MIF Real Time Primer Set	Biomol GmbH, Hamburg
Poly-D-lysine hydrobromide	Sigma Aldrich, München
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
TBP Real Time PCR Primer Set	Biomol GmbH, Hamburg
Ziegenserum, Goat Serum (Normal)	DAKO Denmark A/S, Glostrup, Dänemark

2.1.4 Zytostatika

Doxorubicin (Doxo)	Cell Pharm, Hannover
Etoposid (Etopo)	Britstol-Myers Squibb, München
Vincristin (Vin)	GRY Pharma, Kirchzarten

2.1.5 Geräte und Hilfsmittel

5100 Cryo 1°C Freezing Container, “Mr. Frosty”	Nalgene® Labware, Thermo Scientific, Roskilde, Dänemark
ApoTome Axio Imager 2	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System, PCR C1000 Thermal Cycler	Bio-Rad, München
Dampfdrucktopf Sanoclav	Sanoclav, Bad Überkingen
Durchflusszytometer, BD LSR II	BD Biosciences, San Jose, USA
Durchflusszytometer, FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
ELISA-Reader, Milenia Kinetic Analyzer	Milenia Biotec GmbH, Gießen
Eppendorf Multipette® Xstream Feuchtekkammer	Eppendorf AG, Hamburg Roth, Karlsruhe
Gefrierschrank, -80°C	Heraeus Holding GmbH, Hanau
GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems, Kalifornien, USA
Heizplatte HI 1220	Leica, Nussloch
Inkubator, BBD 6220	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Kamera, AxioCam MR colour	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Kamera, Canon Eos 550D	Canon Deutschland GmbH, Krefeld
Kühl- und Gefrierschrank	Robert Bosch Hausgeräte GmbH, München
Luminometer, WALLAC Victor™ 1420 Multilabel Counter	PerkinElmer™ Life Sciences, Radgau
Magnetrührer Ikamog RH	Janke & Kunkel, Staufen
Magnetständer MagnaRack	Invitrogen, Darmstadt
Mikroskop, Axio Imager 2	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Mikroskop, Axioskop 40	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Mikroskop, Axiovert 135	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Millipore-Anlage, MilliQ	Millipore Corporation, Billerica, USA
Nano Drop	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Neubauer Zählkammer	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

MATERIAL UND METHODEN

pH-Meter Lab 850	Schott Instruments, Mainz
Pipetboy acu	Integra Bioscience AG, Chur
Pipette, Eppendorf Reference® (verstellbar)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette, Eppendorf Research® (verstellbar)	Eppendorf AG, Hamburg
Sterilbank, Msc Advantage	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Stickstofftank CryoSystem 4000	MVE/Chart, Ball Ground, USA
Vakuumpumpe EcoVac Absaugsystem	Schuett Biotec, Göttingen
Vortexer, VF2	Janke & Kunkel GmbH & Co KG, Staufen
Waage Analytic	Sartorius, Göttingen
Waage Excellence	Sartorius, Göttingen
Wasserbad, Typ 1003	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Zentrifuge, Mini Spin®	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge, Rotixa/RP	Hettich Lab Technology, Tuttlingen

2.1.6 Verbrauchsmittel

BD Falcon™ Round-Bottom Tube with Cell Strainer	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
BD Falcon™ Serologische Pipette Combitips, Biopur® Combitips plus	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg Eppendorf AG, Hamburg
Deckgläser, 24 x 60 mm	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen
Desinfektionsspray, Descosept AF	Dr. Schumacher GmbH, Malsfeld
Einmalhandschuhe, HyGrip® Micro- Touch	Ansell Healthcare Europe NV, Brüssel, Belgien
Einwegpinzetten, steril	Servoprax® GmbH, Wesel
Einwegskalpelle, chirurgisch, steril	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Eppendorf-Tubes	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

MATERIAL UND METHODEN

FACS-Tube, BD Falcon™ Round-Bottom Tube	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Falcon™-Tubes, Cellstar® mit konischem Boden	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Fettstift, DAKO Cytomation Pen	DAKO Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Immersionsöl, Immersol® 518N	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Kanüle, Microlance™3, 206 x 1 1/2", 0,9 x 40mm	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Kryoröhrchen, Cryo.s™	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Kultur-Einsätze 2 Well	Ibidi, München
Objektträger, SuperFrost® Plus	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen
Parafilm® „M“	Pechiney Plastic Packaging, Menaska, USA
Pasteur-Kapillarpipetten, 230 mm	WU, Mainz
Pipettenspitzen, 0,5 – 10 µl Kristall E	Ratiolab GmbH, Dreieich
Pipettenspitzen, 1.000 µl Ultratip	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen, 100 µl	Sarstedt Ag & Co, Nürnbrecht
Pipettenspitzen, Safe-Seal Tips Premium	Biozym Scientific GmbH, Oldenburg
RNase-Spray RNase AWAY	Invitrogen, Darmstadt
S-Monovette EDTA 9 ml	Sarstedt, Nürnberg
Spritzen, Injekt 1ml; 5 ml; 10 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Sterilfilter, Millex®-GS, 0,22 µm	Millipore Ireland Ltd., Tullagreen, Irland
Zellkulturflasche, Cellstar® 250 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturplatte, 24-Well Falcon® Multiwell™	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

MATERIAL UND METHODEN

Zellkulturplatte, 96-Well Falcon® Microplate™	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Zellkulturplatte, 96-Well Falcon® Microtest™	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Zellkulturplatten, 96-Well Cellstar®, U- bottom	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturplatten, 96-Well Costar®, Ultra Low Cluster Plate	Corning Inc. Life Sciences, Lowell, USA
Zellkulturplatten, Rundschalen 100 x 20 mm	Sarstedt Ag & Co, Nürnberg
Zytostatika Schutzhandschuhe Z ^{Plus}	Bemer, Elmshorn

2.1.7 Computerprogramme

Adobe Reader	Adobe Systems GmbH, München
BD FACSDiva™ -Software	BD Biosciences, San Jose, USA
EndNote X5	Thomson Reuters, Carlsbad, USA
Eos Utility	Canon Deutschland GmbH, Krefeld
FCS Express V3	De Novo Software, Los Angeles, USA
Microsoft® Office 2003, 2010	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Microsoft Office 2007 (Word, Excel)	Microsoft, Unterschleißheim
Axio Vision Viewer 3.0	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Wallac 1420 Workstation, Version 3.0	PerkinElmer™ Life Sciences, Radgau
GraphPad Prism®, Version 5.0	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
Axio Vision 3.1	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Um eine möglichst hohe Kontaminationsfreiheit und sauberes Arbeiten zu gewährleisten, wurde die gesamte zellbiologische Arbeit unter einer Sterilbank durchgeführt. Mittels *laminar flow* (turbulenzarme Luftströmung), Ventilatoren, Luftverteiltern und bestimmten Filtern wird hierbei sowohl das Eindringen als auch das Austreten von fremden und potenziell verunreinigenden Partikeln wie zum Beispiel Viren, Bakterien, Pilze o.ä. verhindert. Dadurch wird gewährleistet, dass nur sterile Luft unter der Werkbank verbleibt. Ferner wurden sowohl die in die Sterilbank eingeführten Arbeitsutensilien als auch die Arbeitsflächen und die über die Hände gezogenen Einmalhandschuhe vor dem Gebrauch mit Descosept AF-Lösung desinfiziert. Verwendete Materialien und Lösungen wurden steril filtriert, steril verpackt geliefert oder autoklaviert. Kontaminierter Abfall wurde in speziell dafür vorgesehene Entsorgungsbehälter gesammelt und von einer Spezialfirma abgeholt und entsorgt. Anfallender Zytostatika-Abfall wurde gesondert gesammelt und in entsprechenden Behältnissen entfernt. Mithilfe einer Saugflasche, die zuvor mit einem ätzenden Desinfektionsmittel behandelt wurde, wurden Lösungen, Medien und Zellen abgesaugt und durch das darin enthaltende Mittel unschädlich gemacht. Abschließend wurden die Arbeitsflächen nochmals desinfiziert und gereinigt.

2.2.2 Zelllinien

In den vorliegenden Versuchen wurden die humanen Rhabdomyosarkom-Zelllinien Rh30 (alveolärer Typ), A204, RD sowie RMS33-2 (embryonale Typen) verwendet. Um einen Vergleich mit den umgebenden Zellen des Tumors herzustellen, insbesondere in Hinblick auf eine Behandlung mit Zytostatika, wurden außerdem Fibroblasten-3 hinzugezogen. Ergänzend wurde die gentechnisch veränderte Zelllinie Rh30 Gluc mCherry verwendet.

2.2.3 Kultivierung von Tumorzellen und Fibroblasten

Sowohl die verwendeten Tumorzelllinien als auch die Fibroblasten wurden in Zellkulturplatten (100 x 20 mm) kultiviert, die in einem Begasungsbrutschrank

mit 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit bei 37°C gelagert wurden. Die Grundlage des Nährmediums stellte Dulbecco's MEM (DMEM) dar, welchem die Zusätze Fötale Kälberserum (FCS, 10%), die *wachstumsbegrenzende* Aminosäure L-Glutamin (1%) und die Antibiotika Penicillin/Streptomycin gegen das Anwachsen von unerwünschten Bakterien (1%) hinzugefügt wurden. Hiervon erhielten die Zellen 8 ml Kulturmedium auf einer 100 x 20 mm großen, speziell beschichteten Platte, wodurch die Zellen als adhärente Monolayerkultur wachsen konnten. Sowohl frisches Medium, als auch *phosphate buffered saline* (PBS) zum Waschen und Trypsin/EDTA (Ethylendiamintetraacetat) zum Lösen der adhärent wachsenden Zellen wurden vor dem Gebrauch im Wasserbad bei 37°C erwärmt.

2.2.4 Passagieren

Nach ungefähr zwei bis drei Tagen wurden die Kulturen je nach Zelldichte und Wachstumsgeschwindigkeit von der Zellkulturplatte gelöst, um die Zellzahl zu reduzieren und Platz für neues Wachstum zu schaffen. Dies wurde täglich unter dem Lichtmikroskop kontrolliert und die Passage bei einer 90-100% konfluenten Zellkultur durchgeführt. Hierbei wurde zunächst das verbrauchte Kulturmedium, welches einen gelben Farbumschlag bei sauren pH-Werten durch den Indikator Phenolrot und dadurch das verbrauchte Medium anzeigte, mit den abgestorbenen Zellen abgesaugt, um die Zellkulturplatte anschließend mit 5 ml PBS zu waschen. Durch dieses Vorgehen konnten Rückstände des Mediums und der Zellen entfernt werden. Als nächstes wurde 1,5 ml der Protease Trypsin mit EDTA versetzt hinzu gegeben und die Zellkulturplatte für 1-2 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert, um die auf dem Boden adhärent wachsenden Zellen zu lösen. Dies wurde lichtmikroskopisch kontrolliert und durch leichtes Klopfen am Plattenrand unterstützt. Nachdem sich die Zellen gelöst hatten, wurde 3,5 ml Medium zum Stoppen der Reaktion dazu gegeben und die gesamte Lösung resuspendiert, damit sich alle Zellen vom Verband lösten. Je nach gewünschter Zellzahl wurde mindestens 1/6 der Zellsuspension auf der Platte belassen; die Tochterkolonien wurden dadurch subkultiviert. Die

restlichen Zellen wurden in ein 15 ml Falcon überführt, wodurch sie gezählt werden konnten.

2.2.5 Bestimmung der Zellzahl

Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer konnten sowohl die lebenden Zellen gezählt, als auch tote Zellen detektiert werden. Vor dem Gebrauch wurde die Zählkammer gereinigt und angefeuchtet. Mit leichtem Druck wurde das Deckglas vorsichtig auf die Zählkammer geschoben, so dass auf den seitlichen Trägerstegen Newton'sche Interferenzfarben erkennbar waren, die den korrekten Sitz des Deckglases bestätigten. Zunächst wurde eine geeignete Verdünnung der zu untersuchenden Zellen hergestellt, um diese anschließend in einem Verhältnis von 1 : 1 mit Trypanblau zu mischen. Hierbei wurden 10 μ l der Zellsuspension mit demselben Volumen Farbstoff resuspendiert, wovon wiederum 10 μ l an den Rand des Deckglases pipettiert wurden. Durch Kapillarkraft konnte die Lösung in die normierte Kammer gesaugt werden. Ob die vitalen Zellen gleichmäßig in den Quadranten des Linienrasters verteilt waren, wurde mit einer geringen Vergrößerung lichtmikroskopisch überprüft. Anschließend wurden die vier Großquadranten, die sich jeweils in 16 kleinere Quadranten unterteilten, mit einer 10-fachen Vergrößerung ausgezählt. Dabei wurden nur die Zellen auf zwei Grenzlinien eines Quadrates, nicht jedoch die auf den anderen beiden Grenzlinien liegenden Zellen gezählt. Hierdurch konnte ein doppeltes Zählen der auf den Linien liegenden Zellen vermieden werden. Durch den Farbstoff Trypanblau, der nach kurzer Einwirkzeit tote Zellen blau anfärbte/welcher von toten Zellen aufgenommen wird, konnten wie erwünscht ausschließlich lebende Zellen detektiert werden / konnte ein Zählen toter, blau angefarbter Zellen ausgeschlossen werden. Um die Gesamtzellzahl der Zellsuspension pro Milliliter zu erhalten, wurde das arithmetische Mittel der vier Großquadranten gebildet, welches mit dem Kammerfaktor 10^4 , dem Verdünnungsfaktor sowie dem Gesamtvolumen der zu zählenden Zellsuspension multipliziert wurde. Der Kammerfaktor errechnet sich aus der Fläche eines Großquadrates (1 mm^2) und der Kammerhöhe (0,1 mm). Somit entspricht ein Eckquadrat dem Volumen von $0,1 \text{ } \mu\text{l} = 0,1 \text{ mm}^3$. Damit die

Zellzahl auf einen Milliliter bezogen werden konnte, wurde daher der Kammerfaktor 10^4 verwendet. Nach dem Gebrauch wurde die Zählkammer mit Descosept AF desinfiziert und gereinigt.

2.2.6 Langzeitlagerung von humanen Zellen

Das langfristige Aufbewahren von humanen Zellen erfolgte durch Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff bei -196°C , wodurch die Vitalität der Zellen nahezu unbegrenzt gewährleistet werden kann. Hierfür wurden die Zellen zunächst trypsinisiert (siehe Kap. 2.2.4), um sie in einer Zellsuspension zu erhalten. Diese wurde gezählt (siehe Kap. 2.2.5) und anschließend bei $460 \times g$ für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in geeignetem Volumen Einfriermedium resuspendiert. Dieses enthielt neben dem oben genannten Zellkulturmedium (*Peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) wurden in Very-Low-Endotoxin Roswell Park Memorial Institute-1640 Medium (VLE RPMI-1640 Medium) anstatt in DMEM kultiviert; gleiche Zusätze) zusätzlich 10% FCS (PBMCs: hitzeinaktiviertes FCS) sowie 10% Dimethylsulfoxid (DMSO). Durch zu geringe Temperaturabsenkung beim Einfrieren kann es in den Zellen zur Bildung von Eiskristallen kommen, welche die Zellwände durchbrechen und dadurch die Zellen schädigen können. Um dem vorzubeugen wurde das Frostschutzmittel DMSO hinzu gegeben. Je Kryoröhrchen wurden so $2-3 \times 10^6$ Zellen/ml (Tumorzellen) bzw. 2×10^7 Zellen/ml (PBMCs) in 1,5 ml Zellsuspension tiefgefroren. Die Zellen wurden bei -80°C für 24 h in einem speziellen Gefrierbehälters („Mr. Frosty“, Nalgene® Labware), welcher pro Minute um 1°C herunter kühlt, eingefroren. Für die langfristige Lagerung wurden die Zellen schließlich nach 24 h in flüssigen Stickstoff bei -196°C überführt.

2.2.7 Auftauen von humanen Zellen

Aus der Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff wurden die gewünschten Zellen in Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37°C kurz aufgetaut, um diese dann in vorgewärmtem Kulturmedium (DMEM mit Zusätzen bei Tumorzellen, RPMI mit Zusätzen bei PBMCs) zu resuspendieren. Diese Suspension wurde

wiederum in einem größeren Volumen von 7 ml, welches vorgewärmt in 15 ml Falcons vorgelegt wurde, nochmals gut gemischt und anschließend bei 460xg für 5 min zentrifugiert. Der DMSO-haltige Überstand wurde abgesaugt und das übrig gebliebene Zellpellet in 8 ml Kulturmedium resuspendiert und auf Kulturschalen ausplattiert. Nach 24 h wurde das Wachstum kontrolliert, die Zellen gewaschen und das Medium gewechselt, um Reste des zellschädigenden DMSOs vollständig zu entfernen.

2.2.8 Isolierung von humanen peripheren mononukleären Zellen

Frisch abgenommenes EDTA-Vollblut von gesunden Spendern diente zur Isolierung von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC). Mithilfe einer Dichtegradientenzentrifugation wurden die einzelnen Bestandteile und Zellen des Blutes aufgetrennt. Hierfür wurde das zuvor mit PBS verdünnte Blut (jeweils 9 ml) auf Biocoll *Separating Solution* geschichtet und anschließend bei 1.200 g für 20 min ohne Bremse zentrifugiert. Aufgrund der höheren Dichte von Erythrozyten, Granulozyten und toten Zellen befinden sich diese auf dem Boden des Falcons, während sich Plasma und Thrombozyten in der obersten Phase anreichern. Dazwischen findet sich der weiß-graue Lymphozytenring, die sogenannte Interphase, welche Lymphozyten und Monozyten enthält, auf dem Biocoll-Kissen gelegen. Die unterschiedliche Schichtung wird durch das im Biocoll enthaltene Polymer Polysucrose mit einem Molekulargewicht von 400 kDa und der Dichte der isotonischen Trennlösung mit 1,077 g/ml⁴ gewährleistet. Das Plasma wurde bis knapp über der Interphase verworfen und daraufhin der Lymphozytenring mit einer 10 ml Pipette vorsichtig abgenommen und in ein frisches 50 ml Falcon überführt. Nach zweimaligem Waschen mit 50 ml kaltem PBS (600 g, RT, 10 min (1) und 5 min (2)) wurde das Zellpellet in warmem VLE RPMI-1640 resuspendiert und die PBMCs gezählt (s. 2.2.5).

2.2.9 Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie können verschiedenste Zellpopulationen und Zellen, welche in einer Zellsuspension gehalten werden, quantifiziert werden. Einzelne Zellen werden dabei mit hoher Geschwindigkeit an einem Laserstrahl

MATERIAL UND METHODEN

vorbei geleitet, wobei ein Streulicht oder ein Fluoreszenzsignal entsteht, welches von einem Detektor gemessen wird. Detektiert werden können das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter), welches vom Volumen der Zelle abhängt, das Seitwärtsstreulicht (SSC = Side Scatter), welches von der Granularität, dem Zellkern und Vesikeln bestimmt wird, sowie fluoreszenzmarkierte Zellbestandteile wie extra- oder intrazelluläre Antigene. Hiermit können sowohl große als auch kleine Zellpopulationen innerhalb kurzer Zeit (> 1000 Zellen/sec) sehr sensitiv gemessen werden. Für die Analysen wurden die Geräte BD FACSCalibur (für durchflusszytometrische Untersuchungen an RMS Zellen) und BD LSR II (Messung von PBMCs) verwendet. Mittels FACS DIVA (BD Bioscience, San Jose, USA) und FCS Express 3 (De Novo Software, Los Angeles, USA) erfolgte die Auswertung der ermittelten Daten.

Im Folgenden wurden sowohl intrazelluläre Proteine als auch extrazelluläre Oberflächenantigene von PBMCs untersucht. Zur Detektion des intrazellulär vorhandenen Proteins MIF in humanen RMS Zellen wurden diese nach einer 48-stündigen Behandlung mit drei verschiedenen Zytostatika (Doxorubicin (0,01 $\mu\text{g/ml}$, 0,03 $\mu\text{g/ml}$ und 0,1 $\mu\text{g/ml}$), Vincristin (0,01 $\mu\text{g/ml}$, 0,03 $\mu\text{g/ml}$ und 0,1 $\mu\text{g/ml}$), Etoposid (0,01 $\mu\text{g/ml}$, 0,1 $\mu\text{g/ml}$ und 1 $\mu\text{g/ml}$) trypsiniert, in 5 ml FACS-Röhrchen überführt und mit FACS-Puffer (PBS mit 2% FCS, 2mM EDTA, 0,005% NaN_3) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 3,7% Formaldehydlösung für 5 min fixiert, gefolgt von einer Permeabilisierung der Zellmembran mit 0,2% Tween-20 in FACS-Puffer für 10 min, jeweils bei Raumtemperatur. Zunächst erfolgte daraufhin die Inkubation mit dem Primärantikörper anti-human MIF (1:1250 in FACS-Puffer) bei RT, welcher falls nicht an Zellen gebunden nach 30 min mit FACS-Puffer herausgewaschen wurde. Hierfür wurden die Zellen mit 2 ml FACS-Puffer resuspendiert, für 5 min mit 1500 rpm bei RT zentrifugiert und im Anschluss der Überstand abgekippt. Ebenfalls für 30 min wurde im Anschluss der Sekundärantikörper, welcher an das Fluorochrom FITC (FITC anti-Maus aus der Ziege) gekoppelt war (1:2000), im Dunkeln mit den Proben inkubiert (200 μl pro Probe). Um unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers zu erfassen, wurden Kontrollen mit FACS-

MATERIAL UND METHODEN

Puffer anstatt des Primärantikörpers mitgeführt. Zuletzt wurden überschüssige Sekundärantikörper mit 2 ml FACS Puffer herausgewaschen, für 5 min bei 1500 rpm und RT zentrifugiert und das Zellpellet in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert. Bis zur Messung wurden die Proben auf Eis gelagert und mit jeweils 5 µl 7-AAD pro Probe (eBioscience Inc., San Diego, USA) versetzt, um tote Zellen auszuschließen. Die Analyse erfolgte am FACSCalibur und wurde mit FCS Express 3 Flow Cytometry ausgewertet.

Zur Identifikation einzelner Populationen kultivierter PBMCs wurden diese mit direkt Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen spezielle Oberflächenantigene inkubiert. Hierfür wurden die PBMCs zunächst in FACS-Röhrchen überführt und das Medium herausgewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit den gewünschten Antikörpern gegen CD33 (PE anti-human CD33 oder APC anti-human CD33) und CD14 (Vioblue® anti-human CD14) in 100 µl bei 4°C für 10 min im Dunkeln. Die Konzentrationen der Antikörper wurden wie vom Hersteller empfohlen eingesetzt. Nach dem Herauswaschen der überschüssigen Antikörper wurde das Zellpellet in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen und die Proben im Dunkeln auf Eis gestellt. Die Messungen wurden am BD LSR II durchgeführt und mittels FCS-Express 3 Flow Cytometry ausgewertet.

Je Ansatz wurden 10.000 – 30.000 *Events* gemessen. RMS Zellen und Fibroblasten wurden nur einfach gefärbt. Die Färbung der PBMCs erfolgte je nach Ansatz mit bis zu maximal 7 verschiedenen Fluorochromen, welche in nachfolgenden Tabellen aufgeführt sind (Tabelle 5, 6, 7). Die Fluorochrome, welche an Antikörper gekoppelt waren, waren direkt an diese konjugiert.

Tabelle 5: Antikörper für durchflusszytometrische Analysen. Färbung für PBMCs, die mit GM-CSF stimuliert wurden.

Epitop & Fluorochrom des AK	Zielzelle
FITC anti-human CD4	Antikörper gerichtet gegen CD4+ T Zellen des peripheren Blutes
APC anti-human CD33 PE anti-human CD33	Antikörper gerichtet gegen CD33+ Zellen der myeloiden Reihe
PE/Cy7 anti-human CD3	Antikörper gerichtet gegen CD3+ positive Zellen
VioBlue® anti-human CD14	Antikörper gerichtet gegen CD14+ Zellen der myeloiden Reihe

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 6: Antikörper für durchflusszytometrische Analysen. Färbung für PBMCs, die mit IL-2 und anti-CD3 stimuliert wurden.

Epitop & Fluorochrom des AK	Zielzelle
FITC anti-human CD4	Antikörper gerichtet gegen CD4+ T-Zellen des peripheren Blutes
APC anti-human CD25	Antikörper gerichtet gegen CD25+ aktivierte T- und B-Zellen
PE/Cy7 anti-human CD3	Antikörper gerichtet gegen CD3+ positive T-Zellen
VioBlue® anti-human CD8	Antikörper gerichtet gegen CD8+ zytotoxische T-Zellen des peripheren Blutes
PerCP anti-human CD20	Antikörper gerichtet gegen B Zellen
PE/CF 594 anti-human CD56	Antikörper gerichtet gegen NK Zellen
PE anti-human FOXP3	Transkriptionsfaktor, v.a. in supprimierenden CD4+ T-Zellen

Tabelle 7: Antikörper für durchflusszytometrische Analysen. Färbung für PBMCs, die mit IL-2 und anti-CD3 stimuliert und mit CFSE gefärbt wurden.

Epitop & Fluorochrom des AK	Zielzelle
FITC CFSE	Teilende Zellen
PE anti-human CD3 PE/Cy7 anti-human CD3	Antikörper gerichtet gegen CD3+ positive Zellen

Für die optimale Detektion der jeweils eingesetzten Fluorochrome wurden drei Laser mit verschiedenen Wellenlängen verwendet (s. Abbildung 11). Die eingesetzten Fluorochrome wurden so gewählt, dass eine Überlappung der Emissionsspektren weitestgehend vermieden wurde. Um die dennoch vorhandenen Überschneidungen zu minimieren und die Fluorochrome eindeutig zu den speziellen Antigenen zuzuordnen, erfolgte vor den Messungen eine Kompensation am Durchflusszytometer. Dabei werden die entsprechenden Fluoreszenzspektren voneinander subtrahiert, um das jeweilige Fluorochrom spezifisch zu detektieren (z.B. FITC gegen PE, siehe Abbildung 11). Diese eingestellten Parameter wurden für jede Messung verwendet und blieben für die folgenden durchflusszytometrischen Messungen identisch. Die einzelnen PBMC Populationen wurden zunächst anhand mehrerer *Gates* detektiert, in denen zum einen die lebenden Zellen (live) und zum anderen speziell die Lymphozyten (anhand FSC und SSC) eingeschlossen wurden.

MATERIAL UND METHODEN

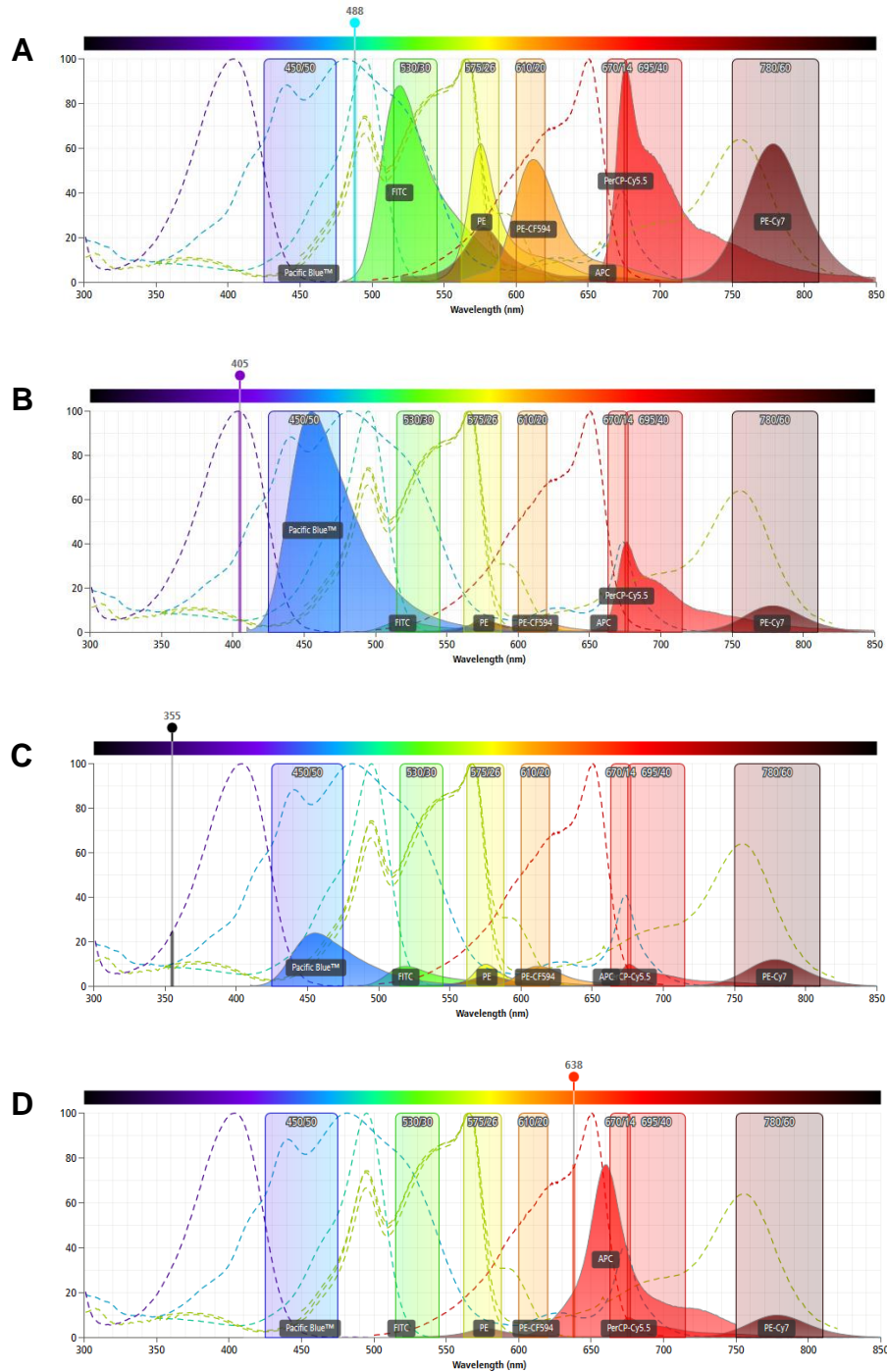


Abbildung 11: Fluoreszenzspektren der verwendeten Fluorochrome. Dargestellt sind die Emissionstärke in % (Ordinate), die Wellenlänge in nm (Abszisse), Anregungswellenlängen der vier unterschiedlichen Laser (A: 488 nm, B: 405, C: 355 nm, D: 638 nm) sowie das Emissionsmaximum der einzelnen Fluorochrome in Abhängigkeit des verwendeten Lasers. Jedes Fluorochrom wurde dabei von unterschiedlichen Lasern angeregt. Pacific Blue™ repräsentiert das eigentlich eingesetzte VioBlue® (Abbildung erstellt mit *BD Fluorescence Spectrum Viewer A Multicolor Tool*, BD Biosciences, http://www.bdbiosciences.com/research/multicolor/spectrum_viewer/index.jsp (Stand 01.04.2017)).

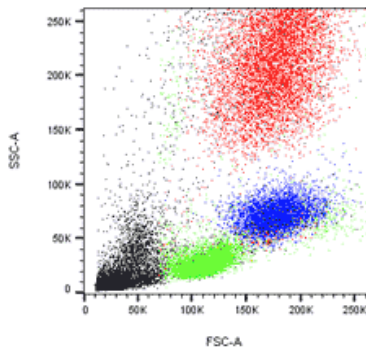


Abbildung 12: Identifizierung der Leukozyten

Subpopulationen. Dargestellt sind beispielhaft die anhand des Side Scatters (SSC) und Forward Scatters (FSC) aufgetrennten Populationen der Leukozyten. Grün: Lymphozyten; Blau: Monozyten; Rot: Granulozyten. Abbildung aus: <https://www.bio-rad-antibodies.com/flow-cytometry-gating-strategies.html> (Stand: 29.04.2018).

2.2.10 Immunfluoreszenzanalyse

Zum Nachweis von Zellbestandteilen, Antigenen oder ganzen Zellen eines Gewebes kann die Immunfluoreszenz herangezogen werden. Hierfür werden Antikörper eingesetzt, welche mit Fluorochromen konjugiert sind, die entweder direkt an den Primärantikörper oder an den Sekundärantikörper gekoppelt sind. Die verwendeten Erstantikörper sind spezifisch gegen bestimmte Strukturen gerichtet, wie beispielsweise in der vorliegenden Arbeit gegen das intrazellulär vorhandene Protein MIF. Mittels der darauf folgenden Antigen-Antikörper-Interaktion können die spezifischen Bestandteile im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

RMS Zellen wurden in einer Konzentration von 3.000 Zellen/100 µl in Zweikammer Kultureinsätzen (Ibidi) auf zuvor mit Poly-D-Lysin beschichteten und für 5 min mit UV-Licht bestrahlten Objektträgern (100 µl pro Kammer für 30 min bei 37°C) ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte eine Behandlung mit den Zytostatika Doxorubicin, Vincristin und Etoposid in drei verschiedenen Konzentrationen für 48 h. Nach der zweitägigen Inkubationszeit wurden die Objektträger in 3,7% Formaldehyd für 30 min eingetaucht und dadurch fixiert. Anschließend folgte ein dreimaliger Waschschrift für jeweils 5 min mit PBST (PBS mit 0,1% Tween-20) und darauf folgender Umrandung der Präparate mit einem Fettstift (DAKO Cytomation Pen). Um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern, wurden die Zellen mit 3% Zeigenserum, gelöst in PBST, für 60 min bei RT inkubiert und im Anschluss drei Mal für 5 min mit PBST gewaschen. Daraufhin erfolgte die Inkubation über Nacht bei 4°C im Dunkeln mit dem primären Antikörper anti-MIF (monoklonal, Maus anti-human MIF, KloneAbcam, Cambridge, UK),

welcher mit einer Konzentration von 1:1.250 in PBST verdünnt und mit jeweils 100 µl je Probe appliziert wurde. Nach der Inkubation über Nacht wurden die Objektträger erneut mit PBST für jeweils 5 min drei Mal gewaschen, um die unspezifisch gebundenen primären Antikörper zu entfernen. Im nächsten Schritt wurde der sekundäre Antikörper AlexaFlour546® anti-mouse aus der Ziege (2 µg/ml in PBST, Invitrogen, Darmstadt, Germany), der an die Fc-Fragmente des primären Antikörpers bindet, zusammen mit dem Zellkern blau färbenden DNA-Interkalator DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride; 1:2000 in PBST) für mindestens 60 min im Dunkeln bei Raumtemperatur, auf die Proben pipettiert. Anschließend wurde der ungebundene Teil mit einem erneuten Waschschrift (drei Mal, 5 min, in PBST) entfernt, die Flüssigkeit vollständig abgesaugt und die Präparate mit einem Tropfen DAKO Fluorescent Mounting Medium unter einem Deckglas konserviert. Die Objektträger wurden getrocknet und im Kühlschrank gelagert. Die Färbung wurde mittels ApoTome Axio Imager 2 analysiert.

2.2.11 Zytotoxizitätsassays

2.2.11.1 Bestimmung der Viabilität mittels MTT Assay

Zur Feststellung der Viabilität von Tumorzellen wurde der sogenannte MTT Assay durchgeführt. Bei dieser kolorimetrischen Viabilitätsmessung wird der Tetrazoliumring des gelblichen Tetrazoliumsalzes 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid (MTT) gespalten, wobei eine Umwandlung in blau-violette Formazankristalle stattfindet. Die in lebenden Zellen vorhandene mitochondriale Succinat-Dehydrogenase katalysiert die Spaltung des Farbstoffs, wodurch sich die blau-violette Farbintensität der Lösung proportional zu der Anzahl lebender Zellen verhält (Mosmann, 1983). Neue Untersuchungen zeigen jedoch, dass vor allem die mitochondrialen pyridinhaltige Reduktionsäquivalente NADH und NADPH für die MTT-Reduktion verantwortlich sind (Berridge, M.V., Tan, A. S., McCoy, K. D. & Wang, R, *The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts*. Biochemica, 1996. 4: p. 14-19).

