

Regulation EWS-FLI1 induzierter Gene  
in Ewing-Tumoren und  
mesenchymalen Stammzellen

**Diana Simone Grabner**



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin

Kinderklinik München Schwabing

Direktor: Univ.-Prof. Dr. S. Burdach

# Regulation EWS-FLI1 induzierter Gene in Ewing-Tumoren und mesenchymalen Stammzellen

**Diana Simone Grabner**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1.Univ.-Prof. Dr. S. Burdach

2.Priv.-Doz. Dr. I.M.E. Teichert-von Lüttichau

3.Univ.-Prof. Dr. R. von Eisenhart

Die Dissertation wurde am 06.05.2013 an der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 22.10.2014 angenommen.

**Teile der vorliegenden Dissertation wurden veröffentlicht in:**

Richter GH, Plehm S, Fasan A, Rössler S, Unland R, Bennani-Baiti IM, Hotfilder M, Löwel D, von Luettichau I, Mossbrugger I, Quintanilla-Martinez L, Kovar H, Staeger MS, Müller-Tidow C, Burdach S (2009) EZH2 is a mediator of EWS/FLI1 driven tumor growth and metastasis blocking endothelial and neuro-ectodermal differentiation. *Proc Natl Acad Sci* 106: 5324-5329

*Mens agitat molem.*

(Pubius Vergilius Maro)

*Der Geist bewegt die Materie.*

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	8
Tabellenverzeichnis	9
Abkürzungsverzeichnis	10
Kapitel 1 - Einleitung	13
1.1 Einführung in das Arbeitsthema	13
1.2 Pathologie des Ewing-Tumors	14
1.2.1 Epidemiologie	14
1.2.2 Symptomatik	15
1.2.3 Diagnostik	16
1.2.4 Therapie	17
1.3 Biologie des Ewing-Tumors	19
1.3.1 Zellursprung des Ewing-Tumors (ET)	19
1.3.2 Transkriptionsanalyse	21
1.3.3 Signalwege	22
1.3.4 Epigenetische Regulation: Trichostatin A, Chaetocin und EZH2	23
1.4 Fragestellung der Arbeit	24
Kapitel 2 - Material und Methoden	25
2.1 Material	25
2.1.1 Antibiotika	25
2.1.2 Bakterien	25
2.1.3 Chemikalien	25
2.1.4 Chemische Inhibitoren	27
2.1.4.1 Histon-modulierende Substanzen	27
2.1.4.2 MEK/MAPK-Pathway-beeinflussende Substanzen	27
2.1.4.3 PI3K-Pathway-beeinflussende Substanzen	27
2.1.5 Geräte	28
2.1.6 Kit-Systeme	28
2.1.7 Medien	29
2.1.8 Puffer	29
2.1.9 Vektoren	30
2.1.10 Verbrauchsmaterial	30
2.1.11 Zellen	30

---

<b>2.2 Methoden</b> .....	<b>32</b>
2.2.1 Zellkultur .....	32
2.2.2 Stabile Infektanten .....	32
2.2.3 Proliferations-Assays .....	35
2.2.4 Inkubationsversuche für die Messung der Genexpression.....	37
2.2.5 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese .....	37
2.2.6 Quantitative Real-Time-PCR (qRLT-PCR).....	39
2.2.7 Western-Blot mit diskontinuierlicher SDS-Poly-Acrylamid-Gelelektrophorese (Sodium-Dodecylsulfat-Page).....	40
<b>Kapitel 3 - Ergebnisse</b> .....	<b>43</b>
3.1 Proliferations-Assays .....	43
3.1.1 Histon-modulierende Substanzen .....	43
3.1.2 MEK/MAPK-Pathway-beeinflussende Substanzen .....	45
3.1.3 PI3K-Pathway-beeinflussende Substanzen.....	49
3.2 Quantitative Real-Time-PCR (qRLT-PCR).....	53
3.2.1 Histon-modulierende Substanzen .....	54
3.2.2 MEK/MAPK-Pathway-beeinflussende Substanzen .....	54
3.2.3 PI3-Pathway-beeinflussende Substanzen .....	64
3.3 Stabile siRNA-Infektanten .....	70
3.4 Mesenchymale Stammzellen (MSC) .....	72
3.4.1 Western-Blot .....	73
3.4.2 qRLT-PCR .....	73
<b>Kapitel 4 - Diskussion</b> .....	<b>75</b>
4.1 Histon-modulierende Substanzen .....	75
4.2 MEK/MAPK-Pathway-beeinflussende Substanzen .....	78
4.3 PI3K-Pathway-beeinflussende Substanzen.....	80
4.3.1 LY 294-002 und Wortmannin.....	80
4.3.2 Rapamycin .....	82
4.4 Stabile siRNA-Infektanten .....	84
4.5 Mesenchymale Stammzellen (MSC) .....	87
4.6 Vergleich Inhibition mit Kinaseinhibitoren und siRNA .....	90
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>92</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>95</b>
<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>97</b>
<b>Lebenslauf</b> .....	<b>112</b>

# Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> IGF-1 Regulationswege.....	23
<b>Abb. 2:</b> Vektorkarte pSilencer 5.1-U6 Promotor (Clontech).....	32
<b>Abb. 3:</b> Vektorkarte pSIREN RetroQ (Clontech).....	33
<b>Abb. 4:</b> Vektorkarte pMSCVNeo (Takara Bio Europe/Clontech) .....	34
<b>Abb. 5:</b> Proliferationsassay mit Trichostatin A.....	43
<b>Abb. 6:</b> Proliferations-Assay mit Chaetocin. ....	44
<b>Abb. 7:</b> Proliferationsassay mit P215.....	45
<b>Abb. 8:</b> Proliferationsassay mit SB 202190. ....	46
<b>Abb. 9:</b> Proliferationsassay mit SB 203580.. ....	47
<b>Abb. 10:</b> Proliferationsassay mit U0126.....	48
<b>Abb. 11:</b> Proliferationsassay mit LY 294-002.....	49
<b>Abb. 12:</b> Proliferationsassay mit Rapamycin. ....	50
<b>Abb. 13:</b> Proliferationsassay mit Wortmannin.....	51
<b>Abb. 14:</b> Genexpression der Ewing-Zellen nach Trichostatin A-Inkubation [100 nM] .....	54
<b>Abb. 15:</b> Genexpression der Ewing-Zellen nach Chaetocin-Inkubation [5 nM; 10 nM] .....	56
<b>Abb. 16:</b> Genexpression der Ewing-Zellen nach P215-Inkubation [50 µM].....	58
<b>Abb. 17:</b> Genexpression der Ewing-Zellen nach SB 202190 und SB 203580-Inkubation [30 µM] .....	60
<b>Abb. 18:</b> Genexpression der Ewing-Zellen nach U0126-Inkubation [20 µM].....	62
<b>Abb. 19:</b> Genexpression der Ewing-Zellen nach LY294-002-Inkubation [80 µM] .....	64
<b>Abb. 20:</b> Genexpression der Ewing-Zellen nach Rapamycin-Inkubation [100 nM] .....	66
<b>Abb. 21:</b> Genexpression der Ewing-Zellen nach Wortmannin-Inkubation [5 µM].....	68
<b>Abb. 22:</b> Genexpression der EWSFLI1-siRNA-Infektanten der Zelllinie A673 .....	71
<b>Abb. 23:</b> EWS/FLI1-Expression der unterschiedlichen getesteten Zellen.....	72
<b>Abb. 24:</b> Western-Blot der EWSFLI1-infizierten MSC .....	73
<b>Abb. 25:</b> Genexpression der EWSFLI1- Infektanten der mesenchymalen Stammzellen.....	74

---

## Tabellenverzeichnis

<b>Tbl. 1:</b>	Fusionsgene des Ewing-Tumors .....	20
<b>Tbl. 2:</b>	Verwendete Antibiotika .....	25
<b>Tbl. 3:</b>	Verwendete Histon-modulierende Substanzen .....	27
<b>Tbl. 4:</b>	Verwendete MEK/MAPK-Pathway-beeinflussende Substanzen.....	27
<b>Tbl. 5:</b>	Verwendete PI3K-Pathway-beeinflussenden Substanzen .....	27
<b>Tbl. 6:</b>	Verwendete Zellen.....	30
<b>Tbl. 7:</b>	$\beta$ -actin-PCR-Programm .....	38
<b>Tbl. 8:</b>	Gen-Assays .....	39
<b>Tbl. 9:</b>	qRLT-PCR-Programm .....	39
<b>Tbl. 10:</b>	SDS-Page .....	41
<b>Tbl. 11:</b>	Proliferationsänderung [%] Trichostatin A .....	44
<b>Tbl. 12:</b>	Proliferationsänderung [%] Chaetocin .....	45
<b>Tbl. 13:</b>	Proliferationsänderung [%] P215 .....	46
<b>Tbl. 14:</b>	Proliferation [%] SB 202190 .....	46
<b>Tbl. 15:</b>	Proliferation [%] SB 2035802 .....	47
<b>Tbl. 16:</b>	Proliferationsänderung [%] SB 202190, SB 203580 .....	48
<b>Tbl. 17:</b>	Proliferationsänderung [%] U0126.....	49
<b>Tbl. 18:</b>	Proliferationsänderung [%] LY 294-002.....	50
<b>Tbl. 19:</b>	Proliferationsänderung [%] Rapamycin .....	50
<b>Tbl. 20:</b>	Proliferationsänderung [%] Wortmannin.....	51
<b>Tbl. 21:</b>	Verwendete Kinaseinhibitoren für qRLT-PCR .....	53
<b>Tbl. 31:</b>	Stabile Infektanten .....	70

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
Akt	extrazellulär signalregulierte Kinase
ALL	Akute lymphatische Leukämie
Amp	Ampicillin
BGN	Biglykan
BMP1	bone morphogenic protein 1
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
Bu-Met	Busulfan und Melphalan
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
bzw.	beziehungsweise
Ca	Calcium
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	cluster of differentiation
CHM1	Chondromodulin 1
CRP	c-reaktives Protein
CT	Computertomographie
CYC	Cyclophosphamid
DGOOC	Deutsche Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie
d. h.	das heißt
DKK2	Dickkopf homolog 2
DOX	Doxorubicin
EFT	Ewing family of tumor
(EI)CESS-Studie	(European intergroup) cooperative Ewing-sarcoma-Studie
eIF4B/E	eukaryotic initiation factor 4B/E
ERG	ets-related gene
ES	Ewing-Sarkom
ET	Ewing-Tumor
et al.	et alia
EtOH	Ethanol
ETO	Etoposid
ETS	erythroblastosis virus transforming sequence
ETV1	ets translocation variant 1

---

Euro-E.W.I.N.G-99-Studie	European Ewing tumor working initiative of national groups-99-Studie
EWS	Ewing sarcoma
EZH2	enhancer of zeste homolog 2
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
FDG-PET	<sup>18</sup> Fluordesoxyglukose-Positronen-Emissions-Tomographie
FEV	fifth ewing variant
FKBP-12	FK 506-bindendes Protein (12 kDa)
FLI1	homologous to friend leukaemia virus integration site 1
Flt-1-Rezeptors	fms-ähnliche Tyrosinkinase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G1P2	interferon, alpha-inducible protein
GPOH	Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie
GPR64	G protein-coupled receptor 64
Gy	Gray
HAT	Histon-Acetyl-Transferase
HDACi	Histon-Deacetylase-Inhibitoren
HRP	horseradish peroxidase
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
ID2	inhibitor of DNA binding 2
IFITM1	Interferon induced transmembrane protein 1
IFO	Ifosfamid
IGF-1R	insulin like growth factor -1-Rezeptor
ITM2A	integral membrane protein 2a
KM	Knochenmark
LB-Medium	Luria Bertani Medium
LDH	Laktatdehydrogenase
Lect1	Leukocyte cell derived chemotaxin 1 (=> Chondromodulin 1)
LIP1	Membran-assoziierte Phospholipase A1-β
LJ	Lebensjahr
LM	Lymphom
LTR	5'-long terminal repeat
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MEK	Mitogen-aktivierte ERK-regulierende Kinase
MRT	Magnetresonanztomographie
MSC	mesenchymale Stammzellen
mTOR	mammalian target of Rapamycin
NB	Neuroblastom
N.D.	nicht detektierbar
NFTP	Neurale-Filament-Triplet-Proteine
NIH3T3	Mausfibroblasten-Zelllinie 3T3, National Institute of Health, USA

---

NSE	Neuronen-spezifische Enolase
OD 495	optische Dichte bei 495 nm
PAS-Reaktion	Perjodsäure-Schiff-Reaktion
PCR	polymerase chain reaction
PDK <sub>1</sub>	Phosphoinositol-abhängige Kinase 1
PGF	placenta growth factor
Ph	Phosphat
PI3K/Akt	Phosphatidyl-Inositol-3 Kinase/Protein Kinase B
PIP <sub>2/3</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bi-/Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-Triphosphat
PNET	peripher neuroektodermaler Tumor
RAF	rasch wachsendes Fibrosarkom oder Ratten-Fibrosarkom
RAS	Ratten-Sarkom-Protein
RF	Raumforderung
RHEB	RAS homolog enriched in brain
RMS	Rhabdomyosarkom
rpm	rounds per minute
RSK <sub>1-4</sub>	ribosomale Protein-Kinase <sub>1-4</sub>
RT	Raumtemperatur
RLT-PCR	real time polymerase chain reaction
Runx 2	Runt-related Transkriptionsfaktor 2
S-100	Serum S100 Protein
siRNA	small interfering RNA
S6K	Protein-S6-Kinase 1
SOX9	Sry-type high mobility group box
SRCT	small round cell tumor
STEAP	six-transmembrane epithelial antigen of the prostate
t(11;22)	Translokation (11;22)
Tbl.	Tabelle
TLS	translocation liposarcoma-Gen
TNM	Tumor-Nodus (Lymphknoten)-Metastasen
TSC <sub>2</sub>	Tuberosklerose-Komplex 2
ÜLR	Überlebensrate
v.a.	vor allem
VAC	Vincristin, Actinomycin D, Cyclophosphamid
VAI	Vincristin, Actinomycin D, Ifosfamid
VCR	Vincristin
VEGF	vesicular endothelial growth factor
VIDE	Vincristin, Ifosfamid, Doxorubicin, Etoposid

---

# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Einführung in das Arbeitsthema

Glücklicherweise treten Tumorerkrankungen im Kindesalter recht selten auf. Dennoch wird bei ca. 1800 Kindern pro Jahr in Deutschland eine maligne Erkrankung diagnostiziert, wobei die primären Knochentumore mit ca. 3,4% aller malignen Neoplasien im Kindesalter einen eher kleineren Anteil ausmachen. Der Ewing-Tumor (ET), als zweithäufigster Vertreter dieser Gruppe, gilt als hochmaligner anaplastischer Tumor neuroektodermalen Ursprungs mit mesenchymaler Differenzierungsmöglichkeit (Staege et al., 2004a), der bei etwa einem Viertel der Betroffenen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits primäre Metastasen aufweist. Es ist jedoch davon auszugehen, dass selbst bei Patienten mit lokalisiertem ET okkulte Mikrometastasen vorliegen, da die Überlebensrate bei alleiniger lokaler Therapie nur 10% beträgt (Oberlin et al., 1985). Neben dem Neuroblastom, dem Rhabdomyosarkom und dem Non-Hodgkin-Lymphom werden Tumore der EFT (Ewing family of tumors) zur Gruppe der kleinen, runden, blauen Zelltumore (engl.: small round blue cell tumor, SRBCT) gezählt (Chen et al., 2007). Zur Familie der Ewing-Tumore wiederum gehören der klassische ET des Knochens und des Weichgewebes, periphere primitive neuroektodermale Tumore (pPNET), paravertebrale kleinzellige Tumore sowie der Askin-Tumor, ein seltener pPNET ausgehend von der Thoraxwand (Roessner & Jürgens, 1993). Diese unterscheiden sich durch ihre neuroektodermale Differenzierung, welche beim Ewing-Tumor am geringsten ausgeprägt ist (Jaffe et al., 1984). Allen ET-Tumoren gemeinsam ist eine reziproke chromosomale Translokation des EWS-Gens (Chromosom 22q12), überwiegend mit dem FLI1-Gen auf Chromosom 11q24, welche bei ca. 85% der Patienten zur EWS/FLI1-Aberration führt (Delattre et al., 1992). Während der 3'-FLI1-Teil dieser Fusionspartner für die Bindung an die DNA verantwortlich ist, wirkt die 5'-EWS-Domäne der chimären Translokation als Aktivator an Promotorregionen (May et al., 1993a/b). Der dabei entstehende, aberrante Transkriptionsfaktor wird für die Onkogenese des Tumors verantwortlich gemacht (Arvand & Denny, 2001). So wurde in Arbeiten von May et al. (1993b) eine Expression des EWS/FLI1-Fusionstranskripts sowohl *in vivo* als auch *in vitro* als entscheidender Faktor für gesteigerte maligne Transformation, Zellwachstum und verminderte Sensibilität der Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika beobachtet.

Die Behandlung des ET konnte während der letzten 30 Jahre durch die Einführung systemischer und interdisziplinärer Therapieschemen gemäß der (EI)CESS-(European intergroup) cooperative Ewing-sarcoma-study) oder der Euro-E.W.I.N.G-99-Studie (European Ewing tumor working initiative of national groups) deutlich verbessert werden. Im Vergleich zu anderen Tumorentitäten fällt die

Prognose bei lokalisiertem Auftreten mit einem 5-Jahres-Überleben von 55-65% (Paulussen et al., 2001a) jedoch immer noch eher schlecht aus. Liegen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung primäre Metastasen vor, so sinkt die Überlebensrate sogar noch weiter. Bei primären Lungenmetastasen auf circa 30% und auf ca. 20% bei primären Knochenmetastasen (Cotterill et al., 2000). Für Patienten mit extrapulmonalen Metastasen bei der Diagnosestellung oder einem frühen Rezidiv, innerhalb der ersten zwei Jahre nach abgeschlossener Therapie, haben sich die Heilungschancen durch konventionelle Therapieschemen bisher leider nicht wesentlich verändert (Paulussen et al., 1998; Burdach et al., 2000/2003/2009; Burdach und Jürgens, 2002; Burdach, 2004; Haeusler et al., 2010). Daher ist die Entwicklung neuer Therapiestrategien Gegenstand der Forschung, die sowohl die Optimierung der bisherigen konventionellen Therapieschemen als auch innovative Therapieansätze mit T-Zell-vermittelten immunzytologischen Methoden vorsieht (Meyer-Wentrup et al., 2005; Thiel et al., 2011). Ebenso wird auf genetischer Ebene die Inhibition der beim Ewing-Tumor exprimierten Gene untersucht wie auch deren Zusammenhang zu EWS/FLI1 näher charakterisiert. Dies war auch Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

## 1.2 Pathologie des Ewing-Tumors

### 1.2.1 Epidemiologie

Mit einer jährlichen Inzidenz von circa 3,2 auf  $10^6$  Kinder unter dem 15. Lebensjahr sind ET (Hense et al., 1999) nach dem Osteosarkom die zweithäufigsten bösartigen Knochentumore im Kindes- und Jugendalter. Wie bei vielen malignen Erkrankungen zeigt sich auch beim Ewing-Tumor, mit einem Verhältnis von ca. 1,3 : 1 (56% Jungen, 44% Mädchen), ein leichtes Überwiegen des männlichen Geschlechts (Rosen, 1976). Bevorzugt manifestiert sich der ET in der 2. Lebensdekade, der Zeit des vermehrten Skelettwachstums mit Prädilektionsalter zwischen dem 5. bis 15. Lebensjahr (Schajowicz, 1994). Der Erkrankungsmedian liegt jedoch um das 15. Lebensjahr. Im Erwachsenenalter tritt dieser Tumor äußerst selten auf, dennoch sind Einzelfälle von Patienten mit einem Erkrankungsalter bis zum 81. Lebensjahr beschrieben (Fizazi et al., 1998; Levine et al., 2002).

#### *Ätiologie*

Die Ursache für die Entstehung des Ewing-Tumors ist bisher noch ungeklärt, jedoch sind bei Patienten mit Häufungen von Skelettanomalien in der Familie oder angeborenem Retinoblastom vermehrt Ewing-Tumore beschrieben worden (Helton et al., 1993; Mittal et al., 2008). Tucker et al. (1987) wie auch Dorfman et al. (1995) fanden in ihren Arbeiten ein um 1-2% erhöhtes Risiko für die Entstehung sekundärer Malignome nach Behandlung eines Primärtumors während der Kindheit wie z.B. das durch Bestrahlung induzierte Sarkom und Leukämien nach Chemotherapie. Bei der Inzidenz des Ewing-Tumors lassen sich auffällige ethnische Unterschiede erkennen. Die meisten Fälle treten in der kaukasischen Bevölkerung auf, wohingegen diese Tumorentität bei Asiaten oder in der schwarzen Bevölkerung so gut wie gar nicht vorkommt (Parkin et al., 1993).

---

### *Lokalisation*

Der Ewing-Tumor kann in fast allen Knochen und Geweben auftreten, insbesondere jedoch in glatten Knochen oder den Diaphysen der langen Röhrenknochen. In letzteren findet er sich am häufigsten in den unteren Extremitäten (30% Femur, 12% Tibia, 8,5% Becken und 8% Fibula (Schajowicz, 1994)) und in 13% der Fälle in den oberen Extremitäten sowie im Rumpf- und Rippenbereich. Bei 15% der Patienten manifestiert er sich als extraossärer Tumor sowohl in paravertebralem als auch in thorakalem Gewebe oder in Organen wie den Nieren, der Harnblase, der Lunge, der Prostata und den Meningen (Ushigome et al. 2002).

### *Metastasierung*

Durch seine frühe hämatogene Metastasierung vor allem in die Lunge, die Knochen (v.a. Wirbelsäule) oder das Knochenmark gilt der Ewing-Tumor mit seinen undifferenzierten Zellen als hochmaligne. Die Lymphknoten, die Leber und das Gehirn sind hingegen weniger von Metastasen betroffen. Bei circa 25% der Patienten finden sich bereits bei der Erstdiagnose des ET Metastasen. Ein primärer Beckenbefall, eine Laktatdehydrogenase-Erhöhung im Serum ( $\geq 200$  IE/l), Fieber, ein Manifestationsalter über dem 12. Lebensjahr und ein Zeitintervall von unter 3 Monaten zwischen den ersten Symptomen und der Diagnosestellung (Bacci et al., 2000) gelten als Risikofaktoren (RF) für die frühe Metastasierung. Zusätzlich weisen nekrotische Tumorareale in kontrastmittelverstärkten MRT-Aufnahmen bei der Erstdiagnose auf ein erhöhtes Metastasierungs-Risiko hin (Dunst et al., 2001). Das Risiko für Metastasen steigt dabei mit der Anzahl der Risikofaktoren von 4% bei einem der oben genannten Risikofaktoren, über 23% bei 2 RF und auf 44% bei Vorliegen von 3-4 RF.

## **1.2.2 Symptomatik**

Klinische Leitsymptome des Ewing-Tumors sind der häufig nachts auftretende lokale Schmerz, der oftmals als Wachstumsschmerz verkannt wird, die an Größe zunehmende Schwellung an Knochen und Weichteilen und der Funktionsverlust der betroffenen Körperregion. Häufig werden diese Symptome durch den Patienten und seine Eltern mit einem vorangegangenen Bagateltrauma in Verbindung gebracht, was die Beurteilung durch den Arzt erschwert. Bei unklarem Zusammenhang zwischen der Art des Traumas und der Dauer bzw. dem Charakter der Schmerzen, sollte daher eine maligne Erkrankung durch sorgfältige Anamnese und Diagnostik ausgeschlossen werden. Dennoch liegen im Durchschnitt rund 6-12 Wochen zwischen den ersten Symptomen und der Diagnosestellung. Aufgrund der sich wesentlich später manifestierenden Beschwerden kann das Tumorgeschehen bei primärem Befall des Beckens sogar noch längere Zeit okkult voranschreiten. So dass in ungefähr 15% der Fälle die Patienten erst durch pathologische Frakturen oder eine B-Symptomatik wie Fieber, Abgeschlagenheit und Gewichtsverlust auffällig werden. Sind die Wirbelsäule oder das Sakrum beteiligt, können Symptome ähnlich eines Spinalen-Kompressions-Syndroms mit Rückenschmerz und Radikulopathien bis hin zum Verlust der Harnblasenkontrolle auftreten. Als entscheidende Faktoren für das Überleben der Patienten mit Ewing-Tumor gelten die Metastasierung, die Tumorgröße und die

Tumorlokalisation, die v. a. für die mögliche chirurgische Entfernung des Tumors eine große Rolle spielt wie auch das Ansprechen des Tumors auf die Chemotherapie (Paulussen et al., 2001b).

Als Faktoren für eine ungünstige Prognose gelten das männliche Geschlecht, ein Manifestationsalter über dem 12. Lebensjahr, Fieber und Anämie zum Zeitpunkt der Diagnose, hohe Serum-LDH-Werte und eine Tumorlokalisation außerhalb der Extremitäten (Axial, Becken, Clavicula, Rippen, Skapula, Schädel, Sternum und Wirbelsäule) (Bacci et al., 2000; Burdach, 2004).