Zunächst wurden 3×10^3 ($\cong 3 \times 10^4/\text{ml}$) A204, RD und Rh30 Zellen sowie 1×10^4 ($\cong 1 \times 10^5/\text{ml}$) RMS33-2 Zellen und 1×10^4 ($\cong 1 \times 10^5/\text{ml}$) Fibroblasten pro Well in einem Volumen von 100 μl (DMEM mit Zusätzen ohne Phenolrot) in einer 96-Well-Platte ausplattiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit den MIF Inhibitoren ISO-1, Ant.III 4-IPP, Ant.V, SF sowie dem anti-MIF Antikörper in fortlaufenden 2-fach Verdünnungen der Inhibitoren mit Konzentrationen von 0 bis 100 μM für 72 Stunden behandelt. Bei der Kombination der Inhibitoren mit dem Zytostatikum Doxorubicin wurde dieses in einer Konzentration von 0,0003 bis 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ verwendet. Nach 72 Stunden wurde pro Well 25 μl MTT-Lösung hinzugegeben. 6 Stunden später wurde die Reaktion mittels 100 μl einer 10%-igen SDS-Lösung gestoppt. Während der Inkubation über Nacht lösten sich die Formazankristalle, woraufhin die optische Dichte mittels ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 570 nm bestimmt werden konnte. Im Anschluss wurden die Daten mit GraphPad Prism® Version 4.0 ausgewertet. Hierbei wurde die Prozentzahl der Zellviabilität berechnet, indem zunächst die Leerwerte (Kulturen ohne Zellen, nur mit Kulturmedium) von den erhaltenen Daten abgezogen wurden und diese anschließend auf die unbehandelten Kontrollen (nur Tumorzellen) normalisiert wurden. Aus dieser Berechnung sowie grafischen Darstellung ließ sich die IC_{50} als auch die Wirksamkeit der Behandlung mit den Inhibitoren und Zytostatika ableiten. Es wurden für jeden Ansatz Triplikate verwendet, so dass Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen berechnet wurden. Die Aufarbeitung und Auswertung erfolgte mit der GraphPad Prism®-Software.

2.2.11.2 Bestimmung der Viabilität von Tumorzellen in einem „Kill-Assay“

Um herauszufinden, ob eine Verstärkung der Tumorzelllyse durch Immunzellen mittels Inhibierung von MIF erreicht werden kann, wurden Reporter-Rh30 Zellen mit einer stabilen Expression der Gaussia Luziferase (Rh30-Gluc) verwendet (Armeanu-Ebinger et al., 2014, Herrmann, 2011). Diese Zellen sezernieren Luziferase in den Zellkulturüberstand. Das Enzym reichert sich dort an und kann mittels Zugabe des Substrats Coelenterazine luminometrisch gemessen werden. Die Menge der Luziferasae, die in den Zellkulturüberstand sezerniert wird, korreliert dabei mit der Menge der lebenden Tumorzellen.

5×10^3 Rh30-Gluc Zellen pro Well wurden in einer 96-Well-Platte ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte die Inkubation mit dem anti-MIF Antikörper in verschiedenen Konzentrationen (2 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 0,5 $\mu\text{g/ml}$) für 30 Minuten bei 37°C. Frisch isolierte PBMCs wurden in einem Tumor : Effektor Verhältnis von 1:10, 1:20 sowie 1:40 in die entsprechenden Wells pipettiert und mit IL-2 (200 IU/ml) stimuliert. Nach 24 h Inkubationszeit bei 37°C wurden die Überstände entfernt, die anhaftenden Rh30-Gluc Zellen mit PBS gewaschen, 200 μl Kulturmedium hinzu gegeben und für weitere 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden 5 μl dieser Zellkulturüberstände in eine weiße 96-Well-Platte transferiert. Das Substrat Coelenterazine wurde im Gaussia Glow Juice Puffer in einem Verhältnis von 1:50 gelöst; 50 μl dieser Lösung wurde direkt vor der Messung in jedes Well gegeben. Die Lumineszenz wurde für eine Sekunde mittels WALLAC Victor-plate reader gemessen und wurde in Lichtimpulsen pro Sekunde angegeben. Jeder Ansatz wurde in Triplikaten durchgeführt. Zur Berechnung der Viabilität der Tumorzellen wurden zunächst die Lichtimpulse des Hintergrundes vom Zellkulturmedium (ohne Zellen) abgezogen. Daraufhin erfolgte eine Normalisierung der Lichtimpulse der Proben gegen die Positivkontrolle (Rh30-Gluc Zellen ohne PBMCs). Eine Auswertung der Daten erfolgte mit GraphPad Prism®, wobei die Kontrollen ohne PBMCs auf eine Viabilität von 100% (maximale Produktion der Luziferase durch Tumorzellen) gesetzt wurden.

2.2.12 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Die quantitative Analyse des sezernierten humanen Proteins MIF wurde mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) durchgeführt. Hierfür wurden die Zellkulturüberstände der konfluent gewachsenen Zelllinien entweder nach einer 24- oder 48-stündigen Inkubation mit den jeweiligen Zytostatika gesammelt und bei -20°C eingefroren. Die Durchführung erfolgte anhand der Instruktionen des Herstellers (Hölzel Human MIF ELISA Kit). In die bereits mit MIF Antikörpern beladene 96-Well-Platte wurden die jeweils unverdünnten Zellkulturüberstände als Duplikate (jeweils 100 μl) in die entsprechenden Wells pipettiert. Zusätzlich wurde ein MIF Standard mit den Konzentrationen 10.000 pg/ml , 5000 pg/ml ,

MATERIAL UND METHODEN

2500 pg/ml, 1250 pg/ml, 625 pg/ml, 313 pg/ml und 156 pg/ml sowie eine Kontrolle nur mit Zellkulturmedium mitgeführt. Die ELISA Platte wurde mit Parafilm® bedeckt und bei 37°C für 90 min inkubiert. Im Anschluss wurden die Überstände verworfen und die Platte auf Papier angetrocknet, wobei ein vollständiges Trocknen der Wells zu jeder Zeit vermieden wurde. In jedes Well wurde 100 µl des biotinylierten anti-human MIF Antikörpers gegeben und die Platte bei 37°C für 60 min inkubiert. Nach diesem Schritt wurde die Platte drei Mal mit PBS gewaschen, wobei der Waschpuffer mindestens 1 min in den Wells verblieb. Der Waschpuffer wurde nach jedem Schritt verworfen und die Platte an Papiertüchern angetrocknet. Nach den Waschschritten wurden 100 µl des vorbereiteten Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes (ABC) in dessen Arbeitslösung in jedes Well hinzugefügt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Dieser Komplex verbindet sich mit dem biotinylierten Antikörper, der wiederum an das zuvor gebundene humane MIF der Zellkulturüberstände eine Antigen-Antikörper-Bindung aufweist. Die nicht verbundenen Anteile wurden mit PBS (5 x für 1-2 min) herausgewaschen. Anschließend erfolgte die Zugab von 90 µl der vorbereiteten TMB *color developing agent* in jedes Well für 15 min bei 37°C. Je höher die MIF Konzentration, desto stärker wurde der Farbumschlag Richtung blau erkennbar. Die Reaktion wurde mittels 100 µl der TMB Stopplösung beendet, wobei ein sofortiger Farbumschlag Richtung gelb beobachtet werden konnte. Innerhalb der nächsten 30 min wurde die O.D. Absorption bei 450 nm mittels ELISA reader gemessen. Die relative O.D. bei 450 nm wurde berechnet, indem die O.D. des Nullwertes von der O.D. jedes Wells abgezogen wurde. Mit Hilfe der Standardkurve (relative O.D. bei 450 nm jeder Standardlösung (Y) vs. entsprechende Konzentration der Standardlösung (X)) wurde die MIF Konzentration der einzelnen Proben interpoliert mittels GraphPad Prism®. Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism® 4.00, hierfür wurde der Bonferroni's Test (Bonferroni's multiple comparisons test) verwendet. Die Daten sind als Mittelwert \pm *standard error of the mean* (SEM) dargestellt, ** $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$.

2.2.13 Migrations-Assay

Mittels Assays, welche die Migration von Zellen untersuchen, lassen sich Rückschlüsse auf das Metastasierungspotenzial von Tumorzellen ziehen. Um die Zellmigration und den Einfluss von MIF auf diese zu untersuchen, wurden Zweikammer Kultureinsätze (Ibidi) in Petrischalen (100 x 20 mm) platziert. RMS Zellen in einer Dichte von $3 \times 10^4/100\mu\text{l/well}$ wurden in jeweils eine Kammer der Kultureinsätze plattiert. Um konfluente, anhaftende Monolayer der Zellen zu erhalten, wurden die RMS Zellen über 24 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Einsätze vorsichtig entfernt und die Petrischalen mit Zellkulturmedium befüllt. Zusätzlich erfolgte eine Zugabe der MIF Inhibitoren ISO-1 (25 μM), Ant.III 4-IPP (25 μM), Ant.V (25 μM), Sulforaphane (3 μM) sowie dem anti-MIF Antikörper (2 $\mu\text{g/ml}$) in die entsprechenden Ansätze. Der zellfreie Raum zwischen den Kultureinsätzen (500 μM) wurde 0 h, 5 h sowie 24 h nach dem Entfernen der Zellkultureinsätze gemessen, indem Bilder mittels Axiovert 40 AxioCamMRcand AxioVision 3.1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) fotografiert wurden. Je mehr die Zellen migrieren, desto geringer ist der zellfreie Bereich zwischen den beiden Kammern der Zellkultureinsätze. Die Migration wurde als relativer Quotient des gemessenen Platzes im Verhältnis zu der unbehandelten Kontrollkultur berechnet und dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte ebenfalls mit GraphPad Prism® 4.00, hierfür wurde Two-way ANOVA verwendet und jeweils zum Zeitpunkt 5 h und 24 h die Migration der behandelten Proben mit der Positivkontrolle (RMS Zellen ohne Behandlung) verglichen. Die Daten wurden als Mittelwert \pm *standard error of the mean* (SEM) dargestellt, signifikante Ergebnisse wurden mit (*) gekennzeichnet.

2.2.14 T Zell Proliferationsanalyse

Für die Analyse der Proliferation von Lymphozyten eignet sich die Färbung mittels Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE). Dieser fluoreszierende Farbstoff kann die Zellmembran penetrieren und mit der Succinimidyl Gruppe an intrazelluläre Moleküle, insbesondere an Lysinreste sowie andere Aminogruppen, binden. Aufgrund der kovalenten Bindung bleibt das fluoreszierende CFSE lange in der Zelle erhalten und wird auch nicht an

benachbarte Zellen weitergegeben, wodurch sich mit jeder Zellteilung die Menge an CFSE in der Zelle halbiert (Lyons and Parish, 1994). Dadurch eignet sich diese Färbung hervorragend zur Beurteilung der Proliferation von Lymphozyten, wobei ca. 7-8 Zellteilungen identifiziert werden können bevor das fluoreszierende Signal zu schwach wird, um es vom autofluoreszierenden Hintergrund zu unterscheiden.

Um die T Zell Proliferation zu untersuchen, wurden frisch isolierte PBMCs mit CFSE gefärbt. Hierfür wurden 5 μM der CFSE Lösung in erwärmtem PBS mit 0,1% hitzeinaktiviertem FCS gelöst und für 10 min bei 37°C mit den PBMCs inkubiert. Die Reaktion wurde mit eiskaltem VLE RPMI-1640 gestoppt und die Zellen zentrifugiert (1500 rpm, 5 min, RT), der Überstand abgekippt und das Zellpellet in warmem VLE RPMI-1640 mit hitzeinaktiviertem FCS resuspendiert und in einer Dichte von $5 \times 10^5/\text{well}/250\mu\text{l}$ in einer 96-well Platte ausplattiert. Um die Proliferation der T-Zellen zu stimulieren, wurden 200 IU/ml Interleukin-2 (IL-2) sowie 1 ng/ml anti-human CD3 (Klon OKT3) verwendet. Die MIF Inhibitoren Ant.III 4-IPP (50 μM), ISO-1 (50 μM) und SF (10 μM und 3 μM) als auch der humane anti-MIF Antikörper (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wurden zu den jeweiligen Proben hinzugefügt. In die dafür vorgesehen Wells wurden 200 μl der RMS Zellkulturüberstände zu 50 μl der PBMC Kultur hinzugegeben. Nach zwei Tagen wurde das verbrauchte Medium mit frischen Zusätzen ausgetauscht. Nach einer Kultivierung für 5 Tage wurden die Zellen zunächst mit einem PE/Cy7 konjugierten anti-human CD3 Antikörper markiert und mittels Durchflusszytometrie detektiert. Die T-Zellproliferation wurde qualitativ bei CD3+ Zellen durch die Verschiebung der CFSE Fluoreszenz beobachtet. Die Messungen erfolgten am BD LSR II und wurden mit BD FACSDiva und FCS Express ausgewertet.

2.2.15 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie eignet sich zum Nachweis von Antigenen, die sowohl intra- als auch extrazellulär in fixierten Gewebeschnitten vorhanden sind. In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Antigen-Antikörper-Interaktion das Protein

MATERIAL UND METHODEN

MIF im Tumorgewebe nachgewiesen und mittels einer Hämatoxylin-Färbung das Gewebe angefärbt.

Hämatoxylin beinhaltet das basische Hämalan, welches zu einer blauen Färbung von sauren Strukturen führt. In Zellen entspricht dies insbesondere der im Zellkern vorhandenen DNA sowie den Ribosomen am rauen endoplasmatischen Retikulum. Im Gegensatz dazu färbt das synthetische saure Eosin basische Strukturen in der Zelle rot. Hiervon sind vor allem die Zellplasmaproteine betroffen.

Die folgenden Inkubationsschritte wurden in einer feuchten und geschlossenen Kammer durchgeführt, um ein Austrocknen zu verhindern. Sofern andere Inkubationsbedingungen gewählt wurden, werden diese im Folgenden erwähnt.

Zunächst wurden die in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte mit zwei Xylol-Bädern für jeweils 10 Minuten und im Anschluss in einer absteigenden Ethanolreihe mit 100%, 90%, 80% und 70% für je 3 Minuten deparaffiniert. Anschließend erfolgte eine Waschung in Reinstwasser ebenfalls für 3 Minuten. Um die Schnitte zu demaskieren und die Antigene freizulegen, wurden diese in Citratpuffer (pH 6; hergestellt aus destilliertem Wasser und zwei Ansätzen: 2 % Ansatz A mit 21 g/l Zitronensäure Monohydrat und HCl mit pH 6; Ansatz B mit 29,4 g/l Natriumcitrat Dihydrat und Natronlauge ebenfalls mit pH 6) in einem Dampfdrucktopf auf 90°C erhitzt, für 20 min bei RT abgekühlt und mit PBST Waschpuffer gewaschen. Es folgte das Blocken der endogenen Peroxidase mit Wasserstoffperoxid 3% für 5 min und das Waschen mit PBST für 5 min. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Gewebeschnitte mit 3% Ziegen Serum für 30 min inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper anti-human MIF in einer Verdünnung von 1:1.250 mit PBST (davon 100 µl je Probe) bei 4°C über Nacht. Für jede Gewebeprobe wurde eine Negativkontrolle ohne Erstantikörper mitgeführt (ausschließlich PBST). Nach Inkubation folgten drei Waschschrte in PBST für jeweils 5 min und das Zugabe des Sekundäntikörpers *horseradish peroxidase* (HRP) One Step polymer anti mouse/rabbit/rat für 30 min bei RT. Die Objektträger wurden erneut drei Mal für jeweils 5 min mit PBST gewaschen. Zur Herstellung der

Diaminobenzidin (DAB) Lösung wurde das Peroxidase Substrat Kit (DAB SK-4100) verwendet. Hierfür wurden 2,5 ml destilliertes Wasser mit einem Tropfen „Buffer Stock Solution“ und zwei Tropfen „DAB Stock Solution“ gemischt und die Reaktion mit einem Tropfen H₂O₂ aktiviert. Die Lösung wurde für 5-10 min bei RT auf die Gewebeproben gegeben. Bei Auftreten einer braunen Färbung wurden die Objektträger in destilliertes Wasser überführt. Anschließend erfolgte die Färbung für ca. 1,5 min in Mayers Hämalaunlösung. Nach der Färbung wurden die Gewebeproben für 10 min unter fließendem Wasser gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 70%, 80%, 90% und 100% Ethanol für jeweils 3 Minuten dehydratisiert. Abschließend wurden die Objektträger zwei Mal für 5 min in Xylol getaucht und die gefärbten Gewebeschnitte mit Eindeckmedium (DePeX) sowie Deckgläsern versorgt und nach dem Trocknen bei RT gelagert. Die Proben wurden mikroskopisch mittels Axiovert 135 analysiert und mit der Kamera EOS Utility aufgenommen.

2.2.16 Isolierung von RNA aus Zelllinien

Um die Kontamination mit RNasen, welche ubiquitär vorhanden sind, zu minimieren, wurden die Arbeiten mit RNA nach der Zellyse an einem gesonderten Arbeitsplatz durchgeführt. Des Weiteren wurden sterile, gestopfte Pipettenspitzen sowie RNase freie Tubes verwendet und die Arbeitsflächen, Arbeitsutensilien und Handschuhe vor Gebrauch mit dem RNase-Hemmer *RNase Away* gereinigt.

Rh30 und RD Zellen wurden in 6-Well Platten mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen/Well ausplattiert. Nach 48 h erfolgte die Behandlung mit den Zytostatika Doxorubicin (0,01 und 0,03 µg/ml), Vincristin (0,01 und 0,03 µg/ml) und Etoposid (0,01 und 0,1 µg/ml) für weitere 48 h. Im Anschluss wurden die Zellüberstände gesondert gesammelt und entsorgt oder eingefroren, die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen und mittels Trypsin von der Platte gelöst. Die RMS Zellen wurden in Eppis überführt, zentrifugiert (300 g für 5 min) und nochmals mit PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (300 g für 5 min) wurde das PBS vollständig abgesaugt und das Zellpellet mit 350 µl RLT Puffer

versetzt und resuspendiert, um eine Lyse der Zellen durchzuführen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellysate bei -80°C eingefroren.

Die Grundlage der RNA-Isolierung bildet die Guanidini-Isothiocyanat-Extraktion. Während der Lyse des Materials erfolgt zeitgleich eine Denaturierung der Proteine und Inaktivierung von RNasen. Mittels Ethanol wird die RNA ausgefällt und über eine Säule gesammelt, gereinigt und mit RNase-freiem Wasser eluiert.

Für die Isolierung der RNA wurde das RNeasy Mini Kit von Qiagen verwendet, die Isolierung erfolgte anhand des Herstellerprotokolls. Nach dem Auftauen der Zellysate wurden diese entsprechend des Herstellerprotokolls homogenisiert. Anschließend wurde 70%iger Ethanol zum homogenisierten Lysat hinzugegeben und dieses resuspendiert. Bis zu 700 μl der jeweiligen Probe wurde auf eine RNeasy Säule, welche in einem 2 ml Eppi platziert wurde, überführt und diese für 15 s bei $\geq 8000 \times g$ (≥ 10.000 rpm) zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 700 μl des RW1 Puffers auf die Säule gegeben. Nach erneuter Zentrifugation mit 15 s bei $\geq 8000 \times g$ (≥ 10.000 rpm) erfolgte die Zugabe von 500 μl des mit Ethanol vorbereiteten HRPE Puffers. Dies wurde erneut bei 15 s bei $\geq 8000 \times g$ (≥ 10.000 rpm) zentrifugiert. Derselbe Puffer wurde nochmals auf die Säule aufgetragen, jedoch folgte eine 2 minütige Zentrifugation bei gleicher Geschwindigkeit, um die Säule zu trocknen und den Ethanol zu entfernen. Im Anschluss wurde die Säule auf ein neues 1,5 ml Eppi platziert und 35 μl RNase-freies Wasser auf die Säule aufgetragen, um die RNA für 1 min bei $\geq 8000 \times g$ (≥ 10.000 rpm) zu eluieren. Die RNA Konzentration wurde am Nano Drop Spektrophometer von Thermo Fisher Scientific gemessen.

2.2.17 Reverse Transkription

Die aus Tumorzellen isolierte RNA wurde im Anschluss mittels Reverse Transkription mit Hilfe des High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits in cDNA umgeschrieben. Die Durchführung erfolgte anhand des Herstellerprotokolls unter RNase-freien Bedingungen. Insgesamt wurden jeweils 1000 ng RNA in cDNA umgeschrieben. Zunächst erfolgte die

MATERIAL UND METHODEN

Zusammensetzung des Mater Mix, welcher 2 µl des 10X RT Buffers, 0,8 µl des 25X dNTP Mix (100 mM), 2 µl des 10X RT Random Hexamer Primers, 1 µl der MultiScribe Reverse Transcriptase, 1 µl RNase Inhibitor und 3,2 µl Nuklease-freies Wasser je Ansatz enthielt (insgesamt 10 µl pro Ansatz). Die Komponenten wurden sorgfältig gemischt und der 2X RT Master Mix wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt. Je Ansatz wurden 10 µl des 2X RT Master Mix mit 10 µl RNA der jeweiligen Probe suspendiert (Gesamtvolumen 20 µl) und anschließend kurz zentrifugiert, um Luftblasen zu eliminieren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben auf Eis gelagert. Die Reverse Transkription erfolgte im GeneAmp PCR System 9700 unter folgenden Einstellungen:

Setting	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur	25°C	37°C	85°C	4°C
Zeit	10 Minuten	120 Minuten	5 Minuten	...

Die erhaltene cDNA wurde mit Nuklease-freiem Wasser auf eine Konzentration von 25 ng/µl verdünnt.

2.2.18 Real Time PCR

Um die gewonnene cDNA und die dort enthaltene MIF Sequenz zu amplifizieren erfolgte die Durchführung einer Real Time Polymerase-Kettenreaktion (real time PCR, RT-PCR) mittels GoTaq® qPCR Master Mix anhand des Herstellerprotokolls. Hierfür wurden je Probe 2 µl cDNA (oder Nuklease-freies Wasser als Kontrolle) mit 10 µl GoTaq® Master Mix, 1 µl des Upstream Primers (10 µM) sowie 1 µl des Downstream Primers (10 µM) und 6 µl Nuklease-freiem Wasser (Gesamtvolumen 20 µl) gemischt und sorgfältig zentrifugiert. Die Amplifikation der Proben erfolgte im PCR C1000 Thermal Cycler.

Setting	Hot Start	Cycle D	Cycle A	Cycle E
Temperatur	95°C	95°C	55°C	72°C
Zeit	5 min	15 sec	30 sec	30 sec

Cycle A für 40 cycles, Melting Curve: 60°C 5 sec, 95°C 5 sec.

MATERIAL UND METHODEN

Die Primer *Melting Temperature* (T_m) für MIF betrug 55°C , die finale Primer Konzentration $0,1 \mu\text{M}$. Als Housekeeping Gen wurde TBP (engl. *TATA-box-binding protein*) verwendet. Die Auswertung erfolgte nach $\Delta\Delta\text{Ct}$.

3. ERGEBNISSE

3.1 Identifizierung und Charakterisierung differentiell exprimierter immunaktiver Proteine im humanem Rhabdomyosarkom Gewebe

3.1.1 Differentiell exprimierte Gene aus Microarray-Genexpressionsanalyse

Mit dem Ziel, neue therapeutische Ansätze im RMS zu identifizieren, wurde in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe eine differentielle Mikroarray-Genexpressionsanalyse mittels Affymetrix U133 Plus2 array in 11 RMS Proben durchgeführt, dabei wurden unter anderem Gewebeproben sowohl von 6 ARMS als auch 5 ERMS verwendet (Armeanu-Ebinger et al., 2011, Herrmann, 2011). Verglichen wurden diese zum einen mit normalem Muskelgewebe, zum anderen zwischen ARMS und ERMS (Armeanu-Ebinger et al., 2011).

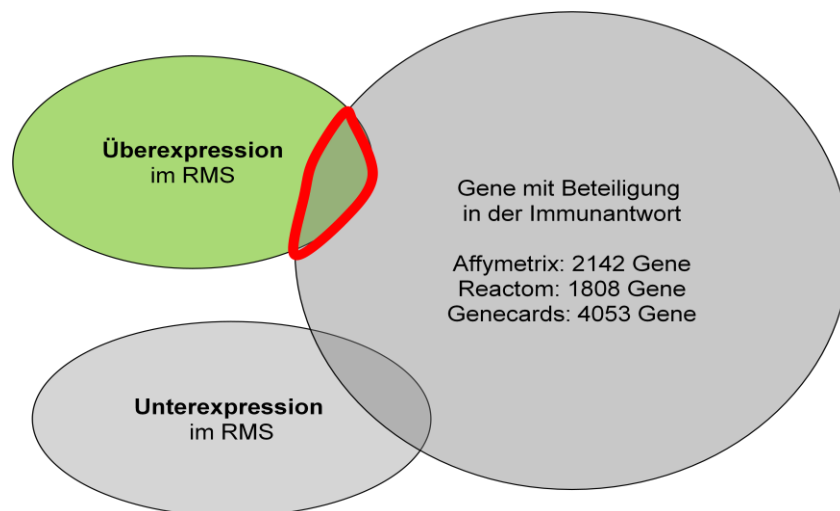


Abbildung 13: Zusammenhang differentiell exprimierter Gene im RMS mit immunmodulatorischen Genen. Schematische Darstellung der Selektion überexprimierter Gene im Rhabdomyosarkom (RMS), die eine Beteiligung in der Immunantwort zeigen.

3.1.2 Vorstellung identifizierter immunmodulatorischer Gene und Proteine

Von diesen differentiell exprimierten Genen im RMS steht jedoch nur ein Teil mit dem Immunsystem in Verbindung (Abbildung 13). Um herauszufinden, welchen Genen immunmodulatorische Funktionen zugeschrieben werden wurden in Vorarbeiten die differentiell exprimierten Gene im RMS mit Genen abgeglichen, bei denen eine Beteiligung in der Immunantwort nachgewiesen wurde. Hierzu wurden Affymetrix, Reactom sowie Genecards verwendet. Mehrere Gene konnten identifiziert werden, die sowohl eine differentielle

ERGEBNISSE

Expression im RMS als auch eine Involvierung mit dem Immunsystem aufwiesen. Eine Auswahl ist in Abbildung 14 dargestellt.

Eine erhöhte Expression von immunmodulatorischen Genen im RMS wurde zudem auch für zahlreiche weitere Gene identifiziert. Daraus bieten sich jedoch nicht alle als mögliche Targets für immuntherapeutische Ansätze an.

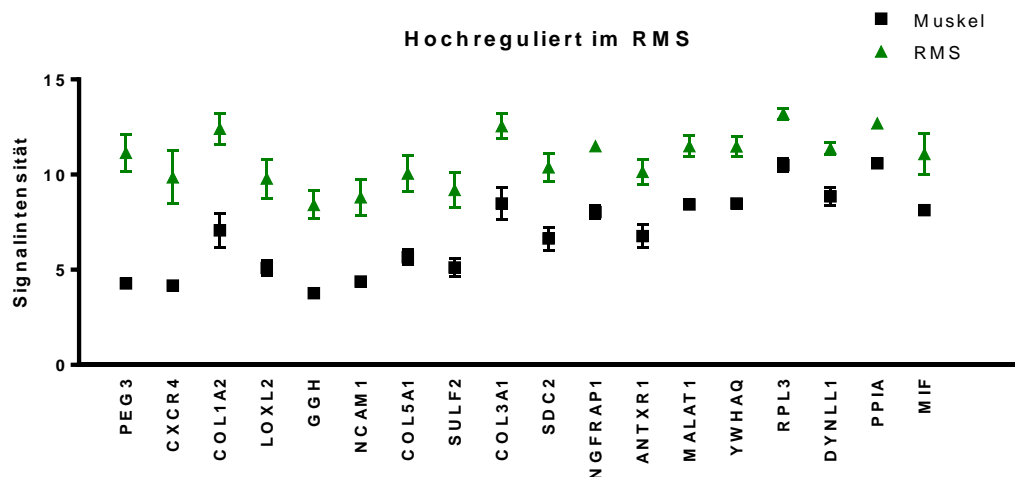


Abbildung 14: Überexprimierte immunmodulatorische Gene im Rhabdomyosarkom verglichen mit Muskelgewebe. Darstellung einer Auswahl von Genen mit erhöhter Expression in Rhabdomyosarkom (RMS) Gewebeproben, die eine Beteiligung in der Immunantwort zeigen. Dargestellt sind die Mittelwerte der 11 RMS Gewebeproben (grün) sowie 8 Muskelgewebeproben (schwarz) mit den jeweiligen Standardabweichungen. Die Signalintensitäten ergaben sich aus der Fluoreszenz der jeweiligen Proben, die im GeneChip-Scanner detektiert und im Anschluss mit der Affymetrix Microarray Suite berechnet wurden. Abbildung und Daten erstellt durch Prof. Dr. Sorin Armeanu-Ebinger.

3.1.3 Selektion und Vorstellung des *macrophage migration inhibitory factor* als putatives differentiell exprimierte Gen im Rhabdomyosarkom

Mittels intensiver Recherche und der Analyse verschiedener potenzieller Gene wurde eine Selektion immunmodulatorischer Proteine mit erhöhter Expression im RMS vorgenommen, die darüber hinaus potenziell relevant im Rahmen des immunogenen Zelltod sein könnten. Als differentiell exprimierte Transkripte wurden die mit der Mikroarray Genexpressionsanalyse erhobenen und anschließend mit der Affymetrix Mikroarray Suite berechneten Signalintensitäten größer oder kleiner zwei definiert. Ein besonderes Augenmerk fiel hierbei unter anderem auf YWHAZ/14-3-3 protein zeta (Bergamaschi et al., 2011, Lin et al., 2009, Li et al., 2010), *heat shock protein 90kDa beta member 1* (HSP90B1) (Cawthorn et al., 2012, Maselli et al., 2012),

ERGEBNISSE

Kollagen Typ V, alpha 1 (Col5a1) (Mohan et al., 2010), CD44 (Jiang et al., 2011, Jaggupilli and Elkord, 2012), *myeloid differentiation primary response 88* (MyD88) (Zhou et al., 2012, Ochi et al., 2012, Cataisson et al., 2012, Wang et al., 2013) sowie MIF. Die Recherche wurde mit Hinblick auf immunmodulatorische Funktionen, der Bedeutung in der Tumorgenese, der Lokalisation des Proteins, dem Verhalten während einer (Chemo-) Therapie sowie der Möglichkeit einer therapeutischen Intervention durchgeführt. Daraus resultierte das *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) Protein (Abbildung 14), welches aufgrund seiner Eigenschaften in der Tumorgenese sowie dessen Einfluss auf das Immunsystem ein vielversprechendes Target im RMS darstellt (Tarnowski et al., 2010a) und einen Signalunterschied im Vergleich zu normalem Muskelgewebe aufweist.

3.2 Analyse des Expressionsprofils von *macrophage migration inhibitory factor* in humanem Rhabdomyosarkom Zellmaterial

3.2.1 Expressionsanalyse von *macrophage migration inhibitory factor* Protein in humanen Rhabdomyosarkom Biopsien

Um die in der differentiellen Genexpressionsanalyse erhaltenen Ergebnisse zu bestätigen, wurde zunächst eine immunhistochemische Darstellung von MIF in humanen Tumor Biopsien durchgeführt. Hierfür wurden Proben eines embryonalen Rhabdomyosarkoms (RMS33; Abbildung 15 C, D) sowie eines hochmalignen desmoplastischen klein- und rundzelligen Tumors (RMS15; Abbildung 15 A, B) verwendet. Wie in Abbildung 15 zu entnehmen, konnte MIF in humanen ERMS Gewebe als auch in einem desmoplastischen Tumor nachgewiesen werden (braun). Weiterhin lässt sich ein Unterschied in der Intensität der Färbung erkennen, korrelierend mit der erhöhten MIF Expression im RMS. Dies wird in Abbildung 15D deutlich, die einen Gewebeanschnitt eines RMS Tumors zeigt sowie in Abbildung 15B, die einen hochmalignen desmoplastischen Tumor demonstriert. Hier stellt sich eine starke MIF Positivität im Bereich der neoplastischen Zellen (weißer Pfeil) im Vergleich zum interstitiellen Bereich mit deutlich reduzierter Färbung (schwarzer Pfeil) dar. MIF wird demnach wie erwartet ubiquitär deprimiert, jedoch in einem weitaus größeren Ausmaß in Tumorgewebe, wie auch im RMS.

ERGEBNISSE

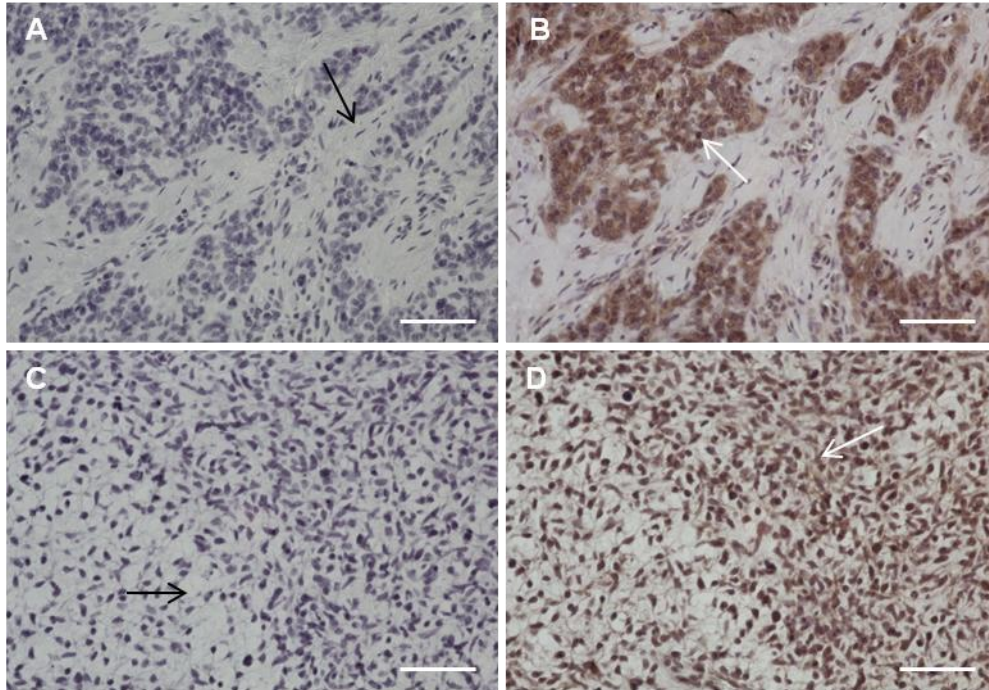


Abbildung 15: Nachweis von *macrophage migration inhibitory factor* Protein in humanem Rhabdomyosarkom Gewebe. (A, C) Hämatoxylin-Färbung eines hochmalignen desmoplastischen klein- und rundzelligen Tumors (A) und eines ERMS (C) in Paraffinschnitten. (B, D) Nachweis des *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) Proteins (braun) in Hämatoxylin gefärbten Paraffinschnitten eines desmoplastischen klein- und rundzelligen Tumors (B) und ERMS (D) mit Hilfe Diaminobenzidin (DAB) Färbung. Blau: Zellkerne; Braun: MIF Protein; Schwarzer Pfeil: Stromazellen; Weißer Pfeil: Tumoröses Gewebe. Standardbalken (weiß) 1 mm.

3.2.2 Expressionsanalyse von *macrophage migration inhibitory factor* Protein *in vitro* mittels Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz

Aufbauend auf den Ergebnissen der differentiellen Genexpressionsanalyse, die eine starke Expression von MIF im RMS demonstrierte, sowie dem Nachweis von MIF Protein in humanem RMS Gewebe, erfolgte die Detektion von MIF in humanen RMS Zelllinien. Sowohl mittels Immunfluoreszenz als auch durchflusszytometrisch wurde das Protein MIF in den RMS Zelllinien Rh30, A204, RD und RMS33-2 sowie in Fibroblasten nachgewiesen (Abbildung 16, 18). Wie in Abbildung 16 zu erkennen, ist das dargestellte Protein MIF im gesamten Zytoplasma, jedoch nicht im Nukleus lokalisiert. Ein Unterschied zwischen den Zelllinien, insbesondere zwischen ARMS und ERMS, konnte nicht festgestellt werden. Eine deutliche Fluoreszenzfärbung sowie dieselbe Lokalisation des MIF Proteins wurden in allen untersuchten Zelllinien (Rh30, RD, RMS33-2) detektiert (Abbildung 16). Diese Ergebnisse wurden im Anschluss mittels durchflusszytometrischer Messung bestätigt, bei der

ERGEBNISSE

intrazelluläres MIF in den humanen RMS Zelllinien Rh30, RD, RMS33-2 und A204 sowie in Fibroblasten nachgewiesen wurde (Kapitel 3.3.1, Abbildung 18). Veranschaulicht wird dies in Abbildung 18. Diese durchflusszytometrisch erhobenen Daten lassen eine deutliche intrazelluläre Expression von MIF in humanen RMS Zellen als auch Fibroblasten erkennen.

ERGEBNISSE

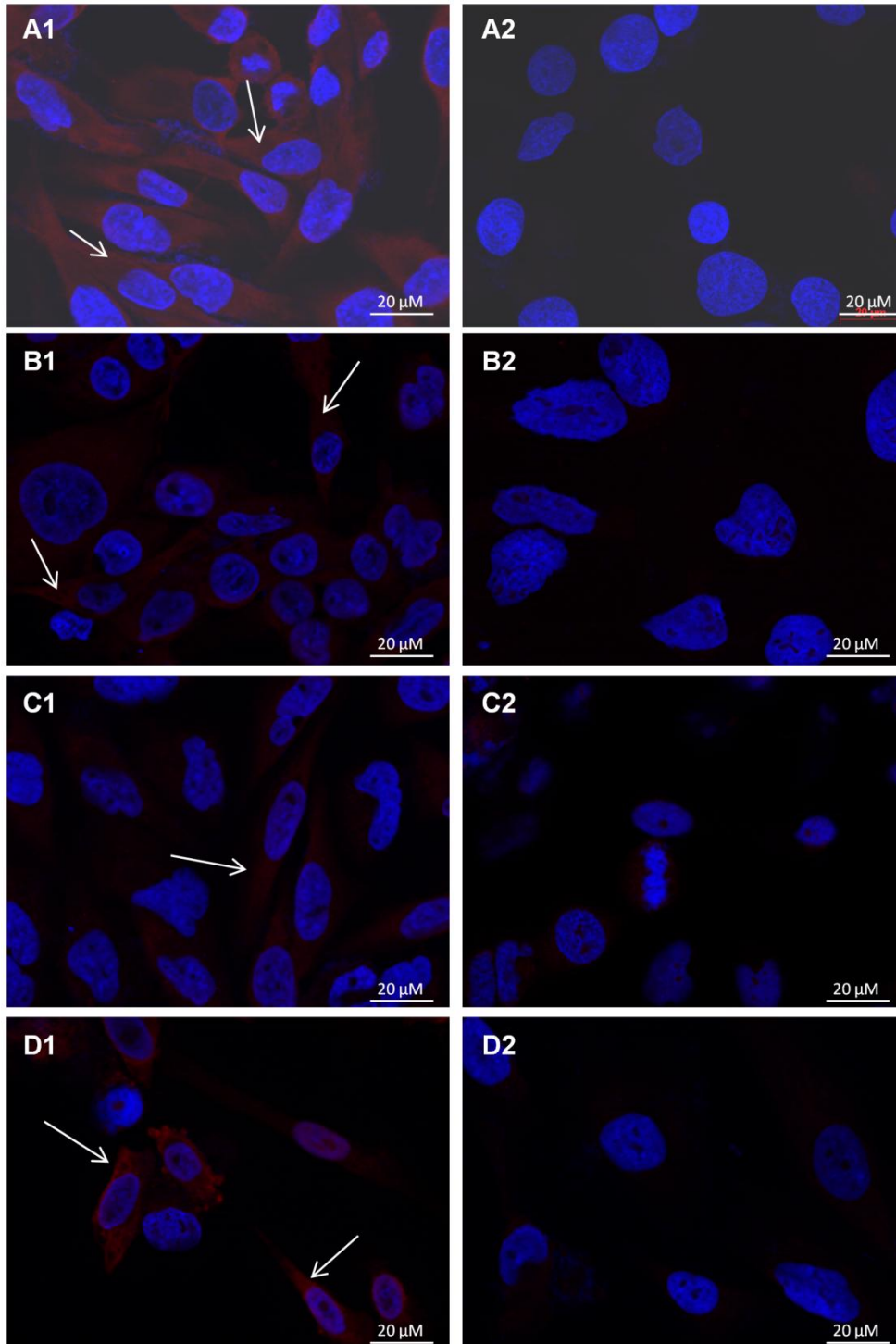


Abbildung 16: Expression von *macrophage migration inhibitory factor* Protein in humanen Rhabdomyosarkom Zelllinien. (A1, B1, C1, D1) Nachweis von *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) Protein (rot) mittels Immunfluoreszenz kolokalisiert mit DAPI Färbung (blau, Zellkerne). (A2, B2, C2, D2) Kontrolle ohne Primärantikörper. (A) Zelllinie A204, (B) Zelllinie RD, (C) Zelllinie Rh30, (D) Zelllinie RMS33-2. Weißer Pfeil: Intrazelluläres MIF Protein. Standardbalken: 20 µm.

3.3 Analyse der Wirkung von Zytostatika auf die Expression von *macrophage migration inhibitory factor*

Die primäre Wirkung von Zytostatika zielt auf einen zytostatischen oder zytotoxischen Effekt ab. Darüber hinaus kann jedoch unter der Behandlung mit konventionellen Chemotherapeutika sowie spezifischen, zielgerichteten Therapien gegen Tumore auch ein verändertes Expressionsprofil von Proteinen und Molekülen sowie eine direkte als auch indirekte Immunstimulation beobachtet werden. Eine herausragende Rolle spielt hierbei der bereits beschriebene *immunogenic cell death*, die erhöhte *antigenicity*, *immuogenicity* sowie *susceptibility*. Um dies für das immunmodulatorische Protein MIF zu analysieren, wurden in der vorliegenden Arbeit RMS Zelllinien mit drei herkömmlichen Zytostatika, welche in der Therapie des kindlichen Rhabdomyosarkoms zum Einsatz kommen (Doxorubicin, Vincristin, Etoposid), behandelt und anschließend das Expressionsverhalten von MIF untersucht.

3.3.1 Zytostatikawirkung auf die Expression von *macrophage migration inhibitory factor* in humanen Rhabdomyosarkom Zelllinien

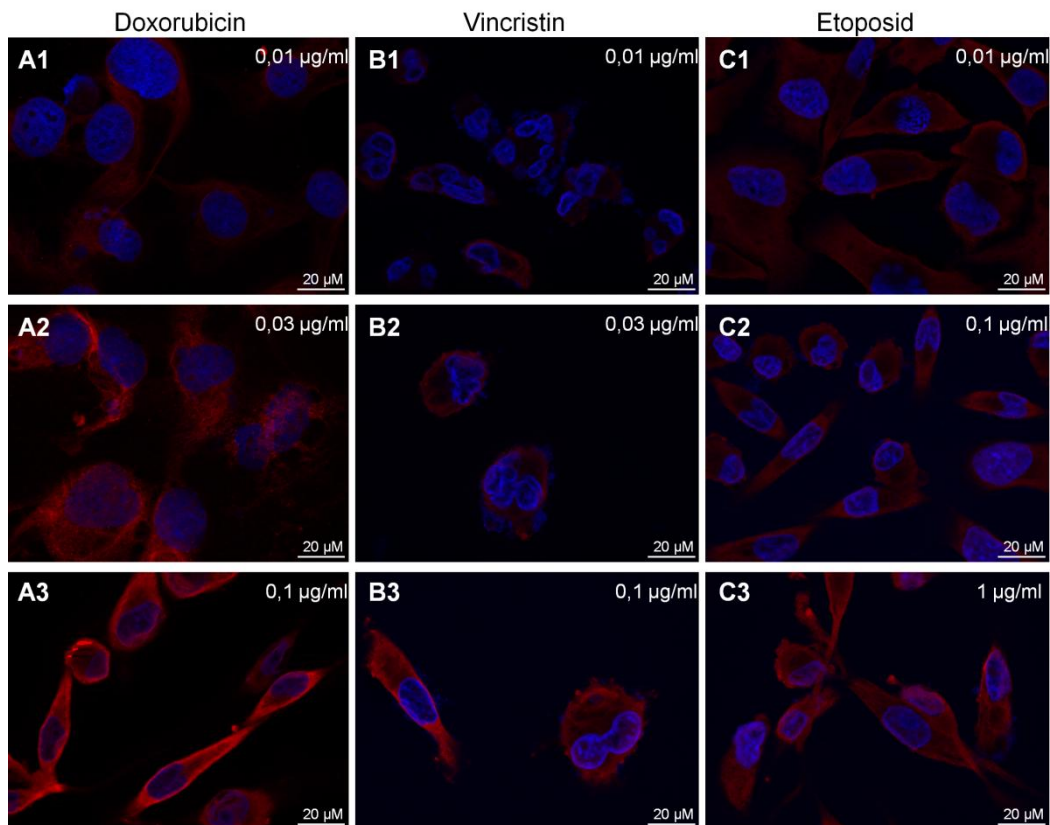
Die humanen RMS Zelllinien A204, RD, Rh30 und RMS33-2 sowie normale Fibroblasten wurden für 48 h mit den Zytostatika Doxorubicin, Vincristin und Etoposid in steigenden Konzentrationen behandelt. Anschließend erfolgte eine Analyse des Expressionsprofils von MIF sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene. Zunächst wurde mittels Immunfluoreszenz nach Behandlung mit allen drei Zytostatika jeweils eine erhöhte Expression von MIF detektiert, welche im Anschluss mittels durchflusszytometrischer Messungen bestätigt werden konnte. Auf RNA-Ebene zeigte sich jedoch keine signifikante Änderung des Expressionsprofils nach 48-stündiger chemotherapeutischer Behandlung.

Zunächst wurde MIF mittels Immunfluoreszenz im gesamten Zytoplasma von RMS Zellen detektiert. Die Behandlung mit steigenden Konzentrationen von Doxorubicin (0,01 µg/ml, 0,03 µg/ml und 0,1 µg/ml) führte zu einer erhöhten intrazellulären Expression von MIF ohne Änderungen in der zellulären Verteilung. Wie in Abbildung 17 dargestellt, kann eine deutliche Intensitätszunahme der Fluoreszenzfärbung (rot) nach erfolgter Behandlung

ERGEBNISSE

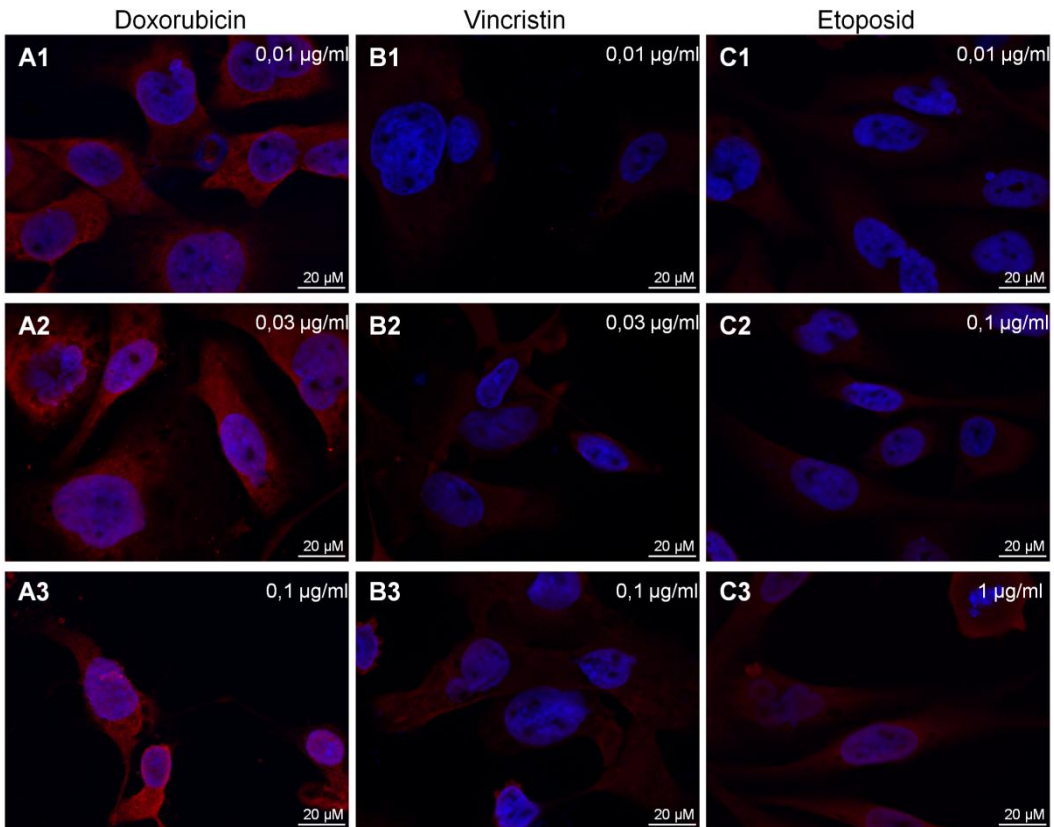
beobachtet werden, welche mit einer erhöhten Expression von MIF einhergeht. Des Weiteren ergab die steigende Konzentration von Doxorubicin eine positive Korrelation in Bezug auf das Färbe- sowie Expressionsverhalten von MIF. Dies konnte außerdem auch für die Zytostatika Vincristin (0,01 µg/ml, 0,03 µg/ml und 0,1 µg/ml) und Etoposid (0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml und 1 µg/ml) nachgewiesen werden (Abbildung 17). Diese Ergebnisse wurden in allen getesteten RMS Zelllinien beobachtet (A204, RD, Rh30, RMS33-2).

A204

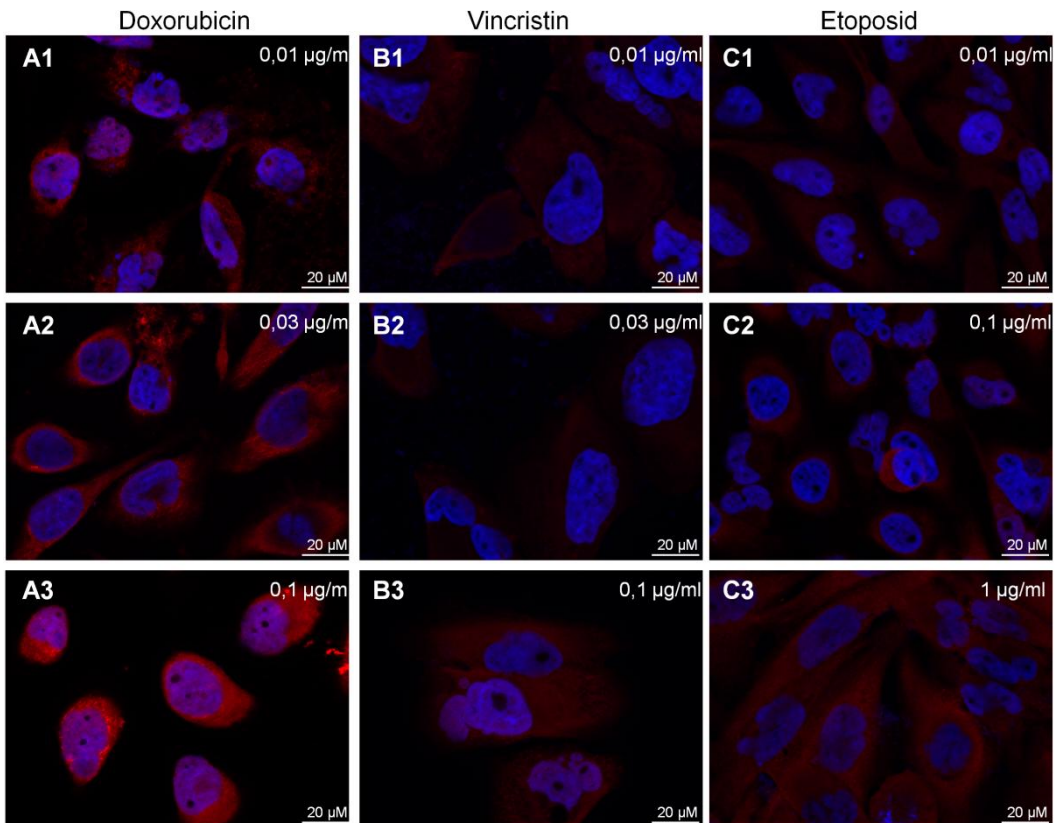


ERGEBNISSE

RD



Rh30



ERGEBNISSE

RMS33-2

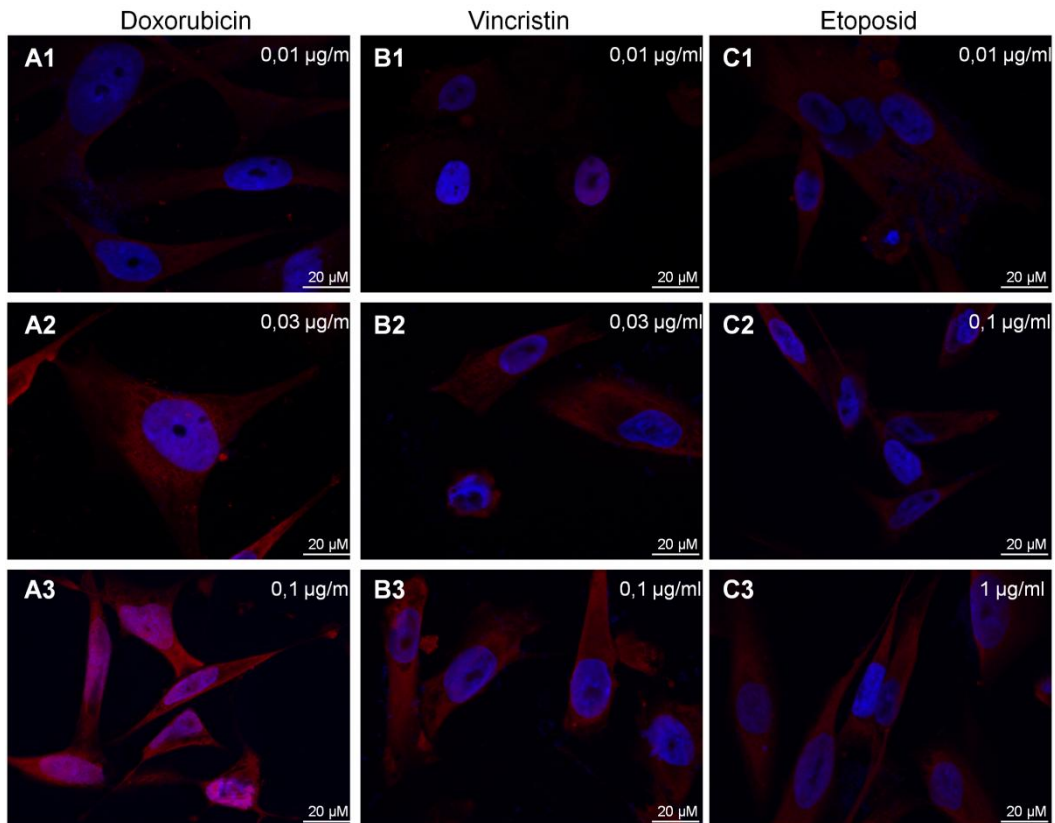


Abbildung 17: Expression von *macrophage migration inhibitory factor* Protein in humanen Rhabdomyosarkom Zelllinien nach Inkubation mit den Zytostatika Doxorubicin, Vincristin und Etoposid. Nachweis von *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) Protein (rot) mittels Immunfluoreszenz kolokalisiert mit DAPI, welches die Zellkerne blau färbt. Die Färbung erfolgte nach 48-stündiger Inkubation mit drei unterschiedlichen Konzentrationen der Zytostatika Doxorubicin (A1-A3), Vincristin (B1-B3) sowie Etoposid (C1-C3). Eine Zunahme der Intensität der Färbung (rot) zeigt sich mit steigenden Konzentrationen aller drei verwendeten Zytostatika, einhergehend mit einer Expressionserhöhung des MIF-Proteins. Abbildung verändert aus (Johler et al., 2016).

Um diese Beobachtungen zu bestätigen, wurden sowohl die unbehandelten als auch die mit den Zytostatika behandelten RMS Zellen durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 18), wobei alle Variablen wie auch die Konzentration der Zytostatika konstant gehalten wurden. Alle vier RMS Zelllinien zeigten eine erhöhte Expression des intrazellulär vorhandenen MIF Proteins nach der Behandlung mit den Zytostatika Doxorubicin, Vincristin und Etoposid. Wie auch bereits mikroskopisch beobachtet, zeigte sich eine positive Korrelation bezüglich der Erhöhung der Konzentration der Zytostatika und der MIF Expression. Hierbei sind insbesondere die mit Vincristin behandelten Zellen hervorzuheben, welche bereits in der geringsten Konzentration des Zytostatikums (0,01 µg/ml) eine intensivere Färbung und somit eine erhöhte

ERGEBNISSE

MIF Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aufwiesen. Die größten Veränderungen im Expressionsmuster nach chemotherapeutischer Behandlung wurden in den Zelllinien RD und RMS33-2 beobachtet, gefolgt von den Zelllinien A204 und Rh30. Im Gegensatz dazu zeigten sich keine Veränderungen der intrazellulären Expression des MIF Proteins nach der Inkubation mit Zytostatika in Fibroblasten (Abbildung 18). Dies deutet darauf hin, dass die Expressionserhöhung von MIF Protein nach Behandlung mit Zytostatika ein genereller Prozess in Tumorzellen, jedoch nicht in normalen Zellen wie beispielsweise Fibroblasten darstellt.

Darüber hinaus wurden Unterschiede sowohl zwischen den Tumorzelllinien als auch den Zytostatika in deren Eigenschaften, MIF zu induzieren, festgestellt. Eine Abhängigkeit der MIF Induktion vom Zelltyp konnte nicht vollständig ausgeschlossen werden. Hierbei zeigte sich beispielsweise, dass in der RMS Zelllinie RD nach der Behandlung mit allen drei Zytostatika eine deutlich verstärkte Induktion der MIF Expression hervorgerufen wurde. Dieses Verhalten konnte auch in der RMS Zelllinie RMS33-2 beobachtet werden, jedoch in weniger ausgeprägter Weise für die Zelllinien Rh30 und A204 (Abbildung 18).

ERGEBNISSE

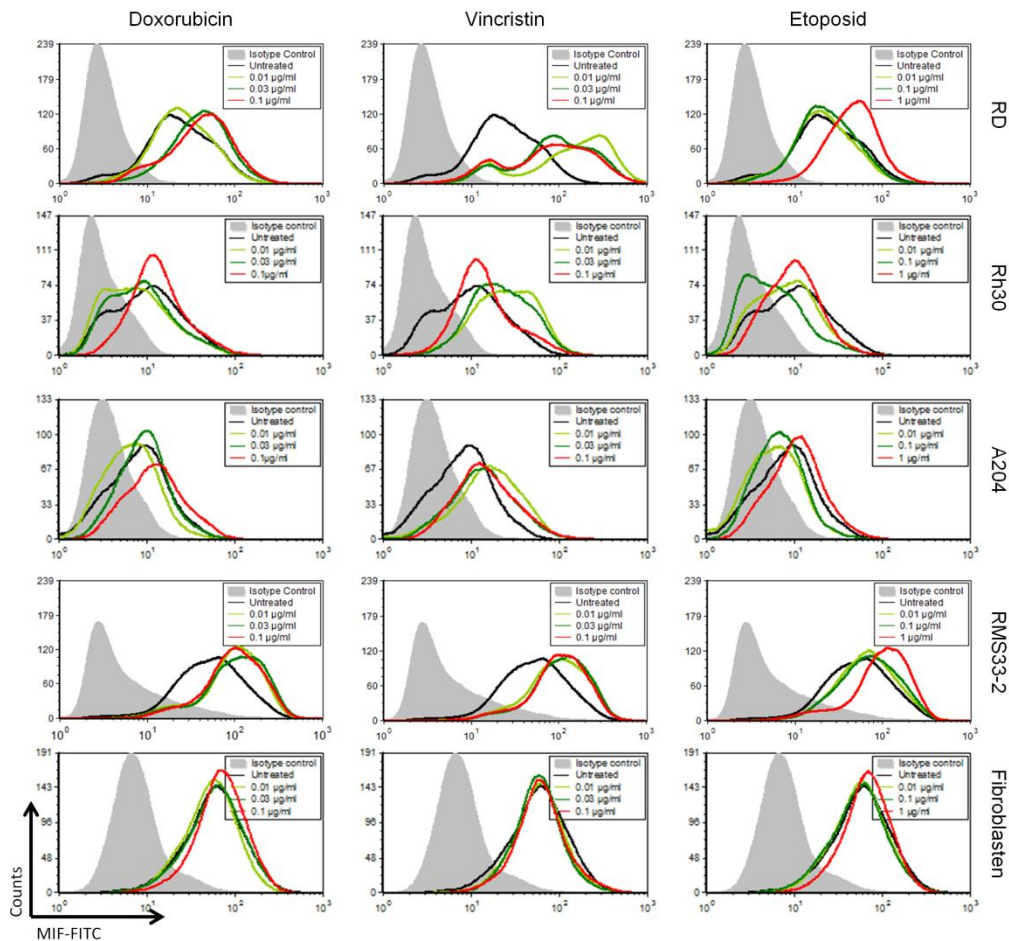


Abbildung 18: Expression von *macrophage migration inhibitory factor* Protein in humanen Rhabdomyosarkom Zelllinien sowie Fibroblasten nach Inkubation mit den Zytostatika Doxorubicin, Vincristin und Etoposid. Nachweis von intrazellulärem *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) Protein mittels Durchflusszytometrie. Die Färbung erfolgte nach 48-stündiger Inkubation mit drei unterschiedlichen Konzentrationen der Zytostatika Doxorubicin (A), Vincristin (B) sowie Etoposid (C). Jeweils in schwarz stellt sich die unbehandelte Kontrolle dar. Als ungefärbte Kontrolle diente weiterhin die grau hinterlegte Fläche. Abbildung verändert aus (Johler et al., 2016).

3.3.2 Zytostatikawirkung auf das Sekretionsverhalten von *macrophage migration inhibitory factor* in humanen Rhabdomyosarkom Zelllinien

Da das Protein MIF nicht nur intrazellulär, sondern auch in einer löslichen, sekretorischen Form vorhanden ist, wurde weiterhin untersucht, ob sich die Sekretion von MIF durch RMS Zellen während der Behandlung mit Zytostatika verändert (Abbildung 19). Sowohl die Kulturbedingungen als auch die Konzentrationen der Zytostatika wurden beibehalten, um nach einer Inkubationszeit von 48 h MIF im Zellkulturüberstand mittels ELISA zu quantifizieren. Abhängig von der Zelllinie wurde eine erhöhte MIF Sekretion in einer Dosis-abhängigen Weise festgestellt, welche in fast allen behandelten

ERGEBNISSE

Kulturen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant höher war (Abbildung 19).

Die Zelllinie RMS33-2 zeigte eine erhöhte Sekretion von MIF im Vergleich zur Negativkontrolle, insbesondere in Gegenwart des Zytostatikums Vincristin, jedoch konnte hier kein signifikanter Unterschied gemessen werden. Im Gegensatz hierzu wurde für die Zelllinien A204 und Rh30 eine signifikant erhöhte Sekretion (bis zu 3-fach) von MIF nach der Behandlung mit Doxorubicin (0,1 µg/ml), Etoposid (1 µg/ml) und zwei Konzentrationen von Vincristin (0,03 und 0,1 µg/ml) detektiert. Zusätzlich wurde für die Zelllinie A204 eine signifikante Zunahme bei 0,03 µg/ml Doxorubicin (ca. 2-fach erhöht) nachgewiesen. Das Zytostatikum Vincristin zeigte bei allen behandelten Zelllinien, mit Ausnahme von RMS33-2, eine signifikant höhere MIF Sekretion im Vergleich zur jeweiligen Negativkontrolle ohne Behandlung mit Zytostatika (Abbildung 19).

Im Gegensatz hierzu sezernierten normale, unbehandelte Fibroblasten eine geringere Menge an MIF (659 ± 3 pg/ml) im Vergleich zu RMS Zellen (3271 ± 161 pg/ml – 6825 ± 132 pg/ml). Obwohl die Sekretion auch bei den Fibroblasten nach Behandlung mit Vincristin ca. 2-fach erhöht war, lag die sezernierte Menge an MIF dennoch unter 15% der korrespondierenden RMS Kulturen (Abbildung 19).

Beobachtet man die Sekretion von MIF während der Behandlung mit Zytostatika nach 24 h und 48 h (Abbildung 20), erkennt man auch hier eine Zunahme der Sekretion in Abhängigkeit der Zeit, insbesondere für das Zytostatikum Vincristin, welches die MIF Sekretion auf nahezu das Doppelte von 4674 pg/ml (24 h) auf 9138 pg/ml (48 h) steigerte. Etoposid zeigte die geringste Zunahme der MIF Sekretion von 24 h (4162 pg/ml) auf 48 h (4659 pg/ml), Doxorubicin hingegen für höhere Konzentrationen (0,1 µg/ml) einen deutlichen Anstieg von 3462 pg/ml (24 h) auf 6283 pg/ml nach einer Behandlungszeit von 48 h (Abbildung 20).

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Daten schließen, dass humane RMS Zellen große Mengen an MIF exprimieren und sezernieren. Des Weiteren kann

ERGEBNISSE

festgehalten werden, dass durch die Behandlung von humanen RMS Zellen mit klinisch gebräuchlichen Zytostatika wie Doxorubicin, Vincristin und Etoposid die Sekretion von MIF in Abhängigkeit von der Expositionszeit als auch der Konzentration der Zytostatika signifikant gesteigert wird. Dagegen konnte dieser Effekt in nicht-Tumor Zellen, beispielsweise in Fibroblasten, nicht beobachtet werden.

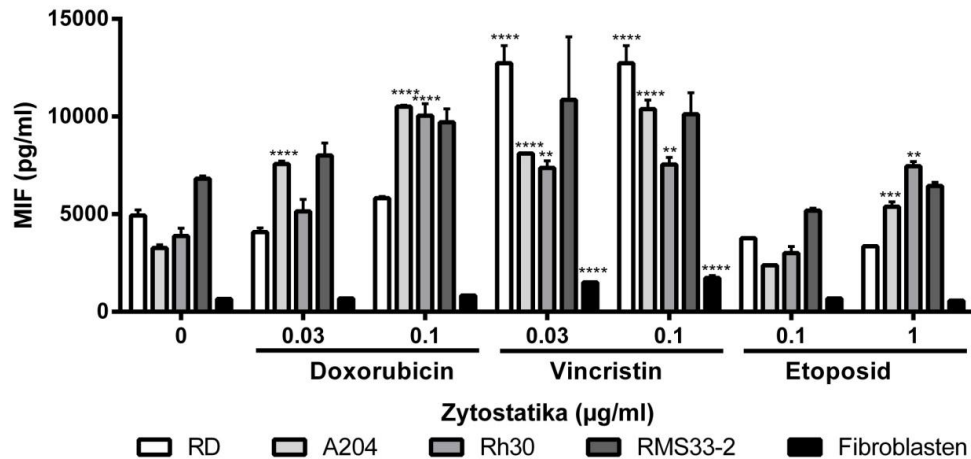


Abbildung 19: Sekretion von *macrophage migration inhibitory factor* Protein in humanen Rhabdomyosarkom Zelllinien sowie Fibroblasten nach Inkubation mit den Zytostatika Doxorubicin, Vincristin und Etoposid. Nachweis von sezerniertem MIF Protein mittels ELISA. Die Detektion von MIF Protein im Zellkulturüberstand erfolgte nach 48-stündiger Inkubation der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der Zytostatika Doxorubicin, Vincristin sowie Etoposid. Die unbehandelten Kontrollen stellen sich auf der Abszisse unter 0 (µg/ml) dar. Gemessen wurde die Menge an MIF mit zwei unabhängigen Replikaten und ist als Mittelwert und *standard error of the mean* (SEM) dargestellt. Signifikant erhöhte MIF Sekretion wurde sowohl in jeder RMS Zelllinie als auch mit allen verwendeten Zytostatika nachgewiesen (** P < 0,05, **** P < 0,0001, *Bonferroni's multiple comparisons test*). Abbildung verändert aus (Johler et al., 2016).

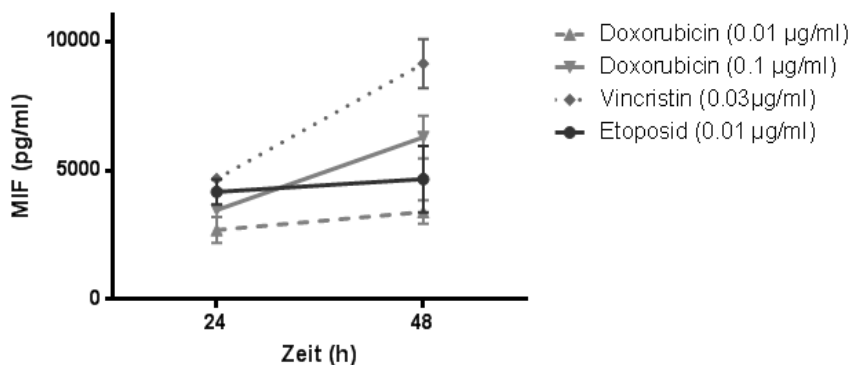


Abbildung 20: Sekretion von *macrophage migration inhibitory factor* Protein in humanen Rhabdomyosarkom Zelllinien nach Inkubation mit den Zytostatika Doxorubicin, Vincristin und Etoposid abhängig von der Inkubationszeit. Nachweis von sezerniertem *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) Protein mittels ELISA. Die Detektion von MIF-Protein im Zellkulturüberstand erfolgte nach 24- sowie nach 48-stündiger Inkubation Rhabdomyosarkom Zellen A204 mit unterschiedlichen Konzentrationen der Zytostatika Doxorubicin, Vincristin sowie Etoposid. Gemessen wurde die Menge an MIF mit zwei unabhängigen Replikaten und ist als Mittelwert und *standard error of the mean* (SEM) dargestellt. Bei allen drei Zytostatika konnte eine Zunahme der MIF Konzentration im Zellkulturüberstand zwischen 24 und 48 h beobachtet werden.

3.3.3 Zytostatikawirkung auf die RNA Produktion von *macrophage migration inhibitory factor* in humanen Rhabdomyosarkom-Zelllinien

Um die Zytostatikawirkung auf RMS Zellen nicht nur auf Proteinebene, sondern auch auf Ebene der RNA Produktion zu analysieren, wurden Rh30 sowie RD Zellen wie oben beschrieben behandelt und im Anschluss eine RNA Isolierung, reverse Transkription und Real Time PCR (RT-PCR) durchgeführt. Im Gegensatz zu der beobachteten Expressionserhöhung von MIF Protein durch die Behandlung mit Zytostatika konnte dieser Effekt nicht auf RNA Ebene nachgewiesen werden (Abbildung 21). Für die Zelllinie RD wurde keine Veränderung in der RNA Expression detektiert, es wurde weder eine Über- noch eine Unterexpression gezeigt. Auch für die Zelllinie Rh30 wurde keine Expressionserhöhung nachgewiesen, jedoch eine geringfügige Abnahme der MIF RNA im Rahmen der Behandlung mit der geringsten Konzentration von Vincristin (0,01 µg/ml). Aufgrund dieser Resultate wurde auf eine Analyse weiterer Zelllinien verzichtet.

ERGEBNISSE

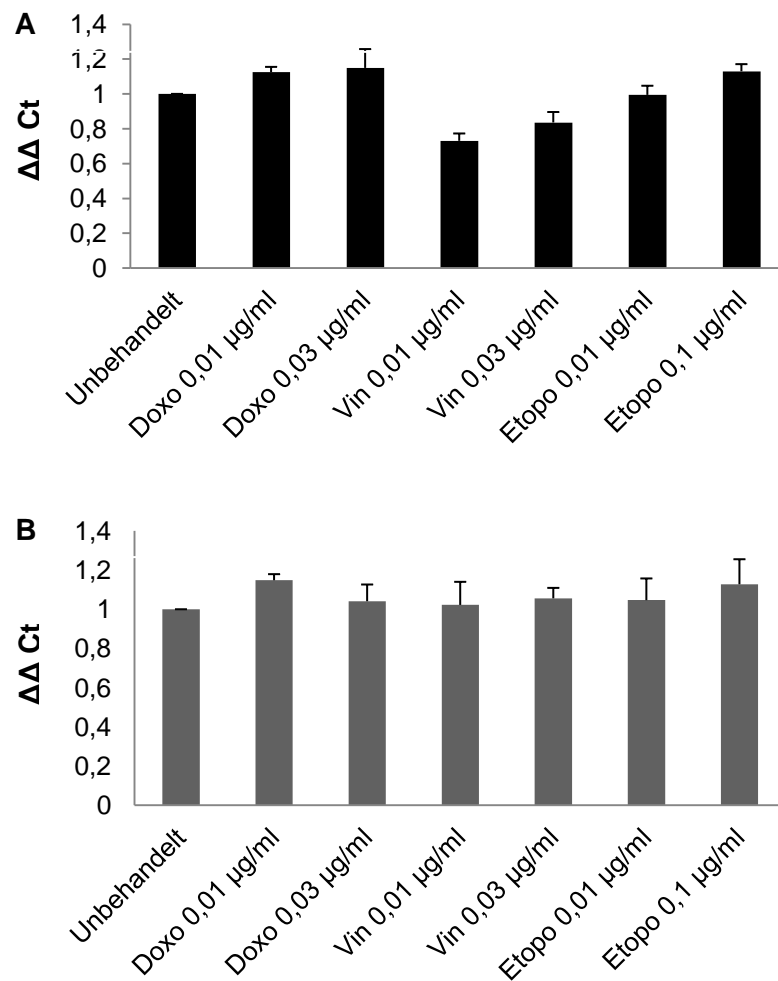


Abbildung 21: Expression von *macrophage migration inhibitory factor* RNA in den humanen Rhabdomyosarkom Zelllinien Rh30 und RD nach Inkubation mit den Zytostatika Doxorubicin, Vincristin und Etoposid. Nachweis von *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) RNA mittels Real Time PCR (RT-PCR). Die Detektion erfolgte nach 48-stündiger Inkubation mit jeweils zwei unterschiedlichen Konzentrationen der Zytostatika Doxorubicin (Doxo), Vincristin (Vin) sowie Etoposid (Etopo). Für die Zelllinie RD (B) ergab sich keine Expressionserhöhung von MIF auf RNA Ebene. Eine geringe Abnahme der Expression wurde für die Zelllinie Rh30 (A) in der geringsten Konzentration von Vincristin (0,01 µg/ml) nachgewiesen. Es wurden drei unabhängige Replikate verwendet, dargestellt sind jeweils der Mittelwert sowie der *standard error of the mean* (SEM) der Replikate. Normiert wurde auf das Housekeeping Gen *TATA-box-binding protein* (TBP), die Auswertung erfolgte nach delta delta Ct.