### 1.2.3 Diagnostik

Neben der ausführlichen Anamnese und der klinischen Untersuchung besteht die Diagnostik in einer laborchemischen Untersuchung, die neben dem Blutbild mit Differentialblutbild, die Bestimmung von Elektrolyten, der Laktatdehydrogenase-Aktivität (LDH), Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit, Eisen und Ferritin wie auch Gesamteiweiß und alkalische Phosphatase als Nachweis konsumierender Prozesse beinhalten sollte. Zur Abgrenzung zur Osteomyelitis, als wichtigste Differentialdiagnose, sollten des Weiteren auch die Entzündungswerte (CRP, Leukozyten) bestimmt werden. Zusätzlich sollte in einer Urinuntersuchung sowohl das Neuroblastom, durch seine im Gegensatz zum Ewing-Tumor erhöhten 24-Stunden-Werte für Katecholamine wie auch durch Bestimmung der Paraproteine das Plasmozytom bei älteren Patienten differentialdiagnostisch ausgeschlossen werden. Als pathognomischer Röntgen-Befund des Ewing-Tumors gelten mottenfraßähnliche diaphysäre Veränderungen der langen Röhrenknochen mit Zwiebschalen-Phänomen infolge progredienter appositioneller Knochenneubildung nach Durchbruch des Tumors durch die Kortikalis (T2). Das Staging mittels CT- und MRT-Aufnahmen komplettiert die Diagnostik im Hinblick auf eventuell vorhandene Lungenmetastasen und dient der Beurteilung der Tumorausdehnung im Weichteilgewebe. Als neueres Verfahren dient hierbei das hochsensitive FDG-PET (18F-Fluordesoxyglukose- Positronen-Emissions-Tomographie), welches sowohl zur Beurteilung des Ausgangsbefundes als auch zur Verlaufskontrolle der Tumorregression eingesetzt wird. Zur histologischen Sicherung sollte eine Tumorbiopsie unter Schonung umliegender Gefäß-Nerven-Stränge, Kompartimente und Gelenke erfolgen, um eine weitere Dissemination des Tumors zu vermeiden. Die so gewonnene Gewebeprobe wird anschließend makro- und mikroskopisch wie auch immunhistochemisch auf spezifische Marker (Glykogen-Bestimmung, CD99, NSE) und chimäre Translokationen (Tbl. 1) des Ewing-Tumors untersucht (Dockhorn-Dworniczak et al., 1994). Anhand unterschiedlicher histologischer Befunde lässt sich die heterogene Gruppe der Ewing-Tumore in das atypische Ewing-Sarkom (Nascimento et al., 1980), das Adamantinom-ähnliche ES (Bridge et al., 1999; Hauben et al., 2001), das sklerosierende und das Spindelzell-Sarkoma-ähnliche ES (Folpe et al., 2005) unterteilen. Allen Ewing-Tumoren gemein, ist jedoch ihre Erscheinung als kleine Rundsarkome mit dicht gepackten Zellnestern und mäßig chromatindichten Zellkernen in vakuolisiertem Zytoplasma. Der Ewing-Tumor des Knochens wird im histopathologischen Grading stets als G4-Tumor klassifiziert, was einem undifferenzierten Tumor mit hohem Malignitätsgrad entspricht. Eine histologische Zweitbegutachtung durch eine Referenzpathologie ist im Rahmen der Euro-E.W.I.N.G-99-Studie obligat.

### 1.2.4 Therapie

#### *Konventionelles Therapieschema*

In der Zeit ohne systemische Therapie verstarben über 90% der Patienten infolge sekundärer Metastasen, weshalb davon auszugehen ist, dass es sich beim Ewing-Tumor um eine systemische Erkrankung handelt. Daher besserte sich die Prognose erst nach Einführung der Chemotherapie seit der ersten (E)CESS-Studie von 1981 (Jürgens et al., 1988). Mittlerweile werden Patienten mit lokalisiertem und primär metastasiertem Ewing-Tumor nach dem Euro-E.W.I.N.G.-99-Protokoll, einer randomisierten, prospektiven, internationalen und multizentrischen Studie, behandelt. Neben der (neo)adjuvanten Chemotherapie nach Biopsie zur Diagnosesicherung sieht dieses Protokoll eine lokale Behandlung durch chirurgische Resektion (Enneking et al., 1983) mit eventuell anschließender fraktionierter Radiatio (45-55 Gy) vor. Die Strahlentherapie findet prä- oder postoperativ bei inoperabler Tumorlokalisation Anwendung. Ab Diagnosestellung beträgt die durchschnittliche Therapiedauer etwa 10 Monate. Als besonders wirksame Chemotherapeutika zeigten sich bisher Alkylanzien (Cyclophosphamid) und Antrazykline (Doxorubicin). Zur histopathologischen Verlaufsdagnostik werden die Resektionsränder des Tumors nach der Methode von Salzer-Kuntschik et al. (1983) lichtmikroskopisch auf vitale Tumorzellen durchsucht. Hierbei wird der Remissionsgrad nach vorangegangener Chemotherapie anhand der noch vorhandenen vitalen Tumorzellen bestimmt und in Grad I bis VI eingeteilt, wobei die Grade I-III für ein gutes Ansprechen auf die neoadjuvante Chemotherapie gewertet werden, die Grade IV bis VI hingegen gelten als "poor response". Wegen möglicher Spätfolgen der Therapie mit Organfunktionsstörungen wie Endokard- und Lungenfibrose oder der Gefahr sekundärer Malignome wie Leukämien (Bhatia et al., 2007) sollten vor und nach Therapie-Beginn die Organfunktionen nach Angaben des Euro-E.W.I.N.G.-99-Protokolls durch Elektrokardiogramm (EKG), Kardioechographie und Lungenfunktionsmessungen regelmäßig überprüft werden. Die Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädischen Chirurgie (DGOOC) und der Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) sehen für die Nachsorge in den ersten beiden Jahren nach abgeschlossener Therapie eine klinische Untersuchung mit lokaler Röntgen-Kontrolle, Kontrolle der Laborwerte, Thorax-CT, Ganzkörper-Szintigraphie in dreimonatigen Abständen sowie eine lokale MRT-Kontrolle alle sechs Monate vor. In den ersten drei bis fünf Jahren nach abgeschlossener Therapie sollten die vorab genannten Kontrolluntersuchungen halbjährlich, bzw. die lokale MRT-Kontrolle alle 12 Monate erfolgen. Ab dem sechsten Jahr sollten die Nachsorgeuntersuchungen bis zum Abschluss des zehnten postoperativen Jahres jährlich durchgeführt werden. Im Rezidiv ist die Heilungschance von der Tumorlokalisation und vom Zeitpunkt des Rezidivs abhängig. Von frühem Rezidiv wird hierbei bei erneutem Auftreten des Tumors in den ersten beiden Jahren nach initialer Therapie gesprochen, ein spätes Rezidiv tritt hingegen erst nach dieser Zeitspanne auf. Die beste Heilungschance zeigen späte pulmonale (ca. 40%) und lokale Rezidive (ca. 50%), wohingegen frühe Knochenrezidive die schlechteste Prognose mit einem Überleben von nur ca. 10% aufweisen. Neben lokaltherapeutischen Maßnahmen kommt in diesen Fällen eine weitere Chemotherapie mit Topoisomerase-Inhibitoren (Etoposid, Topotecan) und Alkylanzien (Ifosfamid, Cyclophosphamid) in Kombination mit myeloablativen Ansätzen durch

autologe hämatopoetische Stammzelltransplantation zum Tragen (Burdach et al., 2000; Burdach, 2004). Als entscheidende Faktoren für verbesserte Überlebenschancen der Ewing-Patienten mit primär disseminiertem multifokalem Tumor gelten neben der lokalen Behandlung betroffener Kompartimente durch chirurgische Eingriffe und Radiotherapie die systemische Behandlung (Haeusler et al., 2010). So konnte in einer Follow-up-Studie über Ganzkörper-MRT-gestützte Bestrahlung betroffener Kompartimente kombiniert mit Hochdosis-Chemotherapie und nachfolgendem Stammzell-Rescue ein verbessertes Langzeit-Überleben von Patienten mit multiplen Knochenmarks-Metastasen gegenüber der konventionellen Therapie mittels EICESS92-Protokoll nachgewiesen werden (Burdach et al., 1993, 2010).

### *Experimentelle Therapieansätze*

Als erfolgversprechende Immuntherapie gelang es durch den Einsatz Interleukin (IL) 2- und 7-transfizierter Ewing-Zelllinien das Tumorwachstum unter Zellkultur-Bedingungen wie auch *in vivo* zu reduzieren, was auf die Aktivierung zytolytischer T-Lymphozyten und NK-Zellen (Natürliche Killerzellen) zurückzuführen ist (Burdach, 2004; Staeger et al., 2004b; Meyer-Wentrup et al., 2005). Der *in vitro*-Einsatz HAT-(Hypoxanthin/Aminopterin/Thymidin)-sensitiver Ewingzellen stellt eine weitere Möglichkeit immuntherapeutischer Ansätze zur Bekämpfung des Ewing-Tumors dar (Pfeifle et al., 2009). Auf genetischer Ebene wurde bisher durch die Inaktivierung von EWS/FLI1 versucht dem Tumorwachstum Einhalt zu gebieten, was *in vitro* durch antisense-Oligonukleotide (Kovar et al., 1996; Tanaka et al., 1997) wie auch durch RNA-Interferenz mit siRNAs gelang. Mittlerweile ist jedoch davon auszugehen, dass durch die Anwendung dieser Methoden auch andere Genkomplexe dysreguliert werden (Tschuch et al., 2008; Anderson et al., 2008; Vankoningsloo et al., 2008) bzw. als weiterer Nebeneffekt immunologische Prozesse beeinflusst werden, die über die Aktivierung von Interferon (IFN) und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) Einfluss auf die Zellproliferation, -differenzierung und die Apoptose nehmen (Karikó et al., 2004). Ribozyme als kleine katalytische RNA-Moleküle bieten hingegen den Vorteil über ihre spezifische Bindungskapazität Target-Zellen gezielt spalten zu können. So gelang Hühn et al. (2009) *in vitro* die spezifische Spaltung der für das EWS/FLI1-Transkript codierenden RNA. Mit der Arbeit von Thiel et al. (2011) ist ein wichtiger Schritt der antigenspezifischen Immunotherapie bei der Behandlung des Ewing-Tumors gelungen. So konnte durch die Herstellung alloreaktiver zytotoxischer T-Zellen im Mausmodell das Tumorwachstum gehemmt werden. Als Epitope der Ewing-Tumorzellen fungierten die bei dieser Tumorentität hochregulierten Proteine EZH2 und CHM1 (Staeger et al., 2004), die durch alloreaktive T Zellen erkannt (Thiel et al., 2011; Steele et al, 2006) werden und das Wachstum des Tumors unterdrücken können (Thiel et al., 2011).

---

## 1.3 Biologie des Ewing-Tumors

### 1.3.1 Zellursprung des Ewing-Tumors (ET)

In den Jahren 1918 und 1921 hielten die Erstbeschreiber Arthur Purdy Stout (1918) und James Ewing (1921) den peripher neuroektodermalen Tumor der Weichteile (PNET) und den Ewing-Tumor, der damals als diffuses Endotheliom des Knochens bezeichnet wurde, für zwei voneinander unabhängige Entitäten. Der histogenetische Ursprung dieser Zellen ist seither Gegenstand vieler Diskussionen und bisher noch nicht vollständig geklärt. Nach der Beschreibung eines extraossären Ewing-Tumors durch Angerwall und Enzinger (1975), eines PNET im Knochen durch Jaffe et al. (1984) und durch die histochemische Differenzierung dieser Zellen durch Schmidt et al. (1985) musste jedoch davon ausgegangen werden, dass beide Tumorarten gleichen Ursprungs sind. Durch die Ergebnisse von Aurias et al. (1983), Turc-Carel et al. (1984) und durch die Arbeitsgruppe um Whang-Peng et al. (1986) konnte dies mit der Entdeckung einer chromosomalen reziproken Translokation des langen Arms der Chromosomen 11 und 22 ( $t(11;22)(q24;q12)$ ), welche für das Fusionsprotein EWS/FLI1 codiert, bestätigt werden. Bei 10% der ET-Fälle besteht eine Fusion zwischen dem EWS-Gen auf Chromosom 22q12 und dem ERG-Gen (Chromosom 11q24 oder 21q22), während bei den verbleibenden 1-5% eine Translokation zwischen dem EWS-Gen und einem weiteren Vertreter der ETS-Familie (ETV1, ETV4, FEV und TLS/ERG) vorliegt (Tbl. 1). De Chadarevian et al. (1984) fanden diese Translokation auch im Askin-Tumor (Askin et al., 1979). Seither gilt der Nachweis dieser spezifischen Fusionsgene als pathognomonisch, weswegen er zur Diagnosesicherung des Ewing-Tumors genutzt wird (Dockhorn-Dworniczak et al., 1994). Ob das Vorliegen dieser unterschiedlichen chimären Fusionspartner prognostische Auswirkung auf das Outcome der Ewing-Patienten hat, ist bisher nicht eindeutig. So fanden Oberlin et al. (1985) wie auch de-Alava et al. (1998) keinen Einfluss der chromosomalen Aberrationen auf den Verlauf der Tumorerkrankung. Van Doorninck et al. (2010) wie auch Le Deley et al. (2010) konnten in ihren Untersuchungen in Hinblick auf Event-freies Überleben oder das Gesamtüberleben von Ewing-Patienten, die gemäß der aktuellen Therapieschemen behandelt wurden, ebenfalls keinen prognostischen Vorteil des EWS/FLI1-Typ 1-Transkriptes (EWS Exon 7 und FLI-1 Exon 6) feststellen. Im Gegensatz dazu korrelierte bei Patienten mit lokalisiertem Tumor der Nachweis des EWS/FLI1 Typ 1-Fusionstranskriptes, im Vergleich zu anderen Fusionsgenen, mit einer günstigeren Prognose (Zoubec et al., 1996), da das hierbei entstehende chimäre Protein eine geringere Aktivität aufzeigte (Lin et al., 1999).

Tbl. 1: Fusionsgene des Ewing-Tumors

Translokation	Fusionsgen	Häufigkeit
t(11;22) (q24;q12)	EWS-FLI1	85-95%
t(21;22) (q22;q12)	EWS-ERG	5-10%
t( 7;22) (q22;q12)	EWS-ETV1	< 1%
t(17;22) (q21;q12)	EWS-ETV4	< 1%
t( 2;22) (q33;q12)	EWS-FEV	< 1%

Nach Kovar (1998), Helman und Meltzer (2003)

Das EWS/FLI1-Fusionsgen ist als chimärer Transkriptionsfaktor in der Lage, unterschiedliche Gene, die für die Tumorentwicklung entscheidend sind, durch Induktion oder Repression zu dysregulieren (Arvand et al., 2001), wodurch die Tumorgenese und Zelltransformation in Ewing-Tumorzellen bedingt wird (Tanaka et al., 1997). So führte die Expression von EWS/FLI1 sowohl in NIH3T3-Fibroblasten zur Zelltransformation (Thompson et al., 1999) als auch *in vivo* mit immundefizienten Mäusen zur Transformation primärer Stromazellen des Knochenmarks in Zellen mit Ewing-Tumor-ähnlicher Histomorphologie (Castillero-Trejo et al., 2005; Riggi et al., 2005). Andererseits konnten durch die Inhibition von EWS/FLI1 wichtige Gene für die mesenchymale Differenzierung wie SOX9 und BMP1 induziert werden. Den Beleg für den neuroektodermalen Ursprung der Ewing-Tumore brachten Cavazzana et al. (1987), indem ihnen die neuronale Differenzierung von Ewing-Zelllinien durch eine *in vitro*-Behandlung mit dem sekundären Botenstoff cAMP gelang. In den differenzierten Zellen konnten daraufhin neurosekretorische Granula, Neuronen-spezifische Enolase (NSE) und Cholinesterase wie auch Neurale-Filament-Triplet-Proteine (NFTP) als spezifische Marker für Zellen neuronalen Ursprungs nachgewiesen werden. Als weitere Differenzierungs-Antigene gelten Synaptophysin, S-100 und CD57, Vimentin und Neurofilament (Ushigome et al., 2002). Zudem ergaben sich in DNA-Microarray-Analysen Hinweise auf einen mesenchymalen Ursprung der Ewing-Zellen, da ein Zusammenhang zwischen der Genexpression in Ewing-Tumorzellen und fetalem, neuronalem und endothelialelem Gewebe hergestellt werden konnte. Dies lässt darauf schließen, dass die Transformation in Ewing-Zellen zu Beginn der mesenchymalen und der endothelialen Differenzierung aus Vorläuferzellen der Neuralleiste stattfinden muss (Staege et al., 2004a) und sich entlang der knochen-, fett- oder der nervenzellbildenden Linien differenziert (de Alava et al., 2000; Tirode et al., 2007). Ebenfalls bekannt ist, dass die neuronale Differenzierung von Neuroblastom-Zellen durch die Infektion mit EWS/FLI1 inhibiert werden kann, weswegen es zu einer Verschiebung der sympathischen Differenzierung, wie sie beim Neuroblastom zu finden ist, zu Gunsten der parasympathischen des Ewing-Tumors kommt (Rorie et al., 2004). Dies zeigt sich über eine vermehrte Induktion der Marker der parasympathischen Differenzierung wie Cholinacetyltransferase (Thiele et al., 1987). Der Stammzell-Charakter der Ewing-Zellen begründet sich auf die beim Ewing-Tumor stark exprimierte Histon-Methyltransferase EZH2 (enhancer of Zeste, *Drosophila*, Homolog 2), welche durch inhibitorische Eigenschaften die Differenzierung sowohl maligne transformierter Zellen als auch nicht neoplastischer Zellen beeinflusst. Dies geschieht über die EZH2-abhängige Regulation Stammzell-typischer Gene wie dem „Nerve-Growth-Faktor“ (NGFR) und der für die Inhibition der

---

neuroektodermalen und endothelialen Differenzierung wichtigen Gene. RNA-Interferenz-Versuche, durch die die Expression von EZH2 supprimiert wurde, konnten zudem die onkogene Transformation von Ewing-Zellen *in vitro* wie auch das Tumorstadium und die Metastasierung im Mausmodell positiv beeinflussen (Richter et al., 2009; Burdach et al., 2009). Darüber hinaus konnten Richter et al. (2009) einen Zusammenhang zwischen dem Transkriptionsfaktor EWS/FLI1 und der bereits beschriebenen Methyltransferase EZH2 feststellen. Die EZH2-Expression in Ewing-Zellen ist dabei von der direkten Bindung des aberranten EWS/FLI1-Transkriptes an den EZH2-Promotor abhängig, was erneut die Bedeutung EWS/FLI1-regulierter Gene für die maligne Transformation in Ewing-Zellen unterstreicht. Aufgrund der mangelnden Kenntnis über den eigentlichen Zellursprung wurde der Ewing-Tumor fälschlicherweise jahrzehntlang als aus Bindegewebe und Muskelzellen ausgehendes Rundzellsarkom bezeichnet. Nach den neuesten Erkenntnissen handelt es sich bei diesem Tumor allerdings um Zellen neuroektodermalen Ursprungs mit mesenchymaler Differenzierungsmöglichkeit, weshalb der Begriff Ewing-Sarkom durch Ewing-Tumor ersetzt werden sollte.

### 1.3.2 Transkriptionsanalyse

Das EWS/FLI1-Fusionsprotein, bestehend aus dem 5'-EWS-Transkriptionsfaktor und der 3'-ETS RNA-bindenden Domäne, wird bei ca. 85% der Ewing-Tumore exprimiert. Die Inhibition dieser Fusionspartner führt zum Zellarrest in der G0/1-Phase des Zellzyklus und limitiert somit das Wachstum der Ewing-Zellen (Matsumoto et al., 2001). Aufgrund seiner deregulierten Expression und seiner Schlüsselfunktion bei der Entstehung des Ewing-Tumors ist EWS/FLI1 ein wichtiges Target für neue Therapien. Durch Transkriptionsanalyse bei der primäre Ewing-Tumore mit dem Normalgewebe des Körpers in einer Mikroarrayanalyse verglichen wurden, konnten 37 Gene identifiziert werden, die selektiv oder im ET überexprimiert werden (Staege et al., 2004a). Unter anderem gelten folgende Gene als hochreguliert: CHM1 (Chondromodulin 1), DKK2 (Dickkopf homolog 2), ITM2A (integral membrane protein 2A) (Staege et al., 2004a) und EZH2 (Richter et al., 2009) wie auch die Gene ID2 (inhibitor of DNA binding 2), GPR64 (G-Protein coupled receptor 64) (Staege et al., 2003; Riggi et al., 2008) und LIPI (lipase member I) (Foell et al., 2008). Dies macht sie zu wichtigen Zielstrukturen neuer Therapiekonzepte. Um die genetische Steuerung der Tumorentstehung und –entwicklung besser zu verstehen und um Ansätze für neue Therapiemöglichkeiten zu finden, wurden in der vorliegenden Arbeit die genannten Gene auf ihre Wechselwirkung mit EWS/FLI1 hin untersucht.

---

### 1.3.3 Signalwege

Schon im Jahre 1997 konnten Toretsky et al. (1997a) in ihren Versuchen am Mausmodell einen Zusammenhang zwischen dem beim Ewing-Tumor beschriebenen, insulin like growth factor-1 (IGF-1R)-Pathway als beeinflussenden Signaltransduktionsweg (Sekyi-Otu et al., 1995) und dem EWS/FLI1-Fusionsprotein im Hinblick auf Tumorgenese und Zellwachstum aufzeigen (Abb. 1). Mittlerweile sind weitere Regulationswege bekannt, die beim Ewing-Tumor in Abhängigkeit von EWS/FLI1 die maligne Entartung der Zellen und das Tumorwachstum vorantreiben. Zu diesen zählen unter anderem mTOR (mammalian target of Rapamycin), MEK/MAPK (Mitogen-aktivierte Protein-Kinase) (Benini et al., 2004) und PI3K/Akt (Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase/Protein-Kinase B) (Geryk-Hall und Hughes, 2009). Weiterführend stellten Schaefer et al. (2008) fest, dass entscheidende Gene dieser Regulationswege bei Ewing-Patienten mit einem eher schlechten Ansprechen des Tumors auf die neoadjuvante Chemotherapie gemäß der Euro-E.W.I.N.G.-99-Studie beeinflusst sind und neben der Chemotherapieresistenz die Ausbildung von Metastasen begünstigen. Folglich stellen diese Regulationswege eine wichtige Schiene in der Entwicklung neuer Therapieoptionen dar. Der chimäre Transkriptionsfaktor EWS/FLI1 ist hierbei, durch sein gehäuftes Vorkommen bei Ewing-Patienten und wegen seiner zentralen Rolle bei der Tumorgenese, eine wichtige Zielstruktur bei der Entwicklung innovativer Therapien. So zeigten sowohl die Inaktivierung dieses Fusionsgens durch small interfering RNAs (siRNA) (Prieur et al., 2004) als auch die Behandlung mit antisense Oligonukleotiden (Toretsky et al., 1997b; Tanaka et al., 1997) wie auch die Antikörper-vermittelte Blockade des IGF-1-Rezeptors (IGF-1R) (Scotlandi et al., 1998) vielversprechende Ergebnisse *in vitro* wie auch im Tiermodell. Diese Verfahren hemmten die Proliferation, was anhand des stagnierenden Zellwachstums durch das Verbleiben der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus und zusätzlich durch vermehrte Apoptose erklärt werden konnte. Antisense Oligonukleotide wurden u.a. bereits zur Behandlung von virostatikarefraktärer Cytomegalie-Virus(CMV)-Retinitis bei Patienten mit AIDS untersucht und klinische Studien mit auf siRNAs-basierenden antiviralen, antiangiogenen oder antiinflammatorischen Effekten durchgeführt. Ebenso befinden sich derzeit mehrere monoklonale Antikörper (R1507, CP-751871, SCH-717454 und IMC-A12) des ubiquitären insulin-like growth factor-Rezeptors 1 (Tyrosinkinase-Rezeptor) in Phase I/II der pharmakologischen Testung und zeigten bisher gute Ergebnisse (Ludwig, 2008). Eine weitere Therapiemöglichkeit ist auch der Einsatz von IGF-1R Antagonisten (NVP-AEW541), die sich bereits als effektiv gegen Ewing-Fremdzelltransplantate im Mausmodell erwiesen haben (Manara et al., 2007).

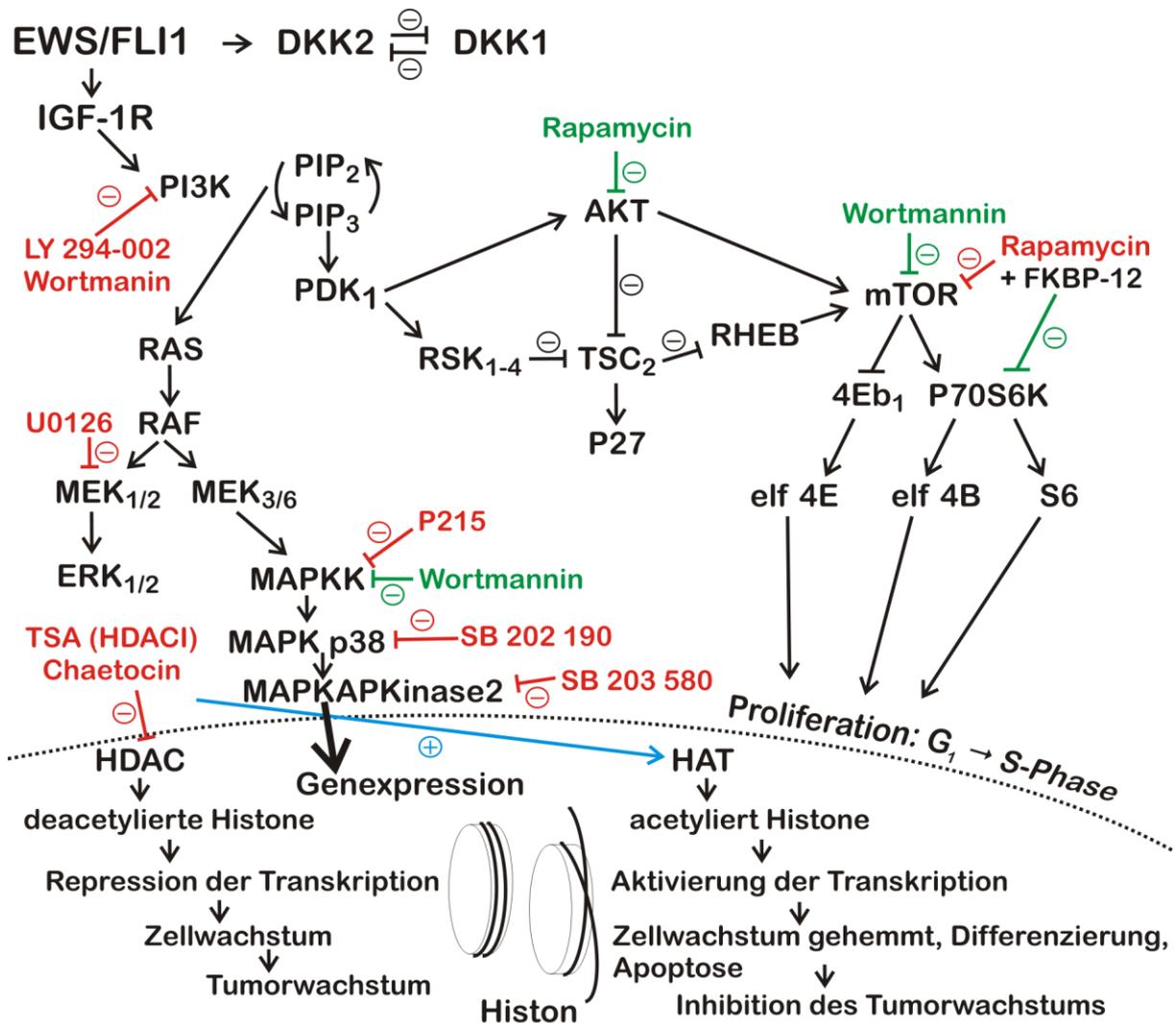


Abb. 1: IGF-1 Regulationswege

Spezifische Inhibition gekennzeichnet in roter Schrift, unspezifische Inhibition (in höheren Konzentrationen) gekennzeichnet in blauer Schrift (nach Vanhaesebroeck et al., 2001).-: Inhibition; +: Aktivierung.