3.4. Wirkung von *macrophage migration inhibitory factor* auf die Viabilität und Migration von Rhabdomyosarkom Zellen

3.4.1 Analyse der Blockade von *macrophage migration inhibitory factor* auf die Zellviabilität von humanen Rhabdomyosarkom Zellen

Um herauszufinden, ob die Inhibierung der Aktivität von MIF eine Reduktion der RMS Zellviabilität zur Folge hat, wurde die Viabilität der Tumorzellen als auch der Fibroblasten mittels MTT-Assay bestimmt. Hierfür wurden RMS Zellen sowie Fibroblasten mit den MIF Inhibitoren Ant.III 4-IPP, Ant. V, ISO-1, SF als auch ein MIF-blockierender Antikörper in steigenden Konzentrationen über 72 h inkubiert, gefolgt von einer Messung der Viabilität mittels MTT (Abbildung 22). Weder der blockierende MIF-Antikörper noch ISO-1 führte zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität, welche selbst bei hohen Konzentrationen von 100 μM über 75% blieb (Abbildung 22). Einen geringen Einfluss auf die Viabilität von RMS Zellen bis auf 75% zeigte Ant. V (Abbildung 22). Den effektivsten Inhibitor der Zelllinie A204 mit einer IC_{50} von 72 μM stellte Ant.III 4-IPP dar, welcher die Viabilität in hohen Konzentrationen beeinträchtigte, diese jedoch nie unter 50% fiel (Abbildung 22). Im Gegensatz hierzu führte eine Behandlung mit SF zu einer Dosis-abhängigen Beeinträchtigung der RMS Zellviabilität in allen untersuchten Zelllinien. Dementsprechend legen diese Ergebnisse einen anti-proliferativen Effekt von SF auf RMS-Zellen nahe (Abbildung 22) und nur gering in hohen Konzentrationen bei Fibroblasten. Die IC_{50} von SF für die Zelllinie RMS33-2 lag bei einer Konzentration von 43 μM , wohingegen in den anderen RMS Zelllinien die IC_{50} von SF jeweils um 15 μM lag (A204, 14 μM ; RD, 17,7 μM ; Rh30, 15 μM). In nicht-Tumorzellen wie Fibroblasten konnte diese ausgeprägte Reduktion der Viabilität nach Behandlung mit SF nicht nachgewiesen werden. Hier zeigte sich erst ab hohen Konzentrationen von SF einen Einfluss auf die Viabilität, jedoch in geringer ausgeprägter Form als auf Tumorzellen (Abbildung 22).

ERGEBNISSE

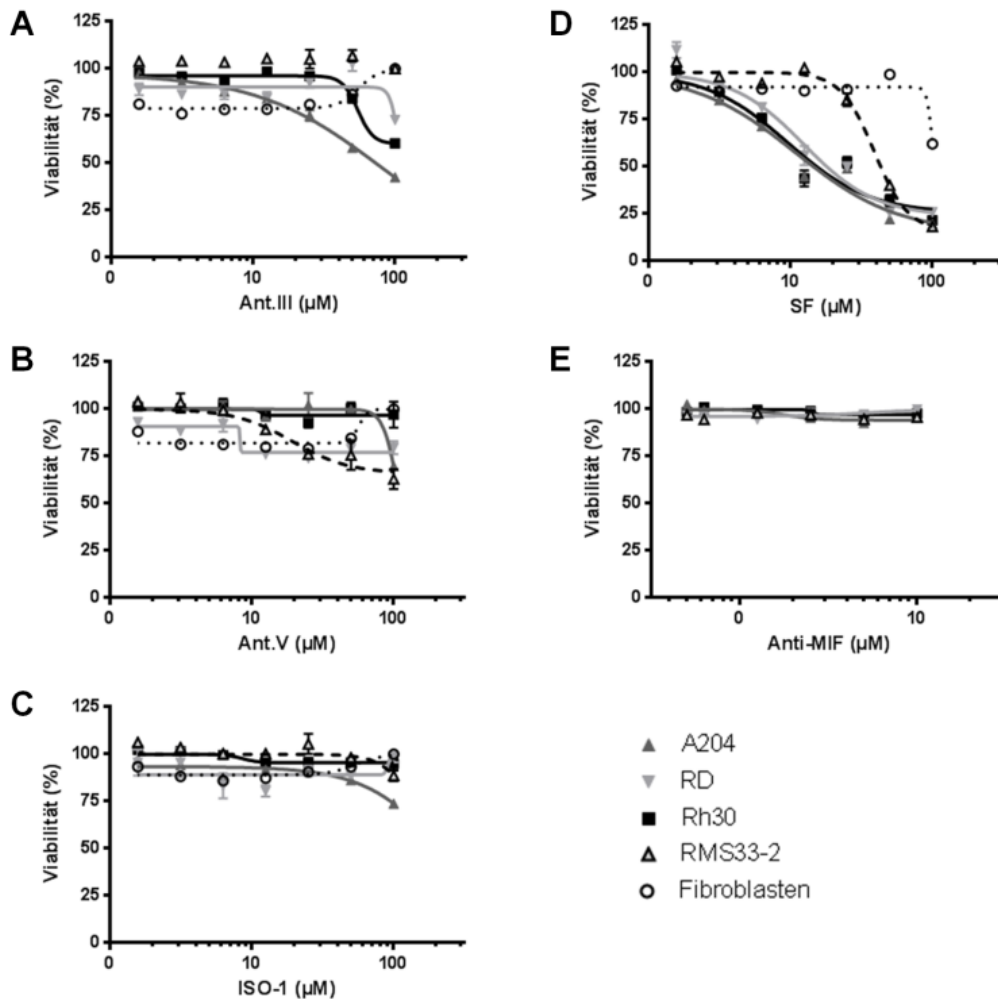


Abbildung 22: Einfluss von Inhibitoren des *macrophage migration inhibitory factors* auf die Viabilität von Rhabdomyosarkom Zellen und Fibroblasten. A204, RD, Rh30, RMS33-2 Zellen sowie Fibroblasten wurden für 72 h mit steigenden Konzentrationen der *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) Inhibitoren Ant.III (A), Ant.V (B), ISO-1 (C), SF (D) sowie dem blockierenden anti-MIF Antikörper (E) inkubiert und mittels MTT-Assay analysiert. Die Ergebnisse wurden auf die jeweiligen unbehandelten Zellkulturen berechnet (Negativkontrolle, 100% Viabilität). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen von drei unabhängigen Replikaten. Eine nennenswerte Reduktion der Viabilität von Rhabdomyosarkom Zellen konnte nur für SF nachgewiesen werden. Abbildung verändert aus (Johler et al., 2016).

Weiterführend wurde die Viabilität von RMS Zellen mit gebräuchlichen Zytostatika und der Kombination von MIF Inhibitoren untersucht. Um die Interaktion von MIF Inhibitoren mit Zytostatika zu analysieren, wurden RMS Zellen mit Doxorubicin in Kombination mit entweder ISO-1 oder SF behandelt (Abbildung 23). Es wurde dieselbe Anzahl von Tumorzellen verwendet, das Zytostatikum Doxorubicin in aufsteigenden Konzentrationen sowie jeweils drei unterschiedliche Konzentrationen von SF oder ISO-1. Wie in Abbildung 23

ERGEBNISSE

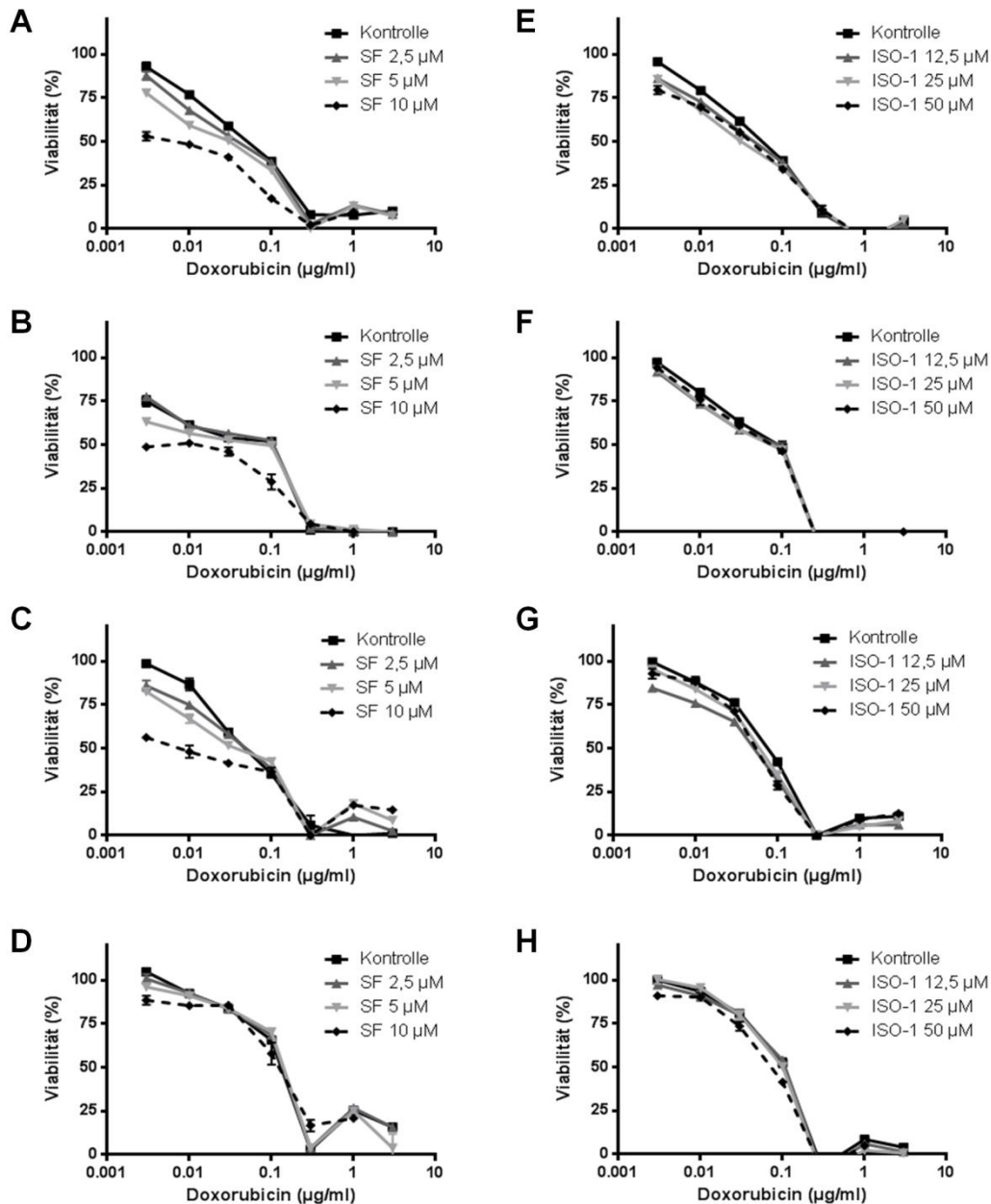


Abbildung 23: Einfluss von MIF Inhibitoren Sulforaphane (SF) und ISO-1 in Kombination mit dem Zytostatikum Doxorubicin auf die Viabilität von RMS Zellen. A204 (A, E), RD (B, F), Rh30 (C, G) und RMS33-2 (D, H) Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen von Doxorubicin (0,001 – 10 µg/ml) sowie SF (2,5; 5; 10 µM) oder ISO-1 (12,5; 25; 50 µM) für 72 h inkubiert und mittels MTT-Assay analysiert. Die relative Viabilität wurde in Relation zu den jeweiligen unbehandelten RMS Zellen gesetzt (Negativkontrolle, 100% Viabilität). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen von drei unabhängigen Replikaten. Eine signifikante Reduktion der Viabilität von RMS Zellen in der Kombination von Doxorubicin mit ISO-1 konnte nicht beobachtet werden. Dagegen führte die Kombination des Zytostatikums mit SF in den Zelllinien A204, RD und Rh30 zu einem additiven Effekt, insbesondere in geringen Konzentrationen von Doxorubicin (0,003 – 0,1 µg/ml) und 10 µM SF. Abbildung verändert aus Jöhler *et al.* (2016).

ERGEBNISSE

deutlich zu sehen, konnte die Kombination von Doxorubicin mit ISO-1 keine Verstärkung der Inhibierung der RMS Zellviabilität erzielen (Abbildung 23 E-H). Die Behandlung von RMS Zellen mit Doxorubicin zusammen mit SF führte hingegen zu einer additiven Wirkung, insbesondere für geringe Konzentrationen von Doxorubicin (0,003 – 0,1 µg/ml) und 10 µM SF (Abbildung 23 A-D).

3.4.2 Analyse der Migration humaner Rhabdomyosarkom Zellen nach Inhibierung des *macrophage migration inhibitory factor*

Die Metastasierung von RMS Tumoren hängt mit der Motilität von RMS Zellen zusammen, wobei auch MIF, welches von Tumoren produziert und auch sezerniert wird, die Motilität von verschiedenen Tumorzellen fördern könnte. Aufgrund dessen wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob eine Inhibierung von MIF zu einer Beeinflussung der Migration von RMS Zellen führt. Hierfür wurde in einem sogenannten Migrationsassay der zellfreie Spalt zwischen Zweikammer-Kultureinsätzen nach 0, 5 und 24 h gemessen, beispielhaft ist in Abbildung 24 die Zelllinie Rh30 dargestellt. RD und Rh30 Zellen migrierten dabei schneller als A204 und insbesondere RMS33-2 Zellen.

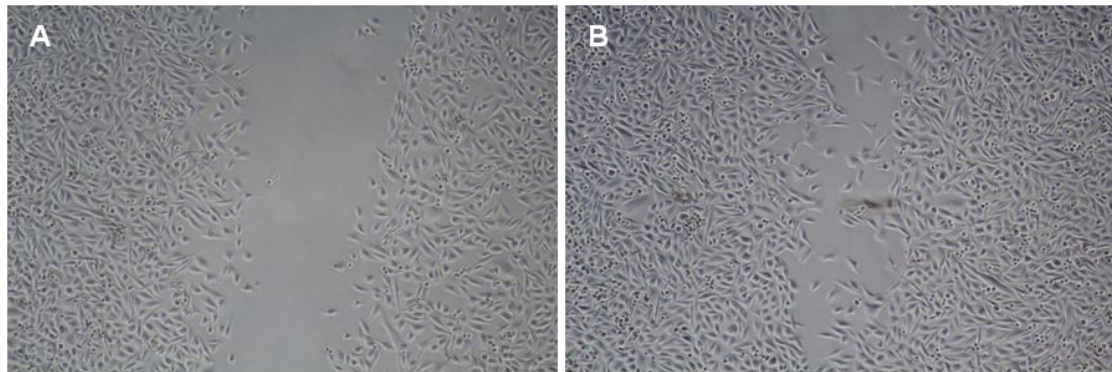


Abbildung 24: Migration von Rh30 Zellen. RMS Zellen wurden in Zweikammer Kultureinsätzen ausplattiert. Nach Entfernen der Einsätze wurde der zellfreie Spalt nach 0, 5 sowie 24 h gemessen. Dargestellt sind beispielhaft Rh30 Zellen (A) 5 h sowie (B) 24 h nach der Entfernung der Einsätze in unbehandelten Kontrollen. Nach 24 h wurde ein Überwachsen des zellfreien Spaltes und somit eine Migration der Rh30 Zellen beobachtet.

Die Zugabe der MIF Inhibitoren Ant. III 4-IPP (25 µM), Ant. V (25 µM), ISO-1 (25 µM), SF (3 µM) sowie des blockierenden anti-MIF Antikörpers (2 µg/ml) zu den jeweiligen Kulturen führte zu einer Zell- und Inhibitor-abhängigen Reduktion der Migration im Migrations-Assay (Abbildung 25). Die Konzentrationen der

ERGEBNISSE

Inhibitoren wurden anhand der zuvor ermittelten MTT Ergebnisse ausgewählt. Der größte Einfluss auf die Zellmigration wurde nach 5 h beobachtet. Die Behandlung mit SF führte in fast allen Kulturen zu einer geringeren Zellmigration nach 5 h (RMS33-2: 5-fach geringere Migration, Rh30: 40% \pm 0,6% der unbehandelten Kontrolle, A204: 56,6% \pm 17,5 % der unbehandelten Kontrolle) und auch nach 24 h (von 52% \pm 8,8% (RMS33-2) bis 93,8% \pm 1,7 % (RD)) im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (Abbildung 25). Der MIF blockierende Antikörper hatte in den Zelllinien Rh30, A204 und RMS33-2 nur einen minimalen bis keinen Einfluss auf die Reduktion der Zellmigration (RMS33-2: 99,7% \pm 21,8% nach 5 h und 125,7% \pm 5,6% nach 24 h; Rh30: 108,0% \pm 8,9% nach 5 h und 98,3% \pm 4,7% nach 24 h; bezogen auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle) (Abbildung 25 A, C, D). Allerdings demonstrierte derselbe Antikörper eine ausgeprägte Reduktion der Zellmigration in der Zelllinie RD, welche im Vergleich zur Kontrolle nach 5 h nur 38,2% \pm 17,9% sowie 54,3% \pm 7,5% nach 24 h migrierte (Abbildung 25 B). Der Einfluss von MIF auf die Migration von RMS Zellen wurde zusätzlich mittels weiterer spezifischer *small molecules* bestätigt. So zeigten die Inhibitoren Ant. V (19,1% \pm 11,6% der Kontrolle) sowie Ant.III (47,3% \pm 15,3% der Kontrolle) den größten hemmenden Einfluss auf die Migration von Rh30 Zellen (Abbildung 25 C), wohingegen ISO-1 (30,7% \pm 5,3% der Kontrolle) in der Zelllinie RD nach 5 h die höchste hemmende Eigenschaft besaß (Abbildung 25 B). Darüber hinaus ergab die Behandlung mit ISO-1 auch bei den Zelllinien Rh30 (34,8% \pm 4,7% nach 5 h im Vergleich zur Kontrolle) sowie RMS33-2 (50,5% \pm 15,6% nach 5 h im Vergleich zur Kontrolle) eine deutliche Abnahme der Migration, jedoch nicht in der Zelllinie A204 (Abbildung 25). Auch der Inhibitor Ant. V demonstrierte nicht nur in der Zelllinie Rh30 das außerordentliche Potenzial, die Tumorzellmigration zu beeinträchtigen, sondern auch in den Zelllinien RD (19,6% \pm 25,8% nach 5 h im Vergleich zur Kontrolle) sowie RMS33-2 (45,8% \pm 6,9% nach 5 h im Vergleich zur Kontrolle) (Abbildung 25 B und D). Insgesamt scheint die Blockade von MIF durch die getesteten Inhibitoren insbesondere zu einem frühen Zeitpunkt sowie bei sich schnell teilenden Zellen (Rh30, RD) eine

ERGEBNISSE

herausragende Rolle zu spielen und zu einer Reduktion der Zellmigration von RMS Tumorzellen beizutragen.

Diese Beobachtungen legen nahe, dass MIF die Motilität von RMS Zellen verstärkt und daher auch in der Lage sein kann, die Metastasierung von RMS Tumoren zu modulieren.

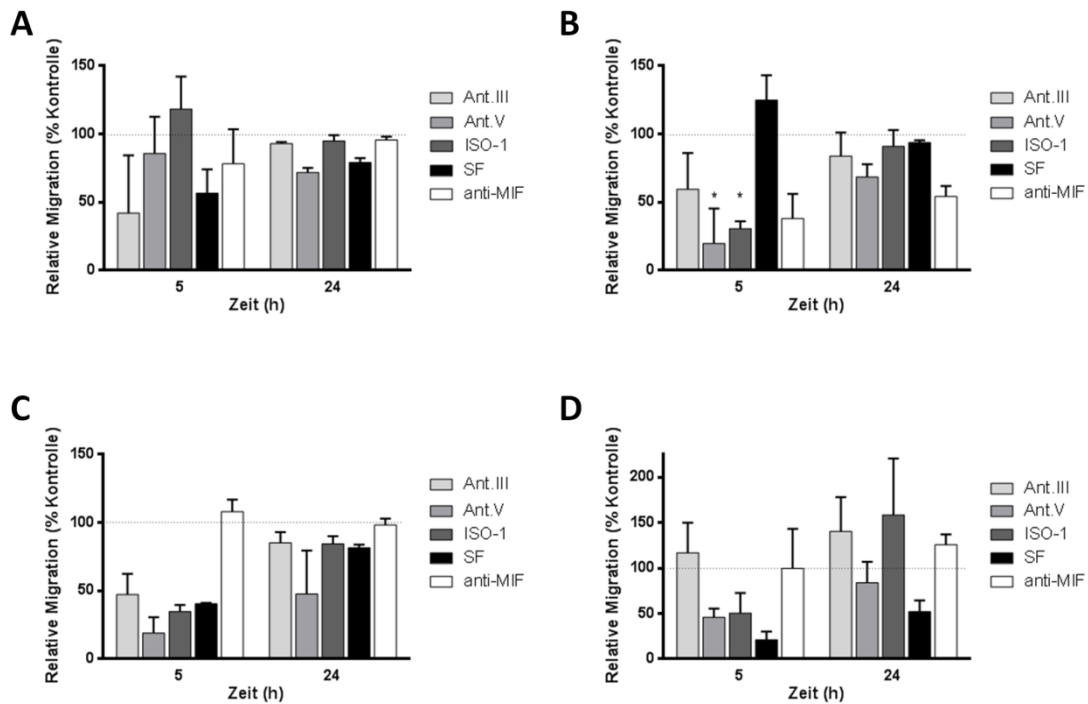


Abbildung 25: Einfluss von Inhibitoren des macrophage migration inhibitory factors auf die Migration von Rhabdomyosarkom Zellen. A204 (A), RD (B), Rh30 (C) und RMS33-2 (D) Zellen wurden jeweils mit den macrophage migration inhibitory factor (MIF) Inhibitoren Ant. III (25 μ M), Ant. V (25 μ M), ISO-1 (25 μ M), SF (3 μ M) sowie dem blockierenden anti-MIF Antikörper (2 μ g/ml) nach Entfernen der Zweikammer-Kultureinsätze inkubiert. Der zellfreie Spalt wurde nach 0, 5 sowie 24 h evaluiert und in Relation zu den unbehandelten Kontrollen gesetzt (100%). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte sowie der jeweilige *standard error of the mean* (SEM). Der hemmende Einfluss auf die Migration von RMS Tumorzellen durch die Blockade von MIF zeigt sich abhängig von den jeweiligen Zelllinien, der Zeit als auch den eingesetzten Inhibitoren. Eine deutliche Reduktion der Migration war in manchen Behandlungen ersichtlich (*). Abbildung verändert nach (Johler et al., 2016).

3.5. Wirkung von *macrophage migration inhibitory factor*-haltigem Zellüberstand von Rhabdomyosarkom Zellen auf das Immunverhalten von Zellen *in vitro*

3.5.1 Wirkung von *macrophage migration inhibitory factor*-haltigem Zellüberstand von Rhabdomyosarkom Zellen auf die T Zell Proliferation

Um das Verhalten von aus Tumorzellen sezerniertem MIF auf das Immunsystem zu analysieren, wurde in der vorliegenden Arbeit die Proliferation von T Zellen auf MIF-haltigen RMS-Zellüberstand untersucht. PBMCs, welche zuvor aus Vollblut mittels Ficoll®-Dichtegradientenzentrifugation isoliert wurden, wurden über 5 Tage mit RMS-Zellüberstand kultiviert. Dieser wurde vor Zugabe zu den PBMCs über mindestens 2-3 Tage von konfluent wachsenden RMS-Kulturen gewonnen, um möglichst große Mengen an MIF Protein im Überstand zu erhalten. Mittels Zugabe der MIF Inhibitoren Ant.III 4-IPP (50 µM), ISO-1 (50 µM), zwei Konzentrationen von SF (3 und 10 µM) sowie blockierenden anti-MIF Antikörpern (1 und 2 µg/ml) wurde getestet, ob sich die Inhibierung von MIF auf die T Zell Proliferation auswirkt. Zusätzlich wurden die PBMCs mit 200 IU/ml Interleukin-2 (IL-2) sowie 1 ng/ml anti-CD3 Antikörper (Klon OKT3) stimuliert. Mittels Durchflusszytometrie auf CD3 PE/Cy7 wurde die CD3+ T Zell Population ermittelt, die Proliferationsaktivität wurde mittels CFSE dargestellt (Abbildung 26).

Zunächst erfolgte die Kultivierung der PBMCs ohne Stimulation mit IL-2 und OKT3, hierbei konnte jedoch keine Proliferation der CD3 positiven Zellen erreicht werden. Erst durch Zugabe von IL-2 und dem stimulierenden Antikörper OKT3 wurden die T Zellen zur Proliferation angeregt und konnten mittels CFSE detektiert werden. Die unstimulierten als auch die unbehandelten Zellen dienten als Kontrollen.

Bereits durch die Kultivierung von PBMCs ausschließlich mit RMS Zellüberstand (und IL-2, OKT3) konnte eine Beeinträchtigung der T Zell Proliferation mittels CFSE Assay festgestellt werden (Abbildung 26 A-D). Der Unterschied zwischen stimulierter Kontrolle ohne RMS Zellüberstand vs. mit RMS Zellüberstand bewegte sich zwischen minimal 5,4% (Abbildung 26 C) bis maximal 15,7% (Abbildung 26 A). Die Zugabe von MIF Inhibitoren zu den

ERGEBNISSE

PBMCs wie SF (hohe Konzentration, 10 μ M) (Abbildung 26 C) und Ant. III 4-IPP (50 μ M) (Abbildung 26 B) unterdrückten die T Zell Proliferation bis zu 70-fach sowohl in Kulturen mit RMS Zellüberstand als auch ohne. Eine nur geringe Beeinflussung der Proliferation CD3 positiver Immunzellen wurde dagegen nach der Behandlung mit geringen Konzentrationen von SF (3 μ M) (Abbildung 26 C), anti-MIF Antikörpern (Abbildung 26 D) oder ISO-1 (50 μ M) (Abbildung 26 A) beobachtet.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass der Zellüberstand von RMS Tumorzellen bereits zu einer Beeinträchtigung der Proliferation von Immunzellen und somit zu einem immunsuppressiven Effekt führt. Dies kann unter anderem auf dem von Tumorzellen sezerniertem MIF im Zellüberstand zurückzuführen sein, andererseits auch auf andere Faktoren, die von den RMS Zellen abgegeben werden. Die Zugabe der MIF Inhibitoren SF (3 μ M), ISO-1 (50 μ M) oder blockierenden anti-MIF Antikörpern zusätzlich zu den RMS Zellüberständen führte nur zu einer geringfügigen Abnahme der T Zell Proliferation verglichen mit den jeweiligen Ansätzen von PBMCs mit RMS Zellüberstand ohne Inhibitor. Einerseits deutet dies darauf hin, dass sezerniertes MIF am ehesten keinen Einfluss auf die Proliferation von Immunzellen hat, andererseits wären diese Inhibitoren geeignet, den darüber hinaus gehenden immunsuppressiven Effekt von MIF zu inhibieren, ohne die gewünschte Proliferation der gegen den Tumor gerichteten T Zellen zu verhindern. Im Gegensatz hierzu wurde die T Zell Proliferation durch die Zugabe von Ant.III 4-IPP (1,28% ohne RMS Zellüberstand, 2,94% mit RMS Zellüberstand) oder höheren Konzentrationen von SF (10 μ M; 1,25% mit und ohne RMS Zellüberstand) vollständig unterdrückt, sowohl mit als auch ohne Kultivierung in RMS Zellüberstand (Abbildung 26 B und C).

ERGEBNISSE

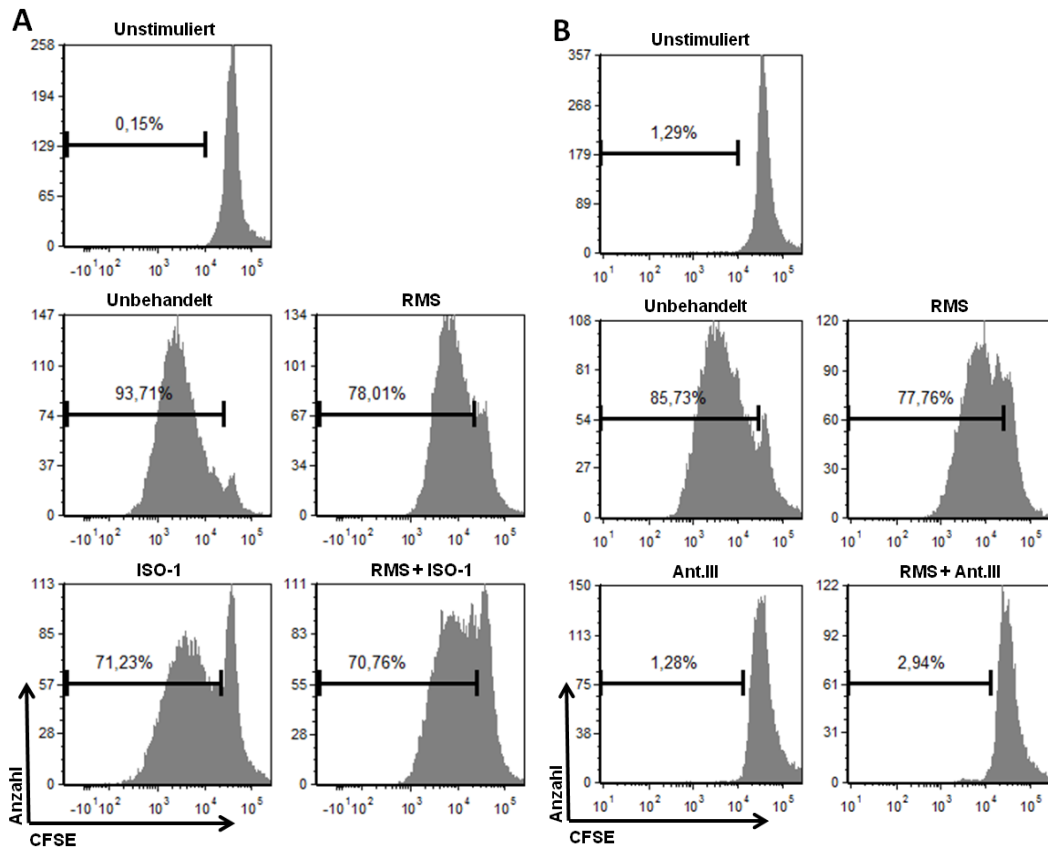


Abbildung 26a: Proliferation von T Zellen während der Inkubation mit *macrophage migration inhibitory factor*-haltigem Rhabdomyosarkom Zellüberstand und Inhibitoren des *macrophage migration inhibitory factors*. (A-D) *Peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) wurden mit Interleukin-2 (IL-2) und OKT3 (anti-CD3 Antikörper) stimuliert und je Ansatz wie in der Abbildung beschrieben für 5 Tage kultiviert. (A) Kultivierung mit dem MIF Antagonist ISO-1. (B) Kultivierung mit dem MIF Antagonist Ant.III. Die Proliferation wurde mittels CFSE Assay detektiert. Die Inkubation mit Rhabdomyosarkom (RMS) Zellüberstand (A204, RD) führte zu einer Abnahme der Proliferationsrate der T Zellen in jeder Kultur. Während der Behandlung mit geringen Konzentrationen von Suforaphane (SF, 3 μ M), ISO-1 oder *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) Antikörpern wurde keine Störung der T Zell Proliferation beobachtet. Im Gegensatz hierzu führten hohe Konzentrationen von SF (10 μ M) sowie Ant.III zu einer vollständigen Unterdrückung der T Zell Proliferation. Abbildung verändert nach (Johler et al., 2016).

ERGEBNISSE

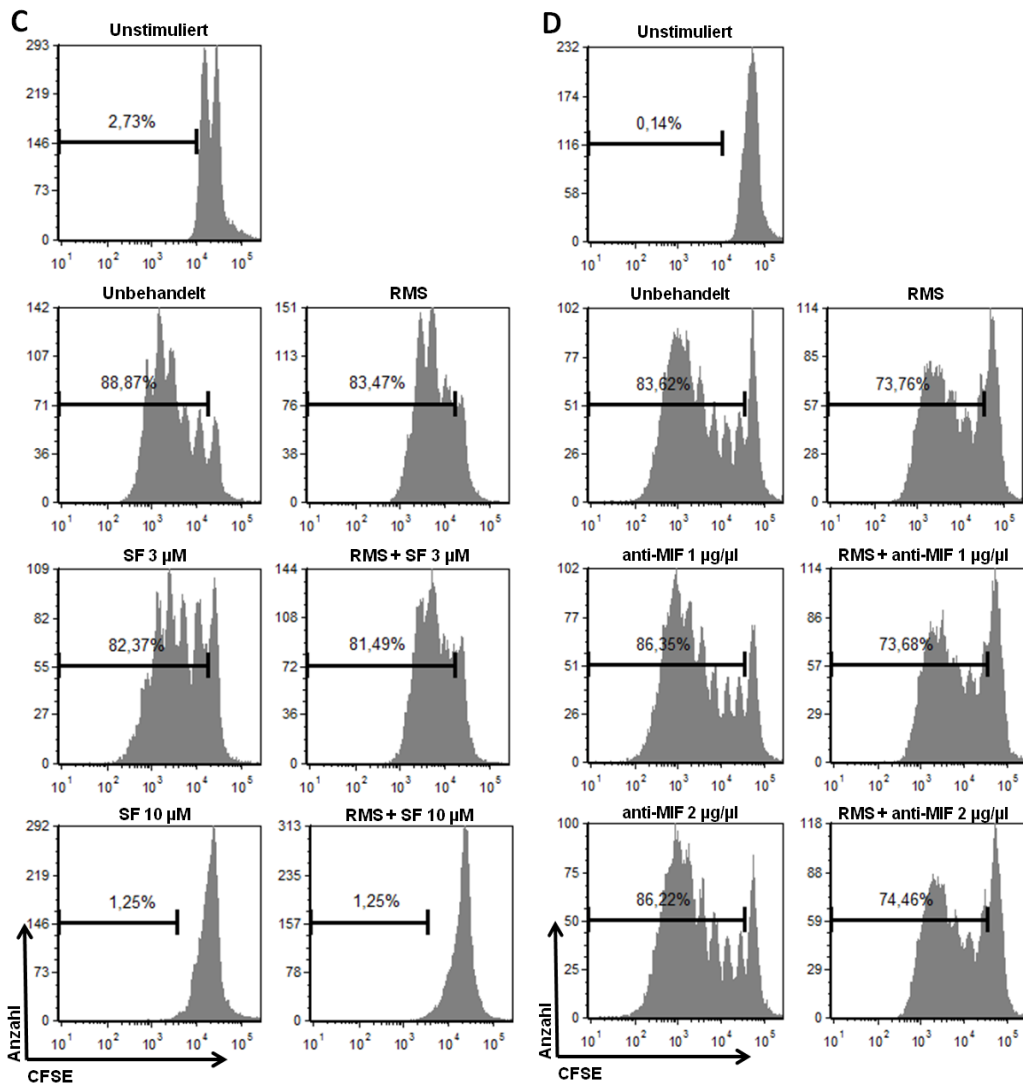


Abbildung 26b: Proliferation von T Zellen während der Inkubation mit *macrophage migration inhibitory factor*-haltigem Rhabdomyosarkom Zellüberstand und Inhibitoren des *macrophage migration inhibitory factors*. (A-D) *Peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) wurden mit Interleukin-2 (IL-2) und OKT3 (anti-CD3 Antikörper) stimuliert und je Ansatz wie in der Abbildung beschrieben für 5 Tage kultiviert. (C) Kultivierung mit Sulforaphane (SF). (D) Kultivierung mit dem MIF Antikörper anti-MIF. Die Proliferation wurde mittels CFSE Assay detektiert. Die Inkubation mit Rhabdomyosarkom (RMS) Zellüberstand (A204, RD) führte zu einer Abnahme der Proliferationsrate der T Zellen in jeder Kultur. Während der Behandlung mit geringen Konzentrationen von Suforaphane (SF, 3 μM), ISO-1 oder *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) Antikörpern wurde keine Störung der T Zell Proliferation beobachtet. Im Gegensatz hierzu führten hohe Konzentrationen von SF (10 μM) sowie Ant.III zu einer vollständigen Unterdrückung der T Zell Proliferation. Abbildung verändert nach (Johler et al., 2016).

3.5.2 Wirkung von *macrophage migration inhibitory factor*-haltigem Zellüberstand von Rhabdomyosarkom Zellen auf T Zell supprimierende *myeloid derived suppressor cells*

In Studien wurde bereits beschrieben, dass das von malignen Zellen sezernierte Protein MIF Tumore vor dem Immunsystem schützt, unter anderem

ERGEBNISSE

durch die Induktion von *myeloid derived suppressor cells* (MDSCs) (Simpson et al., 2012). Aufgrund dessen wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, wie sich die Population aus *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs), welche humane MDSCs (CD14⁺CD33⁺) enthält, nach Stimulation mit GM-CSF und Inkubation mit MIF-haltigem RMS Zellüberstand verhält. Hierfür wurden die zuvor frisch isolierten PBMCs aus Vollblut für 5 Tage kultiviert und mit GM-CSF stimuliert. Im Anschluss wurden die Immunzellen mit an Fluorochromen gekoppelte Antikörper gegen die Oberflächenantigene CD33 sowie CD14 durchflusszytometrisch analysiert. Die 5-tägige Inkubation mit RMS-Zellüberstand, welches von RMS sezerniertes MIF enthielt, veränderte die Population von CD14⁺CD33⁺ Zellen (Abbildung 27). Obwohl die Zellzahl dieser CD14⁺CD33⁺ Zellpopulation mit und ohne RMS Zellüberstand sich nur geringfügig änderte, führte die Inkubation mit RMS-kultiviertem Medium zu einer erhöhten Expression von CD14⁺ innerhalb der CD33⁺ Population (Abbildung 27 A-D). In diesen Kulturen wurde zudem die Entwicklung einer neuen Zellpopulation, welche eine geringe CD33 Expression zusammen mit einer geringen CD14 Expression zeigte (CD14^{lo}CD33^{lo}), beobachtet (Abbildung 27 A-D). Die Zugabe des MIF Inhibitors SF (3 µM) beeinflusste die CD14^{lo}CD33^{lo} Zellpopulation im Vergleich zur Kontrolle (weder Inhibitoren noch RMS Zellkulturüberstand) nicht (Abbildung 27 C). Auch wurde die Expression von CD14 auf den CD33⁺ Zellen nicht verändert, obwohl die Größe dieser Population durch die Inkubation mit SF ca. 2-fach verringert wurde. Dies könnte ein off-target Effekt von SF sein, welches die Zellen unter anderem über High-Mobility-Group-Protein B1 (HMGB1) beeinflussen kann. Die Zugabe von SF zu Kulturen mit PBCMs, welche mit MIF-haltigem RMS Zellüberstand inkubiert wurden, störte die erhöhte Expression von CD14 nicht; allerdings reduzierte sich die CD14^{hi}CD33^{hi} Zellpopulation um die Hälfte im Vergleich zu den Kulturen nur mit RMS-kultiviertem Zellüberstand. Einen stärkeren Einfluss auf die Entwicklung der Population, welche MDSCs enthielt, wurde bei höheren Konzentrationen von SF (10 µM) beobachtet, wobei eine 3,9-fache Reduktion der CD14^{hi}CD33^{hi} Population induziert wurde. Die CD14^{lo}CD33⁺ Population vergrößerte sich mit steigender Konzentration von SF (Abbildung 27 C).

ERGEBNISSE

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass SF die Entwicklung von CD14^{hi}CD33⁺ Zellen unterdrückt und zu einer Vermehrung der CD14^{lo}CD33^{lo} Population führt.

Bei der Zugabe von ISO-1 zur Blockade von MIF wurde eine 9,7-fache Reduktion der CD14^{hi}CD33⁺ Population der PBMCs im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle beobachtet (Abbildung 27 A). Überdies wurde eine 6,7-fache Reduktion derselben Population bei der Kombination von ISO-1, PBMCs sowie MIF-haltigem RMS-Zellüberstand vorgefunden, verglichen mit PBMCs, welche nur mit RMS-kultiviertem Medium inkubiert wurden. Ähnlich wie auch SF, führte die Behandlung mit ISO-1 zu einer Zunahme der CD14^{lo}CD33^{lo} Population (3,4-fach mit ISO-1 alleine und 2,4-fach mit der Zugabe von RMS-kultiviertem Medium) (Abbildung 27 A). Vergleichbare Veränderungen wurden bei der Inkubation mit dem Inhibitor Ant.III 4-IPP beobachtet (Abbildung 27 B).

Im Gegensatz zu den bereits erwähnten Inhibitoren erzeugte der anti-MIF Antikörper nicht dieselben Ergebnisse (Abbildung 27 D). Eine geringe Abnahme in der CD14^{hi}CD33⁺ Population wurde durch die Inkubation von PBMCs mit anti-MIF Antikörpern detektiert. Dennoch kam es zu einer Vergrößerung dieser Population durch die Zugabe von MIF-haltigem RMS Zellkulturüberstand zu den PBMCs, welche zusätzlich mit anti-MIF Antikörpern inkubiert wurden. Die CD14^{lo}CD33^{lo} Population änderte sich in den korrespondierenden Ansätzen nur gering (Abbildung 27 D).

ERGEBNISSE

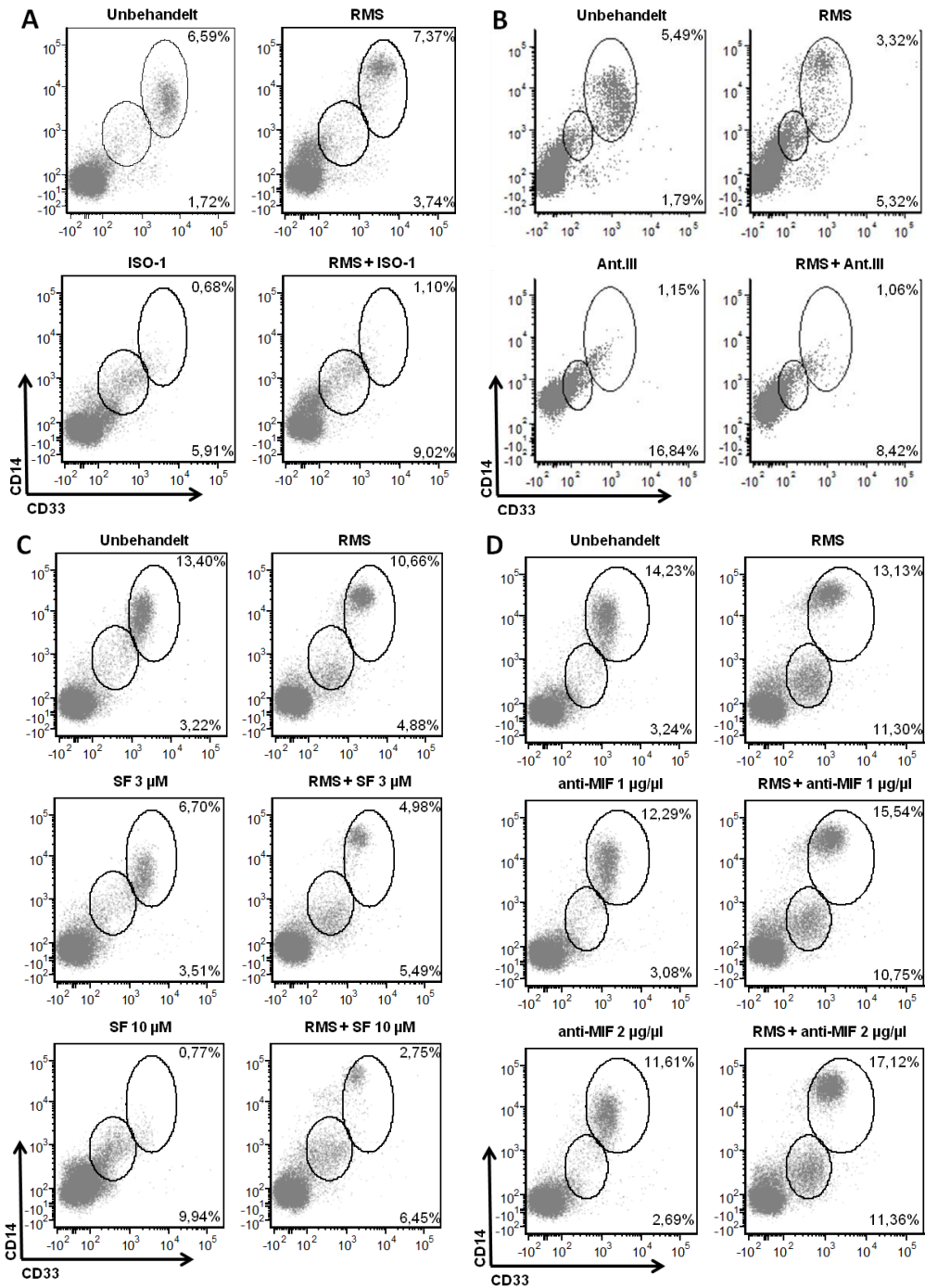


Abbildung 27: Entwicklung einer myeloid derived suppressor cell (MDSC)-haltigen Population während der Inkubation von Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) mit Rhabdomyosarkom (RMS) Zellüberstand und MIF Inhibitoren. (A-D) Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) wurden mit granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) stimuliert und je Ansatz wie in der Abbildung beschrieben für 5 Tage kultiviert. Die unbehandelte Kontrolle erfolgte jeweils ohne Zugabe von RMS Zellüberstand und MIF Inhibitoren. (A) Kultivierung mit dem MIF Antagonist ISO-1. (B) Kultivierung mit dem MIF Antagonist Ant. III. (C) Kultivierung mit Sulforaphane (SF). (D) Kultivierung mit dem anti-MIF Antikörper. Die Detektion der MDSC-haltigen Population von Immunzellen erfolgte durchflusszytometrisch mit Antikörpern gegen die Oberflächenantigene CD14 sowie CD33. Eine Kultivierung von GM-CSF stimulierten PBMCs führte zu der Entwicklung von CD14^{hi}CD33^{hi} als auch CD14^{lo}CD33^{lo} Populationen. Die Zugabe von MIF Inhibitoren SF (C), ISO-1 (A) oder Ant. III (B) verhinderte die Entwicklung von CD14^{hi}CD33^{hi} Zellen und erhöhte die Zahl der CD14^{lo}CD33^{lo} Zellen. Diese Ergebnisse wurden allerdings nicht durch die Behandlung mit anti-MIF Antikörpern beobachtet (D). Demnach führen MIF Inhibitoren zu einer Verschiebung der CD14CD33 Subpopulation. Abbildung verändert nach (Johler et al., 2016).

3.5.3 Einfluss von *macrophage migration inhibitory factor* auf die Zell-vermittelte Zytotoxizität von *peripheral blood mononuclear cells* auf die humane Rhabdomyosarkom Zelllinie Rh30

Um die Fähigkeit von *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) zu untersuchen, humane RMS Zellen während einer Inhibierung von MIF anzugreifen und zu lysieren, wurden Rh30 Gluc Zellen zusammen mit PBMCs zu unterschiedlichen Verhältnissen kultiviert (Abbildung 28). Es wurden Rh30 Gluc Zellen verwendet, die Gaussia Luziferase produzieren und diese in den Zellüberstand sezernieren, so dass die luminometrisch gemessene Aktivität der Luziferase positiv mit den lebenden Tumorzellen korreliert. PBMCs wurden von verschiedenen Spendern aus Vollblut, wie in Material und Methoden beschrieben, frisch isoliert. Die zuvor ausplattierten Rh30 Gluc Zellen wurden mit dem anti-MIF Antikörper vorinkubiert, um die Aktivität des von Tumorzellen stammenden MIFs zu blockieren und hierbei eine Stimulierung der PBMCs zu erreichen. Es wurde der anti-MIF Antikörper unter den Inhibitoren ausgewählt, da dieser keinen hemmenden Einfluss auf die Proliferation von T-Zellen zeigte und im Gegensatz zu *small molecules* nicht dazu in der Lage ist, die Zellmembran der PBMCs zu durchdringen und intrazellulär vorhandenes MIF zu blockieren. Um eine möglichst klinisch relevante Situation nachzustellen, wurden PBMCs verwendet und nicht wie in der Literatur beschriebene NK-Zellen (Krockenberger et al., 2008).

Eine effiziente Lyse der Rh30 Gluc Tumorzellen durch PBMCs wurde beobachtet, jedoch nur bei bestimmten Spendern (Abbildung 28). PBMCs von Spender 3 (Abbildung 28) lysierten die Tumorzellen effizient, bei den Spendern 1 sowie 2 konnte keine Lyse der Tumorzellen beobachtet werden (Abbildung nicht dargestellt). Auch eine zusätzliche Inkubation mit Lenalidomid, welches zu einer Stimulierung von T Zellen und NK Zellen und in diesem Rahmen zu einer Verbesserung der durch diese Zellen vermittelten Immunität gegen Tumorzellen führt, blieb erfolglos. Eine Steigerung der Lyse konnte mittels Lenalidomid nicht erreicht werden (Daten nicht gezeigt).

Bei einem 10:1 Verhältnis von Effektor- zu Tumorzellen blieben 25% der Rh30 Gluc Zellen nach 24 h viabel. Dies wurde mit einem Verhältnis von 20:1 weiter

ERGEBNISSE

auf 20% reduziert. Die Inaktivierung von MIF mittels drei verschiedener Konzentrationen des anti-MIF Antikörpers (0,5 µg/ml, 1 µg/ml und 2 µg/ml) führte zu keiner Beeinflussung der Effektivität der PBMCs, RMS Tumorzellen zu lysieren. Jedoch muss hier berücksichtigt werden, dass die Lyse der PBMCs bereits so stark ist, so dass aufgrund dessen keine synergistische Wirkung mehr nachweisbar ist.

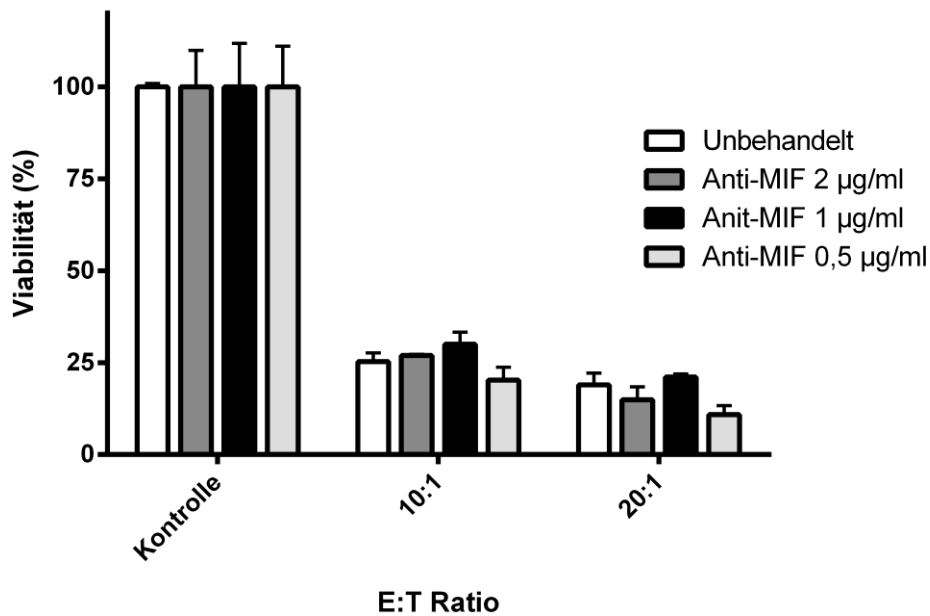


Abbildung 28: Auswirkung von anti-MIF Antikörpern auf die Lyse von Tumorzellen. Rh30 Gluc Zellen (T) wurden mit 2 µg/ml, 1 µg/ml und 0,5 µg/ml anti-MIF Antikörpern für 30 min vor Hinzufügen der Effektor-Zellen (E) inkubiert. Frisch isolierte *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) wurden in verschiedenen Verhältnissen von 10:1 und 20:1 (E:T) hinzugefügt. Nach 24 h der Ko-Kultivierung wurde die Aktivität der Gaussia Luziferase der noch lebendenden Tumorzellen gemessen. Die relative Viabilität der Tumorzellen aus drei Replikaten wurde als Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. Die Behandlung mit dem anti-MIF Antikörper führte zu keiner signifikanten Erhöhung der Lyseaktivität von PBMCs, welche aufgrund der hier dargestellten ausgeprägten lytischen Aktivität der PBMSs nicht eindeutig beurteilbar ist. Abbildung verändert nach (Johler et al., 2016).

4. DISKUSSION

Während der letzten Jahre verbesserte sich die Behandlung des pädiatrischen Rhabdomyosarkoms für die Standardrisiko Patienten (Wolden et al., 1999), dennoch ist das Überleben der Hochrisiko Patienten, insbesondere in fortgeschrittenen und metastasierten Stadien, weiterhin äußerst schlecht (Koscielniak et al., 2002). Dies verdeutlicht die enorme Relevanz, nach neuen therapeutischen Optionen wie immuntherapeutischen Ansätzen zu suchen (Gajewski et al., 2013). Die Modulation des Immunsystems zeigt vielversprechende Ergebnisse in der Behandlung des RMS, was durch Knochenmarkstransplantationen (Lang et al., 2006), Therapie mit Antikörpern (Herrmann et al., 2012), T Zell oder NK Zell Transplantationen (klinische Studien, clinicaltrials.gov) (Mackall et al., 2008) oder T Zell basierten immuntherapeutischen Ansätzen (Meadors et al., 2011, Huang et al., 2011) demonstriert wird. Überdies kristallisiert sich immer deutlicher die enorme Bedeutung des Immunsystems in der Tumorentstehung, Progression und Bekämpfung heraus (Galluzzi et al., 2016, Zitvogel et al., 2013). Daher war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, potenzielle neue Mechanismen zu untersuchen, die die Immunantwort im RMS stören und diese Effekte mithilfe eines therapeutisch anwendbaren Wegs mit Antikörpern oder *small molecules* umzukehren, um zu einer Stimulierung des endogenen Immunsystems und dadurch zu einer Umgehung des *immune escapes* im RMS beizutragen.

4.1 Identifizierung und Charakterisierung des *macrophage migration inhibitory factor* als differentiell exprimiertes immunaktives Protein aus humanem Rhabdomyosarkom Gewebe

Mittels Genexpressionsanalysen, bei denen RMS Gewebe mit humanem Muskelgewebe verglichen wurde, konnten in Vorarbeiten Proteine identifiziert werden, die eine vermehrte Expression im RMS Tumorgewebe aufwiesen. Diese stellen potenzielle Zielstrukturen für neue Therapiemöglichkeiten dar, da sie Ansatzpunkte liefern, die auf normalen Körperzellen nicht oder nicht in diesem Ausmaß vorhanden sind. Bestenfalls handelt es sich um Proteine, die nur auf bzw. von Tumorzellen produziert werden und diese spezifisch für den Tumor sind. Da Tumorzellen jedoch aus körpereigenen Zellen entstehen, ist dies häufig nicht gewährleistet. Dennoch bieten Proteine mit Über- oder auch Unterexpression Möglichkeiten für therapeutische Interventionen.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Protein *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) als überexprimierte Struktur im RMS identifiziert, der immunmodulatorische Eigenschaften zugeschrieben werden. Die Selektion von MIF erfolgte nach zuvor durchgeführten Literaturrecherchen sowie Recherchen in (Gen-) Datenbanken, in denen das immunmodulatorische Protein MIF als vielversprechenden Ansatzpunkt für weiterführende Studien sowie das therapeutische Potential dieser Zielstruktur beschrieben wurde. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, das von RMS Zellen stammende MIF zu analysieren und dessen Aktivität auf Immunzellen zu untersuchen.

Wie bereits in der Literatur beschrieben, ist das immunmodulatorische Protein MIF nicht nur im RMS überexprimiert, sondern auch in anderen Tumoren wie dem Neuroblastom, Melanom, Hepatozellulären Karzinom und dem Kolonkarzinom (Bach et al., 2008, Hira et al., 2005, Legendre et al., 2003, Meyer-Siegler et al., 2002). Dabei führt MIF zu Tumorprogression, onkogener Transformation und beeinträchtigter Immunaktivierung (Tarnowski et al., 2010a, Repp et al., 2000, Bach et al., 2008). Verschiedene Studien haben Hinweise in der Beteiligung des aus Tumoren stammenden MIF in der Umgehung der Immunabwehr/dem *immune escape* erbracht, unter anderem durch die Zunahme von Tumor-assoziierten CD4+ und CD8+ regulatorischen T Zellen,

DISKUSSION

einhergehend mit einer Abnahme der CD8+-induzierten Tumorzytotoxizität in MIF^{+/+} Mäusen (Choi et al., 2012) oder durch Förderung sowohl der Differenzierung als auch der Anzahl von MDSCs im Tumor (Simpson et al., 2012). Durch die Inhibierung der Tautomerase Aktivität von MIF, wie beispielsweise durch SF, kann die Entwicklung von MDSCs reduziert und sowohl das Tumorwachstum als auch die Metastasierung unterdrückt werden (Rendon et al., 2007). Des Weiteren scheint MIF der NK und CD8+ T Zell vermittelten Immunüberwachung in malignen Gliomen entgegenzuwirken und dadurch in der Umgehung der Immunabwehr bzw. des *immune escapes* beteiligt zu sein (Mittelbronn et al., 2011). Darüber hinaus interagiert MIF mit verschiedenen Rezeptoren wie CD74, CXCR2, CXCR4 und CXCR7 (Leng et al., 2003, Alampour-Rajabi et al., 2015), welche als mögliche Rezeptor-basierte, zielgerichtete Therapien dienen könnten. Verschiedene intrazelluläre als auch extrazelluläre Signalwege, in welchen MIF involviert ist (siehe Kapitel 1.3.3, Abbildung 5, 6, 8), hängen mit verschiedenen zellulären Effekten zusammen, die zur Tumorgenese beitragen, einschließlich der Inhibierung von p53 (Hudson et al., 1999), der Aktivierung von ERK Signalwegen durch die Induktion der N-Myc Expression, sowie die erhöhte Expression von VEGF (Ren et al., 2004). Ferner wurde gezeigt, dass MIF COX-2 induziert, und dabei zu Zellproliferation, erhöhter Motilität, gestörter Apoptose und Unterdrückung der Immunantwort führt (Telliez et al., 2006).

Die Rolle von MIF im RMS wurde bis heute jedoch nur unzureichend analysiert, insbesondere im Hinblick auf dessen Interaktion im Rahmen der *immunosurveillance*, dem *immune escape* und dem Verhalten unter einer anti-tumoralen Therapie.

Zusammengefasst bietet MIF ein äußerst vielversprechendes Target, um mittels Inhibierung dieses Proteins dem Tumorwachstum im RMS in vielfältiger Weise entgegenzuwirken. Aus diesen Gründen wurde MIF in der vorliegenden Arbeit als Zielstruktur ausgewählt.

4.2 Analyse des Expressionsprofils von *macrophage migration inhibitory factor* in humanem Rhabdomyosarkom Zellmaterial

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst das Expressionsprofil von MIF mittels humanem RMS Zellmaterial *in vitro* evaluiert. Humane RMS Zelllinien sind hierfür sehr gut geeignet, sowohl die Expression als auch die Aktivität von MIF im Rhabdomyosarkom zu untersuchen. Auf humanen RMS Gewebeschnitten wurde zunächst das Protein MIF immunhistochemisch nachgewiesen. Mit Hilfe durchflusszytometrischer Messungen wurde intrazelluläres MIF in humanen ERMS als auch ARMS Zellen (Rh30, RD, A204, RMS33-2) detektiert, welche sich mittels Immunfluoreszenz in allen getesteten Zelllinien bestätigte. Des Weiteren wurde MIF auf RNA Ebene in den Zelllinien RD und Rh30 nachgewiesen. Da MIF jedoch nicht nur in einer intrazellulären Form, sondern auch extrazellulär vorhanden ist und von (Tumor-) Zellen sezerniert wird, wurde außerdem das Sekretionsverhalten von MIF analysiert. Eine hohe Sekretion von MIF wurde für alle untersuchten RMS Tumorzellen (Rh30, RD, A204, RMS33-2) aufgezeigt. In normalen Zellen, hier wurden beispielhaft Fibroblasten herangezogen, konnte im Gegensatz dazu jedoch nur eine geringe Sekretion von MIF beobachtet werden. Dem ist allerdings gegenüberzustellen, dass Fibroblasten generell eine geringere Proliferationsrate besitzen als RMS Zellen und dadurch die Möglichkeit einer verminderten Sekretion von MIF besteht. Demzufolge konnte der Nachweis von MIF sowohl in humanen RMS Zelllinien als auch in humanem RMS Tumorgewebe erbracht werden.

4.3 Erhöhte Expression und Sekretion von *macrophage migration inhibitory factor* durch die Wirkung von Zytostatika

Konventionelle Chemotherapeutika reduzieren generell die systemische immunsuppressive Aktivität maligner Zellen (Zitvogel et al., 2013, Zitvogel et al., 2011). Hinzukommend können diese klinisch eingesetzten antineoplastischen Stoffe zu Veränderungen des Tumors, seiner Umgebung und der *immunosurveillance* durch Beeinflussung der *antigenicity*, *adjuvantcity* sowie *immunogenicity* beitragen (Zitvogel et al., 2013, Galluzzi et al., 2016, Galluzzi et al., 2015, Galluzzi et al., 2017).

Die Behandlung maligner Neoplasien mit klinisch gebräuchlichen Zytostatika kann demnach unter anderem in einem veränderten Expressionsprofil der Tumorzellen resultieren, welches wiederum zu einer Beeinträchtigung oder auch Stimulierung der Immunantwort gegen Tumore führen kann, sowohl über eine direkte oder indirekte Immunstimulation als auch über „on“- und „off-target“ Effekte.

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit speziell das Verhalten des aus Tumoren stammenden Proteins MIF unter der Behandlung dreier klinisch gebräuchlicher Zytostatika, welche in der Therapie des pädiatrischen RMS zum Einsatz kommen, analysiert.

Die Sekretion von MIF erfolgt über verschiedene Signalwege, beispielsweise über die Vermittlung von p115 (Merk et al., 2009). Daneben können Zytostatika den Zelltod induzieren, gefolgt von einer erhöhten Freisetzung intrazellulärer Proteine, zu denen auch MIF gehört. Durch Veränderung in der *antigenicity* und *adjuvantcity* mittels konventioneller Chemotherapeutika kann es zu einer veränderten Expression und Sekretion immunmodulatorischer Stoffe kommen, im Rahmen des immunogenen Zelltods zählen hierzu ATP, CXCL10, HMGB1, CALR, ANXA1 und Typ I IFN (Galluzzi et al., 2017). Ob das Protein MIF ebenfalls eine Rolle im immunogenen Zelltod spielt, sollte in dieser Arbeit evaluiert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von MIF in ERMS sowie ARMS Tumorzellen durch jeweils drei Zytostatika mit

DISKUSSION

unterschiedlicher Wirkungsweise (Doxorubicin, Vincristin und Etoposid) induziert wurde. Die Menge an intrazellulärem als auch sezerniertem MIF erhöhte sich während der Behandlung mit Zytostatika in allen RMS Zelltypen in jeweils unterschiedlichem Ausmaß. Allerdings wurde keine erhöhte Expression auf RNA Ebene nach der Behandlung mit denselben Zytostatika in Rh30 und RD Zellen beobachtet. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die Inkubation mit Zytostatika eher zu einer intra- und extrazellulären Freisetzung des MIF Proteins führt sowie zu einer verstärkten Translation des Proteins und weniger zu einer Erhöhung der Transkription der MIF RNA. Bisher sind wenige Daten vorhanden, die die Medikamenten-induzierte Überexpression von MIF in Patienten bestätigen (Livni et al., 1987). Eine weitergehende Analyse der Genexpressions Datenbanken (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/>) zeigen eine Induktion von MIF in mit Doxorubicin behandelten Mammakarzinom Zellen (GDS2244 / 217871_s_at) sowie in Endometriumzellen, welche mit Carboplatin behandelt wurden (GPL570, 217871_s_at).

Darüber hinaus stellt sich die Frage nach der funktionellen Charakterisierung des von RMS Zellen sezernierten MIFs und der Expressions- und Sekretionserhöhung während der Behandlung mit konventionellen Chemotherapeutika, nicht nur im Hinblick auf die Migration und Proliferation, sondern auch im Hinblick auf dessen Einfluss auf das Immunsystem. Insbesondere ist es von großem Interesse, wie sich die Expressionserhöhung von MIF durch die Inkubation mit Zytostatika auf das Immunsystem auswirkt. Die verstärkte Expression von MIF als Antwort auf die Behandlung mit Zytostatika kann aufgrund seiner immunsuppressiven Eigenschaften möglicherweise in einer Reduktion der Immunogenität sowie einer Beeinträchtigung der Immunantwort gegen Tumoren und in einem *immune escape* resultieren. Diese Interpretation liegt aufgrund der Eigenschaft von MIF, immunsuppressive Netzwerke des Tumors zu fördern, unter anderem durch Stimulierung von MDSCs, regulatorischen T Zellen und einer Abnahme der CD8+ Zytotoxizität (Bach et al., 2008, Choi et al., 2012, Xu et al., 2008, Krockenberger et al., 2008, Simpson et al., 2012), nahe. Obwohl bekannt ist, dass konventionelle Chemotherapeutika generell immunsuppressiv sind, gibt es

DISKUSSION

inzwischen sowohl präklinisch als auch klinisch eindeutige Hinweise, dass antineoplastische Medikamente in der Lage sind, einen *immunogenic cell death* zu induzieren, unter anderem für das Anthrazyklin Doxorubicin, den DNA-Interkalator Oxaliplatin und zahlreichen weiteren Substanzen (Matarollo et al., 2011, Casares et al., 2005, Vacchelli et al., 2014, Zitvogel et al., 2013, Galluzzi et al., 2016, Galluzzi et al., 2015, Galluzzi et al., 2012).

Dennoch legen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nahe, dass antineoplastische Therapeutika nicht nur den immunogenen Zelltod unterstützen, sondern gegebenenfalls auch diesen unterdrücken oder umgehen können, indem eine erhöhte Expression oder Sekretion von Proteinen stattfindet, die einen immunsuppressiven Einfluss auf das den Tumor bekämpfenden Immunsystems haben. Ein Beispiel liefert das hier untersuchte Protein MIF, welches durch die gesteigerte Freisetzung während der chemotherapeutischen Behandlung zu einer vermehrten Differenzierung von immunsupprimierenden Immunzellen wie MDSCs oder auch Tumor-assoziierten CD4+ sowie CD8+ regulatorische T Zellen führen und damit zu einer Stabilisierung oder Verstärkung des immunsuppressiven *tumor microenvironments* beitragen könnte.

Des Weiteren kann es durch die Behandlung mit konventionellen Chemotherapeutika in Tumorzellen zur Induktion von DAMPs kommen, die wiederum eine Immunantwort auslösen und zu einer Stimulierung des Immunsystems beitragen können (Galluzzi et al., 2016). Anhand der hier erhobenen Ergebnisse trifft dies für das immunsuppressive Protein MIF eher nicht zu. Möglicherweise könnte die beobachtete Induktion von MIF durch Zytostatika auf Mechanismen zurückzuführen sein, die RMS Tumorzellen im Laufe ihrer Entwicklung im Rahmen des *immune escapes* erwerben, um sich dem Immunsystem zu entziehen. Darüber hinaus könnte dies auch eine Art Resistenzmechanismus darstellen, den Tumore während der Therapie im Rahmen des *immune escapes* entwickeln könnten. Ferner besteht die Möglichkeit, dass durch die Behandlung mit konventionellen Chemotherapeutika auch immunsuppressive Moleküle induziert werden könnten, worauf die Ergebnisse in dieser Arbeit hindeuten.

DISKUSSION

Zusätzlich beeinflusst das von Tumoren stammende MIF nicht nur das Immunverhalten, sondern auch generell die onkogene Transformation sowie Tumorprogression (Tarnowski et al., 2010a, Bach et al., 2008), Tumorzellwachstum, Angiogenese als auch Migration (Shimizu et al., 1999, Rendon et al., 2007, Dessein et al., 2010). Unter diesen Aspekten könnte es möglich sein, dass diese Vorgänge durch die vermehrte Expression von MIF unter der Behandlung mit Zytostatika im RMS gefördert werden. Gegebenenfalls könnte ein ungenügendes Ansprechen im Rahmen einer chemotherapeutischen Behandlung unter anderem auch darauf zurückgeführt werden.

Um dies jedoch näher zu spezifizieren, sollten in jedem Falle weitere Untersuchungen durchgeführt werden, insbesondere *in vivo*. Eine Möglichkeit könnte ein MIF knock-down in RMS Tumorzellen vs. MIF exprimierende RMS Zellen mit nachfolgender Injektion in ein Mausmodell und chemotherapeutischer Behandlung darstellen. Die Evaluation könnte mittels Ansprechen, Tumorwachstum, Progression, Metastasierung und Monitoring des Immunsystems (insbesondere im Hinblick auf MDSCs und regulatorische T Zellen) erfolgen. Im klinischen Setting könnte man beispielsweise MIF Spiegel im Blut bei pädiatrischen RMS Patienten vor, während und nach der Behandlung mit Chemotherapeutika monitoren sowie das Verhalten von Effektorzellen als auch MDSCs und regulatorische T Zellen, um dies mit dem Progressionsfreien- sowie Gesamtüberleben in Relation zu setzen.

Zusammengefasst konnte in der vorliegenden Arbeit durch die Behandlung mit konventionellen Chemotherapeutika eine Sekretions- und Expressionserhöhung des immunmodulatorischen Proteins MIF in humanem RMS Zellmaterial nachgewiesen werden. Weiterführende Untersuchungen sind jedoch notwendig, um die Bedeutung dieser Expressionserhöhung im *immune escape*, dem immunogenen Zelltod und den Auswirkungen auf Therapieansprechen, Tumorprogression und Metastasierung herauszuarbeiten.

4.4 Einfluss auf die Viabilität und Migration von Rhabdomyosarkom Zellen durch die Blockade der Aktivitäten von *macrophage migration inhibitory factor*

Aufgrund der vielfältigen Eigenschaften des Proteins MIF, die Tumorprogression sowie Metastasierung zu fördern, liegt es nahe, die Aktivität von MIF zu inhibieren um diesen Effekten entgegenzuwirken. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit das Verhalten von RMS Zellen auf die Blockade der Aktivität von MIF im Hinblick auf die Zellviabilität sowie Migration evaluiert.

Die enzymatische Aktivität der MIF Tautomerase lässt sich mit verschiedenen Methoden blockieren. Zum einen können hierfür sogenannte *small molecules* zum Einsatz kommen, zum anderen blockierende Antikörper. Die in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren wurden teilweise bereits in anderen Studien verwendet, um die Aktivität von MIF zu inhibieren (Al-Abed and VanPatten, 2011, Piette et al., 2009).

Ein experimentell häufig gebräuchlicher Inhibitor stellt ISO-1 dar (Piette et al., 2009, Al-Abed and VanPatten, 2011), ein Isoxazolin Substrat, welcher die Tautomerase Aktivität von MIF kompetitiv durch Bindung an dessen katalytische Seite antagonisiert. Ein weiterer Inhibitor repräsentiert Ant. III 4-IPP, ein Iodo-pyrimidin, der durch seine kovalente Modifizierung von MIF bekannt ist (O'Reilly et al., 2016). Im Gegensatz hierzu verhindert der allosterische Inhibitor Ant. V p425 unter anderem die Bindung von MIF an Rezeptoren durch dessen Aufbau einer symmetrischen Bis-(amino, hydroxynaphthalenedisulfonate) Verbindung (Bai et al., 2012, O'Reilly et al., 2016). Nicht ausschließlich spezifisch auf MIF wirkend, jedoch als potente Inaktivatoren der MIF Tautomerase Aktivität bekannt, sind Isothiocyanate (Healy et al., 2011, O'Reilly et al., 2016). Darunter findet sich das in Brokkoli vorkommende Sulforaphane (SF), eine Version des natürlichen R-Sulforaphane, welches die Tumorformierung zu inhibieren scheint sowie die chemotherapeutische Effizienz verbessern soll (Wang et al., 2016, Li and Zhang, 2013, Tortorella et al., 2015). Alle genannten *small molecule* Inhibitoren können im Gegensatz zu anti-MIF Antikörpern die Zellmembran penetrieren und

DISKUSSION

dadurch die Aktivität von MIF sowohl über den intrazellulären als auch extrazellulären Signalweg blockieren. Im Gegensatz hierzu haben neutralisierende anti-MIF Antikörper nicht die Möglichkeit, durch die Zellmembran zu gelangen, und entfalten ihre Wirkungsweise aufgrund dessen ausschließlich extrazellulär.