HDACi: Histondeacetylase-Inhibitoren; HAT: Histonacetyltransferase (verändert nach Tao et al., 2007).

### 1.3.4 Epigenetische Regulation: Trichostatin A, Chaetocin und EZH2

Das beim Ewing-Tumor überexprimierte Gen EZH2 (enhancer of Zeste, *Drosophila*, Homolog 2) ist als Histon-Methyltransferase in der Lage durch die Methylierung von Lysin am Histon 3 (H3K27) und Lysin 26 am Histon 1 (H1K26) die Expression ganzer Genbereiche zu blockieren. Es gehört neben dem EED-Protein (embryonic ectoderm development) und dem „Suppressor of Zeste“ (SUZ12) zum Polycomb-Repressor-Komplex 2 (PRC2). EZH2 bindet über das EED-Protein an die HDAC2 (Histondeacetylase) und ist darüber an der Proliferation und dem kontakt-unabhängigen Wachstum der Ewing-Zellen beteiligt (Van der Vlag und Otte, 1999). EZH2 selbst wird durch EWS/FLI1 induziert (Richter et al., 2009). In Microarray-Analysen nach EZH2-Knock-down wie auch durch die Behandlung

mit Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi) konnte der undifferenzierte Phänotyp des ET als EZH2-vermittelt nachgewiesen werden. EZH2 supprimiert Gene mit Bedeutung für die neuronale und endotheliale Differenzierung, fördert aber auch die Expression von Stammzellgenen wie den „Nerve growth factor receptor“ (NGFR) (Burdach et al., 2009). Ewing Tumore können nach EZH2 Suppression sowohl endothelial als auch neuronal differenzieren. EZH2 fördert Tumorwachstum und Metastasierung und erhält den unreifen, stammzellartigen Charakter dieser Tumore aufrecht (Richter et al., 2009; Burdach et al., 2009).

## 1.4 Fragestellung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte die Beeinflussung verschiedener Zelllinien aus der heterogenen Gruppe der „small round blue cell tumors“ (SRBCT) durch verschiedene Kinaseinhibitoren, Histonmodulierende Agentien sowie durch small interfering RNAs (siRNA) untersucht werden. Es wurden die Ewing-Zelllinien A673, SB-KMS-KS1 und SK-N-MC wie auch die Neuroblastom-Zelllinie SIMA verwendet. Zudem wurden die Leukämiezelllinie cALL-2 und die mesenchymalen Stammzellen L87 und V54.2 getestet. Hierfür wurde die Wirkung von Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACis) und Mitogen-aktivierte Protein-Kinase- (MEK/MAPK) bzw. Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K)-Pathway-beeinflussenden Substanzen mittels Bromdesoxyuridin-Proliferations-Assays getestet. Der Effekt sowohl der gentechnischen als auch der chemischen Behandlung der Zellen auf verschiedene Gene, die bekanntermaßen für die Entstehung und Entwicklung des Ewing-Tumors eine Rolle spielen (Staege et al., 2004), wurde mittels quantitativer Messung in der Real-Time-PCR geprüft. Dies sollte zum einen den direkten Vergleich der Effizienz beider Methoden für die Therapie des ET ermöglichen und zum anderen die Kenntnisse über die EWS/FLI1-regulierte Gengruppe in den Tumorzellen erweitern.

# Kapitel 2

## Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Antibiotika

Tbl. 2: Verwendete Antibiotika

Antibiotika	Stammlösung	Gebrauchslösung
Ampicillin (Merck)	100 µg/ml in 1ml H <sub>2</sub> O dest. (steril filtriert)	100 µg/ml
G 418 (PAA)	50 mg/ml	0,5 mg/ml
Penicillin (Gibco)	10 000 U/ml	100 µg/ml
Puromycin (PAA)	50 mg/ml	1 µg/ml
Streptomycin (Gibco)	10 000 µg/ml	100 µg/ml

#### 2.1.2 Bakterien

Escherichia coli (Fusion-Blue™ Competent Cells, E. coli K-12 Stamm, Takara Bio Europe/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich)

#### 2.1.3 Chemikalien

- Ambion, Kassel:
  - DEPC- behandeltes Wasser
- Applied Biosystems, Darmstadt:
  - Power Sybr® Green PCR Master Mix
  - Quanti Tect® Primer Assays (ID2)
  - Taq Man® Gene Expression Assays (BGN, DKK2, EZH2, GAPDH, G1P2, GPR64, IFITM1, ITM2A, CHM1, PGF)
  - Taq Man® PCR Master Mix



## 2.1.4 Chemische Inhibitoren

### 2.1.4.1 Histon-modulierende Substanzen

Tbl. 3: Verwendete Histon-modulierende Substanzen

Primäres Target	Stammlösung
Chaetocin	1 mg/ml DMSO $\triangleq$ 1,43 mM (Sigma)
Trichostatin A	3 mg/ml DMSO $\triangleq$ 10 mM (Calbiochem)

### 2.1.4.2 MEK/MAPK-Pathway-beeinflussende Substanzen

Tbl. 4: Verwendete MEK/MAPK-Pathway-beeinflussende Substanzen

Primäres Target	Stammlösung
P215	6,5 mg/ml DMSO $\triangleq$ 24,3 mM (Sigma)
SB 202190	1 mg/ml DMSO $\triangleq$ 3 mM (Calbiochem)
SB 203580	1 mg/ml DMSO $\triangleq$ 2,65 mM (Calbiochem)
U0126	10 mg/ml DMSO $\triangleq$ 23,4 mM (Sigma)

### 2.1.4.3 PI3K-Pathway-beeinflussende Substanzen

Tbl. 5: Verwendete PI3K-Pathway-beeinflussende Substanzen

Primäres Target	Stammlösung
LY 294-002	5 mg/ml DMSO $\triangleq$ 16,3 mM (Calbiochem)
Rapamycin	1 mg in 547 $\mu$ l EtOH $\triangleq$ 2 mM (Sigma)
Wortmannin	5 mg/ml DMSO $\triangleq$ 11,7 mM (Sigma)

### 2.1.5 Geräte

- Analysenwaage (Kern EW)
- Bakterenschüttler (sartorius certomat<sup>®</sup> BS-T)
- Brutschrank Hera cell 150 (Heraeus)
- Dampfsterilisator (Systec V-95)
- ELISA-Reader (Dynex MRX Technologies)
- Gelelektrophoresekammer (Peqlab)
- Gelelektrophorese-Spannungsquelle Power Pac 300 (BioRad)
- Heizblock Thermomixer Comfort (Eppendorf)
- Kühlschranks (Siemens)
- Kolbenhubpipette Pipetman (Gibson)
- Mikrowelle (Privileg)
- Multifuge 3S-R Thermo Scientific (Heraeus)
- Optech Mikroskop (Optical Technology)
- PCR-Thermocycler iCycler (BioRad)
- Real time PCR-System 7300 (Applied Biosystems)
- Schwenktisch Polymax 2040 (Heidolph Instruments)
- -80° C Schrank Hera freeze (Heraeus)
- Standzentrifuge RC6 (Sorvall)
- Sterilbank Hera safe (Heraeus)
- Stickstofftank tec-lab K series cryostorage system
- Tisch-Zentrifuge 541 R (Eppendorf)
- Uvikon-Spectrophotometer 922 (Bio-Tek Kontron)
- Vortex-Rüttler, Janke & Kunkel IKA<sup>®</sup> Labortechnik VF 2

### 2.1.6 Kit-Systeme

- Cell Proliferation ELISA, BrdU (colometric) (Roche)
- Jetstar Mini/ Maxi-Prep-Kit (Genomed)
- Nucleo Spin<sup>®</sup> Plasmid Kit (Machery-Nagel)
- RNAi-Ready pSIREN-RetroQ (Clontech)
- RNeasy Mini Kit (Qiagen)

### 2.1.7 Medien

- DMEM-Medium (Gibco)
- LB-Medium:
 

Bacterial Peptone (Merck)	10 g
Hefe-Extrakt (Oxoid)	5 g
NaCl (Merck)	10 g

 mit Aqua dest. auf 1 L auffüllen, pH mit NaOH (Merck) auf pH 7,0 einstellen, autoklavieren
- LB-Agarplatten: 2% Agar mit LB-Medium vermischen, autoklavieren und ab 50° C Ampicillin (1 µl/ml) hinzugeben
- RPMI-1640-Medium (Gibco)

### 2.1.8 Puffer

- 2x Laemmli-Puffer:
 

- Tris-HCl (pH 6,8):	0,125 M
- Glycerol:	20%
- SDS:	4%
- Bromphenol Blau:	0,002%
- Phosphat-buffered-saline (DPBS):
 

- 10x (Stammlösung) (Gibco)	
- 1x (Gebrauchslösung):	100ml 10x-PBS mit H <sub>2</sub> O dest. auf 1L auffüllen
- 5x Transferpuffer:
 

- Glycin:	192 mM
- Tris (pH 8,3):	25 mM
- Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE):
 

- 50x (Stammlösung)	
- Tris (Merck):	242 g
- Eisessig (Merck):	57,1 ml
- 0,5 M EDTA (Sigma):	100 ml, pH 8,0 mit H <sub>2</sub> O bidest. auf 1L auffüllen
- 1x (Gebrauchslösung):	50x TAE-Puffer 1:50 mit H <sub>2</sub> O bidest. verdünnen
- 1x Tris buffered saline (TBS):
 

- NaCl:	150 mM
- Tris-HCl (pH 8,0):	10 mM
- 1x TBS mit Tween (TBST):
 

- Tween 20:	0,05%
-------------	-------
- 5x Running Buffer:
 

- Tris-HCl:	0,125 M
- Glycin:	0,76 M
- SDS:	0,5%

### 2.1.9 Vektoren

- RNAi-Ready pSIREN-RetroQ 6,4 kb (Takara Bio Europe/Clontech)
- psilencer™ 5.1-U6 Retro 6486 bp (Takara Bio Europe/Clontech)
- pMSCV Neo (Takara Bio Europe/Clontech)

### 2.1.10 Verbrauchsmaterial

- Einmalinjektionskanülen BD Microlance™ 20G steril 0,9 mm (Becton Dickinson)
- Einmalspritzen Omnifix (Braun)
- Frischhaltefolie
- Glas-Pipettenspitzen (25 ml, 10 ml und 5 ml) (Falcon)
- Micro-Amp 96-well-Platten PCR (Ambion)
- Micro-Amp Optical Adhesive Film (Ambion)
- Pipettenspitzen, gestopft, ART: Aerosol resistant tips® (Molecular Bio Products)
- 6-well-Platten (Falcon Becton Dickinson)
- 96-well-Platten: rund 96F Zellkultur Testplatte TPP, flach 96U Zellkultur Testplatte TPP
- Zellkulturflaschen mit Filter (25 m<sup>2</sup>, 75 m<sup>2</sup>) (Greiner-bio-one)

### 2.1.11 Zellen

Für die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Zelllinien der Gruppe „small round blue cell tumors“, zu denen u.a. die Familie der Ewing-Tumore (EFT) und das Neuroblastom zu zählen sind, mit der pädiatrischen B-Zell-Vorläufer-Leukämie-Zelllinie cALL-2 und mesenchymalen Stammzellen (MSC) verglichen (Tbl. 6).

Tbl. 6: Verwendete Zellen

Ewing-Tumor	Neuroblastom	Prä-B-ALL	MSC
A673	SIMA	cALL-2	L87
SB-KMS-KS1			V54.2
SK-N-MC			

---

Die Ewing- (A673, SK-N-MC), Neuroblastom- (SIMA) und Leukämiezellen (cALL-2) stammten von der Deutschen Gesellschaft für Mikroorganismen und Zellkultur (DSMZ; Braunschweig). Die SB-KMS-KS1-Zelllinie wurde in unserem Labor aus Gewebe (inguinale Metastase) einer 17jährigen Ewing-Patientin etabliert, die an unserer klinischen Studie teilgenommen hatte. Hierbei handelt es sich um eine Zelllinie mit Typ I EWS/FLI1-Translokation. Die mesenchymalen Stammzellen L87 und V54.2 wurden freundlicherweise von Herrn Peter Nelson vom Institut für Immunologie der Ludwig-Maximilians-Universität München zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich im Falle von L87 um Knochen-marks-Stammzellen, sowie bei V54.2 um pluripotente Stammzellen, die aus peripherem Blut gewonnen wurden (Thalmeier et al., 1994/1996; Conrad et al., 2002). Die Verpackungszelllinie pT67 stammte aus dem RNAi-Ready pSIREN-RetroQ-Kit von Takara Bio Europe/Clontech.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Die verwendeten Ewing-, Neuroblastom- und mesenchymalen Stammzellen (MSC) wurden in RPMI-1640-Medium mit 10% FCS, 1% 2mM L-Glutamin, 1% Penicillin- Streptomycin-Lösung (P/S) bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Für die suspensorischen cALL-2-Leukämiezellen wurde 20% FCS mit 1% L-Glutamin und 1% P/S verwendet. Die Verpackungszelllinie pT67, zur Gewinnung stabiler Infektanten, wurde in DMEM-Medium mit 10% FCS und 1% P/S bei 37° C und 8% CO<sub>2</sub> kultiviert.

### 2.2.2 Stabile Infektanten

#### *Herstellung rekombinanter shRNA Vektoren*

Zur Gewinnung der stabilen siRNA-Transfektanten mittels retroviralem Gentransfer wurde der RNAi-Ready pSIREN- RetroQ-Transfektionskit verwendet. Hierbei handelt es sich um einen sich selbst inaktivierenden retroviralen Vektor, der zur Selektion stabiler Transfektanten ein Puromycin- Resistenzgen enthält, über das die shRNAs schließlich selektioniert werden. Dieser Vektor exprimiert unter der Kontrolle des humanen U6 Promotors eine „small“ bzw. „short hairpin RNA“ (shRNA), die dazu dient, die Expression eines Gens gezielt herunter zu regulieren. Um dies auch in Tochterzellen gewährleisten zu können, benötigt die shRNA den humanen U6-Promotor (pSilencer™ 5.1-U6 Retro; RNA-Polymerase III abhängig, Abb. 2). In der Zelle wird die shRNA schließlich durch Dicer zur siRNA prozessiert, welche sich nun an den „RNA-induced silencing complex“ (RISC) binden kann. Dieser Komplex schneidet die zur siRNA komplementäre mRNA und unterbindet folglich die weitere Genexpression.

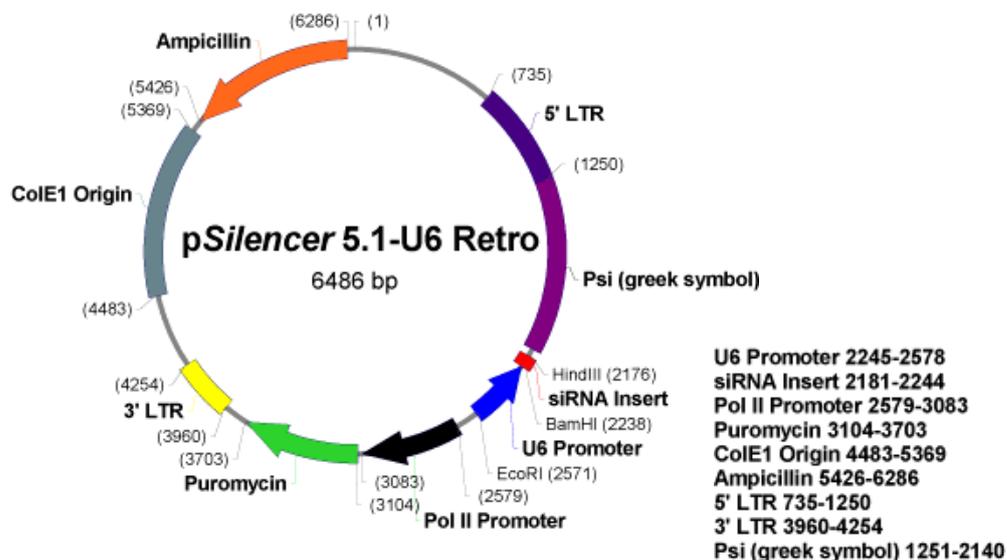


Abb. 2: Vektorkarte pSilencer 5.1-U6 Promotor (Clontech)

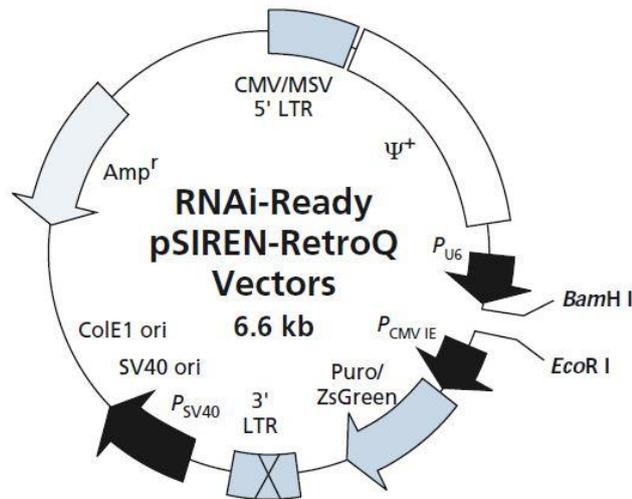


Abb. 3: Vektorkarte pSIREN RetroQ (Clontech)

Zunächst wurden geeignete sense und antisense shRNA-Oligonukleotide für jedes zu untersuchende Gen konstruiert und synthetisiert (Clontech). Nach dem Annealing der komplementären shRNA-Oligonukleotide wurden diese mittels der im Kit beigefügten T4 DNA-Ligase (400 U/μl) über die 5' *BamH* I bzw. die 3' *EcoR* I Restriktionsstellen des DNA-Stranges in den RNAi-Ready pSIREN-Vektor (Abb. 3) ligiert. Das Ligationsprodukt wurde anschließend in Fusion-Blue Competent Cells transformiert. Danach wurden die Bakterien auf LB-Ampicillin-Platten (50 μg/ml Ampicillin) ausgebracht und über Nacht bei 37° C herangezogen. Über ihre Ampicillin-Resistenz konnten nun positive Klone selektioniert werden, welche den pSIREN-Vektor enthielten. Zur Amplifikation rekombinanter Klone wurden jeweils 24 Kolonien von jedem shRNA/Vektor-Konstrukt gepickt und in 4 ml LB-Medium und Ampicillin (50 μg/ml) über Nacht bei 37° C inkubiert.

Am nächsten Morgen konnte von den Ansätzen das Plasmid isoliert (Nucleo Spin<sup>®</sup> Plasmid Kit) und deren Kontrollverdau (*Xba* I/*Bgl* II-Restriktionsenzyme) durchgeführt werden. Bei der anschließenden Gel-Elektrophorese mit 1 kb Plus DNA-Ladder als Marker traten im Fall des gelungenen Einbaus des shRNA-Oligonukleotids Banden auf Höhe von 410 bp auf. Die auf diese Weise als positiv identifizierten Plasmide wurden anschließend sequenziert. Von den über-Nacht-Kolonien wurden zusätzlich durch Zentrifugation und Resuspension der LB-Kulturen in 15% Glycerin Stocks zur Aufbewahrung angefertigt und bei -80° C gelagert.

#### *Transfektion in Verpackungszellen*

Klone, bei denen mittels Sequenzierung das gewünschte Insert nachgewiesen werden konnte, wurden aus den Glycerolstocks in 400 ml LB-Medium mit Ampicillin (50 μg/ml) vermehrt. Nach steriler Plasmidisolierung (Jetstar Maxi-Prep-Kit) und Ethanol-fällung wurden 20 μg DNA mittels Elektroporation mit einem Gene Pulser X cell (BioRad) nach Angaben des Herstellers in 3x10<sup>6</sup> /ml pT67-Verpackungszellen transfiziert und ein Virusüberstand in DMEM-Medium mit 1% FCS und 1%

P/S über 48 Stunden Inkubation bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> gewonnen. Die Verpackungszellen wurden zuvor in DMEM-Medium mit 10% FCS und 1% P/S bei 37° C und 8% CO<sub>2</sub> kultiviert. Zur Elektroporation wurde DMEM-Medium ohne FCS und P/S verwendet. Der Virusüberstand wurde durch Zentrifugation und anschließender Filtration (mit 0,45 µm Durchmesser) gewonnen, aliquotiert und bei -80° C aufbewahrt.

### Infektion

Für die anschließende Titration des Virusüberstandes wurden  $1 \times 10^5$  Target-Zellen (Ewing-Zelllinie A673) in 1ml RPMI-1640-Medium auf 6-well-Platten ausgesät und für 4 Stunden im Brutschrank bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> ruhen gelassen. Nach dieser Zeit wurde das bereits verbrauchte Medium ersetzt. In der 6-well-Platte wurde nun eine Verdünnungsreihe (1:2, 1:10, 1:50, 1:250 und 1:1250) vom Virusüberstand und einer reinen Medium-Kontrolle hergestellt. Zur Verbesserung der Gentransfer-effizienz wurde Polybrene (Hexadimethrinbromid) auf 1 ml Virusüberstand in der Endkonzentration 8 g/ml für 48 Stunden auf die Zellen gebracht und bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Nach 2 Tagen wurde das verbrauchte Medium durch RPMI-1640-Medium (4 ml/well) ersetzt. Mittels der im Vektor enthaltenen Puromycin-Resistenz konnten die stabilen Transfektanten (A673-siRNA, Tbl. 31) nach 48 Stunden Inkubation selektioniert werden (2 µg/ml Puromycin 8 µl/well) bis die Kontrolle ohne Puromycin-Resistenz (A673-Zellen mit RPMI-Medium) abgetötet war. Die weitere Kultivierung der Infektanten erfolgte mittels RPMI-1640-Medium und 10% FCS mit 1% P/S bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub>. Für die Infektion der mesenchymalen Stammzellen mit EWS/FLI1 cDNA (Klonierung s. Kapitel 2.2.5) wurde nach Herstellerangaben vorgegangen, als Vektor diente hierbei jedoch pMSCVNeo (Takara Bio Europe/Clontech) (Abb. 4), der mit seinem LTR (5'-long terminal repeat) besonders für die Expression in Stammzellen geeignet ist. Die anschließende Selektion erfolgte über die Neomycin (G418)-Resistenz (0,5mg/ml) über 48 Stunden bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> in DMEM-Medium mit 10% FCS und einer 1%igen P/S-Lösung. Für die weitere Kultivierung des Expressionskonstruktes wurde wie für die siRNA-Infektanten der Zelllinie A673 vorgegangen.

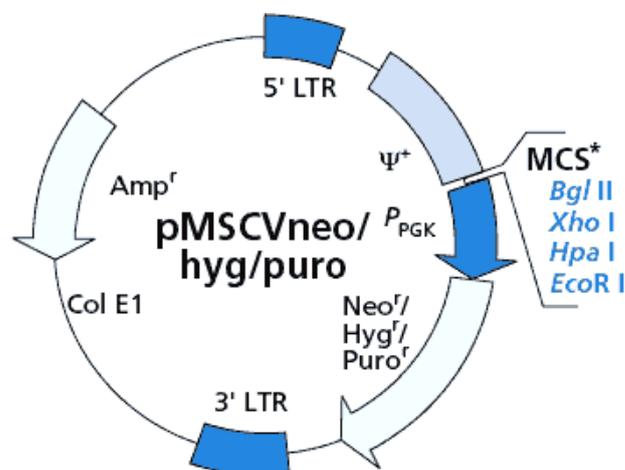


Abb. 4: Vektorkarte pMSCVNeo (Takara Bio Europe/Clontech)

### 2.2.3 Proliferations-Assays

Um geeignete Konzentrationen der eingesetzten chemischen Substanzen zu erhalten, bei denen potentiell ein antiproliferativer Effekt zu sehen war, ohne die Zellen letal zu schädigen, wurde der Cell Proliferation ELISA (Roche) zur quantitativen Erfassung der Zell-Proliferation eingesetzt. Hierfür wurde 5'-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) auf die Zellen gegeben, das während der Zell-Synthese in die DNA eingebaut und auch an Tochterzellen weitergegeben wird. Der Einbau von BrdU in die DNA dient dabei als Maß für die Zell-Proliferation und kann nach enzymatisch katalysiertem Farbumschlag photometrisch bei 450 nm gemessen werden.

Für adhärente Zellen (A673, SB-KMS-KS1, SIMA und SK-N-MC) wurden 96-well-Platten mit flachem Boden benutzt, suspensorische Zellen (cALL-2) hingegen in runden 96-well-Platten bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die zu testenden Zellen wurden hierfür als Triplets in 100 µl/well RPMI-Medium aufgenommen und für 2 Stunden im Brutschrank bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend wurden 100 µl/well der Verdünnungsreihe der entsprechenden chemischen Substanzen hinzugegeben. Zum Schutz vor Verdampfung bei geringen Volumina wurden die 96 well-Platten in Frischhaltefolie eingewickelt für weitere 24 Stunden im Brutschrank unter den oben genannten Bedingungen inkubiert. Als nächster Schritt wurden 20 µl/well BrdU in der Verdünnung 1:100 mit Medium versetzt (Endkonzentration 10 µM BrdU) und für weitere 12 Stunden inkubiert.

Nach der Fixierung der Zellen und der DNA-Denaturierung, laut Herstellerangaben, erfolgte der immunologische Nachweis mit Peroxidase-konjugierten, BrdU spezifischen Antikörpern. Tetramethylbenzidin (TMB) diente als Substrat für die Peroxidase-katalysierte Farbreaktion, die durch Zugabe von 25 µl 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pro well nach 7 Minuten gestoppt wurde. Im MRX microplate reader (Dynex) wurde die Extinktion bei 450 nm gemessen. Von jedem Messpunkt wurden Triplikate gemessen. Als Kontrollen dienten jeweils die vom Hersteller angegebenen Lösungsmittelkontrollen sowie un-behandelte Ewing-Zellen. Für die Berechnung der in den Tabellen 11-20 angegebenen Proliferations-änderungen in Prozent wurde bei stetigem Abfall des Zellwachstums der getesteten Zelllinien die Differenz der Messwerte bei höchster und niedrigster Konzentration ermittelt. Zeigten die Zellen auf die Inkubation mit den chemischen Substanzen einen initialen Proliferationsanstieg, so wurde die Differenz zwischen höchstem und niedrigstem Extinktionswert herangezogen.

#### *Histon- modulierende Substanzen*

- Trichostatin A (TSA)

Die Hydroxamidsäure TSA ist ein Bakterien-Metabolit (*Streptomyces hygroscopicus*) und wurde ursprünglich als antifungales Antibiotikum eingesetzt (Tsuji et al., 1976). Heute findet es als spezifischer, reversibler Inhibitor der Klasse I- bzw. II- Histondeacetylasen der Säugetierzelle Verwendung. Es führt zu vermehrter Acetylierung der Histone, zu einer Dekondensation der DNA und somit zur Aktivierung der Transkription (Allfrey, 1976).

- **Chaetocin**  
Chaetocin ist ein natürliches Produkt eines Pilzes (*Chaetomium*) mit antimikrobieller und zytostatischer Wirkung durch die Inhibition der Lysin-spezifischen Histon-Methyltransferase SU(VAR)3-9 ( $IC_{50} = 0.6 \mu\text{M}$ ) bei *Drosophila melanogaster* und mit  $IC_{50} = 0.8 \mu\text{M}$  ortholog zum *Homo sapiens*. Es zeigt strukturelle Ähnlichkeit zum acetylierten Lysinrest der Histone und eignet sich zur Untersuchung der heterochromatingestützten Regression von Genen.

#### *PI3K-Pathway-beeinflussende Substanzen*

Der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) Pathway beeinflusst den Zellzyklus und die Tumorpheriferation; wird er gehemmt, führt dies zur Apoptose der Zellen.

- **LY 294-002**  
LY 294-002 ist ein synthetisch hergestellter Inhibitor der Phosphatidylinositol-3-Kinase, welcher mit einer inhibitorischen Konzentration ( $IC_{50}$ ) von  $1,4 \mu\text{M}$  weniger inhibitorisch wirkt als Wortmannin (Vanhaesebroeck et al., 2001).
- **Wortmannin**  
Wortmannin ist ein Furanosteroid-Metabolit des Pilzes *Penicillium funiculosum*, *Talaromyces wortmannii* (Vanhaesebroeck et al., 2001). Es ist ein spezifischer kovalenter Inhibitor der Phosphatidylinositol-3-Kinasen I, II und III und weiterer PI3-Kinase-abhängiger Enzyme wie mTOR und MAPK in hohen Konzentrationen (Ferby et al., 1996). Wegen seiner inhibitorischen Konzentration ( $IC_{50}$ ) von  $5 \text{ nM}$  ist Wortmannin ein potenterer PI3K-Inhibitor als LY 294-002.
- **Rapamycin**  
Rapamycin ist ein Makrolidantibiotikum, welches aus *Streptomyces hygroscopicus* gewonnen wird. Diese findet unter der Bezeichnung Sirolimus Verwendung in der immunsuppressiven Therapie z.B. nach Nierentransplantation. Rapamycin bildet mit dem FK506-bindenden Protein zusammen einen Komplex, der das Protein mTOR (mammalian Target of Rapamycin) inhibiert. Hierdurch unterbleiben die anschließende Proteinsynthese der S6 Kinase (p70S6) und die Aktivierung des eIF4E/B (eukaryotic initiation factor 4E/B), was letztlich die Zellproliferation hemmt (Abb. 1).

#### *MEK/MAPK-Pathway-beeinflussende Substanzen*

- U0126: Hemmt spezifisch das Enzym  $MEK_{1/2}$ .
- SB 202190: Spezifischer Inhibitor der p38 Mitogen-aktivierten Protein-Kinase (MAPK).
- SB 203580: Hemmt spezifisch die MAPK-aktivierte Protein-Kinase 2 (MAPKAP-Kinase 2).
- P215: Inhibiert spezifisch die Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kinase (MAPKK).

Wie der Abb. 1 zu entnehmen, können diese Inhibitoren, neben ihrer erwähnten spezifischen Wirkung, wie fast alle Kinaseinhibitoren konzentrationsabhängig auch unspezifisch an weitere Targets binden (Vanhaesebroeck et al., 2001).

### 2.2.4 Inkubationsversuche für die Messung der Genexpression

Die Beeinflussung der Genregulation durch unterschiedliche Kinaseinhibitoren (Tbl. 12) in den verschiedenen Ewing-Zelllinien wurde über eine Quantifizierung entsprechender Gene mittels quantitativer Real-Time-PCR (qRLT-PCR) ermittelt. Hierfür wurden für die Zelllinien A673, SB-KMS-KS1 und SK-N-MC jeweils  $5 \times 10^5$  Zellen/well in 1ml RPMI-Medium auf 6-well-Platten ausgebracht und für 2 Stunden im Brutschrank bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden sie mit den in Tabelle 21 angegebenen Konzentrationen an chemischen Substanzen für 24 Stunden unter den oben genannten Bedingungen im Brutschrank behandelt. Die Konzentrationen der Substanzen für die Genexpressionsversuche ergaben sich aus den zuvor durchgeführten Proliferations-Assays (Abb. 5-13). Für die RNA-Präparation wurden Konzentrationen der Kinaseinhibitoren gewählt, bei denen die Proliferation der getesteten Zellen eingeschränkt, diese jedoch noch nicht letal geschädigt waren (Tbl. 21). Zur Ermittlung der Expressionsänderung der einzelnen Gene wurden die Messwerte der jeweiligen Lösungsmittelkontrollen der einzelnen Zelllinien dem Wert 1 zugeordnet.

### 2.2.5 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Zur RNA-Isolierung wurde der RNeasy Mini Kit von Qiagen benutzt. Dazu wurden  $5 \times 10^6$  Zellen der Ewing-Zelllinien A673, SB-KMS-KS1 oder SK-N-MC in 350 µl RLT-Puffer mit 10 µl Mercaptoethanol/ml RLT-Puffer gegeben und lysiert. Die DNA im Lysat wurde durch mehrmalige Passage durch sterile 20 Gauge Einmalkanülen (0,9 mm) fragmentiert. Die folgende Aufreinigung der RNA erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Zur Konzentrationsbestimmung wurde 1 µl der erhaltenen RNA mit 99 µl DEPC-H<sub>2</sub>O verdünnt und bei 260 nM photometrisch gemessen. Aufgrund des erhaltenen Messwerts wurde 1 µg RNA für die cDNA-Synthese eingesetzt, hierzu wurde 1 µl oligo-dt Primer und die Super Script II Reverse-Transkriptase (1 µl/Probe) hinzugegeben und entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### *cDNA-Synthese*

- 1 µg RNA auf 11 µl DEPC-H<sub>2</sub>O  
→ 10 min. 70 °C
- pro Probe :
  - 4 µl first strand buffer (Invitrogen)
  - 2 µl 0,1 M DTT (Invitrogen)
  - 1 µl dNTP (Invitrogen)
  - 2 min. 42 °C
- 1 µl Super Script II (Invitrogen) pro Probe  
→ 50 min. 42 °C, 15 min. 70 °C, hold: 4 °C

Kontrolliert wurde der Erfolg der reversen Transkription mittels einer  $\beta$ -actin-spezifischen PCR (0,3  $\mu$ l Taq DNA-Polymerase mit 0,5  $\mu$ l cDNA in 50  $\mu$ l Gesamtvolumen) und anschließender Gelelektrophorese im 1%igen Agarosegel, versetzt mit 1  $\mu$ l Ethidiumbromid/50 ml Agarose bei 90 V für 1 Stunde. Die Größe der Banden wurde mit Hilfe eines Größenstandards (1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen) ermittelt. Sowohl die cDNA-Synthese als auch die  $\beta$ -actin-PCR wurden mit einem iCycler von BioRad durchgeführt.

### *$\beta$ -actin-PCR*

- pro Probe:
- 0,5  $\mu$ l cDNA
  - 5  $\mu$ l 10x PCR –MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen)
  - 1,5  $\mu$ l 50 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen)
  - 1  $\mu$ l dNTP
  - 0,5  $\mu$ l 10  $\mu$ M sense Primer (Invitrogen)  
Sense Primer: 5'-CAG TCT TCC AGC CTT CTT TCC-3'
  - 0,5  $\mu$ l 10  $\mu$ M antisense Primer (Invitrogen)  
Antisense Primer: 5'-CGG ACT CGT CAT ACT CCT GCT T-3'
  - 0,3  $\mu$ l Taq Polymerase (Invitrogen)
  - 40,7  $\mu$ l H<sub>2</sub>O dest.

Tbl. 7:  $\beta$ -actin-PCR-Programm

Wiederholungen	Temperatur	Zeit (min.)
1	94° C	2:00
	57° C; 72° C	1:00
30	94° C; 57° C	0:30
	72° C	1:00
1	94° C; 60°C	0:30

### *Agarose-Gelelektrophorese (Peqlab)*

1% Agarose Gel: 2 g Agarose auf 200 ml 1x TAE-Puffer wurden in der Mikrowelle bei 600 Watt für 4 Minuten gekocht; nach dem Abkühlen auf 60° C wurden 4  $\mu$ l Ethidiumbromid (10 mg/ml) hinzugefügt und das Gel gegossen. Jede Geltasche wurde mit 22  $\mu$ l Probe ( $\beta$ -actin-Produkt mit 5  $\mu$ l 6x Gel-Ladepuffer) beschickt und bei 90 Volt für eine Stunde in der Gelelektrophoresekammer inkubiert.

### *Gelelektrophorese*

- pro Probe:
- 5  $\mu$ l 6x Gel-Ladepuffer (6x loading dye solution)
- Marker:
- 19  $\mu$ l H<sub>2</sub>O dest.
  - 2  $\mu$ l 6x Gel-Ladepuffer (6x loading dye solution)
  - 1  $\mu$ l  $\pm$  1  $\mu$ g kb plus DNA Ladder

### 2.2.6 Quantitative Real-Time-PCR (qRLT-PCR)

Für die quantitative Analyse der Genregulation wurden jeweils 0,5 µl cDNA als Template in der qRLT-PCR auf ein Gesamtvolumen von 25 µl eingesetzt. Je nach zu untersuchendem Gen wurde entweder mit Taq Man<sup>®</sup> Master Mix oder mit Power Sybr<sup>®</sup> Green (ID2) Master Mix (Tbl. 8) für 40 Zyklen laut qRLT-PCR-Programm (Tbl. 9) amplifiziert.

Tbl. 8: Gen-Assays

Taq Man <sup>®</sup> Gene Expression Assays	
BGN	(Hs 00959143_m1)
CHM1	(Hs 00170877_m1)
DKK2	(Hs 00205294_m1)
EZH2	(Hs 00544830_m1)
GAPDH	(Hs 99999905_m1)
GPR64	(Hs 00971391_g1)
G1P2	(Hs 00192713_m1)
IFITM1	(Hs 01652522_g1)
ITM2A	(Hs 01011360_g1)
LIPI	(Hs 01017703_m1)
PGF	(Hs 00182176)
Sonden	
EWSR1	(Hs 01580530_gH)
FLI1	(Hs 00231107_m1)
Quanti Tect <sup>®</sup> Primer Assays	
ID2	(Hs_ID2_1_SG)

Tbl. 9: qRLT-PCR-Programm

Wiederholungen	Temperatur	Zeit (min.)
1	50.0° C	00:01
1	95.0° C	10:00
40	95.0° C	00:15

### *siRNA-PCR*

Als Referenz der siRNA-PCR wurde die jeweilige siRNA-Negativkontrolle mitbestimmt. Um sicher zu stellen, dass die beobachtete Genregulation bei den transfizierten Zellen nicht durch zelluläre Schutzmechanismen hervorgerufen wurde, verglich ich die Interferon  $\alpha$ -Antwort mittels der G1P2- und IF1TM1-Amplifikate mit denen der siRNA-transfizierten Zellen.

### *PCR-Assays*

Für die PCR-Assays der chemisch behandelten Zellen dienten unbehandelte Ewing-Zellen als Kontrolle. Zur nachfolgenden Bestimmung der Genexpression wurde GAPDH (Hs99999905\_m1) als Referenzgen sowohl bei den siRNA-PCRs als auch bei den PCR-Assays der chemisch behandelten Zellen herangezogen. Unterschiede zwischen den Mittelwerten der einzelnen Gruppen wurden mittels ungepaartem t-Test auf Signifikanz getestet.

## **2.2.7 Western-Blot mit diskontinuierlicher SDS-Poly-Acrylamid-Gelelektrophorese (Sodium-Dodecylsulfat-Page)**

### *SDS-Page*

Zur Untersuchung der spezifischen Proteinexpression diente der Western-Blot, bei dem die Polypeptide zunächst mittels Elektrophorese anhand ihres Molekulargewichts in der Matrix des Polyacrylamidgels (SDS-Page) aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran überführt wurden. Zur Herstellung des Zelllysats wurden jeweils  $10^5$  Zellen in PBS-Puffer gewaschen und anschließend in 200  $\mu$ l Laemmli-Puffer (1 ml 2x Laemmli-Puffer mit 30  $\mu$ l  $\beta$ -ME) aufgenommen und für 10 Minuten bei 70° C inkubiert. Das im Laemmli-Puffer enthaltene negativ geladene Dodecylsulfat (SDS) bindet dabei an die Proteine und hält diese im denaturierten Zustand. Zusätzlich werden die Proteinmoleküle unabhängig von ihrem isoelektrischen Punkt mit einer einheitlichen negativen Ladung versehen. Nach dem Scheren der DNA mit 23 Gauge- und 26 Gauge-Injektionskanülen wurde das Gemisch bei 15 000 Umdrehungen/Minute (rpm) für 5 Minuten zentrifugiert. Der so gewonnene Überstand konnte anschließend aliquotiert und bei -20° C gelagert werden.

Zur optimierten Trennung der Proteine wurde zunächst ein Trenngel (10% Acrylamid/Bisacrylamid; pH 8,8) gegossen, das mit einem Sammelgel (4,5% Acrylamid/Bisacrylamid; pH 6,8) überschichtet wurde. Dadurch konnte eine Fokussierung der Banden an der Grenze von Sammel- und Trenngel erreicht werden (Tbl. 10). In die Taschen des Gels wurden 10  $\mu$ l der vorbereiteten Proben und in eine Spur jedes Gels ein Proteinstandard (Bench Mark<sup>®</sup> Pre-Stained Protein Ladder) geladen. Nach Anlegen einer Spannung von 90 Volt senkrecht zum Gel für 2 Stunden wanderten die durch das SDS negativ geladenen Proteine in Richtung der Anode.

Tbl. 10: SDS-Page

SDS-Page	10% Trenngel (1,5 M Tris/ pH 8,8)	4,5% Sammelgel (0,5 M Tris/ pH 6,8)
40% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	4 ml	787 µl
4 x Puffer (1l: 3 g Tris; 14 g Glycerine)	4 ml	1,75 ml
H <sub>2</sub> O	8 ml	4,46 ml
10 % Ammoniumpersulfat (APS)	80 µl	50 µl
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	8 µl	4,2 µl

*Elektroblot*

Nach dieser Zeit wurde ein Elektroblot zur Übertragung der Proteinbanden mittels halbtrockenen Elektrotransfers auf Nitrocellulose als Trägermembran durchgeführt. Um das SDS abzuspülen, wurde das Gel in 100 ml Transferpuffer für 30 Minuten gewaschen. Anschließend wurden jeweils drei, zuvor für 10 Minuten in Transferpuffer getränkte, Whatman-Papiere blasenfrei auf beide Seiten des Gels mit einer Nitrocellulose-Membran auf die Anode geschichtet. Für den 50 minütigen Elektroblot wurde an das so entstandene „Sandwich“ in der Blotting-Kammer eine Stromstärke von 90 mA angelegt. Durch die negative Ladung der Proteine wanderten diese in Richtung Anode auf die Nitrocellulose-Membran, auf der sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften blieben. Das zuvor bei der Proteinauftrennung entstandene Bandenmuster blieb dabei erhalten. Im Anschluss an den Blot wurden die Nitrocellulose-Membranen zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindungen in 40 ml einer 5%-igen Magermilchpulver-1 x TBS-Lösung gegeben und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

*Western-Blot und ECL-Detektion*

Die Inkubation mit den primären, polyklonalen Antikörpern (Ak) aus Kaninchen gegen das C-terminale Ende von FLI1 sowie gegen das Kontrollprotein Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) (Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany)) erfolgte für 2 Stunden bei Raumtemperatur (beide Ak 1:500 in 5%igem Magermilchpulver in 1 x TBS) auf dem Schwenktisch. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 min. in TBST-Puffer und zuletzt in TBS-Puffer für 15 Minuten wurde ein sekundärer polyklonaler Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper (IgG-HRP; engl.: horseradish peroxidase) 1:1000 in 5%igem Magermilchpulver in 1 x TBS verdünnt hinzugegeben und die Blottingmembranen für 1 Stunde unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde erneut zweimal mit TBST und einmal mit TBS gewaschen. Für die ECL (enhanced chemiluminescent)-Detektion der Proteinbanden wurden die Membranen für 1 Minute mit dem ECL-Reagenz bedeckt, abgetupft und in Frischhaltefolie gewickelt. In einer Dunkelkammer wurden die Membranen mit den gebundenen Proteinen nach oben in eine Röntgenfilmkassette gelegt. Darauf wurde ein Autoradiografiefilm platziert, die Kassette geschlossen, der Film für 15 Sekunden belichtet, wieder entnommen und entwickelt.



# Kapitel 3

## Ergebnisse

### 3.1 Proliferations-Assays

Verschiedene Zelllinien der heterogenen Gruppe „small round blue cell tumors“ wurden auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Histon-modulierenden Substanzen wie Trichostatin A (TSA) und Chaetocin, mittels BrdU-Assay getestet. Hierfür wurden Ewing- (A673, SB-KMS-KS1, SK-N-MC) und Neuroblastomzellen (SIMA) mit der pädiatrischen B-Zell-Vorläufer-Leukämiezelllinie cALL-2 verglichen. Die Änderung des BrdU-Einbaus als Maß für die DNA-Synthese bzw. Zellproliferation, gemessen bei einer OD von 495 nm, ermöglicht hierbei Rückschlüsse auf die Stoffwechselaktivität und Lebensfähigkeit der mit den chemischen Substanzen behandelten Zellen.

#### 3.1.1 Histon-modulierende Substanzen

*Trichostatin A (HDACi)*

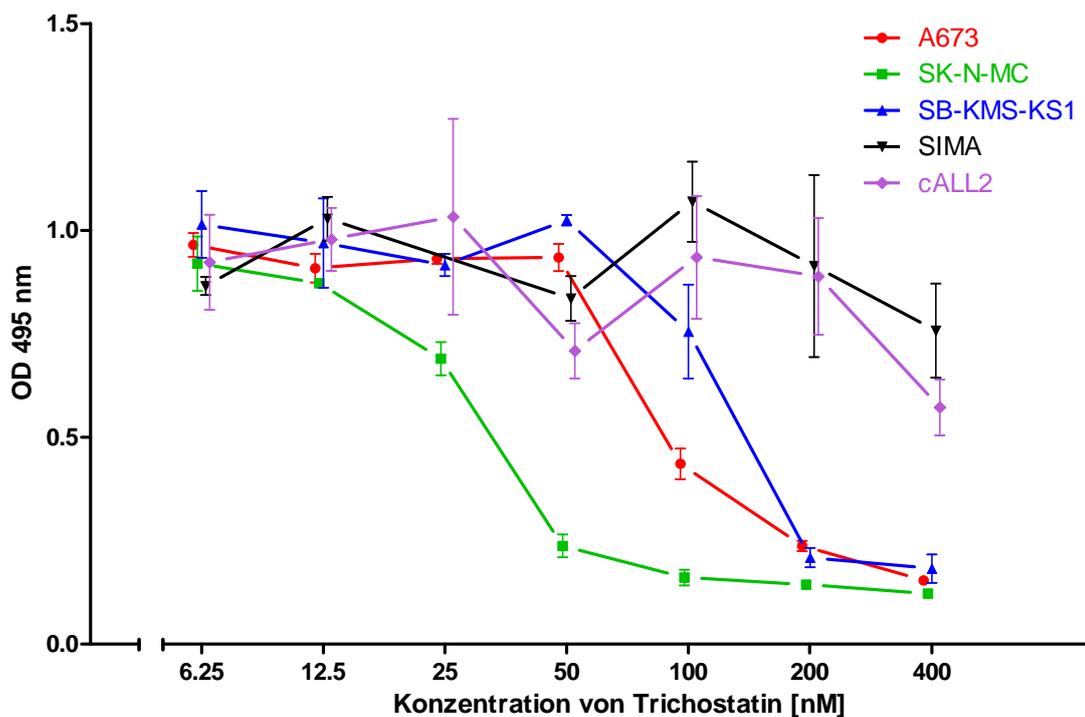


Abb. 5: Proliferationsassay mit Trichostatin A. A673, cALL-2, SIMA, SK-N-MC jeweils  $2 \times 10^4$  Zellen/well, SB-KMS-KS1  $1 \times 10^4$  Zellen/well. Kontrolle: 0,5% DMSO; x-Achse logarithmisch.

Tbl. 11: Proliferationsänderung [%] Trichostatin A

Zelllinien	Trichostatin A
A673 p11	- 81,1
SB-KMS-KS1 p32	- 83,2
SK-N-MC p13	- 79,8
cALL-2 p4	- 46,2
SIMA p7	- 27,05

+ := hochreguliert; - := supprimiert

Die Behandlung mit dem HDACi TSA erbrachte v.a. für die Ewing-Zelllinien einen ausgeprägten konzentrationsabhängigen Proliferationsrückgang (Tbl. 11), der für SK-N-MC schon bei der Ausgangskonzentration 6,25 nM messbar war und bei A673 und SB-KMS-KS1 erst bei der Konzentration 50 nM einsetzte (Abb. 5).

Die Zelllinie SB-KMS-KS1 zeigte mit einem Rückgang der Proliferation von ca. 83,2% (zw. 50 nM bis 400 nM) die deutlichste Beeinflussung, gefolgt von den Zelllinien A673 (zw. 50 nM und 400 nM) und SK-N-MC (ab 6,25 nM) (Abb. 5). Die getestete Leukämiezelllinie cALL-2 wie auch die Neuroblastomzelllinie SIMA konnten nur in vergleichsweise geringem Maße durch TSA in ihrer Proliferation verändert werden (Tbl. 11). Sie reagierten beide unter der Behandlung mit TSA mit einem leichten Rückgang ihrer Proliferation zw. 50 nM und 12,5 nM (SIMA) bzw. zw. 25 nM und 50 nM (cALL-2).

#### Chaetocin

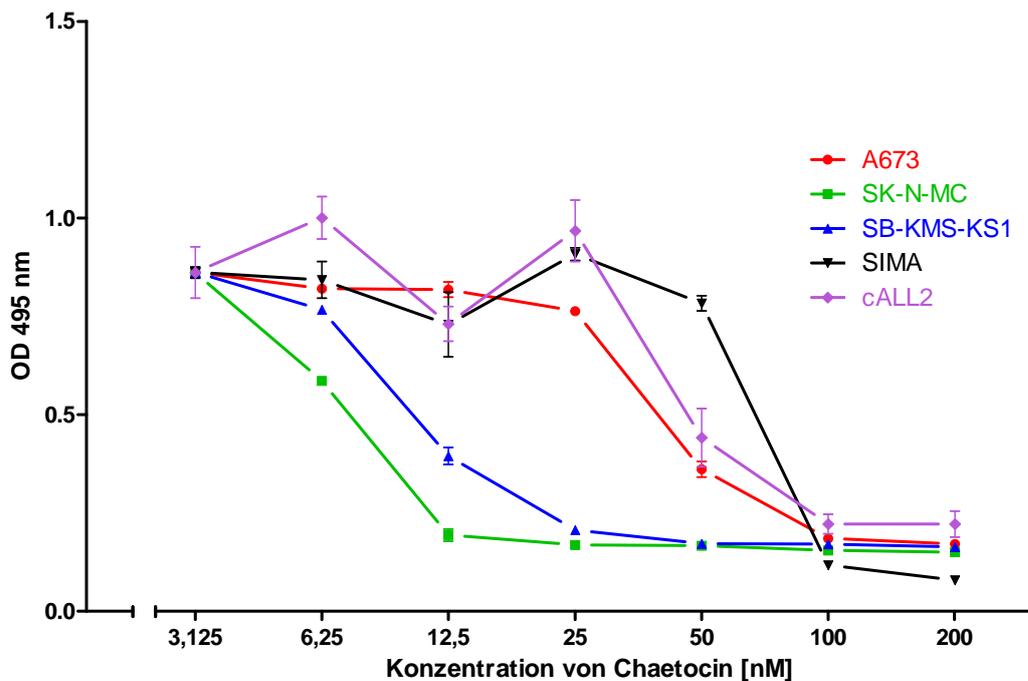


Abb. 6: Proliferations-Assay mit Chaetocin.

A673, SB-KMS-KS1, SIMA, SK-N-MC jeweils 1x10<sup>4</sup> Zellen/ well, cALL-2 1x10<sup>5</sup> Zellen/well;  
Kontrolle: 0,1% DMSO; x-Achse logarithmisch.