Wie bereits beschrieben, ist MIF in mehreren Signalwegen im Rahmen der Tumorgenese involviert, welche unter anderem die Proliferation von Tumorzellen beeinflussen. Dennoch zeigen die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit keine Beeinträchtigung der Viabilität von RMS Zellen als auch Fibroblasten *in vitro* durch eine Inhibition von MIF sowohl mittels spezifischer Inhibitoren als auch neutralisierenden Antikörpern. Hierfür wurden die Inhibitoren ISO-1, Ant.III 4-IPP, Ant. V sowie der neutralisierende anti-MIF Antikörper verwendet, eine Abnahme der RMS Zellviabilität konnte bei keinem dieser genannten Strukturen beobachtet werden (Abbildung 22). Diese Ergebnisse bestätigen einen Teil der bisher vorhandenen Datenlage, dass teilweise keine direkte Wirkung von MIF oder dessen Inhibierung auf die Viabilität und Proliferation von Tumorzellen besteht, wie durch ein knock-down der MIF Expression, welcher von Tarnowski *et al.* in humanen RH18 Zellen durchgeführt wurde, bestärkt wurde (Tarnowski *et al.*, 2010a). Dennoch gibt es in weiteren Studien widersprüchliche Ergebnisse, so konnte in anderen Tumoren eine Reduktion der Tumorzellproliferation mittels MIF Inhibitoren oder auch anti-MIF Antikörpern beobachtet werden. Kindt *et al.* wiesen eine Dosis-abhängige Reduktion der Zellproliferation im Plattenepithelkarzinom mit Hilfe des MIF Inhibitors 4-IPP nach (Kindt *et al.*, 2013). ISO-1 wurde in primären Glioblastomzellen verwendet, wobei eine reduzierte Wachstumsrate in Abhängigkeit der Konzentration insbesondere zwischen 5 – 100 μM mittels BrdU (Bromdesoxyuridin) Proliferationsassay festgestellt wurde (Baron *et al.*, 2011). Des Weiteren scheinen bestimmte anti-MIF Antikörper die Zellproliferation im Prostatakarzinom zu inhibieren (Hussain *et al.*, 2013). Unter diesen Aspekten gilt es allerdings zu beachten, dass die Messung der Viabilität, wie sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, nicht genau der Proliferation entspricht und dies wiederum zu den unterschiedlichen

DISKUSSION

Ergebnissen führen könnte. Zudem wurden verschiedene Tumorentitäten verwendet, die wiederum ein unterschiedliches Ansprechen auf eine Inhibierung von MIF demonstrieren können. Um dies näher zu spezifizieren sind weitere Untersuchungen, unter anderem im Hinblick auf die Tumorzellproliferation *in vitro* sowie *in vivo* notwendig, beispielsweise mit einem MIF knock-down und/oder einem BrdU Proliferationsassays. Auch neuere Stoffe könnten vielversprechende Ansätze liefern, darunter Oxazolin Derviate (CPSI-2705, CPSI-1306), die sowohl die MIF Tautomerase als auch die Interaktion mit dessen Rezeptor CD74 blockieren und so zu einer Reduktion des Tumorwachstums, der Angiogenese sowie der Zellproliferation des Blasenkarzinoms *in vivo* und *in vitro* führten (Choudhary et al., 2013), oder Isocumarine, die eine signifikante Reduktion des Tumorumfanges beim Lungenkarzinom im Mausmodell zeigten (Mawhinney et al., 2015).

Demgegenüber steht die Beobachtung, dass eine Behandlung der RMS Zellen mit SF konzentrationsabhängig zu einer Reduktion der Viabilität *in vitro* führte (Abbildung 22 D). Isothiozyanate wie SF sind dafür bekannt, umfassende zelluläre Prozesse zu modulieren, darunter die potente Inaktivierung der Aktivität der MIF Tautomerase (Crichlow et al., 2012, Healy et al., 2011). Da jedoch auch weitere Signalwege durch SF moduliert werden und die spezifischen MIF Inhibitoren keinen Einfluss auf die Viabilität von RMS Zellen demonstrieren, lässt sich eher auf eine unspezifische Reduktion der Zellviabilität durch SF schließen. Demnach spricht dies weniger für eine direkte Folge der Inaktivierung der MIF Tautomerase, sondern vielmehr für einen off-target Effekt durch SF. Dennoch konnte diese Reduktion der Viabilität nur bei RMS Tumorzellen, nicht jedoch bei der Behandlung von Fibroblasten mit SF beobachtet werden. Weitergehende Untersuchungen, zeitgleich eine Behandlung mit Zytostatika durchzuführen um die Wirkung verschiedener Therapieansätze zu vereinen und gegebenenfalls zu verstärken, lieferten interessante Ergebnisse. Die Kombination des Zytostatikums Doxorubicin zusammen mit SF ließ erkennen, dass dadurch ein additiver Effekt erzielt werden konnte, insbesondere bei geringen Konzentrationen von Doxorubicin mit 10 µM SF (Abbildung 23). Diese Ergebnisse, trotz eines möglichen off-target

DISKUSSION

Effekts von SF, regen weitergehende Studien im RMS oder auch anderen Tumoren *in vivo* an, um möglicherweise eine Steigerung der Therapieeffizienz durch eine Kombination unterschiedlicher therapeutischer Ansätze zu erreichen.

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit evaluiert, ob die Verwendung von MIF Inhibitoren sowie anti-MIF Antikörpern zu einem Einfluss auf die Zellmigration von RMS Zellen führt. Die bisherige Datenlage berichtet über die Funktion von MIF, die Metastasierung sowie Migration von Tumorzellen zu fördern (Kindt et al., 2016, O'Reilly et al., 2016). Dies lässt vermuten, dass eine Inhibierung von MIF zu einer Beeinflussung der Zellmigration beitragen kann (Rendon et al., 2007). Daher wurde in dieser Arbeit mittels eines Migrations-Assays der zellfreie Spalt zwischen zwei Migrationskammern sowie dessen Veränderung über 5 h sowie 24 h gemessen. Durch die Verwendung von MIF Inhibitoren wurde insgesamt eine Abnahme der Migration von RMS Zellen demonstriert, welche sich allerdings abhängig von den verwendeten Inhibitoren sowie Zelllinien zeigte (Abbildung 25). Generell deuten die Daten jedoch darauf hin, dass mittels einer Inhibierung von MIF eine Abnahme der Migration von RMS Tumorzellen erzielt werden kann. Daneben lässt sich eine geringfügige Korrelation dieser Inhibierung mit der basalen MIF Sekretion in den untersuchten RMS Zelllinien beobachten. Jedoch wurde diese Korrelation nur für die spezifischen MIF Inhibitoren identifiziert, nicht jedoch in den Experimenten mit SF, was wiederum einen off-target Effekt von SF vermuten lässt. Darüber hinaus zeigten die MIF Inhibitoren untereinander Unterschiede in ihrem Einfluss auf die Zellmigration, dies wiederum kann auf einen zusätzlichen unspezifischen Effekt der *small molecules* hindeuten. Weiterhin ließen die blockierenden anti-MIF Antikörper, welche ausschließlich extrazellulär wirken, mit Ausnahme der Zelllinie RMS33-2 keinen wesentlichen Einfluss auf die Migration von RMS Zellen erkennen. Aufgrund dieser Ergebnisse liegt die Annahme nahe, dass insbesondere das intrazelluläre MIF eine wichtige Rolle in der Migration der RMS Zellen über intrazelluläre Signalwege innezuhaben scheint.

DISKUSSION

Auch weitere Studien in anderen Tumorentitäten konnten die Involvierung von MIF in der Tumorzellmigration nachweisen (Kindt et al., 2016). Beispielsweise demonstrierten Kindt *et al.* eine geringere Kapazität der Migration von Plattenepithelkarzinomzellen über eine Matrigel-überzogene Membran, welche zuvor mit dem MIF Inhibitor 4-IPP behandelt wurden (Kindt et al., 2013). Auch im Androgen-unabhängigen Prostatakarzinom (DU-145 Zellen) wurde eine Reduktion der *in vitro* Invasion über Matrigel nach der Behandlung mit blockierenden anti-MIF Antikörpern nachgewiesen (Meyer-Siegler et al., 2006). Die Ergebnisse mit blockierenden anti-MIF Antikörpern stehen jedoch im Gegensatz zu den hier gewonnenen Resultaten, welche nur einen geringfügigen Einfluss von anti-MIF Antikörpern erkennen ließ. Eine mögliche Erklärung ist die Verwendung unterschiedlicher Antikörper (AF-289-PB vs. monoklonalem anti-MIF Antikörper von Abcam), jedoch auch die unterschiedlichen biologischen Verhaltensweisen der verschiedenen Tumorentitäten. Da der hier verwendete AK auch in weiteren Experimenten keinen signifikanten Effekt erzielen konnte, liegt es nahe, dass in der vorliegenden Arbeit ein AK mit geringer Aktivität verwendet wurde.

Insgesamt liefern die Ergebnisse dieser Arbeit Hinweise, dass MIF insbesondere zur Migration, jedoch weniger zur Viabilität von RMS Zellen beitragen könnte. Mittels MIF Inhibitoren und anti-MIF Antikörpern könnte die Migration, nicht jedoch die Viabilität von RMS Zellen unterdrückt werden. Eine Ausnahme hiervon stellt der eher unspezifische Inhibitor SF in der Reduktion der RMS Viabilität dar, der einen zusätzlichen Effekt in der Viabilitätsinhibierung durch die Kombination mit Doxorubicin ergab. Aktuell sind viele verschiedene MIF Inhibitoren und anti-MIF Antikörper einsetzbar, wie auch in anderen Studien beschrieben, jedoch sind die hier getesteten MIF Modulatoren aktuell therapeutisch nicht ausgereift.

4.5 Macrophage migration inhibitory factor-haltiger Zellüberstand von Rhabdomyosarkom Zellen führt zu einem veränderten Immunverhalten von Zellen *in vitro*

Neben den bisher genannten, vielfältigen Mechanismen, in denen das Protein MIF involviert ist, gewinnt dessen Beteiligung im Rahmen der *immunosurveillance* von Tumoren eine immer größer werdende Bedeutung, dennoch gibt es bisher nur wenige Daten hierzu. Aufgrund dessen wurde in der vorliegenden Arbeit das Verhalten von Immunzellen auf das von RMS Tumorzellen stammende MIF evaluiert.

Hierfür wurden frisch isolierte PBMCs mit MIF-haltigem RMS Zellkulturüberstand für mehrere Tage kultiviert und je nach Fragestellung mit IL-2 und OKT3 oder GM-CSF stimuliert. Die Stimulation mit GM-CSF erbrachte eine Population von Immunzellen, welche unter anderem MDSCs enthielt. Eine zeitgleiche Inkubation mit über mehrere Tage kultiviertem Medium von MIF-exprimierenden und sezernierenden RMS Zellen förderte die Differenzierung der MDSC enthaltenden Population, welche wiederum durch die Zugabe von MIF Inhibitoren supprimiert wurde. Sowohl ISO-1 als auch Ant. III 4-IPP und SF zeigten diesen Effekt, welcher jedoch nicht für anti-MIF Antikörper reproduzierbar war (Abbildung 27). Diese mögliche MIF-abhängige Induktion einer MDSC enthaltenden Population sowie die Umkehrung diesen Effekts durch spezifische (ISO-1, Ant III 4-IPP) sowie unspezifische (SF) MIF Inhibitoren stimmen mit den Ergebnissen überein, die in einem Modell für das Mammakarzinom erzielt wurden (Simpson et al., 2012, Simpson and Cross, 2013). In dieser Studie wurden CD11b+ Zellen von Tumor-tragenden Mäusen (Wildtyp) mit kultiviertem Medium von 4T1 Mammakarzinomzellen inkubiert, welche entweder den MIF-produzierenden Wildtyp oder einen MIF knock-down vorwiesen. Ein Anstieg der MDSCs wurde mit dem MIF-produzierenden Wildtypzellen demonstriert, der wiederum mit SF oder dem Zellkulturüberstand von MIF knock-down Zellen signifikant geringer ausfiel (Simpson et al., 2012). Aufgrund dieser Ergebnisse erschließt sich die Interpretation, dass RMS Zellen MIF produzieren und sezernieren, welches zu einer Induktion oder Differenzierung immunsupprimierender MDSCs im *tumor microenvironment*

DISKUSSION

führt und somit zu einem *immune escape* beitragen könnte. Überdies ist es jedoch auch möglich, dass weitere Faktoren in den Zellkulturüberstand oder *in vivo* in die Mikroumgebung des Tumors sezerniert werden, die zu einer Beeinflussung des Immunsystems beitragen können. Dies ließe sich möglicherweise, wie auch bei Simpson *et al.* demonstriert, durch einen MIF knock-down näher spezifizieren. Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgern, dass RMS Zellen immunmodulatorische Signale sezernieren, diese allerdings nicht ausschließlich auf MIF zurückgeführt werden können, da die verwendeten MIF Inhibitoren auch eine direkte Wirkung auf Immunzellen haben können. Hier gilt es zu beachten, dass die MIF Inhibitoren an sich bereits eine Reduktion der MDSC enthaltenden Population herbeiführen, ohne zusätzliche Kultivierung mit RMS Zellkulturüberständen. Dies wiederum lässt unter anderem auf einen off-target Effekt der *small molecules* schließen, die auch in der Lage sind, die Zellmembran der Immunzellen zu penetrieren und das dort vorhandene, nicht von Tumoren stammende, endogene MIF zu inhibieren.

In einem weiteren Ansatz wurde die T Zell Proliferation nach Kultivierung von PBMCs mit MIF-haltigem RMS Zellkulturüberstand mittels eines CFSE Assays analysieren, wobei eine Proliferation der T Zellen nur durch Stimulation der PBMCs mit IL-2 sowie OKT3 erreicht werden konnte. Eine Reduktion der T Zell Proliferation zeigte sich bereits nach der Kultivierung von PBMCs mit RMS Zellkulturüberständen, die am ehesten auf immunsupprimierende Faktoren im Überstand, darunter auch MIF, zurückzuführen ist. Diese proliferationshemmenden Eigenschaften sind jedoch nicht allein auf MIF, sondern am ehesten auch auf weitere, im Zellkulturüberstand befindliche immunsupprimierende Substanzen zurückzuführen. In weiteren Ansätzen wurden jeweils MIF Inhibitoren sowie anti-MIF Antikörper hinzugegeben, um deren Einflüsse auf das Immunverhalten des protektiven Immunsystems zu evaluieren. Ant. III 4-IPP sowie SF in höheren Konzentrationen (10 μ M) demonstrierten eine massive Störung der T Zell Proliferation auf unter 2%. Demnach zeigen diese Inhibitoren nicht nur den gewünschten Effekt auf eine Reduktion der Entwicklung von MDSCs, sondern hinzukommend eine unerwünschte Folge in der Inhibierung der immunstimulierenden T Zell

DISKUSSION

Proliferation. Eine Ausnahme stellten der Inhibitor ISO-1, geringere Konzentrationen von SF (3 μ M) sowie anti-MIF Antikörper dar, die entweder zu keiner (anti-MIF Antikörper) oder nur zu einer sehr geringen Beeinträchtigung der T Zell Proliferation beitrugen (Abbildung 26). Allerdings führten blockierende anti-MIF Antikörper nicht zu einer Beeinträchtigung der Differenzierung bzw. Entwicklung der MDSC enthaltenden Zellpopulation. Im Gegensatz hierzu stellten sich der Inhibitor ISO-1 sowie geringere Konzentrationen von SF als die am ehesten geeigneten Inhibitoren heraus, da diese nicht zu einer relevanten Inhibierung der T Zell Proliferation beitrugen, jedoch eine deutliche Abnahme der Entwicklung bzw. Induktion einer MDSC enthaltenden Population nachwies. Wie bereits diskutiert, sind auch hier off-target Effekte der Inhibitoren denkbar, die bereits einen direkten Einfluss auf die T Zellproliferation erkennen lassen. Zwar ist durchaus eine direkte Inhibition von MIF wahrscheinlich, dennoch sind diese Ergebnisse nicht ausschließlich auf eine Inhibierung von MIF zurückzuführen. Auch hier könnte es sich empfehlen, für weitergehende Untersuchungen einen knock-down von MIF vorzunehmen, wie bereits bei Tarnowski *et al.* im RMS durchgeführt wurde (Tarnowski *et al.*, 2010a).

Die Bedeutung des Immunsystems und in diesem Zusammenhang die Rolle von unter anderem immunsupprimierenden MDSCs im RMS wird in der Studie von Highfill *et al.* bestätigt (Highfill *et al.*, 2014). In einem RMS Mausmodell wurde zum einen gezeigt, dass eine Blockade mit anti-PD1 Antikörpern zu einer Verhinderung des Tumorwachstums führt, zum anderen, dass eine Inhibierung CXCR2 positiver MDSCs mit anti-CXCR2 Antikörpern oder einer CXCR2 Defizienz die Effizienz der Checkpoint Blockade steigern konnte (Highfill *et al.*, 2014). Demnach wird auch hier das Potenzial immuntherapeutischer Strategien im RMS verdeutlicht, beispielsweise durch den Einsatz von Checkpoint Inhibitoren wie anti-PD1 Antikörper.

Bisherige Studien beschreiben weiterhin eine Anreicherung von Tumor-assoziierten CD4+ sowie CD8+ regulatorische T Zellen, welche mit einer Verminderung CD8+ induzierter Tumorzytotoxizität durch das Protein MIF einhergeht (Choi *et al.*, 2012). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde versucht,

DISKUSSION

das Verhalten von regulatorischen T Zellen nach Kultivierung mit MIF-haltigem RMS Zellkulturüberstand zu analysieren. Das Ziel war mittels Färbung von CD4, CD25 sowie FOXP3+ die CD4+CD25+FOXP3+ regulatorischen T Zellen durchflusszytometrisch darzustellen. Leider konnte eine solche Zellpopulation nicht dargestellt werden (Daten nicht gezeigt). Dies könnte an der Färbung der PBMCs selbst liegen, oder auch an der Permeabilisierung, die für die Anfärbung des intrazellulär vorhandenen FOXP3 notwendig ist. Möglicherweise verlief im Rahmen der durchgeführten Experimente die Fixation/Permeabilisierung der primären PBMCs erfolglos. Ein weiteres Problem könnte die zu geringe Anzahl von CD4+CD25+FOXP3+ regulatorischen T Zellen darstellen. Um dies zu umgehen, müsste eine Isolation von PBMCs beispielsweise aus *buffy coats* erfolgen mit gegebenenfalls nachfolgender MACS®-Isolation. Aufgrund vielversprechender Ergebnisse bezüglich der Interaktion von MIF sowie der *immunosurveillance* von Tumoren und regulatorischen T Zellen, welche in der Literatur berichtet wurden, wären diesbezüglich weitergehende Untersuchungen lohnenswert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zusätzlich CD8+ sowie CD4+ T Zellen durchflusszytometrisch dargestellt, die wie in Kapitel 2.2.14 kultiviert und entsprechend gefärbt wurden. Es ergaben sich jedoch keine aussagekräftigen Änderungen dieser Populationen durch die unterschiedlichen Behandlungen, weshalb auf eine Darstellung dieser Ergebnisse verzichtet wurde.

In einem weiteren Ansatz wurde das Lyseverhalten von PBMCs auf RMS Tumorzellen (Rh30 Gluc) während einer Inhibierung von MIF untersucht, unter anderem, um die Rolle von MIF im immunogenen Zelltod zu evaluieren. Das Ziel war, eine gesteigerte Lyse von RMS Tumorzellen durch die Inhibierung von MIF zu erhalten. Hierfür war es zunächst ausschlaggebend, von welchem Spender die primären sowie frisch isolierten PBMCs stammten. Nicht alle Spender lieferten PBMCs, welche die Rh30 Gluc Zellen erkannten und lysierten; höchstwahrscheinlich abhängig vom jeweiligen HLA-Typ. Im Verlauf konnte ein passender Spender gefunden werden, woraufhin eine effektive Lyse der RMS Zellen durch PBMCs resultierte. Um eine Steigerung der Lyse zu erreichen, wurden blockierende anti-MIF Antikörper eingesetzt, welche leider

DISKUSSION

keine signifikanten Ergebnisse zur Steigerung einer Tumorzelllyse von Rh30 Gluc Zellen erzielten. Jedoch ist hierbei anzumerken, dass das Lyseverhalten bereits so stark war, dass keine synergistische Wirkung durch anti-MIF Antikörper mehr möglich war. Krockenberger *et al.* hingegen zeigten eine Verstärkung der Lyse von Ovarialtumorzellen durch NK Zellen mittels anti-MIF Antikörpern (Krockenberger *et al.*, 2008), wodurch der von MIF induzierte mögliche *immune escape* reduziert werden könnte.

Diese Resultate legen nahe, dass vermutlich ein gering aktiver Antikörper in dieser Arbeit sowie in den funktionalen Assays, welche bereits zuvor diskutiert wurden, verwendet wurde. Dennoch wurde mittels Durchflusszytometrie, Immunhistochemie sowie Immunfluoreszenz nachgewiesen, dass eine Bindung des Antikörpers an MIF erfolgte. Eine weitere Ursache der unterschiedlichen Ergebnisse könnte darin bestehen, dass je nach Antikörper verschiedene Bindungsstellen von MIF verwendet werden. Die Tautomerase von MIF stellt ein wichtiges Element in dessen Aktivität dar; eine Bindung des hier verwendeten Antikörpers an MIF, jedoch nicht an dessen katalytisch aktive Bindungsstelle, wäre denkbar und würde die geringe Aktivität in funktionalen Assays erklären. Um dies näher zu spezifizieren, könnte ein funktionaler Assay durchgeführt werden, in dem eine Substratumwandlung (D/L-Dopachrom) der MIF Tautomerase zusammen mit den verwendeten anti-MIF Antikörpern untersucht wird. Ferner könnte auch die Bindungsstelle von MIF für dessen Aktivität verantwortlich sein, die für eine Interaktion mit dessen Rezeptoren (z.B. CD74) bzw. Protein-Protein Interaktionen ausschlaggebend ist (O'Reilly *et al.*, 2016). In Abhängigkeit der Bindungsstelle der anti-MIF Antikörper oder auch *small molecules* an MIF kann demnach die Aktivität des Proteins mehr oder weniger potent inhibiert werden. Mithilfe einer Kristallstruktur des MIF/Rezeptorkomplexes bzw. des MIF/Inhibitor/Rezeptorkomplexes oder auch aktuell in der Entwicklung stehende biochemische Assays könnten dazu beitragen, die Hypothese weitergehend zu untersuchen (O'Reilly *et al.*, 2016). Andere Studien belegen eine Wirksamkeit von anti-MIF Antikörpern wie bereits weiter oben beschrieben, sowie auch Krockenberger *et al.* im Rahmen einer Steigerung der Tumorzelllyse beim Ovarialkarzinom (Krockenberger *et al.*,

DISKUSSION

2008). Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten demnach aus den verschiedenen Antikörpern, die verwendet wurden, resultieren. Zudem könnte ein weiterer Grund die heterogenen Tumorentitäten und deren differierendes Verhalten darstellen. Trotz dieser widersprüchlichen Resultate könnten anti-MIF Antikörper vielversprechende Effekte im Rahmen einer Inhibierung des von Tumoren stammenden MIFs liefern, wie anhand des Prostatakarzinoms *in vitro* sowie *in vivo* demonstriert wurde (Hussain et al., 2013). Weitere Experimente im RMS mit weiteren blockierenden anti-MIF Antikörpern könnten demnach aufschlussreiche Resultate erzielen.

Eine weitere Ursache des ungenügenden Ansprechens der Tumorzelllyse durch eine Inhibierung von MIF könnte darin begründet sein, dass in der vorliegenden Arbeit primäre PBMCs verwendet wurden anstatt wie bei Krockenberger *et al.* isolierte NK Zellen (Krockenberger et al., 2008). Es wurden jedoch PBMCs eingesetzt, um die umfassende Interaktion der komplexen Population von Leukozyten auf RMS Zellen während einer Inhibierung von MIF zu evaluieren um hierdurch die Realität *in vitro* möglichst getreu nachzustellen.

Abschließend lässt sich festhalten, dass eine Inhibierung von MIF oder dessen Rezeptoren durchaus interessante Resultate im RMS erwarten lassen könnten. Aktuell sind hier mehrere Inhibitoren möglich, die jedoch nicht alle untersucht wurden. Die in dieser Arbeit gestesteten MIF Modulatoren sind allerdings therapeutisch nicht ausgereift, insbesondere aufgrund der geringen Effekte sowie der hohen Konzentrationen, die in den Experimenten verwendet wurden. Eine Kombination der Behandlung mit konventionellen Chemotherapeutika könnte darüber hinaus untersucht werden. In diesem Zusammenhang sei insbesondere Doxorubicin als Anthrazyklin hervorgehoben, welche im Rahmen des *immunogenic cell death* zu einer Depletion regulatorischer T Zellen sowie MDSCs beitragen kann (Galluzzi et al., 2015, Alizadeh et al., 2014, Hannesdottir et al., 2013). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch eine Induktion von MIF durch Zytostatika, unter anderem Doxorubicin, wodurch folglich ein gegenteiliger Effekt resultieren könnte, indem die Differenzierung von MDSCs und regulatorischen T Zellen durch MIF gefördert wird. Der positive Effekt der zytostatischen Behandlung könnte dadurch

DISKUSSION

zurückgesetzt werden, was zu einem ungenügenden Therapieansprechen beitragen könnte. Um den positiven Effekt des immunogenen Zelltods von beispielsweise Doxorubicin wiederherzustellen, könnte sich eine Inhibierung von MIF oder dessen Rezeptoren anbieten, um eine indirekte Immunstimulation zu erreichen und dem *immune escape* der Tumorzellen entgegenzuwirken.

4.6 Schlussfolgerung

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit demonstriert werden, dass MIF im RMS exprimiert wird, in der RMS Tumorzellmigration involviert ist, SF als möglicher MIF Inhibitor die RMS Zellviabilität sowohl mit als auch ohne Kombination mit Chemotherapeutika (Doxorubicin) beeinträchtigt sowie eine Behandlung mit Zytostatika zu einer verstärkten MIF Expression im RMS führt. Letzteres könnte den immunogenen Zelltod beeinflussen, möglicherweise durch die Induktion von immunsupprimierenden Netzwerken wie die Förderung der Entwicklung immunsupprimierender MDSCs oder auch regulatorischen T Zellen. Um das Immunsystem zu reaktivieren, scheint eine Inhibierung von MIF mittels blockierender Antikörper, geringen Konzentrationen von SF oder auch ISO-1 eine Möglichkeit darzustellen, um die behandlungsabhängige MIF Induktion umzukehren. Dennoch ist zu beachten, dass die verwendeten Inhibitoren auch eine direkte Wirkung auf Immunzellen haben und deren Wirkung somit nicht direkt auf MIF zurückgeführt werden kann. Des Weiteren sind die getesteten MIF Modulatoren therapeutisch (noch) nicht ausgereift.

Für mechanistische Fragestellungen könnte man MIF knock-down Zelllinien generieren, wie bereits bei Tarnowski *et al.* im RMS beschrieben wurde (Tarnowski *et al.*, 2010a). Allerdings sind im Hinblick auf therapeutische Anwendungen Inhibitoren bzw. *small molecules* oder auch Antikörper zu bevorzugen.

Eine indirekte Methode, die Aktivität von MIF zu inhibieren, könnte durch eine Blockade von MIF Rezeptoren erzielt werden. Hier seien vorwiegend Antikörper gegen CD74 und/oder CXCR4 genannt, die beide mit dem Immunsystem interagieren und aktuell vielversprechende Ergebnisse zeigen (O'Reilly *et al.*, 2016, Tanese *et al.*, 2015, Kindt *et al.*, 2016). Insbesondere würde CXCR4 ein ideales Target im RMS bieten, zum einen aufgrund der erhöhten Expression im Vergleich zum Muskelgewebe, wie in der durchgeführten differentiellen Genexpressionsanalyse nachgewiesen wurde (Abbildung 14), zum anderen aufgrund seiner engen Vernetzung mit dem Immunsystem.

DISKUSSION

Insgesamt stellt MIF ein interessantes Target dar, welches über mehrere Wege zur Tumorgenese und möglicherweise dem *immune escape* beitragen könnte. In der vorliegenden Arbeit konnte die Bedeutung von MIF im RMS im Rahmen der Tumorzellmigration, Proliferation, dem Verhalten während der Behandlung mit konventionellen Chemotherapeutika sowie der Involvierung in der *immunosurveillance* herausgearbeitet werden. Eine Inhibierung von MIF könnte zu einer indirekten Immunstimulation sowie möglicherweise zu einem besseren Ansprechen auf eine Therapie mit konventionellen Chemotherapeutika im RMS beitragen. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass auch endogenes MIF, welches von normalen Körperzellen wie beispielsweise Immunzellen exprimiert wird, ebenfalls inhibiert werden könnte.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das immunmodulatorische Protein *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) ist sowohl in der onkogenen Transformation, Tumorprogression und Metastasierung als auch der Immunsuppression involviert. Des Weiteren ist MIF in vielen soliden Tumoren überexprimiert, darunter im pädiatrischen Rhabdomyosarkom (RMS). In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Funktion von MIF im RMS während der Behandlung mit konventionellen Chemotherapeutika (Doxorubicin, Vincristin, Etoposid) untersucht. Hierfür wurden humane RMS Zelllinien mittels Durchflusszytometrie, Immunfluoreszenz, PCR und ELISA analysiert, wobei sowohl eine Überexpression von MIF in RMS Zellen als auch eine vermehrte Expression und Sekretion nach der Behandlung mit konventionellen Chemotherapeutika nachgewiesen wurde. Weiterführende Untersuchungen wie Migrations Assays ließen erkennen, dass MIF Inhibitoren (ISO-1, Ant. III 4-IPP, Ant. V, SF) sowie blockierende Antikörper zu einer Reduktion der Migration führten und hierbei auf eine Rolle von MIF in der Metastasierung hindeuten. Zusätzlich wurde die Funktion von MIF im *immune escape* untersucht. Die Differenzierung einer Population von Immunzellen, welche immunsuppressive *myeloid-derived suppressor cells* (MDSCs) enthielt, wurde durch die Inkubation mit MIF-haltigem RMS Zellkulturüberstand gefördert und mittels MIF Inhibitoren, jedoch nicht durch anti-MIF Antikörper, unterdrückt. Obwohl die meisten Inhibitoren die Immunaktivität wiederherstellen könnten, wurde die T Zell Proliferation in einem CFSE Assay durch den Inhibitor Ant. III sowie durch hohe Konzentrationen von SF beeinträchtigt, wohingegen die T Zell Proliferation durch niedrige Konzentrationen von SF, ISO-1 oder anti-MIF Antikörpern nicht vermindert wurde. Allerdings führte die Inhibierung von MIF durch Antikörper nicht zu einer Steigerung der Lyseaktivität von PBMCs, welche mit RMS Tumorzellen kultiviert wurden. Diese Ergebnisse zeigen, dass MIF in Mechanismen des *immune escapes* involviert sein könnte sowie im *immunogenic cell death* im Rahmen der Behandlung mit konventionellen Chemotherapeutika. MIF als zielgerichtetes Target könnte zu einer Wiederherstellung der Sensitivität des Immunsystems sowie zur Kontrolle der Tumorzellmigration und Metastasierung beitragen.

6. LITERATUR

- AL-ABED, Y. & VANPATTEN, S.** 2011. MIF as a disease target: ISO-1 as a proof-of-concept therapeutic. *Future Med Chem*, 3, 45-63.
- ALAMPOUR-RAJABI, S., EL BOUNKARI, O., ROT, A., MULLER-NEWEN, G., BACHELERIE, F., GAWAZ, M., WEBER, C., SCHOBER, A. & BERNHAGEN, J.** 2015. MIF interacts with CXCR7 to promote receptor internalization, ERK1/2 and ZAP-70 signaling, and lymphocyte chemotaxis. *FASEB J*, 29, 4497-511.
- ALIZADEH, D., TRAD, M., HANKE, N. T., LARMONIER, C. B., JANIKASHVILI, N., BONNOTTE, B., KATSANIS, E. & LARMONIER, N.** 2014. Doxorubicin eliminates myeloid-derived suppressor cells and enhances the efficacy of adoptive T-cell transfer in breast cancer. *Cancer Res*, 74, 104-18.
- AOKI, Y., NIIHORI, T., KAWAME, H., KUROSAWA, K., OHASHI, H., TANAKA, Y., FILOCAMO, M., KATO, K., SUZUKI, Y., KURE, S. & MATSUBARA, Y.** 2005. Germline mutations in HRAS proto-oncogene cause Costello syndrome. *Nat Genet*, 37, 1038-40.
- APETOH, L., GHIRINGHELLI, F., TESNIERE, A., OBEID, M., ORTIZ, C., CRIOLLO, A., MIGNOT, G., MAIURI, M. C., ULLRICH, E., SAULNIER, P., YANG, H., AMIGORENA, S., RYFFEL, B., BARRAT, F. J., SAFTIG, P., LEVI, F., LIDEREAU, R., NOGUES, C., MIRA, J. P., CHOMPRET, A., JOULIN, V., CLAVEL-CHAPELON, F., BOURHIS, J., ANDRE, F., DELALOGUE, S., TURSZ, T., KROEMER, G. & ZITVOGEL, L.** 2007. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med*, 13, 1050-9.
- APTE, R. S., SINHA, D., MAYHEW, E., WISTOW, G. J. & NIEDERKORN, J. Y.** 1998. Cutting edge: role of macrophage migration inhibitory factor in inhibiting NK cell activity and preserving immune privilege. *J Immunol*, 160, 5693-6.
- ARMEANU-EBINGER, S., BONIN, M., HABIG, K., POREMBA, C., KOSCIELNIAK, E., GODZINSKI, J., WARMANN, S. W., FUCHS, J. & SEITZ, G.** 2011. Differential expression of invasion promoting genes in childhood rhabdomyosarcoma. *Int J Oncol*, 38, 993-1000.
- ARMEANU-EBINGER, S., GRIESSINGER, C. M., HERRMANN, D., FUCHS, J., KNEILLING, M., PICHLER, B. J. & SEITZ, G.** 2014. PET/MR Imaging and Optical Imaging of Metastatic Rhabdomyosarcoma in Mice. *J Nucl Med*.
- BACH, J. P., RINN, B., MEYER, B., DODEL, R. & BACHER, M.** 2008. Role of MIF in inflammation and tumorigenesis. *Oncology*, 75, 127-33.