Tbl. 12: Proliferationsänderung [%] Chaetocin

Zelllinien	Chaetocin
A673 p15	- 15,41
SB-KMS-KS1 p24	- 19,38
SK-N-MC p7	- 21,89
cALL-2 p2	- 16,30
SIMA p16	- 22,15

+ := hochreguliert; - := supprimiert

Chaetocin hatte eine deutliche Wirkung sowohl auf die Ewing-Zellen als auch auf die beiden anderen Zelllinien (Tbl. 12). Allerdings war bereits bei der niedrigsten Chaetocinkonzentration (3,125 nM) eine Wirkung auf alle drei Ewing-Zelllinien zu erkennen, während SIMA und cALL-2 erst bei 25 nM Chaetocin eine verringerte Proliferation aufwiesen (Abb. 6). Am empfindlichsten reagierten die Ewing-Zelllinien SB-KMS-KS1 und SK-N-MC auf die Behandlung mit Chaetocin, gefolgt von A673.

Die Neuroblastomzelllinie SIMA zeigte mit einem Proliferationsrückgang von ca. 22% zwar die stärkste Beeinflussung jedoch erst ab der Konzentration von 25 nM (siehe Tbl. 12).

### 3.1.2 MEK/MAPK-Pathway-beeinflussende Substanzen

Für die Testung der übrigen chemischen Substanzen wurden die Ewing-Zelllinien A673, SB-KMS-KS1 und SK-N-MC in weiteren BrdU-Assays auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Inhibitoren des MEK/MAPK-Pathways wie auch des PI3K-Regulationsweges getestet und miteinander verglichen.

P215

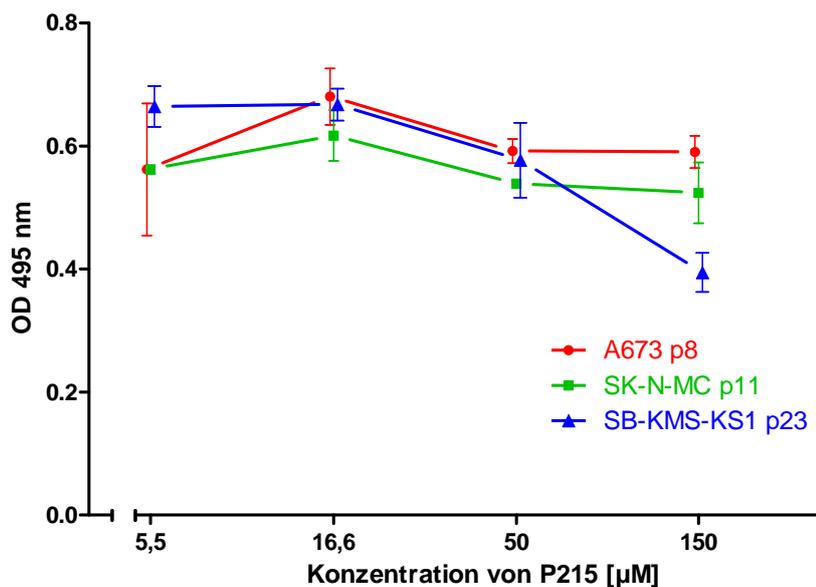


Abb. 7: Proliferationsassay mit P215.

A673, SK-N-MC jeweils 2x10<sup>4</sup> Zellen/well, SB-KMS-KS1 1x10<sup>4</sup> Zellen/well.

Kontrolle 0,5% DMSO; x-Achse logarithmisch.

Tbl. 13: Proliferationsänderung [%] P215

Zelllinien	P215
A673 p8	- 9,00
SB-KMS-KS1 p23	- 27,30
SK-N-MC p11	- 9,30

+ := hochreguliert; - := supprimiert

Unter dem Einfluss von P215 konnte die Proliferation der getesteten Ewing-Zelllinien nur in geringem Maße verändert werden (Tbl. 13). A673 und SK-N-MC zeigten fast keine Proliferationsveränderung von der niedrigsten zur höchsten Konzentration der Substanz, während das Wachstum der Zelllinie SB-KMS-KS1 ab 16,6  $\mu\text{M}$  abfiel (Abb. 7). Da bei der chemischen Substanz SB 20190 nur eine Konzentration (30  $\mu\text{M}$ ) getestet wurde, wurde zur übersichtlichen Darstellung der Zellproliferation ein Säulendiagramm gewählt.

#### SB 202190

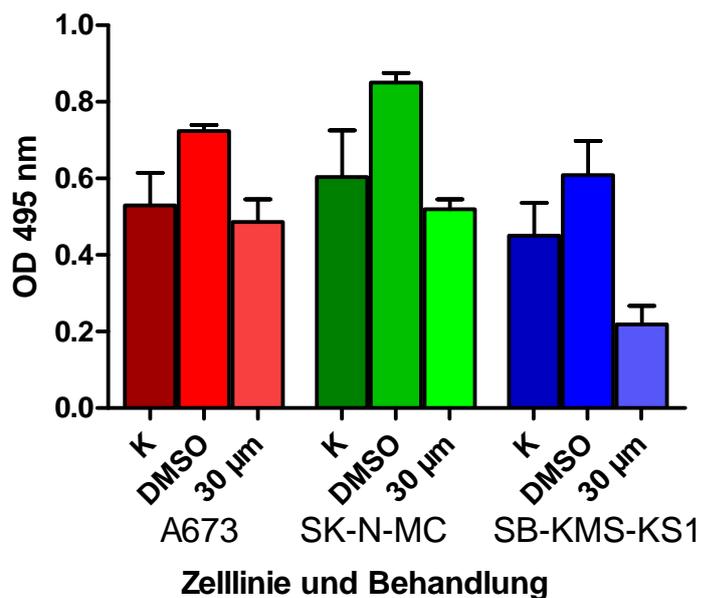


Abb. 8: Proliferationsassay mit SB 202190 [30  $\mu\text{M}$ ].

A673, SB-KMS-KS1, SK-N-MC jeweils  $1 \times 10^4$  Zellen/well.

K: Mediumskontrolle; 1% DMSO-Lösungsmittel-Kontrolle.

Tbl. 14: Proliferation [%] SB 202190 [30  $\mu\text{M}$ ]

Ewing-Zelllinien	SB 202190	DMSO-Kontrolle	Medium-Kontrolle
A673 p12	48,60	72,40	52,90
SB-KMS-KS1 p20	21,85	60,85	45,00
SK-N-MC p7	51,90	85,05	60,35

Im Proliferationsassay mit dem Kinaseinhibitor SB 202190 ergab sich ein nennenswerter Unterschied zwischen der Substanz und der Mediumskontrolle, v.a. für die Ewing-Zelllinie SB-KMS-KS1 (Abb. 8). Die Inkubation der Zelllinien SK-N-MC wie auch A673 mit SB 202190 führte im Vergleich zu den dazugehörigen Mediumskontrollen zu einer geringeren Beeinflussung der Proliferationsrate (Differenz zwischen Mediums- und Substanzkontrolle: SK-N-MC 8,38%; A673 4,3%). Bei allen getesteten Ewing-Zellen stimulierte die DMSO-Lösungsmittelkontrolle das Zellwachstum (Tbl. 14), was eventuell mit der Hochregulation des Zellnotfallprogramms als Antwort auf die zytotoxische Wirkung von DMSO erklärt werden kann. Den geringsten Unterschied zwischen der chemischen Substanz SB 202190 und der Lösungsmittelkontrolle weist die Passage p12 der Zelllinie A673 auf (Tbl. 14). Da bei der chemischen Substanz SB 203580 nur eine Konzentration (30  $\mu$ M) getestet wurde, wurde zur übersichtlichen Darstellung der Zellproliferation ein Säulendiagramm gewählt.

SB 203580

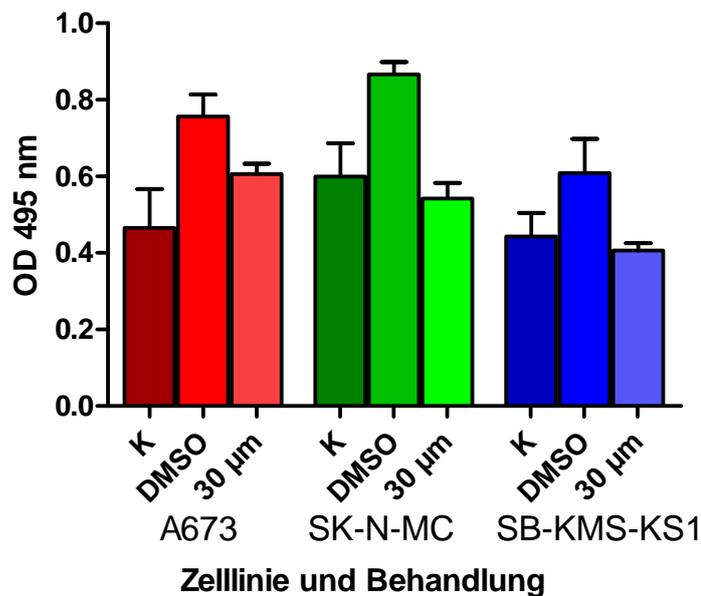


Abb. 9: Proliferationsassay mit SB 203580 [30  $\mu$ M].

A673, SB-KMS-KS1, SK-N-MC jeweils  $1 \times 10^4$  Zellen/well.

K: Mediumskontrolle; 1% DMSO-Lösungsmittel-Kontrolle.

Tbl. 15: Proliferation [%] SB 2035802 [30  $\mu$ M]

Ewing-Zelllinien	SB 203580	DMSO-Kontrolle	Medium-Kontrolle
A673 p12	60,60	75,60	46,50
S-KMS-KS1 p20	40,63	60,85	44,30
SK-N-MC p7	54,23	86,60	59,96

Der MAP-Kinase-Inhibitor SB 203580 beeinflusste die Proliferation der getesteten Ewing-Zellen in unterschiedlichem Maße (Tbl. 15). So stieg die Proliferationsrate bei den A673-Zellen der Passage 12 im Vergleich zu ihrer Mediumskontrolle (A673 p12 um 14,1%), wohingegen die restlichen getesteten

Zelllinien durch die chemische Substanz SB 203580 in ihrem Wachstum im Vergleich zu ihrer Mediumskontrolle gehemmt wurden. Wie bereits im Proliferationsassay mit der Substanz SB 202190 (Abb. 9) zeigte auch hier die Lösungsmittelkontrolle (1% DMSO) einen proliferationssteigernden Effekt auf die untersuchten Ewing-Zelllinien.

Tbl. 16: Proliferationsänderung [%] SB 202190 [30  $\mu\text{M}$ ], SB 203580 [30  $\mu\text{M}$ ]

Zelllinien	SB 202190	SB 203580
A673	- 23,80	- 15,00
SB-KMS-KS1	- 39,00	- 20,22
SK-N-MC	- 33,15	- 32,37

+ := hochreguliert; - := supprimiert

Vergleicht man die Wirkung beider MAPK-Inhibitoren, so fällt auf, dass diese die Proliferation der Ewing-Zellen ähnlich schwach beeinflussen (Abb. 8/9). Der Kinase-Inhibitor SB 202190 zeigte jedoch einen stärkeren proliferationshemmenden Einfluss auf die Zelllinie SB-KMS-KS1, wohingegen SB 203580 das Wachstum der Zelllinie SK-N-MC in ausgeprägterem Maße hemmte (Tbl. 16).

#### U0126

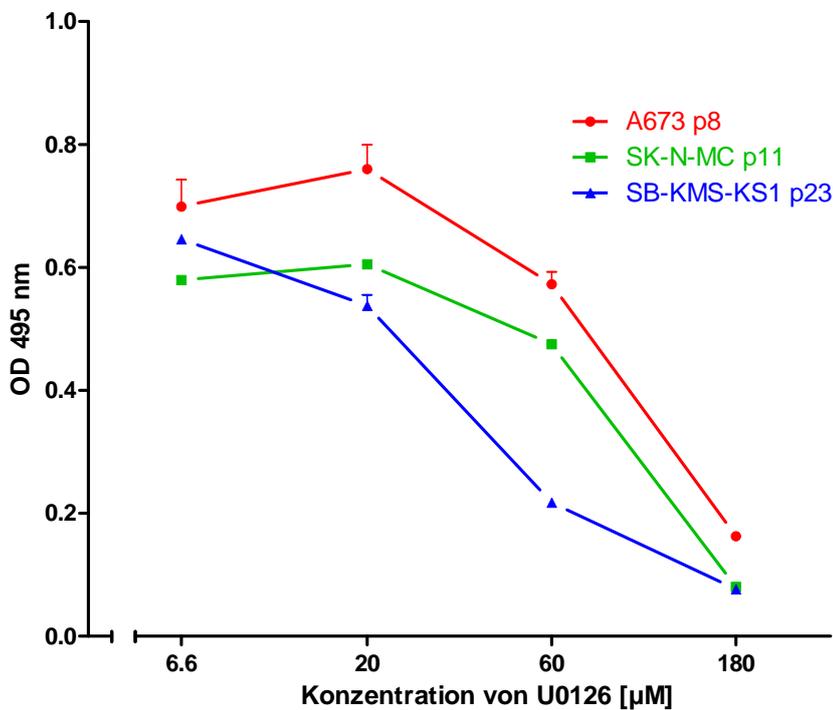


Abb. 10: Proliferationsassay mit U0126.

A673, SK-N-MC jeweils  $2 \times 10^4$  Zellen/well, SB-KMS-KS1  $1 \times 10^4$  Zellen/well.  
Kontrolle: 0,5% DMSO; x-Achse logarithmisch.

Tbl. 17: Proliferationsänderung [%] U0126

Zelllinien	U0126
A673 p8	- 59,75
SB-KMS-KS1 p23	- 56,59
SK-N-MC p11	- 52,50

+ := hochreguliert; - := supprimiert

Die Behandlung der Ewing-Zellen mit dem MEK<sub>1/2</sub>-Inhibitor U0126 führte zu einem starken Rückgang der Proliferation aller getesteten Ewing-Zellen (Abb. 10), wobei die Zelllinie A673 mit ca. 59,75% den größten Unterschied zwischen den maximalen (Konzentration 20 µM) und den geringsten Extinktionswerten bei 180 µM aufwies. Die Zelllinie SB-KMS-KS1 konnte um ca. 56,95% in ihrem Wachstum gehemmt werden, SK-N-MC um ca. 52,5% (Tbl. 17).

### 3.1.3 PI3K-Pathway-beeinflussende Substanzen

LY 294-002

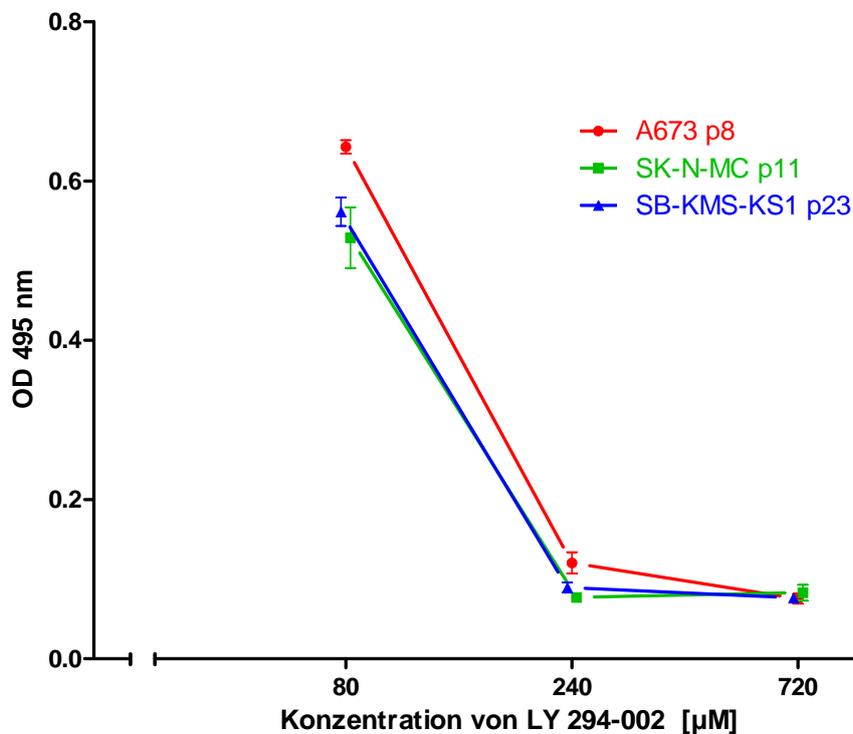


Abb. 11: Proliferationsassay mit LY 294-002.

A673, SB-KMS-KS1, SK-N-MC jeweils 1x10<sup>4</sup> Zellen/well

Kontrolle: 0,5% DMSO; x-Achse logarithmisch.

Tbl. 18: Proliferationsänderung [%] LY 294-002

Zelllinien	LY 294-002
A673 p8	- 56,75
SB-KMS-KS1 p23	- 44,60
SK-N-MC p11	- 48,50

+ := hochreguliert; - := supprimiert

Die Wirkung des PI3K-Inhibitors LY 294-002 auf die Ewing-Zelllinien A673, SB-KMS-KS1 und SK-N-MC wurde ebenfalls mittels BrdU-Proliferationsassay getestet (Abb. 11). Alle Ewing-Zelllinien reagierten hierbei mit einem vergleichbaren, drastischen Abfall ihrer Proliferation ab der niedrigsten Konzentration (80  $\mu$ M) (Tbl. 18).

### Rapamycin

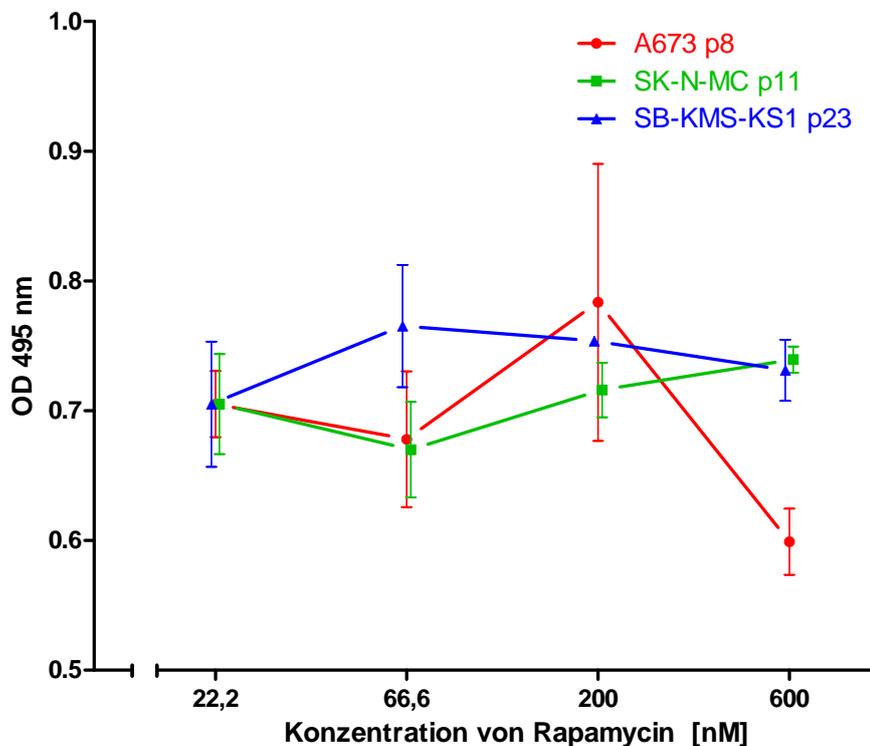


Abb. 12: Proliferationsassay mit Rapamycin.

A673, SB-KMS-KS1, SK-N-MC jeweils  $1 \times 10^4$  Zellen/well  
Kontrolle: 0,1% ETOH. x-Achse logarithmisch.

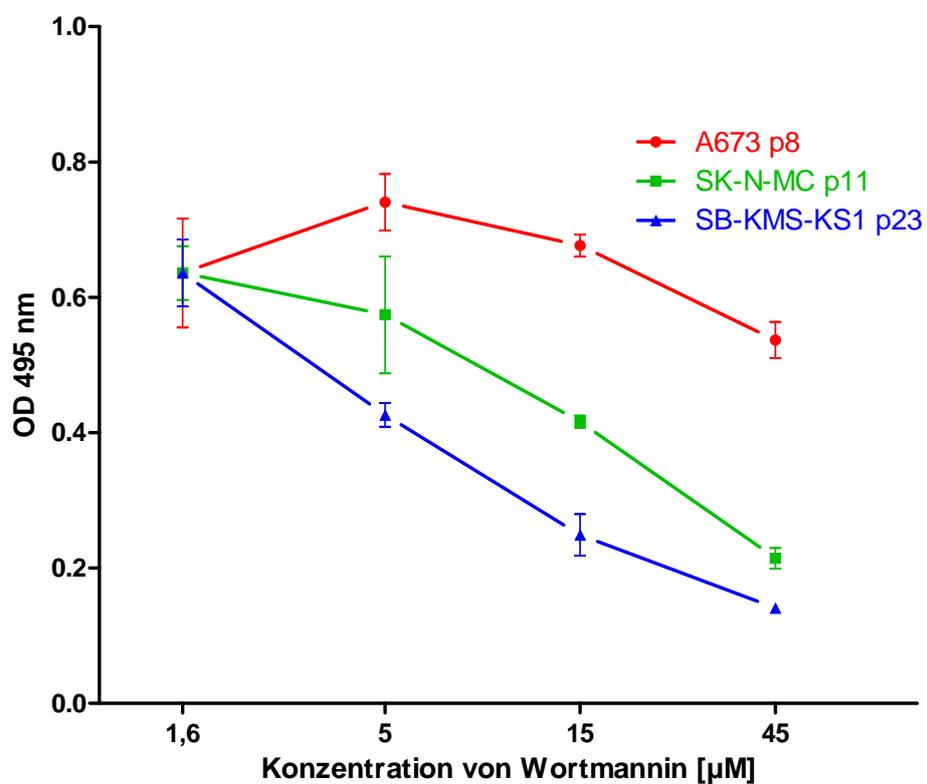
Tbl. 19: Proliferationsänderung [%] Rapamycin

Zelllinien	Rapamycin
A673 p8	- 18,45
SB-KMS-KS1 p23	- 5,33
SK-N-MC p11	+ 5,85

+ := hochreguliert; - := supprimiert

Am ehesten konnte eine Wirkung durch die Inhibition mit Rapamycin auf die Zelllinie A673, nach Proliferationsanstieg zwischen 66,6 nM und 200 nM (Abb. 12) um ca. 10,5%, mit einem anschließenden Proliferationsverlust von ca. 18% beobachtet werden (Tbl. 19). Bei den übrigen Ewing-Zellen bewirkte Rapamycin nur eine geringe Beeinflussung der Proliferation. Dabei wurden die Zellen SB-KMS-KS1 in ihrer Proliferation um ca. 5% gehemmt, wohingegen SK-N-MC durch die Behandlung mit Rapamycin ab der Konzentration von 66,6 nM eine stetige Proliferationssteigerung von ca. 5% erfuhr (Tbl. 19).

#### Wortmannin



**Abb. 13: Proliferationsassay mit Wortmannin.**

A673, SB-KMS-KS1, SK-N-MC jeweils  $1 \times 10^4$  Zellen/well  
Kontrolle: 0,5% DMSO; x-Achse logarithmisch.

**Tbl. 20: Proliferationsänderung [%] Wortmannin**

Zelllinien	Wortmannin
A673 p8	- 20,35
SB-KMS-KS1 p23	- 33,13
SK-N-MC p11	- 44,56

+ := hochreguliert; - := supprimiert

Nach Zugabe des potenten PI3-K-Inhibitors Wortmannin zeigte die Ewing-Zelllinie SK-N-MC ausgehend vom höchsten Extinktionswert bei der Konzentration 1,6  $\mu\text{M}$  mit ca. 44% die stärkste Reaktion (Abb. 13). Bei der Zelllinie SB-KMS-KS1 wurde die Proliferation um maximal 33% gehemmt (Tbl. 20). A673 war in diesem Assay die einzige Zelllinie, bei der die Proliferation zunächst anstieg (Konzentration 1,6  $\mu\text{M}$  bis 5  $\mu\text{M}$ ), bevor sie um ca. 20% zurückging und somit die geringste Beeinflussung durch die Inkubation mit Wortmannin aufwies.

## 3.2 Quantitative Real-Time-PCR (qRLT-PCR)

Anhand der ermittelten Proliferationskurven durch den BrdU-Assay der unterschiedlichen Substanzen konnten die Konzentrationen ermittelt werden, bei denen die Zellen in ihrem Wachstum gehemmt, jedoch noch nicht letal geschädigt waren (Abb. 5-13). Diese Konzentrationen wurden anschließend eingesetzt, um die Ewing-Zelllinien nach chemischer Behandlung durch die quantitative Real-Time-PCR (qRLT-PCR) auf genetischer Ebene untersuchen zu können.

Ausgehend von Staeger et al. (2004) sollte die Regulation einzelner beim ET als überexprimiert geltenden Gene nach chemischer Behandlung der Zelllinien mit unterschiedlichen Inhibitoren, untersucht und deren Zusammenhang zu EWS/FLI1 dargestellt werden. Hierzu wurden die Zellen mit den Inhibitoren inkubiert, wie dem Methodenteil der vorliegenden Arbeit (Kapitel 2.2.4) zu entnehmen ist (Tbl. 21). Die so beeinflussten Enzyme sind für die Regulationswege unterschiedlicher Zelltypen von potentiell entscheidender Bedeutung. So sind diese neben der Differenzierung, der Proliferation von Zellen und deren programmierten Zelltod an der Entstehung und Progression unterschiedlicher Tumorentitäten wie dem Ewing-Tumor beteiligt.

**Tbl. 21: Verwendete Kinaseinhibitoren für qRLT-PCR**

chem. Substanz	Konzentration	Lösungsmittel-Kontrolle
Chaetocin	5 $\mu$ M; 10 $\mu$ M	1% DMSO
LY 294-002	80 $\mu$ M	0,5% DMSO
P215	50 $\mu$ M	0,5% DMSO
Rapamycin	100 nM	0,1‰ EtOH
SB 202190	30 $\mu$ M	1% DMSO
SB 203580	30 $\mu$ M	1% DMSO
Trichostatin A	100 nM	0,5% DMSO
U0126	20 $\mu$ M	0,5% DMSO
Wortmannin	5 $\mu$ M	0,5% DMSO

A673, SKN-MC und SB-KMS-KS1 jeweils  $5 \times 10^5$  Zellen/well

## 3.2.1 Histon-modulierende Substanzen

## Trichostatin A

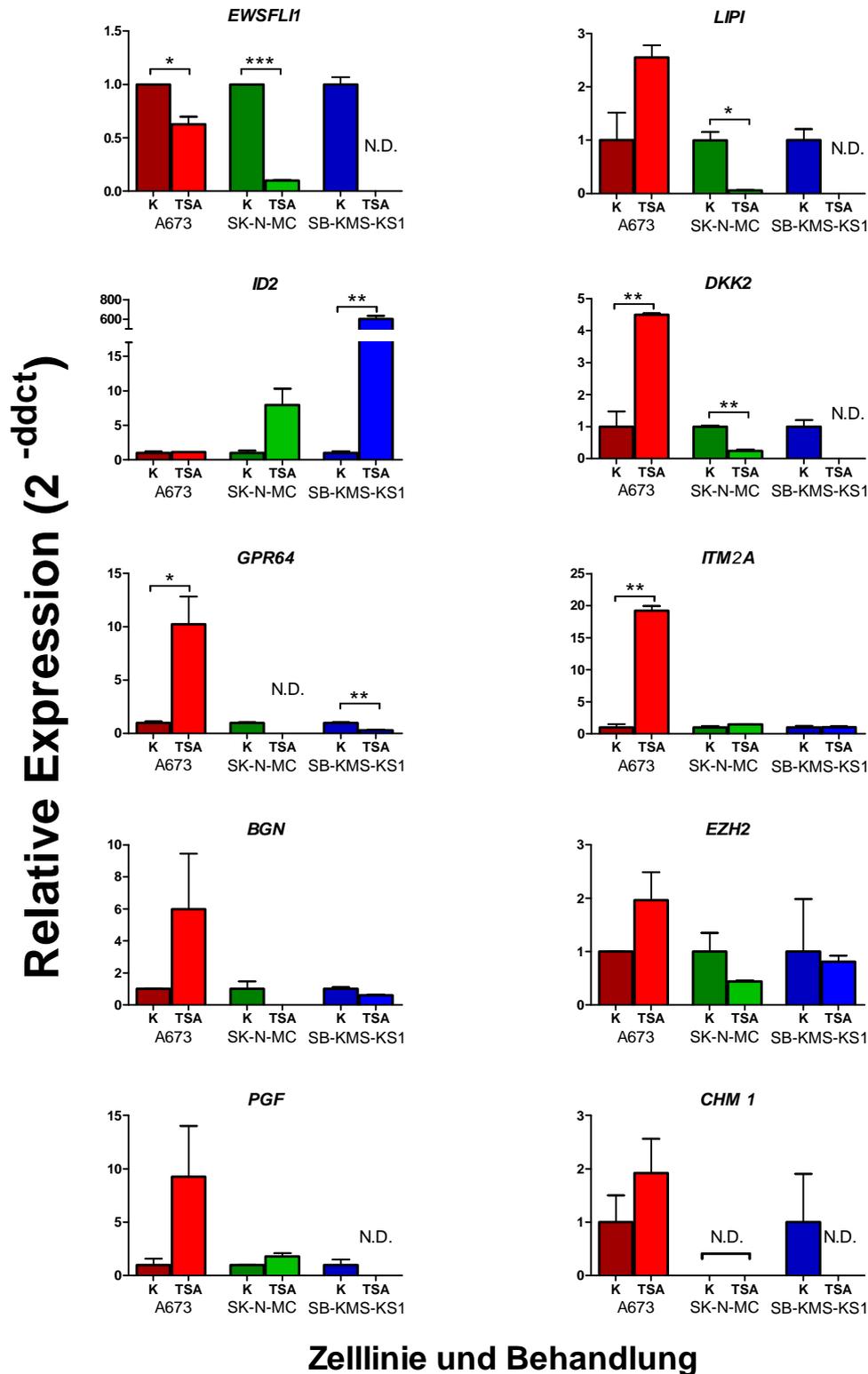


Abb. 14: Genexpression der Ewing-Zellen nach Trichostatin A-Inkubation [100 nM].

Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

N.D.: nicht detektierbar.

---

Unter der Behandlung mit TSA reagierten alle getesteten Ewing-Zelllinien mit einer signifikanten Suppression des chimären Transkriptionsfaktors EWS/FLI1, wenn auch in unterschiedlichem Maße (Abb. 14). Bei der Zelllinie SB-KMS-KS1 sogar unter das Niveau der messbaren Genexpression, was sich ebenso für die Gene CHM1, DKK2, LIPI und PGF fortsetzte. DKK2 und LIPI waren auch bei der Zelllinie SK-N-MC signifikant supprimiert (DKK2:  $p=0,0023$ ; LIPI:  $p=0,0136$ ). Ein besonders starker Anstieg der Expression nach TSA-Behandlung zeigte sich für das Gen ID2 bei den Zelllinien SB-KMS-KS1 und SK-N-MC, allerdings war dieser Unterschied nur bei SB-KMS-KS1 statistisch signifikant. Die Zelllinie A673 unterschied sich in dem Expressionsmuster der getesteten Gene zum Teil deutlich von denen der anderen Zelllinien. Nur bei dem Gen EWS/FLI1 konnte durch TSA eine signifikante Inhibition der Expression gemessen werden, während alle anderen Gene durch diese Substanz überexprimiert wurden (Abb. 14).

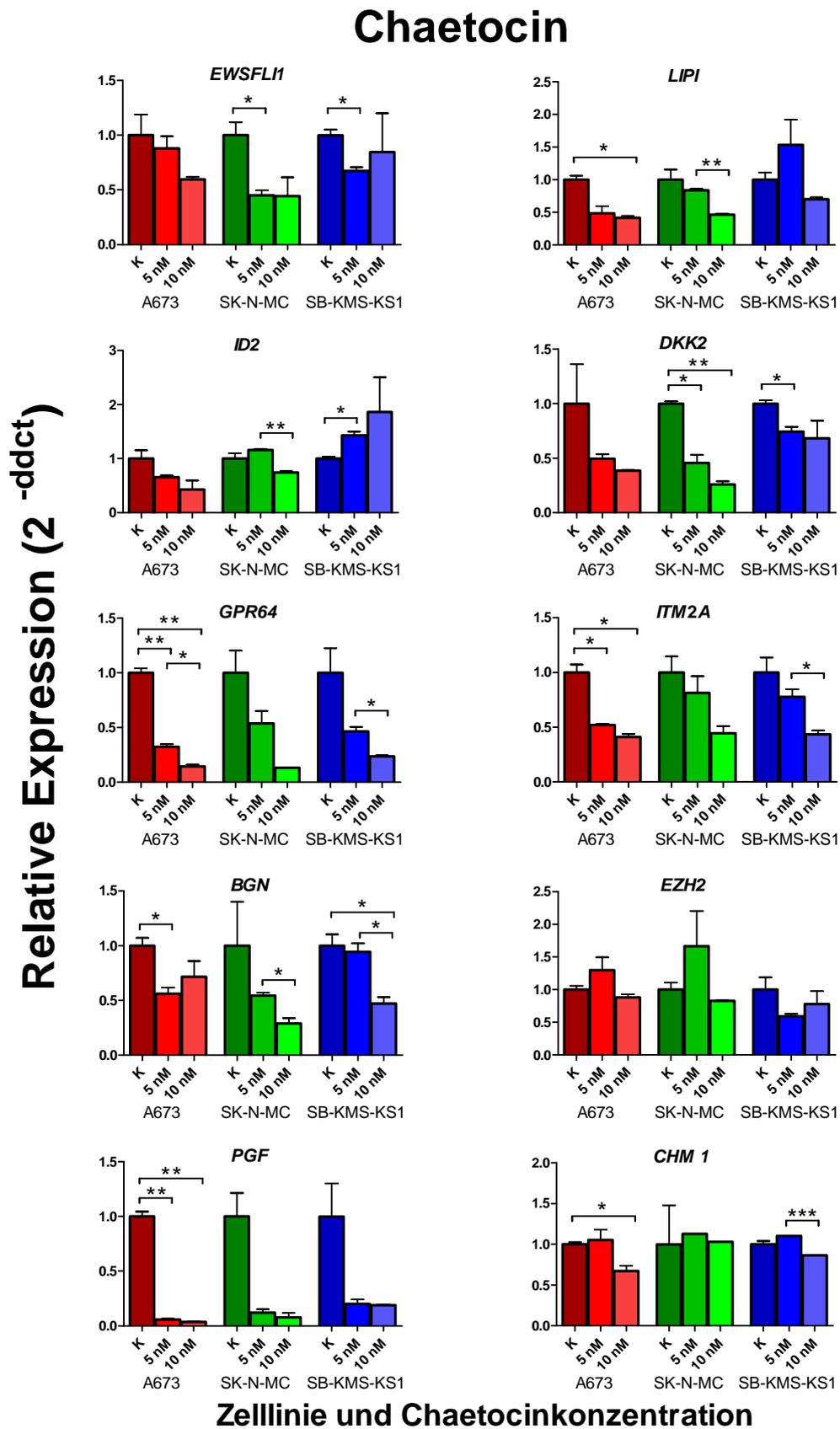


Abb. 15: Genexpression der Ewing-Zellen nach Chaetocin-Inkubation [5 nM; 10 nM].

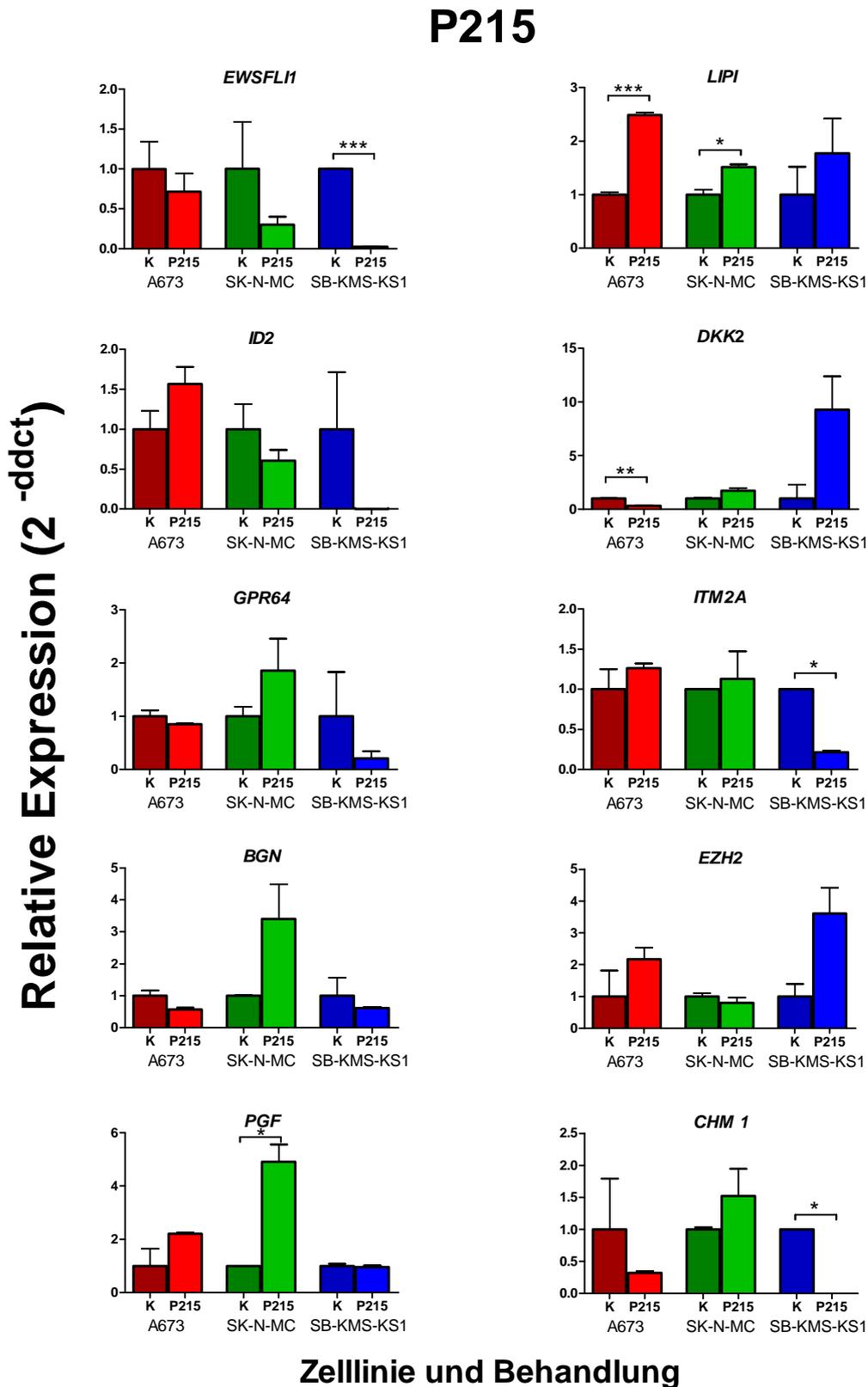
Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

N.D.: nicht detektierbar.

---

Eine signifikante Suppression der EWS/FLI1-Expression unter Einwirkung von Chaetocin war v.a. bei der Zelllinie SK-N-MC zu sehen, allerdings nur bei der Konzentration 5 nM ( $p=0,048$ ), nicht bei 10 nM aufgrund der höheren Variabilität der Daten. Ein konzentrationsabhängiger Zusammenhang besteht bei diesem Gen jedoch nur für die Zelllinie A673 (Abb. 15). Eine signifikante konzentrationsabhängige Chaetocinwirkung mit nachfolgender Suppression der Genexpression ergab sich bei der Zelllinie A673 für die Gene CHM1 (K vs. 10 nM:  $p=0,042$ ), GPR64 (K vs. 5 nM:  $p=0,005$ , K vs. 10 nM:  $p=0,003$ , 5 nM vs. 10 nM:  $p=0,027$ ), ITM2A (K vs. 5 nM:  $p=0,023$ , K. vs. 10 nM:  $p=0,017$ ), PGF (K vs. 5 nM:  $p=0,002$ , K vs. 10 nM:  $p=0,002$ ). Eine ebensolche Tendenz war für ID2 und DKK2 vorhanden, jedoch war die Veränderung im Vergleich zur Kontrolle hier nicht signifikant. Bei der Zelllinie SK-N-MC konnte außer bei den Genen ID2, EZH2 und CHM1 eine konzentrationsabhängige Expressionsminderung ermittelt werden (Abb. 15). Besonders deutlich war dies für DKK2 (K vs. 5 nM:  $p=0,020$ ; K vs. 10 nM:  $p=0,002$ ). Ebenso konzentrationsabhängig supprimiert waren nach Inkubation mit Chaetocin die Gene BGN (K vs. 10 nM:  $p=0,047$ ; 5 nM vs. 10 nM:  $p=0,040$ ), PGF (GPR64, 5 nM vs. 10 nM:  $p=0,029$ ), ITM2A (5 nM vs. 10 nM:  $p=0,048$ ) und DKK2 (K vs. 5 nM:  $p=0,039$ ) bei der Zelllinie SB-KMS-KS1, während ID2 bei dieser Zelllinie hochreguliert wurde (K vs. 5 nM:  $p=0,032$ ) (Abb. 15).

## 3.2.2 MEK/MAPK-Pathway-beeinflussende Substanzen

Abb. 16: Genexpression der Ewing-Zellen nach P215-Inkubation [50  $\mu$ M].Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

N.D.: nicht detektierbar.

---

Die Verwendung des Kinaseinhibitors P215 erbrachte für alle getesteten Ewing-Zellen eine verminderte Expression des Genes EWS/FLI1, welche allerdings nur bei der Zelllinie SB-KMS-KS1 signifikant war ( $p < 0,0001$ ). Am geringsten war EWS/FLI1 bei A673 herunter reguliert (Abb. 16). Eine klare Veränderung des Expressionsmusters ergab sich lediglich für das Gen LIPI bei allen drei Zelllinien, welches nach Behandlung mit P215 hochreguliert wurde (A673,  $p = 0,001$ ; SK-N-MC,  $p = 0,021$ ). Bei allen anderen Genen war die Expression uneinheitlich. Signifikante Veränderungen nach unten ergaben sich für ITM2A ( $p = 0,0003$ ) und CHM1 ( $p < 0,0001$ ) jeweils bei SB-KMS-KS1 sowie nach oben für PGF ( $p = 0,013$ ) bei SK-N-MC (Abb. 16).

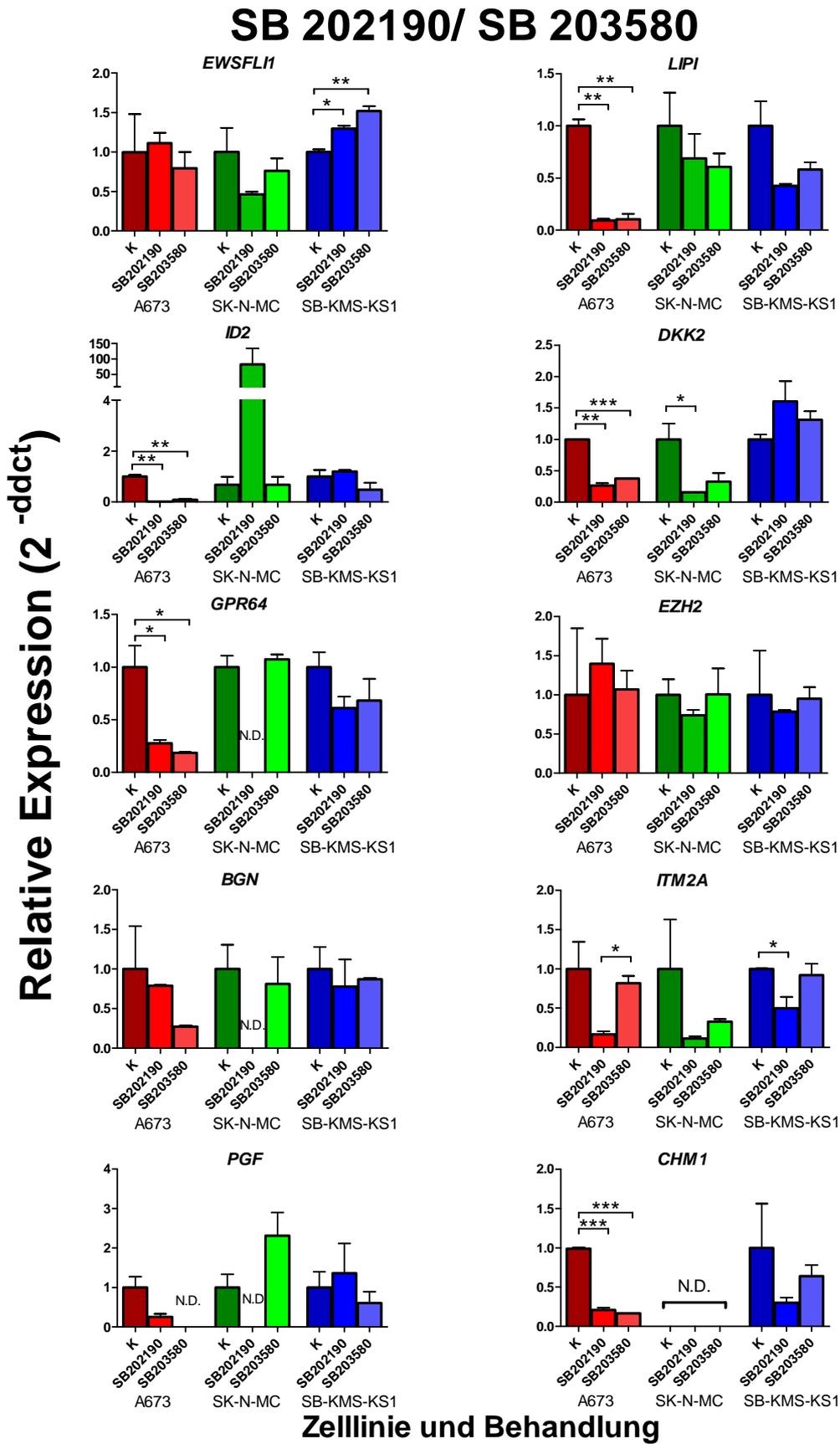
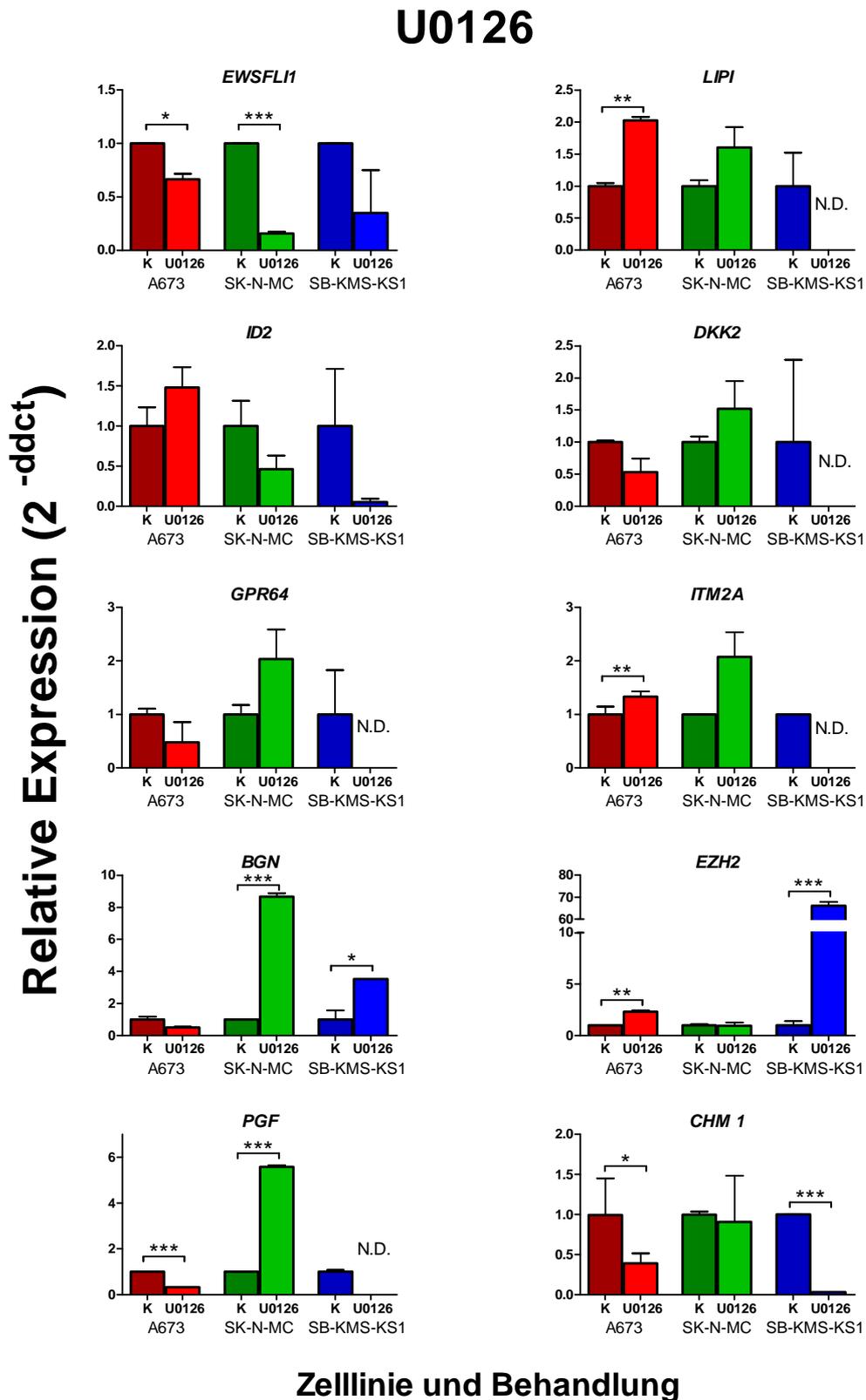


Abb. 17: Genexpression der Ewing-Zellen nach SB 202190 und SB 203580-Inkubation [30 µM].  
 Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede (\*: p < 0,05; \*\*: p < 0,01; \*\*\*: p < 0,001).  
 N.D.: nicht detektierbar.

---

Sowohl SB 202190 als auch SB 203580 bewirkten für EWS/FLI1 bei der Zelllinie SB-KMS-KS1 eine signifikante Expressionserhöhung im Vergleich zur Kontrolle (SB 202190,  $p=0,015$ ; SB 203580  $p=0,009$ ), während für dieses Gen bei A673 und SK-N-MC keine nennenswerte Reaktion zu beobachten war (Abb. 17). Insgesamt reagierte A673 offensichtlich auf beide Substanzen. So waren LIPI, ID2, DKK2 und GPR64 bei den behandelten A673-Zellen signifikant herunter reguliert (SB 202190, LIPI:  $p=0,003$ ; ID2:  $p=0,003$ ; DKK2:  $p=0,001$ ; GPR64:  $p=0,039$ ; SB 203580, LIPI:  $p=0,004$ ; ID2:  $p=0,004$ ; DKK2:  $p<0,0001$ ; GPR64:  $p=0,030$ ) und im Fall von PGF bei SK-N-MC war nach Behandlung mit SB 202190 die Expression unter die Detektionsgrenze der qRLT-PCR herunter reguliert. Tendenziell zeichnete sich auch bei SK-N-MC eine verringerte Expression für beide Substanzen bei LIPI, DKK2 (SB 202190,  $p=0,042$ ) und PGF ab (Abb. 17). Bei dieser Zelllinie schien SB 202190 eine besonders starke Wirkung auf GPR64, BGN und PGF gehabt zu haben, da auch diese Gene bei den behandelten Zellen nicht nachweisbar waren.