LITERATUR

- BAI, F., ASOJO, O. A., CIRILLO, P., CIUSTEA, M., LEDIZET, M., ARISTOFF, P. A., LENG, L., KOSKI, R. A., POWELL, T. J., BUCALA, R. & ANTHONY, K. G.** 2012. A novel allosteric inhibitor of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *J Biol Chem*, 287, 30653-63.
- BARON, N., DEUSTER, O., NOELKER, C., STUER, C., STRIK, H., SCHALLER, C., DODEL, R., MEYER, B. & BACHER, M.** 2011. Role of macrophage migration inhibitory factor in primary glioblastoma multiforme cells. *J Neurosci Res*, 89, 711-7.
- BEN ARUSH, M., MINARD-COLIN, V., MOSSERI, V., DEFACHELLES, A. S., BERGERON, C., ALGRET, N., FASOLA, S., ANDRE, N., THEBAUD, E., CORRADINI, N., BERNIER, V., MARTELLI, H., RANCHERE, D. & ORBACH, D.** 2015. Does aggressive local treatment have an impact on survival in children with metastatic rhabdomyosarcoma? *Eur J Cancer*, 51, 193-201.
- BERGAMASCHI, A., CHRISTENSEN, B. L. & KATZENELLENBOGEN, B. S.** 2011. Reversal of endocrine resistance in breast cancer: interrelationships among 14-3-3zeta, FOXM1, and a gene signature associated with mitosis. *Breast Cancer Res*, 13, R70.
- BERNHAGEN, J., KROHN, R., LUE, H., GREGORY, J. L., ZERNECKE, A., KOENEN, R. R., DEWOR, M., GEORGIEV, I., SCHOBER, A., LENG, L., KOOISTRA, T., FINGERLE-ROWSON, G., GHEZZI, P., KLEEMANN, R., MCCOLL, S. R., BUCALA, R., HICKEY, M. J. & WEBER, C.** 2007. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med*, 13, 587-96.
- BHATIA, A. & KUMAR, Y.** 2014. Cellular and molecular mechanisms in cancer immune escape: a comprehensive review. *Expert Rev Clin Immunol*, 10, 41-62.
- BOURLA, A. B. & ZAMARIN, D.** 2016. Immunotherapy: New Strategies for the Treatment of Gynecologic Malignancies. *Oncology (Williston Park)*, 30, 59-66, 69.
- CABRERA, C. M., JIMENEZ, P., CABRERA, T., ESPARZA, C., RUIZ-CABELLO, F. & GARRIDO, F.** 2003. Total loss of MHC class I in colorectal tumors can be explained by two molecular pathways: beta2-microglobulin inactivation in MSI-positive tumors and LMP7/TAP2 downregulation in MSI-negative tumors. *Tissue Antigens*, 61, 211-9.
- CASARES, N., PEQUIGNOT, M. O., TESNIERE, A., GHIRINGHELLI, F., ROUX, S., CHAPUT, N., SCHMITT, E., HAMAI, A., HERVAS-STUBBS, S., OBEID, M., COUTANT, F., METIVIER, D., PICHARD, E., AUCOUTURIER, P., PIERRON, G., GARRIDO, C., ZITVOGEL, L. &**

- KROEMER, G.** 2005. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J Exp Med*, 202, 1691-701.
- CATAISSON, C., SALCEDO, R., HAKIM, S., MOFFITT, B. A., WRIGHT, L., YI, M., STEPHENS, R., DAI, R. M., LYAKH, L., SCHENTEN, D., YUSPA, H. S. & TRINCHIERI, G.** 2012. IL-1R-MyD88 signaling in keratinocyte transformation and carcinogenesis. *J Exp Med*, 209, 1689-702.
- CAWTHORN, T. R., MORENO, J. C., DHARSEE, M., TRAN-THANH, D., ACKLOO, S., ZHU, P. H., SARDANA, G., CHEN, J., KUPCHAK, P., JACKS, L. M., MILLER, N. A., YOUNGSON, B. J., IAKOVLEV, V., GUIDOS, C. J., VALLIS, K. A., EVANS, K. R., MCCREADY, D., LEONG, W. L. & DONE, S. J.** 2012. Proteomic analyses reveal high expression of decorin and endoplasmic (HSP90B1) are associated with breast cancer metastasis and decreased survival. *PLoS One*, 7, e30992.
- CHOI, S., KIM, H. R., LENG, L., KANG, I., JORGENSEN, W. L., CHO, C. S., BUCALA, R. & KIM, W. U.** 2012. Role of macrophage migration inhibitory factor in the regulatory T cell response of tumor-bearing mice. *J Immunol*, 189, 3905-13.
- CHOUHDARY, S., HEGDE, P., PRUITT, J. R., SIELECKI, T. M., CHOUHDARY, D., SCARPATO, K., DEGRAFF, D. J., PILBEAM, C. C. & TAYLOR, J. A., 3RD** 2013. Macrophage migratory inhibitory factor promotes bladder cancer progression via increasing proliferation and angiogenesis. *Carcinogenesis*, 34, 2891-9.
- COUSSENS, L. M., ZITVOGEL, L. & PALUCKA, A. K.** 2013. Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? *Science*, 339, 286-91.
- COYLE, A. J. & GUTIERREZ-RAMOS, J. C.** 2001. The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. *Nat Immunol*, 2, 203-9.
- CRICHLAW, G. V., FAN, C., KEELER, C., HODSDON, M. & LOLIS, E. J.** 2012. Structural interactions dictate the kinetics of macrophage migration inhibitory factor inhibition by different cancer-preventive isothiocyanates. *Biochemistry*, 51, 7506-14.
- CROSS, J. V., RADY, J. M., FOSS, F. W., LYONS, C. E., MACDONALD, T. L. & TEMPLETON, D. J.** 2009. Nutrient isothiocyanates covalently modify and inhibit the inflammatory cytokine macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Biochem J*, 423, 315-21.
- CRUCIS, A., RICHER, W., BRUGIERES, L., BERGERON, C., MARIE-CARDINE, A., STEPHAN, J. L., GIRARD, P., CORRADINI, N., MUNZER, M., LACOUR, B., MINARD-COLIN, V., SARNACKI, S.,**

LITERATUR

- RANCHERE-VINCE, D., ORBACH, D. & BOURDEAUT, F.** 2015. Rhabdomyosarcomas in children with neurofibromatosis type I: A national historical cohort. *Pediatr Blood Cancer*, 62, 1733-8.
- DAGHER, R., LONG, L. M., READ, E. J., LEITMAN, S. F., CARTER, C. S., TSOKOS, M., GOLETZ, T. J., AVILA, N., BERZOFKY, J. A., HELMAN, L. J. & MACKALL, C. L.** 2002. Pilot trial of tumor-specific peptide vaccination and continuous infusion interleukin-2 in patients with recurrent Ewing sarcoma and alveolar rhabdomyosarcoma: an inter-institute NIH study. *Med Pediatr Oncol*, 38, 158-64.
- DANTONELLO, T. M., INT-VEEN, C., HARMS, D., LEUSCHNER, I., SCHMIDT, B. F., HERBST, M., JUERGENS, H., SCHEEL-WALTER, H. G., BIELACK, S. S., KLINGEBIEL, T., DICKERHOFF, R., KIRSCH, S., BRECHT, I., SCHMELZLE, R., GREULICH, M., GADNER, H., GREINER, J., MARKY, I., TREUNER, J. & KOSCIELNIAK, E.** 2009. Cooperative trial CWS-91 for localized soft tissue sarcoma in children, adolescents, and young adults. *J Clin Oncol*, 27, 1446-55.
- DANTONELLO, T. M., WINKLER, P., BOELLING, T., FRIEDEL, G., SCHMID, I., MATTKE, A. C., LJUNGMAN, G., BIELACK, S. S., KLINGEBIEL, T., KOSCIELNIAK, E. & GROUP, C. W. S. S.** 2011. Embryonal rhabdomyosarcoma with metastases confined to the lungs: report from the CWS Study Group. *Pediatr Blood Cancer*, 56, 725-32.
- DASGUPTA, R., FUCHS, J. & RODEBERG, D.** 2016. Rhabdomyosarcoma. *Semin Pediatr Surg*, 25, 276-283.
- DAVICIONI, E., ANDERSON, J. R., BUCKLEY, J. D., MEYER, W. H. & TRICHE, T. J.** 2010. Gene expression profiling for survival prediction in pediatric rhabdomyosarcomas: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol*, 28, 1240-6.
- DAVICIONI, E., ANDERSON, M. J., FINCKENSTEIN, F. G., LYNCH, J. C., QUALMAN, S. J., SHIMADA, H., SCHOFIELD, D. E., BUCKLEY, J. D., MEYER, W. H., SORENSEN, P. H. & TRICHE, T. J.** 2009. Molecular classification of rhabdomyosarcoma--genotypic and phenotypic determinants of diagnosis: a report from the Children's Oncology Group. *Am J Pathol*, 174, 550-64.
- DEBAUN, M. R. & TUCKER, M. A.** 1998. Risk of cancer during the first four years of life in children from The Beckwith-Wiedemann Syndrome Registry. *J Pediatr*, 132, 398-400.
- DEMARIA, S., VOLM, M. D., SHAPIRO, R. L., YEE, H. T., ORATZ, R., FORMENTI, S. C., MUGGIA, F. & SYMMANS, W. F.** 2001. Development of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer after neoadjuvant paclitaxel chemotherapy. *Clin Cancer Res*, 7, 3025-30.

- DESSEIN, A. F., STECHLY, L., JONCKHEERE, N., DUMONT, P., MONTE, D., LETEURTRE, E., TRUANT, S., PRUVOT, F. R., FIGEAC, M., HEBBAR, M., LECCELLIER, C. H., LESUFFLEUR, T., DESSEIN, R., GRARD, G., DEJONGHE, M. J., DE LAUNOIT, Y., FURUICHI, Y., PREVOST, G., PORCHET, N., GESPACH, C. & HUET, G.** 2010. Autocrine induction of invasive and metastatic phenotypes by the MIF-CXCR4 axis in drug-resistant human colon cancer cells. *Cancer Res*, 70, 4644-54.
- DIKEN, M., KREITER, S., KLOKE, B. & SAHIN, U.** 2015. Current Developments in Actively Personalized Cancer Vaccination with a Focus on RNA as the Drug Format. *Prog Tumor Res*, 42, 44-54.
- DILLER, L., SEXSMITH, E., GOTTLIEB, A., LI, F. P. & MALKIN, D.** 1995. Germline p53 mutations are frequently detected in young children with rhabdomyosarcoma. *J Clin Invest*, 95, 1606-11.
- DUNN, G. P., BRUCE, A. T., IKEDA, H., OLD, L. J. & SCHREIBER, R. D.** 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*, 3, 991-8.
- DUNN, G. P., OLD, L. J. & SCHREIBER, R. D.** 2004. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol*, 22, 329-60.
- FARKONA, S., DIAMANDIS, E. P. & BLASUTIG, I. M.** 2016. Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? *BMC Med*, 14, 73.
- FERRARI, A., BISOGNO, G., MACALUSO, A., CASANOVA, M., D'ANGELO, P., PIERANI, P., ZANETTI, I., ALAGGIO, R., CECCHETTO, G. & CARLI, M.** 2007. Soft-tissue sarcomas in children and adolescents with neurofibromatosis type 1. *Cancer*, 109, 1406-12.
- FINGERLE-ROWSON, G., PETRENKO, O., METZ, C. N., FORSTHUBER, T. G., MITCHELL, R., HUSS, R., MOLL, U., MULLER, W. & BUCALA, R.** 2003. The p53-dependent effects of macrophage migration inhibitory factor revealed by gene targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 9354-9.
- FRIDMAN, W. H., PAGES, F., SAUTES-FRIDMAN, C. & GALON, J.** 2012. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*, 12, 298-306.
- FUCIKOVA, J., MOSEROVA, I., URBANOVA, L., BEZU, L., KEPP, O., CREMER, I., SALEK, C., STRNAD, P., KROEMER, G., GALLUZZI, L. & SPISEK, R.** 2015. Prognostic and Predictive Value of DAMPs and DAMP-Associated Processes in Cancer. *Front Immunol*, 6, 402.
- GADENER, H., GAEDICKE, G., NIEMEYER, C. & RITTER, J.** 2006. *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*, Heidelberg, Springer Verlag.

LITERATUR

- GAJEWSKI, T. F., SCHREIBER, H. & FU, Y. X.** 2013. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol*, 14, 1014-22.
- GALLUZZI, L., BUQUE, A., KEPP, O., ZITVOGEL, L. & KROEMER, G.** 2015. Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents. *Cancer Cell*, 28, 690-714.
- GALLUZZI, L., BUQUE, A., KEPP, O., ZITVOGEL, L. & KROEMER, G.** 2017. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nat Rev Immunol*, 17, 97-111.
- GALLUZZI, L., SENOVILLA, L., ZITVOGEL, L. & KROEMER, G.** 2012. The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov*, 11, 215-33.
- GALLUZZI, L., ZITVOGEL, L. & KROEMER, G.** 2016. Immunological Mechanisms Underneath the Efficacy of Cancer Therapy. *Cancer Immunol Res*, 4, 895-902.
- GHIRINGHELLI, F., APETOH, L., TESNIERE, A., AYMERIC, L., MA, Y., ORTIZ, C., VERMAELEN, K., PANARETAKIS, T., MIGNOT, G., ULLRICH, E., PERFETTINI, J. L., SCHLEMMER, F., TASDEMIR, E., UHL, M., GENIN, P., CIVAS, A., RYFFEL, B., KANELLOPOULOS, J., TSCHOPP, J., ANDRE, F., LIDEREAU, R., MCLAUGHLIN, N. M., HAYNES, N. M., SMYTH, M. J., KROEMER, G. & ZITVOGEL, L.** 2009. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med*, 15, 1170-8.
- GHIRINGHELLI, F., LARMONIER, N., SCHMITT, E., PARCELLIER, A., CATHELIN, D., GARRIDO, C., CHAUFFERT, B., SOLARY, E., BONNOTTE, B. & MARTIN, F.** 2004. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur J Immunol*, 34, 336-44.
- GHIRINGHELLI, F., MENARD, C., PUIG, P. E., LADOIRE, S., ROUX, S., MARTIN, F., SOLARY, E., LE CESNE, A., ZITVOGEL, L. & CHAUFFERT, B.** 2007. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*, 56, 641-8.
- GONZALEZ-APARICIO, M., ALZUGUREN, P., MAULEON, I., MEDINA-ECHEVERZ, J., HERVAS-STUBBS, S., MANCHENO, U., BERRAONDO, P., CRETZAZ, J., GONZALEZ-ASEGUINOLAZA, G., PRIETO, J. & HERNANDEZ-ALCOCEBA, R.** 2011. Oxaliplatin in combination with liver-specific expression of interleukin 12 reduces the

LITERATUR

immunosuppressive microenvironment of tumours and eradicates metastatic colorectal cancer in mice. *Gut*, 60, 341-9.

GORDON-WEEKS, A. N., LIM, S. Y., YUZHALLIN, A. E., JONES, K. & MUSCHEL, R. 2015. Macrophage migration inhibitory factor: a key cytokine and therapeutic target in colon cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*, 26, 451-61.

GOTWALS, P., CAMERON, S., CIPOLLETTA, D., CREMASCO, V., CRYSTAL, A., HEWES, B., MUELLER, B., QUARATINO, S., SABATOS-PEYTON, C., PETRUZZELLI, L., ENGELMAN, J. A. & DRANOFF, G. 2017. Prospects for combining targeted and conventional cancer therapy with immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 17, 286-301.

GRIPP, K. W. 2005. Tumor predisposition in Costello syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 137C, 72-7.

GRIPP, K. W., LIN, A. E., STABLEY, D. L., NICHOLSON, L., SCOTT, C. I., JR., DOYLE, D., AOKI, Y., MATSUBARA, Y., ZACKAI, E. H., LAPUNZINA, P., GONZALEZ-MENESES, A., HOLBROOK, J., AGRESTA, C. A., GONZALEZ, I. L. & SOL-CHURCH, K. 2006. HRAS mutation analysis in Costello syndrome: genotype and phenotype correlation. *Am J Med Genet A*, 140, 1-7.

GUO, P., WANG, J., LIU, J., XIA, M., LI, W. & HE, M. 2015. Macrophage immigration inhibitory factor promotes cell proliferation and inhibits apoptosis of cervical adenocarcinoma. *Tumour Biol*, 36, 5095-102.

HANNESDOTTIR, L., TYMOSZUK, P., PARAJULI, N., WASMER, M. H., PHILIPP, S., DASCHIL, N., DATTA, S., KOLLER, J. B., TRIPP, C. H., STOITZNER, P., MULLER-HOLZNER, E., WIEGERS, G. J., SEXL, V., VILLUNGER, A. & DOPPLER, W. 2013. Lapatinib and doxorubicin enhance the Stat1-dependent antitumor immune response. *Eur J Immunol*, 43, 2718-29.

HASLE, H. 2009. Malignant diseases in Noonan syndrome and related disorders. *Horm Res*, 72 Suppl 2, 8-14.

HAWKINS, D. S., GUPTA, A. A. & RUDZINSKI, E. R. 2014. What is new in the biology and treatment of pediatric rhabdomyosarcoma? *Curr Opin Pediatr*, 26, 50-6.

HAYES-JORDAN, A., DOHERTY, D. K., WEST, S. D., RANEY, R. B., BLAKELY, M. L., COX, C. S., JR., ANDRASSY, R. J. & LALLY, K. P. 2006. Outcome after surgical resection of recurrent rhabdomyosarcoma. *J Pediatr Surg*, 41, 633-8; discussion 633-8.

LITERATUR

- HEALY, Z. R., LIU, H., HOLTZCLAW, W. D. & TALALAY, P.** 2011. Inactivation of tautomerase activity of macrophage migration inhibitory factor by sulforaphane: a potential biomarker for anti-inflammatory intervention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 20, 1516-23.
- HERRMANN, D.** 2011. *Immuntherapeutische Ansätze beim Rhabdomyosarkom: Therapeutische Antikörper und Phagozytose*. Naturwissenschaftliche Dissertationsschrift, Universität Tübingen.
- HERRMANN, D., SEITZ, G., FUCHS, J. & ARMEANU-EBINGER, S.** 2012. Susceptibility of rhabdomyosarcoma cells to macrophage-mediated cytotoxicity. *Oncoimmunology*, 1, 279-286.
- HIGHFILL, S. L., CUI, Y., GILES, A. J., SMITH, J. P., ZHANG, H., MORSE, E., KAPLAN, R. N. & MACKALL, C. L.** 2014. Disruption of CXCR2-mediated MDSC tumor trafficking enhances anti-PD1 efficacy. *Sci Transl Med*, 6, 237ra67.
- HINSON, A. R., JONES, R., CROSE, L. E., BELYEA, B. C., BARR, F. G. & LINARDIC, C. M.** 2013. Human rhabdomyosarcoma cell lines for rhabdomyosarcoma research: utility and pitfalls. *Front Oncol*, 3, 183.
- HINZ, T., KALLEN, K., BRITTEN, C. M., FLAMION, B., GRANZER, U., HOOS, A., HUBER, C., KHLEIF, S., KREITER, S., RAMMENSEE, H. G., SAHIN, U., SINGH-JASUJA, H., TURECI, O. & KALINKE, U.** 2017. The European Regulatory Environment of RNA-Based Vaccines. *Methods Mol Biol*, 1499, 203-222.
- HIRA, E., ONO, T., DHAR, D. K., EL-ASSAL, O. N., HISHIKAWA, Y., YAMANOI, A. & NAGASUE, N.** 2005. Overexpression of macrophage migration inhibitory factor induces angiogenesis and deteriorates prognosis after radical resection for hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 103, 588-98.
- HOMMA, Y., TANIGUCHI, K., NAKAZAWA, M., MATSUYAMA, R., MORI, R., TAKEDA, K., ICHIKAWA, Y., TANAKA, K. & ENDO, I.** 2014. Changes in the immune cell population and cell proliferation in peripheral blood after gemcitabine-based chemotherapy for pancreatic cancer. *Clin Transl Oncol*, 16, 330-5.
- HUANG, E., RUBIN, B. P. & KELLER, C.** 2011. The long road to immunotherapy for childhood rhabdomyosarcoma. *Pediatr Blood Cancer*, 57, 899-901.
- HUANG, F., HURLBURT, W., GREER, A., REEVES, K. A., HILLERMAN, S., CHANG, H., FARGNOLI, J., GRAF FINCKENSTEIN, F., GOTTARDIS, M. M. & CARBONI, J. M.** 2010. Differential mechanisms of acquired resistance to insulin-like growth factor-i receptor antibody therapy or to a

LITERATUR

small-molecule inhibitor, BMS-754807, in a human rhabdomyosarcoma model. *Cancer Res*, 70, 7221-31.

HUDSON, J. D., SHOAIABI, M. A., MAESTRO, R., CARNERO, A., HANNON, G. J. & BEACH, D. H. 1999. A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J Exp Med*, 190, 1375-82.

HUH, W. W. & SKAPEK, S. X. 2010. Childhood rhabdomyosarcoma: new insight on biology and treatment. *Curr Oncol Rep*, 12, 402-10.

HUSSAIN, F., FREISSMUTH, M., VOLKEL, D., THIELE, M., DOUILLARD, P., ANTOINE, G., THURNER, P., EHRlich, H., SCHWARZ, H. P., SCHEIFLINGER, F. & KERSCHBAUMER, R. J. 2013. Human anti-macrophage migration inhibitory factor antibodies inhibit growth of human prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther*, 12, 1223-34.

IIDA, N., DZUTSEV, A., STEWART, C. A., SMITH, L., BOULADOUX, N., WEINGARTEN, R. A., MOLINA, D. A., SALCEDO, R., BACK, T., CRAMER, S., DAI, R. M., KIU, H., CARDONE, M., NAIK, S., PATRI, A. K., WANG, E., MARINCOLA, F. M., FRANK, K. M., BELKAID, Y., TRINCHIERI, G. & GOLDSZMID, R. S. 2013. Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment. *Science*, 342, 967-70.

ISSA-NUMMER, Y., DARB-ESFAHANI, S., LOIBL, S., KUNZ, G., NEKLJUDOVA, V., SCHRADER, I., SINN, B. V., ULMER, H. U., KRONENWETT, R., JUST, M., KUHN, T., DIEBOLD, K., UNTCH, M., HOLMS, F., BLOHMER, J. U., HABECK, J. O., DIETEL, M., OVERKAMP, F., KRABISCH, P., VON MINCKWITZ, G. & DENKERT, C. 2013. Prospective validation of immunological infiltrate for prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in HER2-negative breast cancer--a substudy of the neoadjuvant GeparQuinto trial. *PLoS One*, 8, e79775.

ITOH, K. & YAMADA, A. 2006. Personalized peptide vaccines: a new therapeutic modality for cancer. *Cancer Sci*, 97, 970-6.

JACOBS, J. F., NIERKENS, S., FIGDOR, C. G., DE VRIES, I. J. & ADEMA, G. J. 2012. Regulatory T cells in melanoma: the final hurdle towards effective immunotherapy? *Lancet Oncol*, 13, e32-42.

JAGGUPILLI, A. & ELKORD, E. 2012. Significance of CD44 and CD24 as cancer stem cell markers: an enduring ambiguity. *Clin Dev Immunol*, 2012, 708036.

JANEWAY, C. A., TRAVERS, P., WALPORT, M. & SHLOMCHIK, M. 2008. *Janeway's Immunobiology*, New York, Garland Science Taylor & Francis.

- JIANG, D., LIANG, J. & NOBLE, P. W.** 2011. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. *Physiol Rev*, 91, 221-64.
- JOHLER, S. M., FUCHS, J., SEITZ, G. & ARMEANU-EBINGER, S.** 2016. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is induced by cytotoxic drugs and is involved in immune escape and migration in childhood rhabdomyosarcoma. *Cancer Immunol Immunother*, 65, 1465-1476.
- JOYCE, J. A. & FEARON, D. T.** 2015. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science*, 348, 74-80.
- KAMIMURA, A., KAMACHI, M., NISHIHARA, J., OGURA, S., ISOBE, H., DOSAKA-AKITA, H., OGATA, A., SHINDOH, M., OHBUCHI, T. & KAWAKAMI, Y.** 2000. Intracellular distribution of macrophage migration inhibitory factor predicts the prognosis of patients with adenocarcinoma of the lung. *Cancer*, 89, 334-41.
- KANTERMAN, J., SADE-FELDMAN, M., BITON, M., ISH-SHALOM, E., LASRY, A., GOLDSHTEIN, A., HUBERT, A. & BANAYASH, M.** 2014. Adverse immunoregulatory effects of 5FU and CPT11 chemotherapy on myeloid-derived suppressor cells and colorectal cancer outcomes. *Cancer Res*, 74, 6022-35.
- KHALLOUF, H., MARTEN, A., SERBA, S., TEICHGRABER, V., BUCHLER, M. W., JAGER, D. & SCHMIDT, J.** 2012. 5-Fluorouracil and interferon-alpha immunochemotherapy enhances immunogenicity of murine pancreatic cancer through upregulation of NKG2D ligands and MHC class I. *J Immunother*, 35, 245-53.
- KINDT, N., JOURNE, F., LAURENT, G. & SAUSSEZ, S.** 2016. Involvement of macrophage migration inhibitory factor in cancer and novel therapeutic targets. *Oncol Lett*, 12, 2247-2253.
- KINDT, N., LAURENT, G., NONCLERCQ, D., JOURNE, F., GHANEM, G., DUVILLIER, H., GABIUS, H. J., LECHIEN, J. & SAUSSEZ, S.** 2013. Pharmacological inhibition of macrophage migration inhibitory factor interferes with the proliferation and invasiveness of squamous carcinoma cells. *Int J Oncol*, 43, 185-93.
- KOBOLD, S., MERK, M., HOFER, L., PETERS, P., BUCALA, R. & ENDRES, S.** 2014. The macrophage migration inhibitory factor (MIF)-homologue D-dopachrome tautomerase is a therapeutic target in a murine melanoma model. *Oncotarget*, 5, 103-7.
- KOSCIELNIAK, E., MORGAN, M. & TREUNER, J.** 2002. Soft tissue sarcoma in children: prognosis and management. *Paediatr Drugs*, 4, 21-8.

- KRANZ, L. M., DIKEN, M., HAAS, H., KREITER, S., LOQUAI, C., REUTER, K. C., MENG, M., FRITZ, D., VASCOTTO, F., HEFESHA, H., GRUNWITZ, C., VORMEHR, M., HUSEMANN, Y., SELMI, A., KUHN, A. N., BUCK, J., DERHOVANESEAN, E., RAE, R., ATTIG, S., DIEKMANN, J., JABULOWSKY, R. A., HEESCH, S., HASSEL, J., LANGGUTH, P., GRABBE, S., HUBER, C., TURECI, O. & SAHIN, U.** 2016. Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy. *Nature*, 534, 396-401.
- KRATZ, C. P., RAPISUWON, S., REED, H., HASLE, H. & ROSENBERG, P. S.** 2011. Cancer in Noonan, Costello, cardiofaciocutaneous and LEOPARD syndromes. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 157C, 83-9.
- KREITER, S., VORMEHR, M., VAN DE ROEMER, N., DIKEN, M., LOWER, M., DIEKMANN, J., BOEGEL, S., SCHRORS, B., VASCOTTO, F., CASTLE, J. C., TADMOR, A. D., SCHOENBERGER, S. P., HUBER, C., TURECI, O. & SAHIN, U.** 2015. Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer. *Nature*, 520, 692-6.
- KROCKENBERGER, M., DOMBROWSKI, Y., WEIDLER, C., OSSADNIK, M., HONIG, A., HAUSLER, S., VOIGT, H., BECKER, J. C., LENG, L., STEINLE, A., WELLER, M., BUCALA, R., DIETL, J. & WISCHHUSEN, J.** 2008. Macrophage migration inhibitory factor contributes to the immune escape of ovarian cancer by down-regulating NKG2D. *J Immunol*, 180, 7338-48.
- KRYSKO, D. V., GARG, A. D., KACZMAREK, A., KRYSKO, O., AGOSTINIS, P. & VANDENABEELE, P.** 2012. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 12, 860-75.
- LANG, P., PFEIFFER, M., MULLER, I., SCHUMM, M., EBINGER, M., KOSCIELNIAK, E., FEUCHTINGER, T., FOLL, J., MARTIN, D. & HANDGRETINGER, R.** 2006. Haploidentical stem cell transplantation in patients with pediatric solid tumors: preliminary results of a pilot study and analysis of graft versus tumor effects. *Klin Padiatr*, 218, 321-6.
- LEGENDRE, H., DECAESTECKER, C., NAGY, N., HENDLISZ, A., SCHURING, M. P., SALMON, I., GABIUS, H. J., PECTOR, J. C. & KISS, R.** 2003. Prognostic values of galectin-3 and the macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human colorectal cancers. *Mod Pathol*, 16, 491-504.
- LENG, L., METZ, C. N., FANG, Y., XU, J., DONNELLY, S., BAUGH, J., DELOHERY, T., CHEN, Y., MITCHELL, R. A. & BUCALA, R.** 2003. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J Exp Med*, 197, 1467-76.

LITERATUR

- LI, F. P. & FRAUMENI, J. F., JR.** 1969. Rhabdomyosarcoma in children: epidemiologic study and identification of a familial cancer syndrome. *J Natl Cancer Inst*, 43, 1365-73.
- LI, Y. & ZHANG, T.** 2013. Targeting cancer stem cells with sulforaphane, a dietary component from broccoli and broccoli sprouts. *Future Oncol*, 9, 1097-103.
- LI, Y., ZOU, L., LI, Q., HAIBE-KAINS, B., TIAN, R., LI, Y., DESMEDT, C., SOTIRIOU, C., SZALLASI, Z., IGLEHART, J. D., RICHARDSON, A. L. & WANG, Z. C.** 2010. Amplification of LAPT4B and YWHAZ contributes to chemotherapy resistance and recurrence of breast cancer. *Nat Med*, 16, 214-8.
- LIAO, B., ZHONG, B. L., LI, Z., TIAN, X. Y., LI, Y. & LI, B.** 2010. Macrophage migration inhibitory factor contributes angiogenesis by up-regulating IL-8 and correlates with poor prognosis of patients with primary nasopharyngeal carcinoma. *J Surg Oncol*, 102, 844-51.
- LIN, M., MORRISON, C. D., JONES, S., MOHAMED, N., BACHER, J. & PLASS, C.** 2009. Copy number gain and oncogenic activity of YWHAZ/14-3-3zeta in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*, 125, 603-11.
- LIU, W. M., FOWLER, D. W., SMITH, P. & DALGLEISH, A. G.** 2010. Pre-treatment with chemotherapy can enhance the antigenicity and immunogenicity of tumours by promoting adaptive immune responses. *Br J Cancer*, 102, 115-23.
- LIVNI, E., HALEVY, S., STAHL, B. & JOSHUA, H.** 1987. The appearance of macrophage migration-inhibition factor in drug reactions. *J Allergy Clin Immunol*, 80, 843-9.
- LUBETSKY, J. B., DIOS, A., HAN, J., ALJABARI, B., RUZSICKA, B., MITCHELL, R., LOLIS, E. & AL-ABED, Y.** 2002. The tautomerase active site of macrophage migration inhibitory factor is a potential target for discovery of novel anti-inflammatory agents. *J Biol Chem*, 277, 24976-82.
- LUE, H., THIELE, M., FRANZ, J., DAHL, E., SPECKGENS, S., LENG, L., FINGERLE-ROWSON, G., BUCALA, R., LUSCHER, B. & BERNHAGEN, J.** 2007. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promotes cell survival by activation of the Akt pathway and role for CSN5/JAB1 in the control of autocrine MIF activity. *Oncogene*, 26, 5046-59.
- LYONS, A. B. & PARISH, C. R.** 1994. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods*, 171, 131-7.

LITERATUR

- MA, W. W. & ADJEI, A. A.** 2009. Novel agents on the horizon for cancer therapy. *CA Cancer J Clin*, 59, 111-37.
- MACKALL, C. L., RHEE, E. H., READ, E. J., KHUU, H. M., LEITMAN, S. F., BERNSTEIN, D., TESSO, M., LONG, L. M., GRINDLER, D., MERINO, M., KOPP, W., TSOKOS, M., BERZOFKY, J. A. & HELMAN, L. J.** 2008. A pilot study of consolidative immunotherapy in patients with high-risk pediatric sarcomas. *Clin Cancer Res*, 14, 4850-8.
- MARTIN, J., DUNCAN, F. J., KEISER, T., SHIN, S., KUSEWITT, D. F., OBERYSZYN, T., SATOSKAR, A. R. & VANBUSKIRK, A. M.** 2009. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) plays a critical role in pathogenesis of ultraviolet-B (UVB) -induced nonmelanoma skin cancer (NMSC). *FASEB J*, 23, 720-30.
- MARTINELLI, S., MCDOWELL, H. P., VIGNE, S. D., KOKAI, G., UCCINI, S., TARTAGLIA, M. & DOMINICI, C.** 2009. RAS signaling dysregulation in human embryonal Rhabdomyosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 48, 975-82.
- MASELLI, J., HALES, B. F., CHAN, P. & ROBAIRE, B.** 2012. Exposure to bleomycin, etoposide, and cis-platinum alters rat sperm chromatin integrity and sperm head protein profile. *Biol Reprod*, 86, 1-10.
- MATSUSHITA, H., VESELY, M. D., KOBOLDT, D. C., RICKERT, C. G., UPPALURI, R., MAGRINI, V. J., ARTHUR, C. D., WHITE, J. M., CHEN, Y. S., SHEA, L. K., HUNDAL, J., WENDL, M. C., DEMETER, R., WYLIE, T., ALLISON, J. P., SMYTH, M. J., OLD, L. J., MARDIS, E. R. & SCHREIBER, R. D.** 2012. Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting. *Nature*, 482, 400-4.
- MATTAROLLO, S. R., LOI, S., DURET, H., MA, Y., ZITVOGEL, L. & SMYTH, M. J.** 2011. Pivotal role of innate and adaptive immunity in anthracycline chemotherapy of established tumors. *Cancer Res*, 71, 4809-20.
- MAUDE, S. L.** 2017. Future directions in chimeric antigen receptor T cell therapy. *Curr Opin Pediatr*, 29, 27-33.
- MAUDE, S. L., TEACHEY, D. T., PORTER, D. L. & GRUPP, S. A.** 2015. CD19-targeted chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 125, 4017-23.
- MAWHINNEY, L., ARMSTRONG, M. E., C, O. R., BUCALA, R., LENG, L., FINGERLE-ROWSON, G., FAYNE, D., KEANE, M. P., TYNAN, A., MAHER, L., COOKE, G., LLOYD, D., CONROY, H. & DONNELLY, S. C.** 2015. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) enzymatic activity and lung cancer. *Mol Med*, 20, 729-35.

LITERATUR

- MCCARTHY, N.** 2014. Rhabdomyosarcoma: Flexibility could be important. *Nat Rev Cancer*, 14, 156-7.
- MCDOWELL, H. P.** 2003. Update on childhood rhabdomyosarcoma. *Arch Dis Child*, 88, 354-7.
- MEADORS, J. L., CUI, Y., CHEN, Q. R., SONG, Y. K., KHAN, J., MERLINO, G., TSOKOS, M., ORENTAS, R. J. & MACKALL, C. L.** 2011. Murine rhabdomyosarcoma is immunogenic and responsive to T-cell-based immunotherapy. *Pediatr Blood Cancer*, 57, 921-9.
- MERK, M., BAUGH, J., ZIEROW, S., LENG, L., PAL, U., LEE, S. J., EBERT, A. D., MIZUE, Y., TRENT, J. O., MITCHELL, R., NICKEL, W., KAVATHAS, P. B., BERNHAGEN, J. & BUCALA, R.** 2009. The Golgi-associated protein p115 mediates the secretion of macrophage migration inhibitory factor. *J Immunol*, 182, 6896-906.
- MERLINO, G. & HELMAN, L. J.** 1999. Rhabdomyosarcoma--working out the pathways. *Oncogene*, 18, 5340-8.
- MEYER-SIEGLER, K. L., BELLINO, M. A. & TANNENBAUM, M.** 2002. Macrophage migration inhibitory factor evaluation compared with prostate specific antigen as a biomarker in patients with prostate carcinoma. *Cancer*, 94, 1449-56.
- MEYER-SIEGLER, K. L., ICZKOWSKI, K. A., LENG, L., BUCALA, R. & VERA, P. L.** 2006. Inhibition of macrophage migration inhibitory factor or its receptor (CD74) attenuates growth and invasion of DU-145 prostate cancer cells. *J Immunol*, 177, 8730-9.
- MICHAUD, M., MARTINS, I., SUKKURWALA, A. Q., ADJEMIAN, S., MA, Y., PELLEGATTI, P., SHEN, S., KEPP, O., SCOAZEC, M., MIGNOT, G., RELLO-VARONA, S., TAILLER, M., MENGER, L., VACCHELLI, E., GALLUZZI, L., GHIRINGHELLI, F., DI VIRGILIO, F., ZITVOGEL, L. & KROEMER, G.** 2011. Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science*, 334, 1573-7.
- MILLER, R. W. & RUBINSTEIN, J. H.** 1995. Tumors in Rubinstein-Taybi syndrome. *Am J Med Genet*, 56, 112-5.
- MITCHELL, R. A., LIAO, H., CHESNEY, J., FINGERLE-ROWSON, G., BAUGH, J., DAVID, J. & BUCALA, R.** 2002. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 345-50.