**Abb. 18: Genexpression der Ewing-Zellen nach U0126-Inkubation [20  $\mu$ M].**

Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

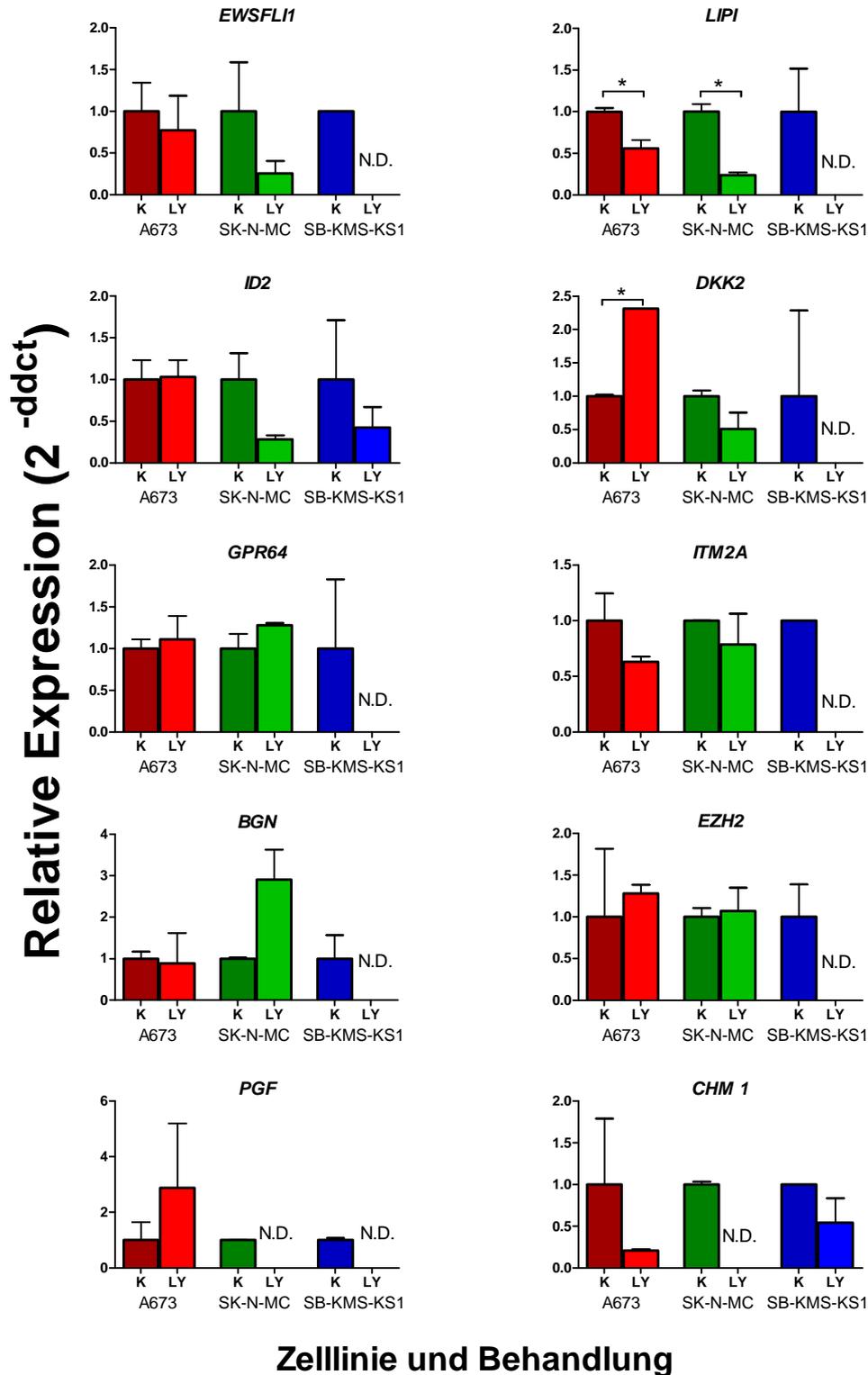
N.D.: nicht detektierbar.

---

Unter Einfluss des Kinaseinhibitors U0126 wurde das EWS/FLI1-Gen bei allen drei Zelllinien herunter reguliert, insbesondere jedoch bei den Zelllinien A673 ( $p=0,012$ ) und SK-N-MC ( $p<0,0001$ ) (Abb. 18). Eine signifikante Suppression der Expression bei den behandelten Zellen ergab sich für die Gene PGF ( $p<0,0001$ ) und CHM1 ( $p=0,043$ ) bei A673 und für LIPI (N.D.), DKK2 (N.D.), GPR64 (N.D.), ITM2A (N.D.) und CHM1 ( $p<0,0001$ ) bei der Zelllinie SB-KMS-KS1. Einige Gene wurden nach Einwirkung von U0126 stark überexprimiert. LIPI und ITM2A bei A673 ( $p= 0,0021$  und  $p=0,0093$ ), EZH2 bei A673 ( $p=0,0053$ ) und SB-KMS-KS1 ( $p=0,0003$ ), PGF bei SK-N-MC ( $p=0,0002$ ) sowie BGN bei den Zelllinien SK-N-MC ( $p=0,0004$ ) und SB-KMS-KS1 ( $p=0,0242$ ) (Abb. 18).

## 3.2.3 PI3K-Pathway-beeinflussende Substanzen

## LY 294-002

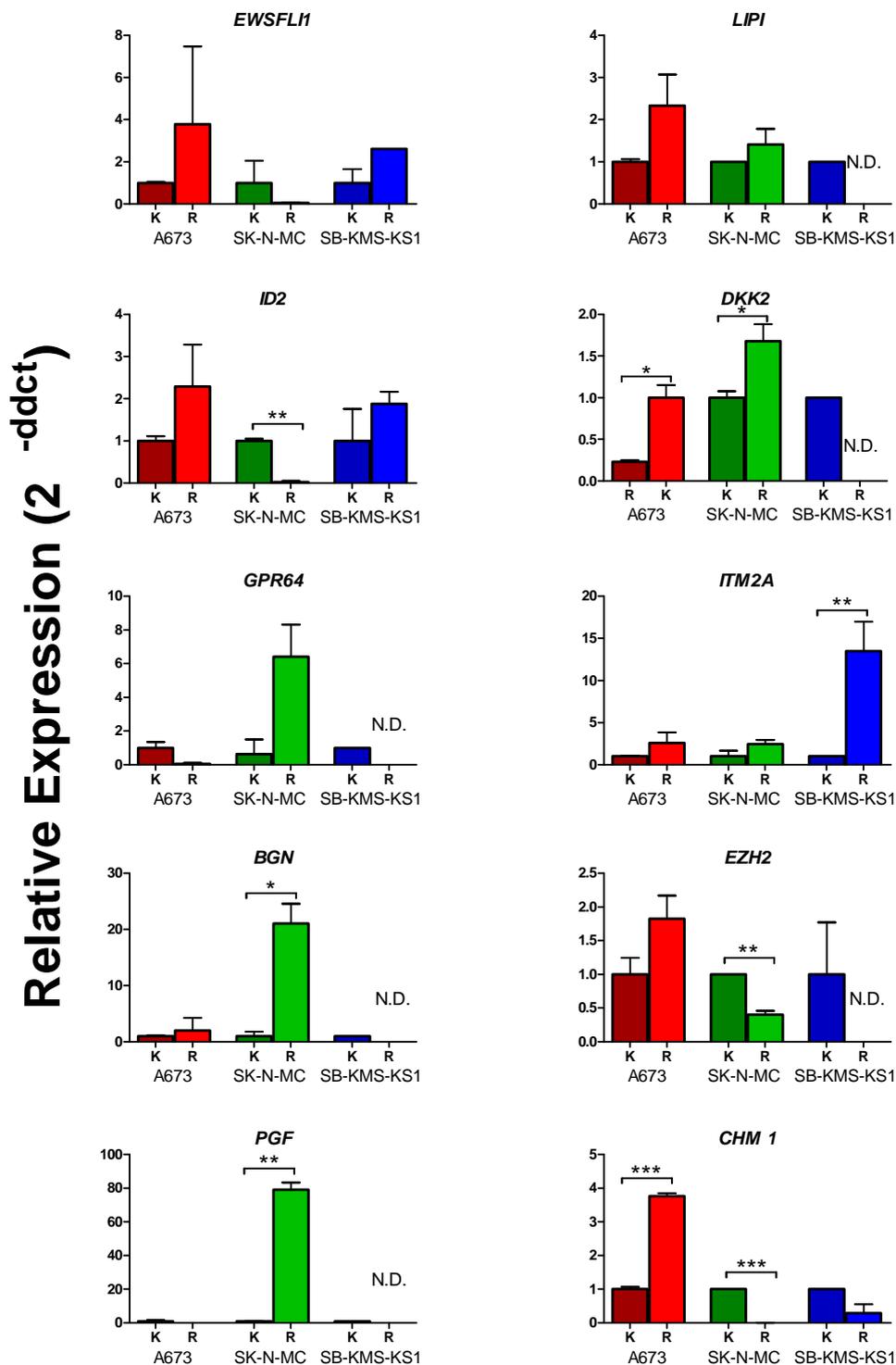
Abb. 19: Genexpression der Ewing-Zellen nach LY294-002-Inkubation [80  $\mu$ M].Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p > 0,001$ ).

N.D.: nicht detektierbar.

---

Die Behandlung der Zellen mit LY 294-002 führte zu einer Suppression des Fusionsgenes EWS/FLI1, welches sich bei der Zelllinie A673 am wenigsten und bei den Zelllinien SK-N-MC und SB-KMS-KS1 (N.D.) stark beeinflusst zeigte (Abb. 19). Durch den Kinaseinhibitor LY 294-002 konnten alle getesteten Gene bei der Zelllinie SB-KMS-KS1 supprimiert werden, bei den Genen EWS/FLI1, BGN, DKK2, EZH2, GPR64, ITM2A, PGF, und LIPI sogar unter den Detektionsbereich. Ein einheitliches Bild für alle drei getesteten Zelllinien ergab sich dabei für das Gen LIPI, welches auch bei A673 ( $p=0,0298$ ) und SK-N-MC ( $p=0,0082$ ) signifikant supprimiert war (Abb. 19).

## Rapamycin



## Zelllinie und Behandlung

Abb. 20: Genexpression der Ewing-Zellen nach Rapamycin-Inkubation [100 nM].

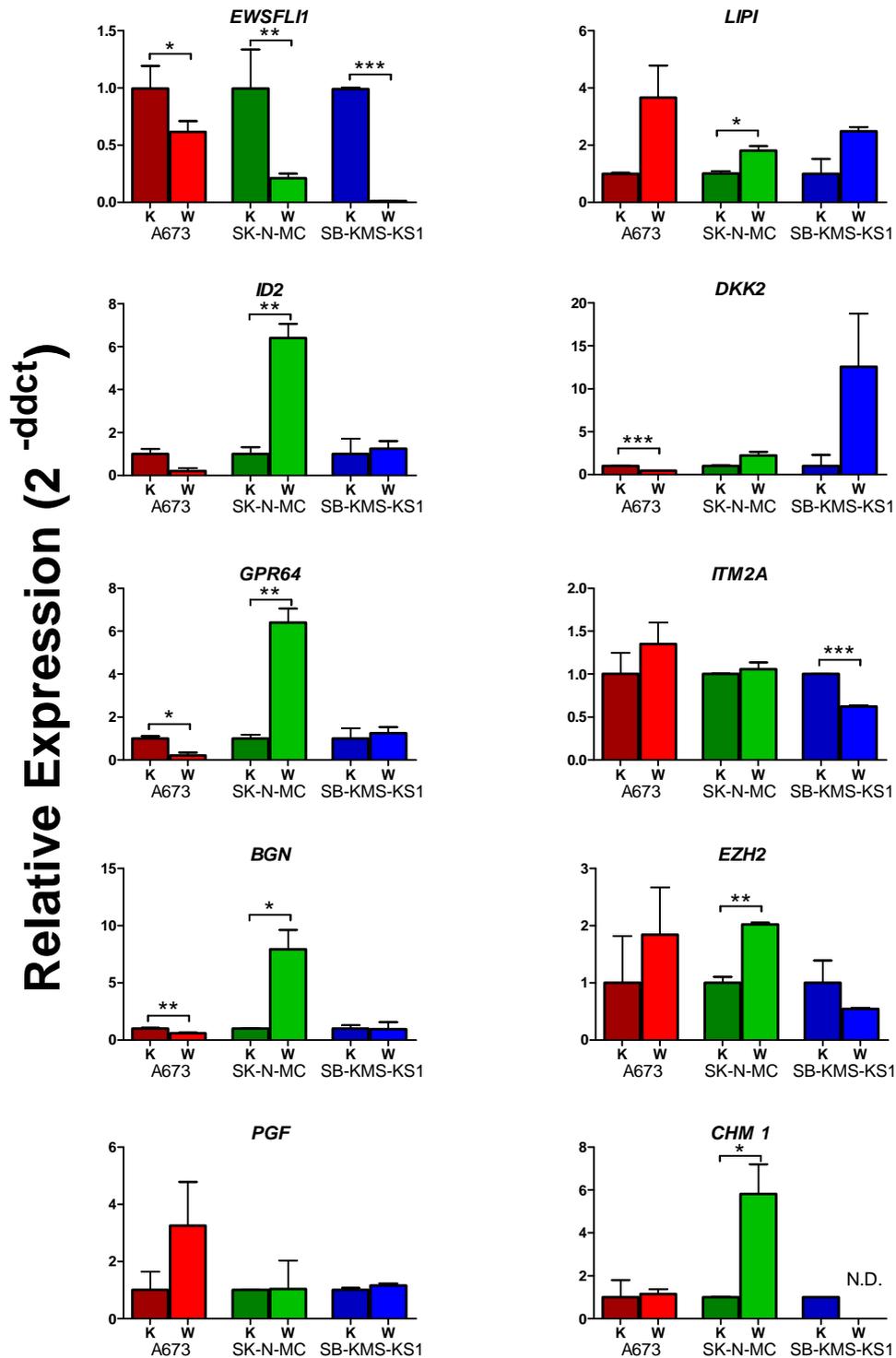
Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

N.D.: nicht detektierbar.

---

Durch die Rapamycin-Behandlung konnte nur für die Zelllinie SK-N-MC eine Expressionsminderung des Gens EWS/FLI1 erreicht werden. Jedoch bewirkte die Inkubation mit diesem Kinaseinhibitor bei der Zelllinie SB-KMS-KS1 eine Verminderung der Expression von BGN, DKK2, EZH2, GPR64, LIPI und PGF unter den Detektionsbereich. Konträr dazu verhielt sich die Zelllinie A673, bei der mit Ausnahme der Gene GPR64 und PGF alle anderen getesteten Gene überexprimiert wurden, vor allem DKK2 ( $p=0,0019$ ) und CHM1 ( $p=0,0007$ ) (Abb. 20). Die stärkste Erhöhung der Expression durch Rapamycin konnte jedoch für die Zelllinie SK-N-MC bei den Genen DKK2 ( $p=0,0485$ ), GPR64, BGN ( $p=0,0155$ ) und PGF ( $p=0,0015$ ) detektiert werden (Abb. 20). In Abb. 20 lässt sich für die Gene EWS/FLI1 und ID2 wie auch für BGN, GPR64 und PGF ein ähnlich konfiguriertes Expressionsmuster erkennen.

## Wortmannin



## Zelllinie und Behandlung

Abb. 21: Genexpression der Ewing-Zellen nach Wortmannin-Inkubation [5  $\mu$ M].

Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

N.D.: nicht detektierbar.

---

Das Fusionstranskript EWS/FLI1 war bei allen Zellen durch die Behandlung mit Wortmannin signifikant supprimiert, v.a. jedoch bei der Zelllinie SB-KMS-KS1 ( $p < 0,0001$ ) und in geringerem Maße bei SK-N-MC ( $p = 0,0038$ ) sowie A673 ( $p = 0,0134$ ) (Abb. 21). Für die anderen getesteten Gene war das Bild eher uneinheitlich. Bei der Zelllinie A673 waren die Gene DKK2 ( $p = 0,0007$ ), GPR64 ( $p = 0,0216$ ) und BGN ( $p = 0,0010$ ) im Vergleich zur Kontrolle signifikant herunter reguliert, ebenso ITM2A ( $p = 0,0008$ ) und CHM1 (N.D.) bei SB-KMS-KS1. Im Gegensatz dazu waren 6 der 10 Gene bei der Zelllinie SK-N-MC überexprimiert (LIPI,  $p = 0,0274$ ; ID2,  $p = 0,0090$ ; GPR64,  $p = 0,0079$ ; BGN,  $p = 0,0287$ ; EZH2,  $p = 0,0055$ ; CHM1,  $p = 0,0389$ ). Das Gen EZH2 war auch bei A673 und LIPI bei den Zelllinien A673 und SB-KMS-KS1 gegenüber der Kontrolle hochreguliert, allerdings waren diese Unterschiede nicht signifikant (Abb. 21).

### 3.3 Stabile siRNA-Infektanten

Wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, wurden mittels retroviralem Gentransfer mit dem pSIREN-Vektor EWS/FLI1-spezifische small interfering RNA (Dohjima et al., 2003) (si-RNA)-Infektanten der Zelllinie A673 hergestellt und auf ihre Puromycin-Resistenz hin selektioniert. Dabei ergaben sich die in Tbl. 31 aufgeführten Klone, die in unterschiedlichem Maße das EWS/FLI1-Gen exprimierten (Abb. 22) Der Klon Nr. 2 zeigte dabei die geringste Reduktion des Fusionsgenes.

Tbl. 22: Stabile Infektanten

Target-Zellen	Vektor	si-Infektanten	Klon-Nr.
A 673	pSIREN	EWS/FLI1	Nr.1
			Nr.2
			Nr.3

Im Vergleich zur Negativ-Kontrolle war das Gen EWS/FLI1 bei den si-RNA-Infektanten Klon-Nr. 1 ( $p=0,0047$ ) und Nr.3 ( $p=0,0012$ ) der Zelllinie A673 am stärksten supprimiert (Abb. 22). Dies setzte sich durch eine starke Suppression der Gene DKK2 (Nr. 1:  $p=0,044$ ; Nr. 2:  $p=0,044$ ) GPR64 (Nr. 1:  $p=0,011$ ; Nr. 2:  $p=0,010$ ), ITM2A (Nr. 1:  $p=0,017$ ; Nr. 2:  $p=0,017$ ), EZH2 (Nr. 1:  $p=0,025$ ; Nr. 2:  $p=0,031$ ) und CHM1 (Nr. 1:  $p=0,039$ ; Nr. 2:  $p=0,039$ ) bei den Klonen Nr. 1 und 3 fort. Zudem war bei einigen Genen auch die Expression bei Klon Nr. 2 signifikant reduziert (DKK2, Nr. 2:  $p=0,022$ ; ITM2A, Nr. 2:  $p=0,017$ ; EZH2, Nr. 2:  $p=0,030$ ; CHM1, Nr. 2:  $p=0,040$ ). Beim Gen LIPI waren ebenfalls alle 3 Klone supprimiert, allerdings waren diese Unterschiede durch die Variabilität der Kontrolle nicht signifikant (Abb. 22). Bei ID2 war nur Klon 3 signifikant supprimiert ( $p<0,0001$ ), während Nr. 2 stark hochreguliert war. Ebenso war GPR64 bei Klon Nr. 2 hochreguliert. Die Gene PGF und BGN waren bei allen Klonen z.T. signifikant hochreguliert (BGN, Nr. 1:  $p=0,019$ ; Nr. 2:  $p=0,007$ ; Nr. 3:  $p=0,013$ ; PGF, Nr 1:  $p=0,0001$ ), was im Widerspruch zu der geringen Expression von EWS/FLI1 bei den Klonen Nr. 1 und 3 steht. Anhand der Abb. 22 lässt sich für die Gene CHM1, DKK2, ITM2A und LIPI wie auch für EZH2, PGF, ID2 und GPR64 ein vom EWS/FLI1-Gehalt der Zellen abhängiges Expressionsmuster erkennen.

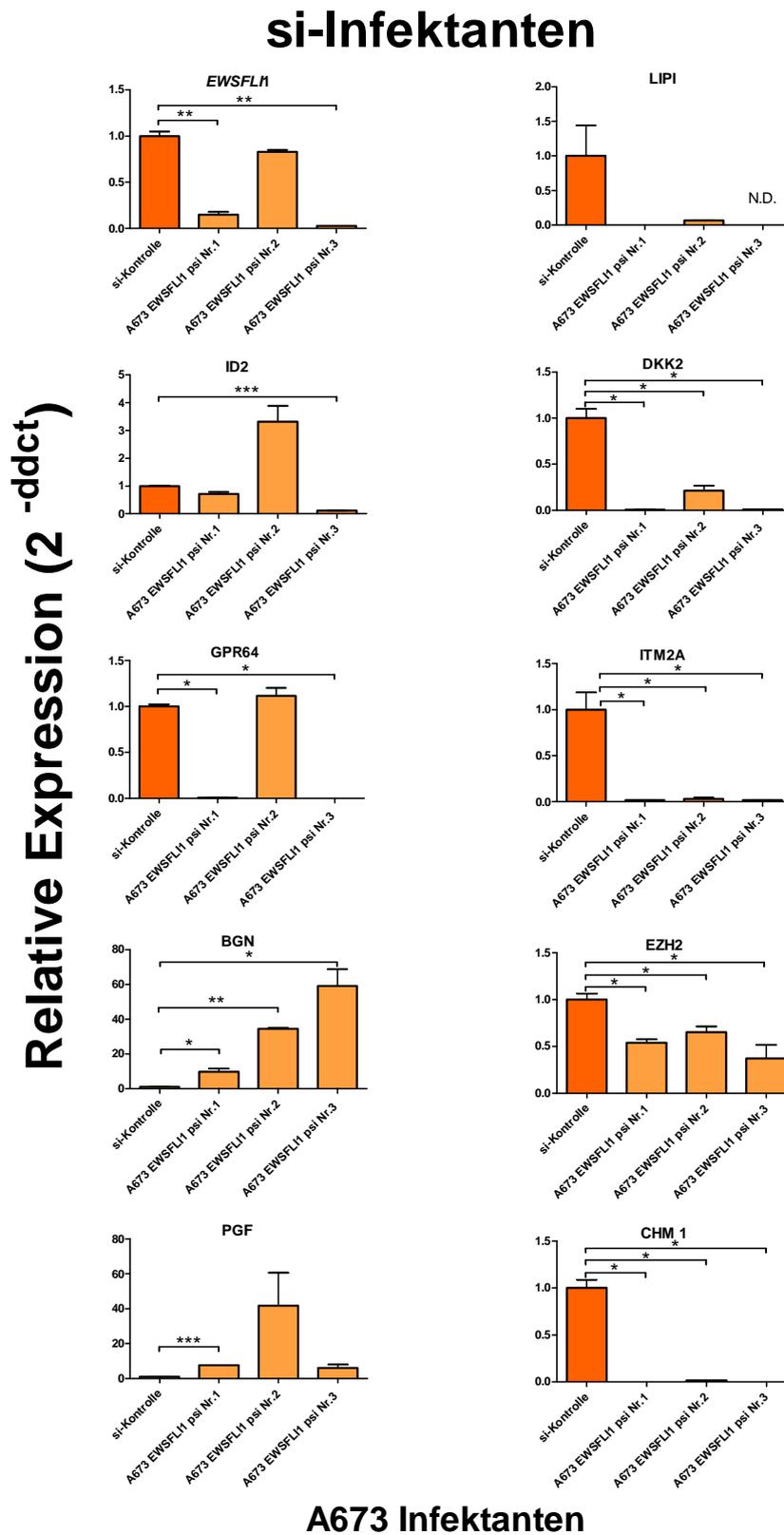


Abb. 22: Genexpression der EWSFL11-siRNA-Infektanten der Zelllinie A673.

Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

N.D.: nicht detektierbar.

### 3.4 Mesenchymale Stammzellen (MSC)

Bei den verwendeten mesenchymalen Stammzellen (MSC) handelte es sich um Zellen, die aus peripherem Blut gewonnen wurden (Zelllinie V54.2) und im Falle der Zelllinie L87 um Knochenmarkszellen. Zum weiteren Verständnis der genetischen Zusammenhänge in Hinblick auf die Entstehung des Ewing-Tumors wurden diese MSC, denen das Fusionsgen normalerweise fehlt (Abb. 24), mit EWS/FLI1 infiziert (s. Kapitel 2.2.2 Material und Methoden). Hierdurch sollte sich die Genexpression der Zellen von ihrem mesenchymalen Ursprung ausgehend in Richtung Ewing-Tumor verändern, was in dieser Arbeit gezeigt werden konnte (s. Kapitel 4.5 der Diskussion). Durch die Einführung des EWS/FLI1-Fusionsgenes in die MSC sollte des Weiteren der mesenchymale Ursprung der Familie der Ewing-Tumore untersucht werden.

In Abb. 23 ist das unterschiedliche Expressionslevel des Genes EWS/FLI1 in MSC, den EWS/FLI1-infizierten mesenchymalen Stammzellen (MSC mit EWS/FLI1) als auch in den unterschiedlichen Ewing-Zellen dargestellt. Hier wird deutlich, dass EWS/FLI1, im Gegensatz zu Ewing-Tumorzellen, in MSC nicht nachweisbar ist, sondern erst durch deren Infektion mit dem Fusionstranskript (Abb. 23). Auch innerhalb der Ewing-Zellen wird das Fusionsgen in unterschiedlichem Maße exprimiert, wobei es bei der Zelllinie A673 am höchsten und bei SK-N-MC am niedrigsten durch die qRLT-PCR detektierbar ist (Abb. 23).