- MITTELBRONN, M., PLATTEN, M., ZEINER, P., DOMBROWSKI, Y., FRANK, B., ZACHSKORN, C., HARTER, P. N., WELLER, M. & WISCHHUSEN, J.** 2011. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression in human malignant gliomas contributes to immune escape and tumour progression. *Acta Neuropathol*, 122, 353-65.
- MOHAN, H., KRUMBHOLZ, M., SHARMA, R., EISELE, S., JUNKER, A., SIXT, M., NEWCOMBE, J., WEKERLE, H., HOHLFELD, R., LASSMANN, H. & MEINL, E.** 2010. Extracellular matrix in multiple sclerosis lesions: Fibrillar collagens, biglycan and decorin are upregulated and associated with infiltrating immune cells. *Brain Pathol*, 20, 966-75.
- MOSCHOVI, M., TOULIATOU, V., PAPADOPOULOU, A., MAYAKOU, M. A., NIKOLAIDOU-KARPATHIOU, P. & KITSIOU-TZELI, S.** 2007. Rhabdomyosarcoma in a patient with Noonan syndrome phenotype and review of the literature. *J Pediatr Hematol Oncol*, 29, 341-4.
- MOSMANN, T.** 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65, 55-63.
- MUNAUT, C., BONIVER, J., FOIDART, J. M. & DEPRez, M.** 2002. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression in human glioblastomas correlates with vascular endothelial growth factor (VEGF) expression. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 28, 452-60.
- NAGARAJAN, P., TOBER, K. L., RIGGENBACH, J. A., KUSEWITT, D. F., LEHMAN, A. M., SIELECKI, T., PRUITT, J., SATOSKAR, A. R. & OBERYSZYN, T. M.** 2014. MIF antagonist (CPSI-1306) protects against UVB-induced squamous cell carcinoma. *Mol Cancer Res*, 12, 1292-302.
- NELDE, A., WALZ, J. S., KOWALEWSKI, D. J., SCHUSTER, H., WOLZ, O. O., PEPPER, J. K., CARDONA GLORIA, Y., LANGERAK, A. W., MUGGEN, A. F., CLAUS, R., BONZHEIM, I., FEND, F., SALIH, H. R., KANZ, L., RAMMENSEE, H. G., STEVANOVIC, S. & WEBER, A. N.** 2017. HLA class I-restricted MYD88 L265P-derived peptides as specific targets for lymphoma immunotherapy. *Oncoimmunology*, 6, e1219825.
- NEMAJEROVA, A., MENA, P., FINGERLE-ROWSON, G., MOLL, U. M. & PETRENKO, O.** 2007. Impaired DNA damage checkpoint response in MIF-deficient mice. *EMBO J*, 26, 987-97.
- NEWTON, W. A., JR., SOULE, E. H., HAMOUDI, A. B., REIMAN, H. M., SHIMADA, H., BELTANGADY, M. & MAURER, H.** 1988. Histopathology of childhood sarcomas, Intergroup Rhabdomyosarcoma Studies I and II: clinicopathologic correlation. *J Clin Oncol*, 6, 67-75.

- NO, Y. R., LEE, S. J., KUMAR, A. & YUN, C. C.** 2015. HIF1 α -Induced by Lysophosphatidic Acid Is Stabilized via Interaction with MIF and CSN5. *PLoS One*, 10, e0137513.
- O'REILLY, C., DOROUDIAN, M., MAWHINNEY, L. & DONNELLY, S. C.** 2016. Targeting MIF in Cancer: Therapeutic Strategies, Current Developments, and Future Opportunities. *Med Res Rev*, 36, 440-60.
- OBEID, M., TESNIERE, A., GHIRINGHELLI, F., FIMIA, G. M., APETOH, L., PERFETTINI, J. L., CASTEDO, M., MIGNOT, G., PANARETAKIS, T., CASARES, N., METIVIER, D., LAROCLETTE, N., VAN ENDERT, P., CICCOSANTI, F., PIACENTINI, M., ZITVOGEL, L. & KROEMER, G.** 2007. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med*, 13, 54-61.
- OBERLIN, O., REY, A., SANCHEZ DE TOLEDO, J., MARTELLI, H., JENNEY, M. E., SCOPINARO, M., BERGERON, C., MERKS, J. H., BOUVET, N., ELLERSHAW, C., KELSEY, A., SPOONER, D. & STEVENS, M. C.** 2012. Randomized comparison of intensified six-drug versus standard three-drug chemotherapy for high-risk nonmetastatic rhabdomyosarcoma and other chemotherapy-sensitive childhood soft tissue sarcomas: long-term results from the International Society of Pediatric Oncology MMT95 study. *J Clin Oncol*, 30, 2457-65.
- OCHI, A., NGUYEN, A. H., BEDROSIAN, A. S., MUSHLIN, H. M., ZARBAKSH, S., BARILLA, R., ZAMBIRINIS, C. P., FALLON, N. C., REHMAN, A., PYLAYEVA-GUPTA, Y., BADAR, S., HAJDU, C. H., FREY, A. B., BAR-SAGI, D. & MILLER, G.** 2012. MyD88 inhibition amplifies dendritic cell capacity to promote pancreatic carcinogenesis via Th2 cells. *J Exp Med*, 209, 1671-87.
- ODA, S., ODA, T., NISHI, K., TAKABUCHI, S., WAKAMATSU, T., TANAKA, T., ADACHI, T., FUKUDA, K., SEMENZA, G. L. & HIROTA, K.** 2008. Macrophage migration inhibitory factor activates hypoxia-inducible factor in a p53-dependent manner. *PLoS One*, 3, e2215.
- OGNJANOVIC, S., CAROZZA, S. E., CHOW, E. J., FOX, E. E., HOREL, S., MCLAUGHLIN, C. C., MUELLER, B. A., PUUMALA, S., REYNOLDS, P., VON BEHREN, J. & SPECTOR, L.** 2010. Birth characteristics and the risk of childhood rhabdomyosarcoma based on histological subtype. *Br J Cancer*, 102, 227-31.
- OGNJANOVIC, S., LINABERY, A. M., CHARBONNEAU, B. & ROSS, J. A.** 2009. Trends in childhood rhabdomyosarcoma incidence and survival in the United States, 1975-2005. *Cancer*, 115, 4218-26.
- OLIVEIRA, C. S., DE BOCK, C. E., MOLLOY, T. J., SADEQZADEH, E., GENG, X. Y., HERSEY, P., ZHANG, X. D. & THORNE, R. F.** 2014.

LITERATUR

Macrophage migration inhibitory factor engages PI3K/Akt signalling and is a prognostic factor in metastatic melanoma. *BMC Cancer*, 14, 630.

OUERTATANI-SAKOUHI, H., EL-TURK, F., FAUVET, B., CHO, M. K., PINAR KARPINAR, D., LE ROY, D., DEWOR, M., ROGER, T., BERNHAGEN, J., CALANDRA, T., ZWECKSTETTER, M. & LASHUEL, H. A. 2010. Identification and characterization of novel classes of macrophage migration inhibitory factor (MIF) inhibitors with distinct mechanisms of action. *J Biol Chem*, 285, 26581-98.

PAPPO, A. S., SHAPIRO, D. N., CRIST, W. M. & MAURER, H. M. 1995. Biology and therapy of pediatric rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol*, 13, 2123-39.

PARHAM, D. M. 2001. Pathologic classification of rhabdomyosarcomas and correlations with molecular studies. *Mod Pathol*, 14, 506-14.

PARHAM, D. M., QUALMAN, S. J., TEOT, L., BARR, F. G., MOROTTI, R., SORENSEN, P. H., TRICHE, T. J., MEYER, W. H. & SOFT TISSUE SARCOMA COMMITTEE OF THE CHILDREN'S ONCOLOGY, G. 2007. Correlation between histology and PAX/FKHR fusion status in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *Am J Surg Pathol*, 31, 895-901.

PASTORE, G., PERIS-BONET, R., CARLI, M., MARTINEZ-GARCIA, C., SANCHEZ DE TOLEDO, J. & STELIAROVA-FOUCHER, E. 2006. Childhood soft tissue sarcomas incidence and survival in European children (1978-1997): report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *Eur J Cancer*, 42, 2136-49.

PFANNENSTIEL, L. W., LAM, S. S., EMENS, L. A., JAFFEE, E. M. & ARMSTRONG, T. D. 2010. Paclitaxel enhances early dendritic cell maturation and function through TLR4 signaling in mice. *Cell Immunol*, 263, 79-87.

PIETTE, C., DEPREZ, M., ROGER, T., NOEL, A., FOIDART, J. M. & MUNAUT, C. 2009. The dexamethasone-induced inhibition of proliferation, migration, and invasion in glioma cell lines is antagonized by macrophage migration inhibitory factor (MIF) and can be enhanced by specific MIF inhibitors. *J Biol Chem*, 284, 32483-92.

RABINOVICH, G. A., GABRILOVICH, D. & SOTOMAYOR, E. M. 2007. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol*, 25, 267-96.

REN, Y., CHAN, H. M., LI, Z., LIN, C., NICHOLLS, J., CHEN, C. F., LEE, P. Y., LUI, V., BACHER, M. & TAM, P. K. 2004. Upregulation of macrophage migration inhibitory factor contributes to induced N-Myc expression by

LITERATUR

the activation of ERK signaling pathway and increased expression of interleukin-8 and VEGF in neuroblastoma. *Oncogene*, 23, 4146-54.

RENDON, B. E., ROGER, T., TENENG, I., ZHAO, M., AL-ABED, Y., CALANDRA, T. & MITCHELL, R. A. 2007. Regulation of human lung adenocarcinoma cell migration and invasion by macrophage migration inhibitory factor. *J Biol Chem*, 282, 29910-8.

REPP, A. C., MAYHEW, E. S., APTE, S. & NIEDERKORN, J. Y. 2000. Human uveal melanoma cells produce macrophage migration-inhibitory factor to prevent lysis by NK cells. *J Immunol*, 165, 710-5.

RITTIG, S. M., HAENTSCHEL, M., WEIMER, K. J., HEINE, A., MULLER, M. R., BRUGGER, W., HORGER, M. S., MAKSIMOVIC, O., STENZL, A., HOERR, I., RAMMENSEE, H. G., HOLDERRIED, T. A., KANZ, L., PASCOLO, S. & BROSSART, P. 2011. Intradermal vaccinations with RNA coding for TAA generate CD8+ and CD4+ immune responses and induce clinical benefit in vaccinated patients. *Mol Ther*, 19, 990-9.

RODEBERG, D. A., GARCIA-HENRIQUEZ, N., LYDEN, E. R., DAVICIONI, E., PARHAM, D. M., SKAPEK, S. X., HAYES-JORDAN, A. A., DONALDSON, S. S., BROWN, K. L., TRICHE, T. J., MEYER, W. H. & HAWKINS, D. S. 2011. Prognostic significance and tumor biology of regional lymph node disease in patients with rhabdomyosarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*, 29, 1304-11.

SAMUEL, D. P., TSOKOS, M. & DEBAUN, M. R. 1999. Hemihypertrophy and a poorly differentiated embryonal rhabdomyosarcoma of the pelvis. *Med Pediatr Oncol*, 32, 38-43.

SCHOBER, A., BERNHAGEN, J. & WEBER, C. 2008. Chemokine-like functions of MIF in atherosclerosis. *J Mol Med (Berl)*, 86, 761-70.

SCHRADER, J., DEUSTER, O., RINN, B., SCHULZ, M., KAUTZ, A., DODEL, R., MEYER, B., AL-ABED, Y., BALAKRISHNAN, K., REESE, J. P. & BACHER, M. 2009. Restoration of contact inhibition in human glioblastoma cell lines after MIF knockdown. *BMC Cancer*, 9, 464.

SCHREIBER, R. D., OLD, L. J. & SMYTH, M. J. 2011. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*, 331, 1565-70.

SCRABLE, H., CAVENEE, W., GHAVIMI, F., LOVELL, M., MORGAN, K. & SAPIENZA, C. 1989. A model for embryonal rhabdomyosarcoma tumorigenesis that involves genome imprinting. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 7480-4.

- SEITZ, G., DANTONELLO, T. M., INT-VEEN, C., BLUMENSTOCK, G., GODZINSKI, J., KLINGEBIEL, T., SCHUCK, A., LEUSCHNER, I., KOSCIELNIAK, E., FUCHS, J. & GROUP, C. W. S. S.** 2011. Treatment efficiency, outcome and surgical treatment problems in patients suffering from localized embryonal bladder/prostate rhabdomyosarcoma: a report from the Cooperative Soft Tissue Sarcoma trial CWS-96. *Pediatr Blood Cancer*, 56, 718-24.
- SENOVILLA, L., VACCHELLI, E., GALON, J., ADJEMIAN, S., EGGERMONT, A., FRIDMAN, W. H., SAUTES-FRIDMAN, C., MA, Y., TARTOUR, E., ZITVOGEL, L., KROEMER, G. & GALLUZZI, L.** 2012a. Trial watch: Prognostic and predictive value of the immune infiltrate in cancer. *Oncoimmunology*, 1, 1323-1343.
- SENOVILLA, L., VITALE, I., MARTINS, I., TAILLER, M., PAILLERET, C., MICHAUD, M., GALLUZZI, L., ADJEMIAN, S., KEPP, O., NISO-SANTANO, M., SHEN, S., MARINO, G., CRIOLLO, A., BOILEVE, A., JOB, B., LADOIRE, S., GHIRINGHELLI, F., SISTIGU, A., YAMAZAKI, T., RELLO-VARONA, S., LOCHER, C., POIRIER-COLAME, V., TALBOT, M., VALENT, A., BERARDINELLI, F., ANTOCCIA, A., CICCOSANTI, F., FIMIA, G. M., PIACENTINI, M., FUEYO, A., MESSINA, N. L., LI, M., CHAN, C. J., SIGL, V., POURCHER, G., RUCKENSTUHL, C., CARMONA-GUTIERREZ, D., LAZAR, V., PENNINGER, J. M., MADEO, F., LOPEZ-OTIN, C., SMYTH, M. J., ZITVOGEL, L., CASTEDO, M. & KROEMER, G.** 2012b. An immunosurveillance mechanism controls cancer cell ploidy. *Science*, 337, 1678-84.
- SEVKO, A., MICHELS, T., VROHLINGS, M., UMANSKY, L., BECKHOVE, P., KATO, M., SHURIN, G. V., SHURIN, M. R. & UMANSKY, V.** 2013. Antitumor effect of paclitaxel is mediated by inhibition of myeloid-derived suppressor cells and chronic inflammation in the spontaneous melanoma model. *J Immunol*, 190, 2464-71.
- SHARMA, P. & ALLISON, J. P.** 2015. The future of immune checkpoint therapy. *Science*, 348, 56-61.
- SHI, X., LENG, L., WANG, T., WANG, W., DU, X., LI, J., MCDONALD, C., CHEN, Z., MURPHY, J. W., LOLIS, E., NOBLE, P., KNUDSON, W. & BUCALA, R.** 2006. CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. *Immunity*, 25, 595-606.
- SHIMIZU, T., ABE, R., NAKAMURA, H., OHKAWARA, A., SUZUKI, M. & NISHIHARA, J.** 1999. High expression of macrophage migration inhibitory factor in human melanoma cells and its role in tumor cell growth and angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 264, 751-8.

- SIMPSON, K. D. & CROSS, J. V.** 2013. MIF: metastasis/MDSC-inducing factor? *Oncoimmunology*, 2, e23337.
- SIMPSON, K. D., TEMPLETON, D. J. & CROSS, J. V.** 2012. Macrophage migration inhibitory factor promotes tumor growth and metastasis by inducing myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *J Immunol*, 189, 5533-40.
- SISTIGU, A., YAMAZAKI, T., VACCHELLI, E., CHABA, K., ENOT, D. P., ADAM, J., VITALE, I., GOUBAR, A., BARACCO, E. E., REMEDIOS, C., FEND, L., HANNANI, D., AYMERIC, L., MA, Y., NISO-SANTANO, M., KEPP, O., SCHULTZE, J. L., TUTING, T., BELARDELLI, F., BRACCI, L., LA SORSA, V., ZICCHEDDU, G., SESTILI, P., URBANI, F., DELORENZI, M., LACROIX-TRIKI, M., QUIDVILLE, V., CONFORTI, R., SPANO, J. P., PUSZTAI, L., POIRIER-COLAME, V., DELALOGUE, S., PENAULT-LLORCA, F., LADOIRE, S., ARNOULD, L., CYRTA, J., DESSOLIERS, M. C., EGGERMONT, A., BIANCHI, M. E., PITTET, M., ENGBLOM, C., PFIRSCHKE, C., PREVILLE, X., UZE, G., SCHREIBER, R. D., CHOW, M. T., SMYTH, M. J., PROIETTI, E., ANDRE, F., KROEMER, G. & ZITVOGEL, L.** 2014. Cancer cell-autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy. *Nat Med*, 20, 1301-9.
- SORENSEN, P. H., LYNCH, J. C., QUALMAN, S. J., TIRABOSCO, R., LIM, J. F., MAURER, H. M., BRIDGE, J. A., CRIST, W. M., TRICHE, T. J. & BARR, F. G.** 2002. PAX3-FKHR and PAX7-FKHR gene fusions are prognostic indicators in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol*, 20, 2672-9.
- STADLER, C. R., BAHR-MAHMUD, H., CELIK, L., HEBICH, B., ROTH, A. S., ROTH, R. P., KARIKO, K., TURECI, O. & SAHIN, U.** 2017. Elimination of large tumors in mice by mRNA-encoded bispecific antibodies. *Nat Med*.
- SUGIMOTO, H., TANIGUCHI, M., NAKAGAWA, A., TANAKA, I., SUZUKI, M. & NISHIHARA, J.** 1999. Crystal structure of human D-dopachrome tautomerase, a homologue of macrophage migration inhibitory factor, at 1.54 Å resolution. *Biochemistry*, 38, 3268-79.
- SUN, X., GUO, W., SHEN, J. K., MANKIN, H. J., HORNICEK, F. J. & DUAN, Z.** 2015. Rhabdomyosarcoma: Advances in Molecular and Cellular Biology. *Sarcoma*, 2015, 232010.
- SUZUKI, E., KAPOOR, V., JASSAR, A. S., KAISER, L. R. & ALBELDA, S. M.** 2005. Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1+/CD11b+ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *Clin Cancer Res*, 11, 6713-21.

- TALMADGE, J. E. & GABRILOVICH, D. I.** 2013. History of myeloid-derived suppressor cells. *Nat Rev Cancer*, 13, 739-52.
- TALOS, F., MENA, P., FINGERLE-ROWSON, G., MOLL, U. & PETRENKO, O.** 2005. MIF loss impairs Myc-induced lymphomagenesis. *Cell Death Differ*, 12, 1319-28.
- TANESE, K., HASHIMOTO, Y., BERKOVA, Z., WANG, Y., SAMANIEGO, F., LEE, J. E., EKMEKCIOGLU, S. & GRIMM, E. A.** 2015. Cell Surface CD74-MIF Interactions Drive Melanoma Survival in Response to Interferon-gamma. *J Invest Dermatol*, 135, 2775-2784.
- TARNOWSKI, M., GRYMULA, K., LIU, R., TARNOWSKA, J., DRUKALA, J., RATAJCZAK, J., MITCHELL, R. A., RATAJCZAK, M. Z. & KUCIA, M.** 2010a. Macrophage migration inhibitory factor is secreted by rhabdomyosarcoma cells, modulates tumor metastasis by binding to CXCR4 and CXCR7 receptors and inhibits recruitment of cancer-associated fibroblasts. *Mol Cancer Res*, 8, 1328-43.
- TARNOWSKI, M., GRYMULA, K., RECA, R., JANKOWSKI, K., MAKSYM, R., TARNOWSKA, J., PRZYBYLSKI, G., BARR, F. G., KUCIA, M. & RATAJCZAK, M. Z.** 2010b. Regulation of expression of stromal-derived factor-1 receptors: CXCR4 and CXCR7 in human rhabdomyosarcomas. *Mol Cancer Res*, 8, 1-14.
- TELLIEZ, A., FURMAN, C., POMMERY, N. & HENICHART, J. P.** 2006. Mechanisms leading to COX-2 expression and COX-2 induced tumorigenesis: topical therapeutic strategies targeting COX-2 expression and activity. *Anticancer Agents Med Chem*, 6, 187-208.
- TOMIYASU, M., YOSHINO, I., SUEMITSU, R., OKAMOTO, T. & SUGIMACHI, K.** 2002. Quantification of macrophage migration inhibitory factor mRNA expression in non-small cell lung cancer tissues and its clinical significance. *Clin Cancer Res*, 8, 3755-60.
- TOPALIAN, S. L., WEINER, G. J. & PARDOLL, D. M.** 2011. Cancer immunotherapy comes of age. *J Clin Oncol*, 29, 4828-36.
- TORTORELLA, S. M., ROYCE, S. G., LICCIARDI, P. V. & KARAGIANNIS, T. C.** 2015. Dietary Sulforaphane in Cancer Chemoprevention: The Role of Epigenetic Regulation and HDAC Inhibition. *Antioxid Redox Signal*, 22, 1382-424.
- TRAHAIR, T., ANDREWS, L. & COHN, R. J.** 2007. Recognition of Li Fraumeni syndrome at diagnosis of a locally advanced extremity rhabdomyosarcoma. *Pediatr Blood Cancer*, 48, 345-8.

- TURECI, O., VORMEHR, M., DIKEN, M., KREITER, S., HUBER, C. & SAHIN, U.** 2016. Targeting the Heterogeneity of Cancer with Individualized Neoepitope Vaccines. *Clin Cancer Res*, 22, 1885-96.
- VACCHELLI, E., ARANDA, F., EGGERMONT, A., GALON, J., SAUTES-FRIDMAN, C., CREMER, I., ZITVOGEL, L., KROEMER, G. & GALLUZZI, L.** 2014. Trial Watch: Chemotherapy with immunogenic cell death inducers. *Oncoimmunology*, 3, e27878.
- VACCHELLI, E., MA, Y., BARACCO, E. E., SISTIGU, A., ENOT, D. P., PIETROCOLA, F., YANG, H., ADJEMIAN, S., CHABA, K., SEMERARO, M., SIGNORE, M., DE NINNO, A., LUCARINI, V., PESCHIAROLI, F., BUSINARO, L., GERARDINO, A., MANIC, G., ULAS, T., GUNTHER, P., SCHULTZE, J. L., KEPP, O., STOLL, G., LEFEBVRE, C., MULOT, C., CASTOLDI, F., RUSAKIEWICZ, S., LADOIRE, S., APETOH, L., BRAVO-SAN PEDRO, J. M., LUCATTELLI, M., DELARASSE, C., BOIGE, V., DUCREUX, M., DELALOGUE, S., BORG, C., ANDRE, F., SCHIAVONI, G., VITALE, I., LAURENT-PUIG, P., MATTEI, F., ZITVOGEL, L. & KROEMER, G.** 2015. Chemotherapy-induced antitumor immunity requires formyl peptide receptor 1. *Science*, 350, 972-8.
- VANNEMAN, M. & DRANOFF, G.** 2012. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nat Rev Cancer*, 12, 237-51.
- VESELY, M. D., KERSHAW, M. H., SCHREIBER, R. D. & SMYTH, M. J.** 2011. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol*, 29, 235-71.
- VIAUD, S., SACCHERI, F., MIGNOT, G., YAMAZAKI, T., DAILLIERE, R., HANNANI, D., ENOT, D. P., PFIRSCHKE, C., ENGBLOM, C., PITTET, M. J., SCHLITZER, A., GINHOUX, F., APETOH, L., CHACHATY, E., WOERTHER, P. L., EBERL, G., BERARD, M., ECOBICHON, C., CLERMONT, D., BIZET, C., GABORIAU-ROUTHIAU, V., CERF-BENSUSSAN, N., OPOLON, P., YESSAAD, N., VIVIER, E., RYFFEL, B., ELSON, C. O., DORE, J., KROEMER, G., LEPAGE, P., BONECA, I. G., GHIRINGHELLI, F. & ZITVOGEL, L.** 2013. The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide. *Science*, 342, 971-6.
- VINAY, D. S., RYAN, E. P., PAWELEC, G., TALIB, W. H., STAGG, J., ELKORD, E., LICHTOR, T., DECKER, W. K., WHELAN, R. L., KUMARA, H. M., SIGNORI, E., HONOKI, K., GEORGAKILAS, A. G., AMIN, A., HELFERICH, W. G., BOOSANI, C. S., GUHA, G., CIRIOLO, M. R., CHEN, S., MOHAMMED, S. I., AZMI, A. S., KEITH, W. N., BILSLAND, A., BHAKTA, D., HALICKA, D., FUJII, H., AQUILANO, K., ASHRAF, S. S., NOWSHEEN, S., YANG, X., CHOI, B. K. & KWON, B.**

LITERATUR

- S. 2015. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol*, 35 Suppl, S185-98.
- VINCENT, J., MIGNOT, G., CHALMIN, F., LADOIRE, S., BRUCHARD, M., CHEVRIAUX, A., MARTIN, F., APETOH, L., REBE, C. & GHIRINGHELLI, F. 2010. 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Res*, 70, 3052-61.
- VIVIER, E., RAULET, D. H., MORETTA, A., CALIGIURI, M. A., ZITVOGEL, L., LANIER, L. L., YOKOYAMA, W. M. & UGOLINI, S. 2011. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*, 331, 44-9.
- WACHTEL, M., RUNGE, T., LEUSCHNER, I., STEGMAIER, S., KOSCIELNIAK, E., TREUNER, J., ODERMATT, B., BEHNKE, S., NIGGLI, F. K. & SCHAFER, B. W. 2006. Subtype and prognostic classification of rhabdomyosarcoma by immunohistochemistry. *J Clin Oncol*, 24, 816-22.
- WANG, L., ZHAO, Y., QIAN, J., SUN, L., LU, Y., LI, H., LI, Y., YANG, J., CAI, Z. & YI, Q. 2013. Toll-like receptor-4 signaling in mantle cell lymphoma: effects on tumor growth and immune evasion. *Cancer*, 119, 782-91.
- WANG, X., LI, Y., DAI, Y., LIU, Q., NING, S., LIU, J., SHEN, Z., ZHU, D., JIANG, F., ZHANG, J. & LI, Z. 2016. Sulforaphane improves chemotherapy efficacy by targeting cancer stem cell-like properties via the miR-124/IL-6R/STAT3 axis. *Sci Rep*, 6, 36796.
- WEIHKOPF, T., BLETTNER, M., DANTONELLO, T., JUNG, I., KLINGEBIEL, T., KOSCIELNIAK, E., LUCKEL, M., SPIX, C. & KAATSCH, P. 2008. Incidence and time trends of soft tissue sarcomas in German children 1985-2004 - a report from the population-based German Childhood Cancer Registry. *Eur J Cancer*, 44, 432-40.
- WENGER, S. L., BLATT, J., STEELE, M. W., LLOYD, D. A., BELLINGER, M., PHEBUS, C. K., HORN, M. & JAFFE, R. 1988. Rhabdomyosarcoma in Roberts syndrome. *Cancer Genet Cytogenet*, 31, 285-9.
- WILLIAMSON, D., MISSIAGLIA, E., DE REYNIES, A., PIERRON, G., THUILLE, B., PALENZUELA, G., THWAY, K., ORBACH, D., LAE, M., FRENEAUX, P., PRITCHARD-JONES, K., OBERLIN, O., SHIPLEY, J. & DELATTRE, O. 2010. Fusion gene-negative alveolar rhabdomyosarcoma is clinically and molecularly indistinguishable from embryonal rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol*, 28, 2151-8.
- WINNER, M., KOONG, A. C., RENDON, B. E., ZUNDEL, W. & MITCHELL, R. A. 2007. Amplification of tumor hypoxic responses by macrophage

LITERATUR

- migration inhibitory factor-dependent hypoxia-inducible factor stabilization. *Cancer Res*, 67, 186-93.
- WINNER, M., MEIER, J., ZIEROW, S., RENDON, B. E., CRICHLLOW, G. V., RIGGS, R., BUCALA, R., LENG, L., SMITH, N., LOLIS, E., TRENT, J. O. & MITCHELL, R. A.** 2008. A novel, macrophage migration inhibitory factor suicide substrate inhibits motility and growth of lung cancer cells. *Cancer Res*, 68, 7253-7.
- WOLDEN, S. L., ANDERSON, J. R., CRIST, W. M., BRENNEMAN, J. C., WHARAM, M. D., JR., WIENER, E. S., QUALMAN, S. J. & DONALDSON, S. S.** 1999. Indications for radiotherapy and chemotherapy after complete resection in rhabdomyosarcoma: A report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Studies I to III. *J Clin Oncol*, 17, 3468-75.
- WU, J. & WAXMAN, D. J.** 2015. Metronomic cyclophosphamide eradicates large implanted GL261 gliomas by activating antitumor Cd8+ T-cell responses and immune memory. *Oncoimmunology*, 4, e1005521.
- WU, X., ZHOU, Q. H. & XU, K.** 2009. Are isothiocyanates potential anti-cancer drugs? *Acta Pharmacol Sin*, 30, 501-12.
- XU, X., RAO, G. S., GROH, V., SPIES, T., GATTUSO, P., KAUFMAN, H. L., PLATE, J. & PRINZ, R. A.** 2011. Major histocompatibility complex class I-related chain A/B (MICA/B) expression in tumor tissue and serum of pancreatic cancer: role of uric acid accumulation in gemcitabine-induced MICA/B expression. *BMC Cancer*, 11, 194.
- XU, X., WANG, B., YE, C., YAO, C., LIN, Y., HUANG, X., ZHANG, Y. & WANG, S.** 2008. Overexpression of macrophage migration inhibitory factor induces angiogenesis in human breast cancer. *Cancer Lett*, 261, 147-57.
- YADDANAPUDI, K., PUTTY, K., RENDON, B. E., LAMONT, G. J., FAUGHN, J. D., SATOSKAR, A., LASNIK, A., EATON, J. W. & MITCHELL, R. A.** 2013. Control of tumor-associated macrophage alternative activation by macrophage migration inhibitory factor. *J Immunol*, 190, 2984-93.
- YADDANAPUDI, K., RENDON, B. E., LAMONT, G., KIM, E. J., AL RAYYAN, N., RICHIE, J., ALBEITUNI, S., WAIGEL, S., WISE, A. & MITCHELL, R. A.** 2015. MIF Is Necessary for Late-Stage Melanoma Patient MDSC Immune Suppression and Differentiation. *Cancer Immunol Res*.
- YAN, X., ORENTAS, R. J. & JOHNSON, B. D.** 2006. Tumor-derived macrophage migration inhibitory factor (MIF) inhibits T lymphocyte activation. *Cytokine*, 33, 188-98.

LITERATUR

ZAROOUR, H. M. 2016. Reversing T-cell Dysfunction and Exhaustion in Cancer. *Clin Cancer Res*, 22, 1856-64.

ZHOU, S. X., LI, F. S., QIAO, Y. L., ZHANG, X. Q. & WANG, Z. D. 2012. Toll-like receptor 5 agonist inhibition of growth of A549 lung cancer cells in vivo in a Myd88 dependent manner. *Asian Pac J Cancer Prev*, 13, 2807-12.

ZITVOGEL, L., GALLUZZI, L., SMYTH, M. J. & KROEMER, G. 2013. Mechanism of action of conventional and targeted anticancer therapies: reinstating immunosurveillance. *Immunity*, 39, 74-88.

ZITVOGEL, L., KEPP, O. & KROEMER, G. 2011. Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens. *Nat Rev Clin Oncol*, 8, 151-60.

7. ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für Kinderchirurgie und Kinderurologie des Universitätsklinikums Tübingen unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Sorin Armeanu-Ebinger durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Armeanu-Ebinger.

Sämtliche Versuche, mit Ausnahme der differentiellen Genexpressionsanalyse sowie der Real Time PCR Versuche, wurden nach Einarbeitung durch die medizinisch-technischen Assistentinnen Bettina Kirchner und Julia Wenz eigenständig von mir durchgeführt. Die differentiellen Genexpressionsanalysen wurden in Vorarbeiten durch die Arbeitsgruppe der Kinderchirurgie (Herr Prof. Dr. Armeanu-Ebinger, Frau Dr. Delia Herrmann) erstellt. Die Real Time PCR Versuche wurden von Frau Melanie Hauth unter der Laborleitung von Frau Dr. Evi Schmid durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung von Herrn Prof. Dr. Armeanu-Ebinger durch mich.

Die Veröffentlichung „Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is induced by cytotoxic drugs and is involved in immune escape and migration in childhood rhabdomyosarcoma“, welche aus der vorliegenden Arbeit hervorgegangen ist, wurde von Herrn Prof. Dr. Armeanu-Ebinger und mir konzipiert. Weiterhin trug Herr Prof. Dr. Guido Seitz zur Konzeption bei. Herr Prof. Dr. Jörg Fuchs, Ärztliche Direktor der Abteilung für Kinderchirurgie und Kinderurologie, stellte die Möglichkeit zur Durchführung der Experimente und Veröffentlichungen zur Verfügung. Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung eigenständig von mir durchgeführt. Das Manuskript wurde selbständig von mir verfasst und von Herrn Prof. Armeanu-Ebinger korrigiert. Eine weitere Korrektur erfolgte zudem durch Herrn Prof. Dr. Seitz.

Ich versichere, das Manuskript dieser Dissertation selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL

München, den 03.10.2018

.

8. VERÖFFENTLICHUNGEN

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Johler SM, Fuchs J, Seitz G, Armeanu-Ebinger S (2016) Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is induced by cytotoxic drugs and is involved in immune escape and migration in childhood rhabdomyosarcoma. *Cancer Immunol Immunother* 65 (12):1465-1476. doi:10.1007/s00262-016-1896-4

Weiterhin wurden Teile der Arbeit auf folgenden Kongressen im Rahmen von Posterpräsentationen vorgestellt:

CIMT Annual Meeting, Mainz (Mai 2013):

Johler, S.M., et al.: Role of macrophage migration inhibitory factor in immune-surveillance of rhabdomyosarcoma.

Forschungskolloquium der Medizinischen Fakultät, Universität Tübingen (Oktober 2013):

Johler, S.M., et al.: The role of macrophage migration inhibitory factor in chemo- and immunotherapy in paediatric rhabdomyosarcoma.

9. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinem äußerst kompetenten, geduldigen und stets ansprechbaren sowie hilfsbereiten Betreuer Prof. Dr. Sorin Armeanu-Ebinger. Sowohl während der praktischen und theoretischen Arbeit im Labor als auch darüber hinaus stand mir Herr Prof. Dr. Sorin Armeanu-Ebinger stets mit wertvollen Kommentaren, Diskussionen und Ratschlägen zur Seite. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen – dafür kann ich mich gar nicht genug bedanken!

Dem Ärztlichen Direktor Herrn Prof. Dr. Jörg Fuchs danke ich für die Möglichkeit der Durchführung meiner Promotion in seiner Abteilung für Kinderchirurgie und –urologie des Universitätsklinikums Tübingen. Auch dem Team der Kinderchirurgie möchte ich danken, darunter Herrn Prof. Dr. Seitz, der mit Input zu den Veröffentlichungen beitrug.

Dem IZKF Promotionskolleg Tübingen danke ich für das großzügige Stipendium im Rahmen der Promotion, welches fachlich sowie wissenschaftlich eine ausgesprochene Bereicherung war und den Austausch mit anderen Stipendiaten ermöglichte.

Meiner Arbeitsgruppe in der Kinderchirurgie, allen voran die zwei erfahrenen, hilfsbereiten und äußerst sympathischen Labortechnischen Assistentinnen Bettina Kirchner und Julia Wenz, möchte ich für die sehr schöne Zeit im Labor danken, für die tatkräftige Unterstützung, aber auch für die Kaffee-Pausen und persönlich bereichernden Gespräche.

Großer Dank gilt Frau Dr. Evi Schmid und Melanie Hauth, die es über meine eigentliche Laborzeit hinaus ermöglichten, weitere Versuche durchzuführen und mich mit der PCR hilfsbereit und tatkräftig unterstützten.

Für die emotionale, persönliche und fachliche Unterstützung während des Schreibens, den Ansporn, das Motivieren, dem Zuhören und dem Aufheitern möchte ich mich bei allen meinen liebenswerten und wertvollen Freunden bedanken! An dieser Stelle seien nur einige genannt: Anna, die wirklich immer ein offenes Ohr für mich hat, egal zu welcher Thematik. Annabel, die mich auf

DANKSAGUNG

den letzten Schritten zur Fertigstellung begleitet und motiviert hat. Julia, für die unzähligen und äußerst wertvollen gemeinsamen Stunden, die mich immer wieder von neuem motiviert hat, durchzuhalten und die Promotion fertigzustellen. Maylis, für die Aufheiterung während unserer gemeinsamen Zeit in der Kinderklinik Heidelberg, die mir mit ihren Bildern ein Lächeln ins Gesicht gezaubert hat. Lisa, für die gemeinsame Zeit in München und darüber hinaus – sowohl fachliche Diskussionen als auch ihr Beistand haben wesentlich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen. Frie, die mich mit ihrem Ehrgeiz und ihrer Unterstützung in allen Lebenssituationen angesteckt hat und ein großes Vorbild für mich geworden ist. Sonja, Verena und Simone, für die unzähligen Stunden mit Kaffee, Eis und Kochen, die die Zeit in Tübingen während der Promotion und des Studiums zu etwas ganz Besonderem gemacht haben. Meinem lieben Schwesterherz Marion, die sich immer wieder nach dem Stand meiner Promotion erkundigt hat und immer für mich da war und ist!

Von ganzem Herzen möchte ich meinen Eltern danken – an dieser Stelle kann ich gar nicht genug DANKE sagen. Ein unendlicher Dank gilt der stetigen Unterstützung, die mir meine Eltern zu jeder Zeit entgegen gebracht haben – vor dem Studium, während dem Studium, der Promotion und darüber hinaus. Ohne meine Eltern wäre dieser Weg nie möglich gewesen, dafür bin ich ihnen unendlich dankbar – ihr habt mir meinen Traum ermöglicht, wart immer an meiner Seite, wart stets geduldig, habt mich bei jeglichem (Un-)Sinn unterstützt, mich in den Arm genommen und mich motiviert – ihr seid die Besten!