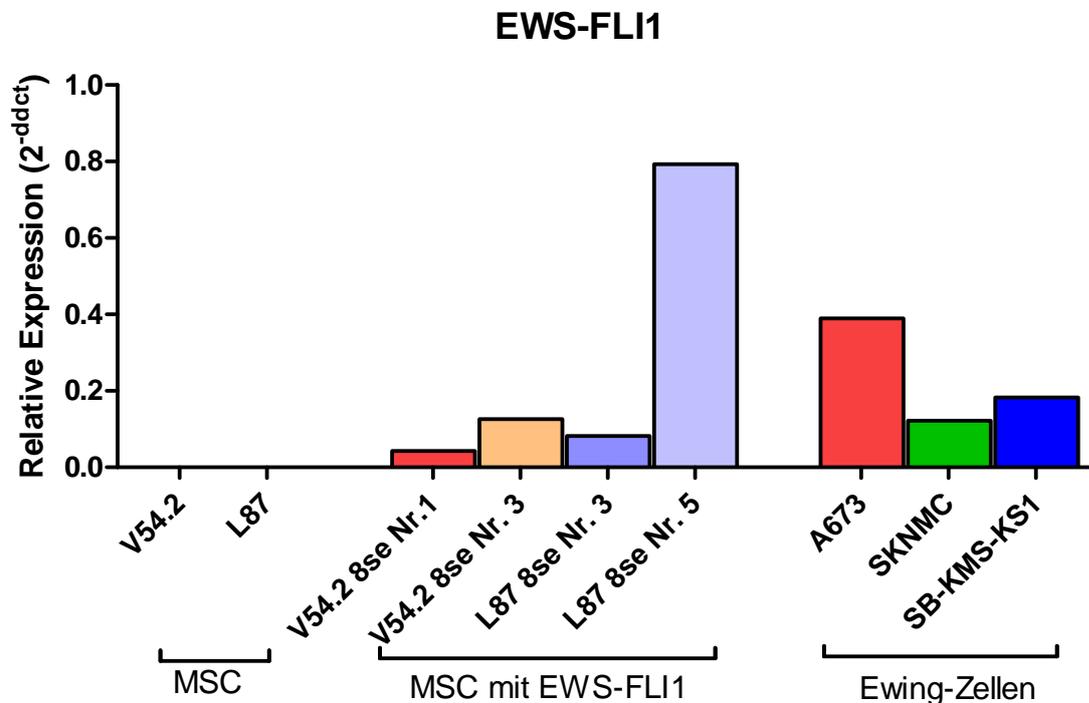


Abb. 23: EWS/FLI1-Expression der unterschiedlichen getesteten Zellen

### 3.4.1 Western-Blot

Im Western-Blot der EWS/FLI1-transfizierten MSC-Linien L87 und V54.2 mit dem Vektor pMSCVNeo konnten mehrere Klone mit erhöhter EWS/FLI1-Expression auf Proteinebene ausgemacht werden (Abb. 24). Als Kontrolle diente hierbei die Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT). Die Klone V54.2 Nr.1 und Nr. 3 wie auch die Klone Nr. 3 und Nr. 5 der Zelllinie L87 zeigten den höchsten Gehalt an EWS/FLI1-Protein, weshalb die anschließende genetische Untersuchung mit der qRLT-PCR anhand dieser Klone erfolgte (s. Kapitel 3.4.2).

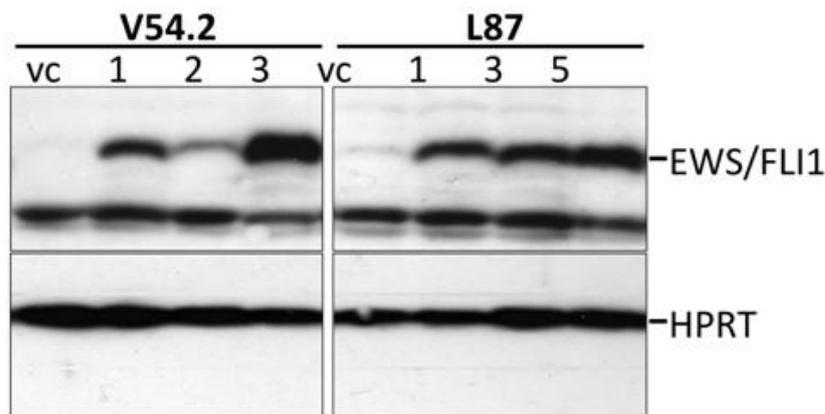
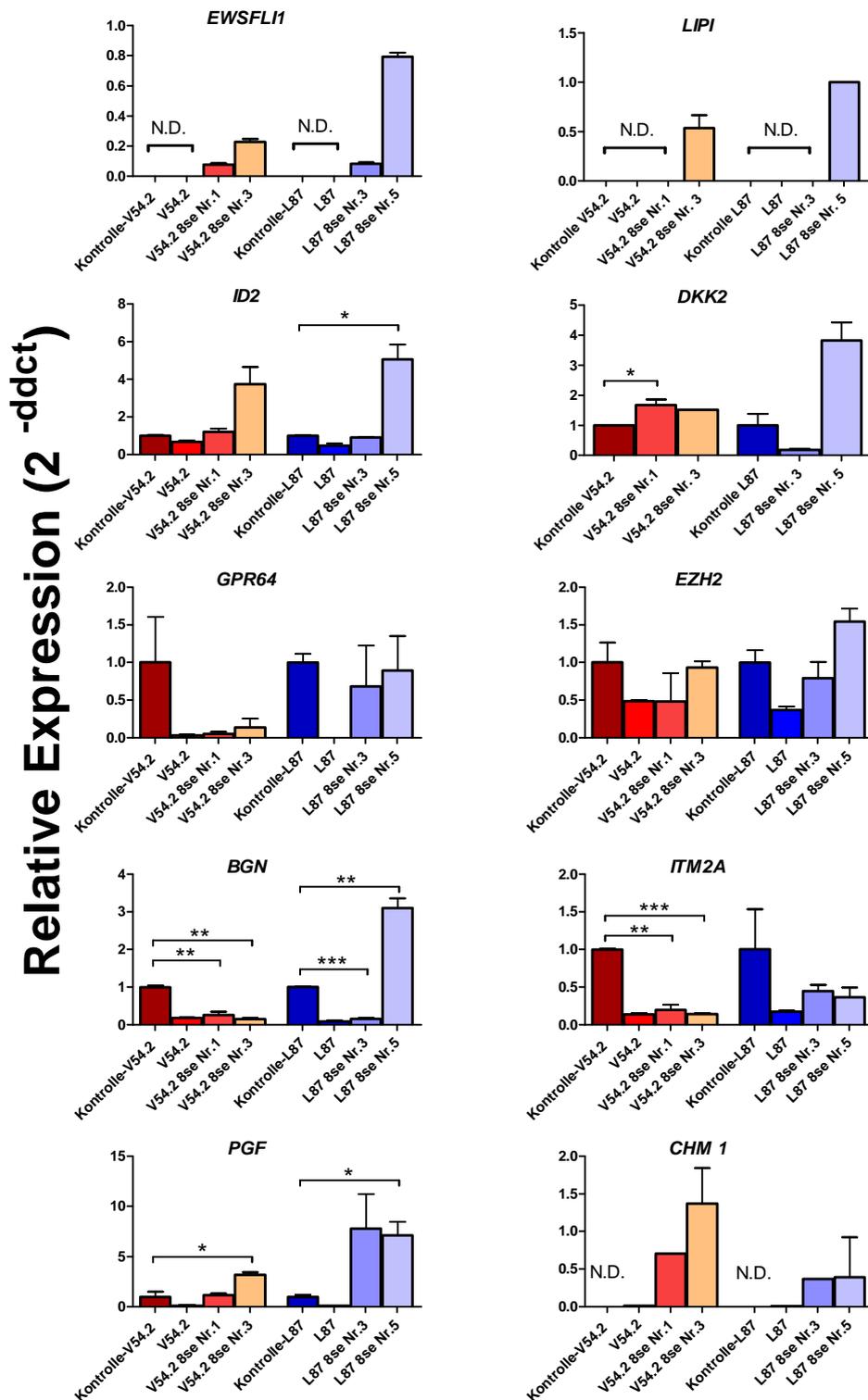


Abb. 24: Western-Blot der EWSFLI1-infizierten MSC

### 3.4.2 qRLT-PCR

In der qRLT-PCR der EWS/FLI1-transduzierten MSC V54.2 und L87 mit ihren unterschiedlichen Klonen konnte das Fusionstranskript EWS/FLI1 für alle Zellen, wenn auch in unterschiedlicher Ausprägung, nachgewiesen werden. Bei den jeweiligen Kontrollen (unbehandelte Zellen und Zellen der jeweiligen MSC, die mit dem leeren Vektor pMSCV Neo versetzt waren) lag der Gehalt an EWS/FLI1-mRNA erwartungsgemäß unter der Nachweisgrenze. Der Klon Nr. 3 der Zelllinie V54.2 zeigte im Vergleich zu den restlichen getesteten MSC die höchste Expression des Fusionsgens, die auch bei den Genen ID2, GPR64, PGF ( $p=0,0316$ ) und CHM1 im Vergleich zu unbehandelten MSC hochreguliert war (Abb. 25). Eine Ausnahme war das Gen DKK2, welches nur bei Klon Nr. 1 signifikant hochreguliert war ( $p=0,0391$ ). Gegensätzlich verhielten sich die Gene BGN und ITM2A, die bei Klon Nr. 1 (BGN:  $p=0,0089$ ; ITM2A:  $p=0,0039$ ) und Nr. 3 (BGN:  $p=0,0021$ ; ITM2A:  $p=0,0002$ ) im Vergleich zur Kontrolle signifikant supprimiert waren. Der Klon Nr. 5 der Zelllinie L87 enthielt offensichtlich die höchste Konzentration des EWS/FLI1-Transkriptes (Abb. 25) und in der qRLT-PCR konnte dementsprechend eine starke Hochregulation der Gene LIPI, ID2 ( $p=0,0185$ ), DKK2, BGN ( $p=0,0075$ ), PGF ( $p=0,0240$ ) und EZH2 gemessen werden (Abb. 25). Das Gen LIPI konnte nur bei den Klonen mit der höchsten EWS/FLI1-Expression nachgewiesen werden (Klon Nr. 3 der Zelllinie V54.2 und Klon Nr. 5 der Zelllinie L87), wohingegen das Gen ITM2A beim Klon Nr. 5 der Zelllinie L87 im Vergleich zu den unbehandelten MSC herunter reguliert wurde, was den Ergebnissen der MSC V54.2 entspricht (siehe Abb. 25).

## Mesenchymale Stammzellen



## Mesenchymale Stammzellen

Abb. 25: Genexpression der EWSFL1- Infektanten der mesenchymalen Stammzellen.

Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

N.D.: nicht detektierbar.

---

# Kapitel 4

## Diskussion

### 4.1 Histon-modulierende Substanzen

Histon-modulierende Substanzen wie der Histondeacetylaseinhibitor (HDACi) Trichostatin A (TSA) und der Histonmethyltransferaseinhibitor Chaetocin (Greiner et al., 2005) sind in der Lage den eukaryoten Zellzyklus in vielerlei Hinsicht zu beeinflussen. So konnte durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mittels Bromdesoxyuridin (BrdU)-Assay gezeigt werden, dass verschiedene Ewing-Zelllinien auf die Behandlung mit diesen Inhibitoren mit einem ausgeprägten konzentrationsabhängigen Rückgang ihres Wachstums reagieren. Von HDACis ist bekannt, dass sie Ratten-Fibroblasten dauerhaft in der G1- bzw. G2-Phase des Zellzyklus halten (Yoshida et al., 1990) wie auch die Differenzierung transformierter Zellen induzieren und deren Zellwachstum durch apoptotische Prozesse beeinflussen (Marks et al., 2000). Daher ist davon auszugehen, dass auch die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Proliferationsminderung der Ewing-Zellen auf einem durch TSA und Chaetocin ausgelösten Zellarrest, wie auch auf Induktion des programmierten Zelltodes beruht. Im Vergleich dazu erwiesen sich die anderen getesteten Zellen aus der Gruppe der „small round blue cell tumors“, wie die Neuroblastomzelllinie SIMA und die Leukämiezellen cALL-2, als weniger empfindlich gegenüber den Histon-modulierenden Substanzen. So reagierten diese erst ab einer Chaetocin-Konzentration von 25 nM mit einer drastischen Abnahme ihrer Proliferation im BrdU-Assay (Abb. 6), während die Inkubation mit TSA das Wachstum dieser Zellen überhaupt nicht beeinflusste (Abb. 5). Die unter Chaetocinbehandlung beobachtete Proliferationsminderung der Zelllinien SIMA und cALL-2 beruht am ehesten auf direkter letaler Schädigung der Zellen. Deshalb wurde auf eine Inkubation mit den übrigen Kinaseinhibitoren und auf nachfolgende Untersuchung der Genexpression der beim Ewing-Tumor involvierten Gene (Staege et al., 2004a) mittels quantitativer Real-Time-PCR (qRLT-PCR) bei den Zelllinien SIMA und cALL-2 verzichtet.

Die Ewing-Zellen hingegen wurden mit Konzentrationen Histon-modulierender Substanzen inkubiert, die im vorausgegangenen BrdU-Assay zwar eine Proliferationsminderung bewirkt, die Zellen jedoch nicht letal geschädigt hatten. So konnte die durch beide Histon-modulierende Substanzen ausgelöste Proliferationsminderung mit einer Suppression der Genexpression für EWS/FLI1 bei allen getesteten Ewing-Zellen in Verbindung gebracht werden. Im Gegensatz zu den Ewing-Tumorzellen exprimieren die Neuroblastomzelllinie SIMA und die Leukämiezellen cALL-2 das Fusionstranskript EWS/FLI1 nicht (Staege et al., 2004a), was eine Erklärung für deren geringere Empfindlichkeit auf die getesteten Histon-modulierenden Substanzen sein könnte. Denn sowohl im BrdU-Assay mit TSA als auch unter

Chaetocin-Behandlung zeigten sich diejenigen Ewing-Zellen in ihrer Proliferation am stärksten beeinflusst, die auch in der anschließenden qRLT-PCR die geringste EWS/FLI1-Expression aufwiesen. Diese Suppression des Fusionsgens könnte zur Inhibition der Zellproliferation mit dauerhaftem Verbleib der Zellen in der G0/G1-Phase (Matsumoto et al., 2001) des Zellzyklus geführt haben. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen die von May et al. (1993a) erbrachte These, dass EWS/FLI1 als Onkogen unter anderem für das Wachstum entarteter Zellen wie dem Ewing-Tumor verantwortlich ist. Vergleichbare Beobachtungen machten Sakimura et al. (2005), die den proliferationsmindernden Effekt der HDACis auf einen Rückgang des EWS/FLI1-Proteins zurückführten. Dadurch konnte nicht nur das durch EWS/FLI1 hervorgerufene Missverhältnis der Histonacetylierung zu Gunsten der Histon-Acetyl-Transferase korrigiert (Sakimura et al., 2005), sondern auch über die Aktivierung von Tumor-Suppressor-Genen die Inhibition des Tumorwachstums erzielt werden (Abb. 1). Die Expressionsminderung des Gens EWS/FLI1 fiel in der vorliegenden Arbeit für die getesteten Ewing-Zellen jedoch unterschiedlich stark aus, was neben dem inhomogenen Histon-Deacetylase-Gehalt der Zellen und dem damit verbundenen ungleichen Acetylierungsgrad ihrer Histone auch von ihrem differierenden Ausgangs-Expressionslevel an EWS/FLI1 (Abb. 24) abhängen könnte. Nach Vermutung von Sakimura et al. (2005) beruht die HDACi-abhängige Inhibition der EWS/FLI1-Expression auf einer Suppression der EWS-Promotorregion. Ob dies nun direkt oder über indirekte Mechanismen zur Suppression der EWS/FLI1-Expression führt, bleibt dabei noch zu klären. Es ist jedoch davon auszugehen, dass dadurch weitere Gene beeinflusst werden, die an den EWS/FLI1-Transkriptionsfaktor gekoppelt sind. Bekannt ist, dass HDACis wie TSA über die Hemmung der Angiogenese zu einem vermehrten Rückgang maligner Zellen *in vitro* führen, was die Invasion entarteter Zellen und somit auch die Progression des Tumorwachstums verhindern kann (Ocker und Schneider-Stock, 2007; Ellis et al., 2008). Das Gen PGF (placenta growth factor) ist ein Mitglied der VEGF-Subfamilie (Vascular endothelial growth factor), die als wichtige Signalproteine sowohl an der Vaskularisierung als auch an der Angiogenese beteiligt sind. Chondromodulin (CHM1) stellt ein weiteres für die Angiogenese wichtiges Gen dar. Es hemmt als knorpelspezifischer Wachstumsfaktor die Proliferation von Gefäßendothelzellen, wie auch die zur Gefäßbildung notwendige tubuläre Umstrukturierung *in vitro*. Die Gefäßeinsprossung in avaskulären Knorpel und dessen Verknöcherung wird auf diese Weise verhindert (Hiraki et al., 1997).

Die antiangiogene Wirkung der eingesetzten Histon-modulierenden Substanzen ließ sich durch die verminderte Genexpression von PGF in der qRLT-PCR der vorliegenden Arbeit nach Behandlung mit TSA bei der Zelllinie SB-KMS-KS1 und nach Chaetocin-Inkubation sogar für alle getesteten Ewing-Zellen bestätigen, wobei die Gene PGF und CHM1 bei der Zelllinie A673 durch die Inkubation mit Chaetocin bei der Konzentration 10 nM statistisch signifikant gegenüber der Kontrolle supprimiert wurden.

Durch die Inkubation mit TSA konnte für die Zelllinie SB-KMS-KS1 sowohl die stärkste Suppression der Gene EWS/FLI1, PGF und CHM1 als auch die ausgeprägteste Inhibition der Proliferation im BrdU-Assay erreicht werden. Für die Zelllinie SK-N-MC ergab die TSA-Behandlung ebenfalls eine Expressionsminderung des Gens CHM1 unter den detektierbaren Bereich. Bei der Zelllinie A673 führte TSA hingegen zur teilweise signifikanten Überexpression der Gene GPR64, BGN (Biglykan), PGF,

---

EZH2 (enhancer of zeste homolog 2), CHM1, LIPI, PGF, ID2 und DKK2 (Dickkopf homolog 2). Des Weiteren erfolgte durch die Inkubation mit den Histon-modulierenden Substanzen neben der bereits erwähnten Expressionshemmung der Gene CHM1 und PGF auch die Suppression der Gene BGN, DKK2, EZH2, GPR64 (G protein-coupled receptor 64) und LIPI (Membran-assoziierte Phospholipase A1- $\beta$ ). Durch TSA konnten diese Gene bei der Zelllinie SB-KMS-KS1 bis auf BGN und EZH2 deutlich supprimiert werden (GPR64 signifikant, alle anderen unter die Detektionsgrenze). Zusätzlich konnte in der qRLT-PCR für das Gen ITM2A (integral membrane protein 2) zumindest bei den TSA-behandelten Ewing-Zellen der Linie A673 eine dem EWS/FLI1-Gehalt gegenläufige Induktion der Genexpression gezeigt werden (für ITM2A bei Zelllinie A673  $p=0,001$ ).

Im Gegensatz zu dem eher uneinheitlichen Bild bei TSA, folgten die meisten Gene bei den Chaetocin behandelten Zellen der Expressionsminderung von EWS/FLI1. Abgesehen von LIPI bei SB-KMS-KS1, ID2 und EZH2 waren alle untersuchten Gene bei den behandelten Zellen meist signifikant herunter reguliert. Im Detail erwies sich nach Inkubation mit Chaetocin die Suppression des Gens BGN bei der Zelllinie A673 ( $p=0,040$ ) wie auch bei der Zelllinie SB-KMS-KS1 ( $p=0,047$  bei 10nM), des Gens DKK2 bei den Zelllinien SK-N-MC ( $p=0,020$  bei 5 nM;  $p=0,0022$  bei 10 nM) und SB-KMS-KS1 ( $p=0,039$  bei 5 nM) als signifikant. Die bei der Zelllinie A673 durch Chaetocin ausgelöste signifikante Suppression des Gens GPR64 erwies sich zudem als konzentrationsabhängig ( $p=0,0051$  bei 5 nM;  $p=0,0027$  bei 10 nM). Falls dieser Zusammenhang *in vivo* ebenso vorliegt, könnten die an der Differenzierung von Chondro- bzw. Osteoblasten beteiligten Gene BGN, GPR64, ITM2A und DKK2 für die vermehrte Lokalisation des Ewing-Tumors im Knochengewebe mit verantwortlich sein und das Vorkommen des Ewing-Tumors zu Zeiten erhöhten Knochenwachstums erklären, wie auch eine Aussage über die Lokalisation des Tumors und den ossären Phänotyp ermöglichen. Nach Behandlung mit TSA konnte für alle getesteten Ewing-Zellen, trotz reduzierter EWS/FLI1-Rate, eine erhöhte ID2-Expression gemessen werden. Auch nach Chaetocin-Inkubation konnte bei der Zelllinie SB-KMS-KS1 eine konzentrationsabhängige Induktion der Expression des Gens ID2 festgestellt werden.

Der positive Nutzen der HDACis durch ihren proliferationsmindernden Effekt auf maligne transformierte Zellen ließ sich bereits in klinischen Studien der Phase I bezüglich der Wirkung des Inhibitors MGCD0103 bei Patienten mit hämatologischen Erkrankungen (Le Tourneau und Siu, 2008) wie auch bei Patienten mit soliden Tumoren bestätigen (Zhou et al., 2008). Dies macht die HDACis zu einer wichtigen Substanzgruppe im Hinblick auf innovative Therapiemöglichkeiten gegen maligne Erkrankungen wie den Ewing-Tumor, auch synergistisch in Verbindung mit anderen Therapeutika. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit scheint Chaetocin besser geeignet für einen therapeutischen Einsatz, da nicht nur EWS/FLI1, sondern die meisten der untersuchten Ewing-Tumor-assoziierten Gene herunter reguliert werden konnten.

## 4.2 MEK/MAPK-Pathway-beeinflussende Substanzen

Die MEK/MAPK-Enzymkaskade ist an physiologischen Zellprozessen wie der Genexpression, der Differenzierung (Pearson et al., 2001) und der Apoptose (Xia et al., 1995) vieler Zellen beteiligt. Bei Fehlregulation kann dies jedoch auch zu maligner Transformation (Raitano et al., 1995; Xu et al., 1996) und somit zu Neoplasien wie dem Ewing-Tumor führen. Dieser Signaltransduktionsweg bietet daher eine gute Grundlage die Tumorentstehung zu verstehen und innovative Therapiestrategien für die Behandlung des Ewing-Tumors zu entwickeln. In der vorliegenden Arbeit konnte durch Inkubation der Ewing-Zellen mit den MEK<sub>1/2</sub>-Inhibitoren P215 und U0126, im Gegensatz zu den Kinaseinhibitoren SB 202190 und SB 203580, ein Rückgang ihres Zellwachstums beobachtet werden. Für die nachfolgenden qRLT-PCRs wurde dies bei den Zelllinien SB-KMS-KS1 (für P215;  $p=0,0001$ ), SK-N-MC (für SB 202190;  $p=0,0146$ ), A673 und SK-N-MC (für SB 203580) mit der höchsten Expressionsminderung des Gens EWS/FLI1 in Verbindung gebracht. Die EWS/FLI1-abhängige Aktivität des MEK/MAPK-Signalweges (Silvany et al., 2000) konnte bereits in vorausgegangenen Arbeiten durch eine MEK<sub>1/2</sub>-Inhibition mit den Substanzen P215 und U0126 vermindert werden, was zu einer geringeren Aktivität des in der Signalkaskade anschließenden Enzyms ERK<sub>1/2</sub> und darüber zu vermindertem Wachstum der Zellen durch Zellarrest in der G1-Phase des Zellzyklus führte (Benini et al., 2004). Unter Einfluss von U0126 war dies ausgeprägter zu beobachten (Silvany et al., 2000), was sich auch in der vorliegenden Arbeit durch die stärkste Proliferationsminderung der Ewing-Zellen durch U0126 aus der Gruppe der MEK/MAP-Kinaseinhibitoren widerspiegelte. Die von EWS/FLI1 ausgehende Aktivierung dieses Signaltransduktionsweges beruht auf der FLI1-Bindungsdomäne des Fusionsgens, wobei die EWS/FLI1-Protein-Expression mit der Höhe der ERK-Aktivität korreliert (Silvany et al., 2000). Ob es sich hierbei um eine direkte oder indirekte Stimulation der ERK-Enzyme durch EWS/FLI1 handelt, ist bisher unklar. Der EWS/FLI1-Typ II zeigt dabei eine stärkere Transkriptionsaktivität und damit verbunden eine höhere MAP-Kinase- und ERK-Aktivität als der prognostisch günstigere Typ I (de Alva et al., 1998; Zoubek et al., 1996), dem beispielsweise die Zelllinie SB-KMS-KS1 der vorliegenden Arbeit zugehörig ist.

Auch an der Entstehung anderer Neoplasien wie dem Mamma-Karzinom (Sivaraman et al., 1997), dem Kolon-Karzinom (Sebolt-Leopold et al., 1999) und den Gliomen (Mandell et al., 1998) ist das ERK<sub>1/2</sub>-Enzym beteiligt. Die Aktivierung dieses Enzyms erfolgt durch IGF-1-Stimulation (insulin like growth factor) (Thimmaiah et al., 2003), was durch den Kinaseinhibitor P215 aufgehoben werden kann und schließlich die Proliferation der Zellen verhindert. IGF-1 ist als Tyrosinkinase an physiologischen Prozessen über die Inhibition apoptotischer Prozesse und der Proliferation von Zellen beteiligt. Zudem korreliert IGF-1 positiv mit dem Körperwachstum (Gourmelen et al., 1984), weshalb es in Zeiten erhöhten Wachstums wie der Pubertät verstärkt im Serum nachweisbar ist (Ranke et al., 1988). In vielen Zellen findet zudem eine autokrine Produktion des Proteins IGF-1 statt, die bei Zellen mit t(11;22) Translokation (Yee et al., 1990), die für das Fusionsgen EWS/FLI1 codiert, stark erhöht ist. Dies führt zur malignen Transformation von Zellen (Baserga, 1995; Toretsky et al., 1997a) und verursacht das für Tumorzellen typische unkontrollierte Wachstum. Ähnliches konnte in Versuchen mit

EWS/FLI1 transfizierten mesenchymalen Stammzellen (MSC) (Cironi et al., 2008) wie auch bei Prieur et al. (2004) durch das Silencing von EWS/FLI1 mit nachfolgender Veränderung der bei der Entstehung des Ewing-Tumors involvierten Signalwege nachgewiesen werden. So verstärkt das Fusionsgen EWS/FLI1 die IGF-1-Expression und beeinflusst darüber die Aktivität des MEK/MAPK-Regulationsweges (Kurihara et al., 2000), höchst wahrscheinlich über eine direkte Stimulation der ERK<sub>1/2</sub>-Enzyme. Diese Erkenntnisse machen den IGF-1R-Regulationsweg und die ihm nachfolgenden Enzymkaskaden zu wichtigen Zielstrukturen neuer Therapieoptionen gegen maligne Erkrankungen.

Für den MAPK-Inhibitor SB 203580 ist hingegen kein nennenswerter Effekt auf die ERK<sub>1/2</sub>-Aktivität bekannt (Benini et al., 2004). Vielmehr werden durch diese Substanz mehrere Enzymklassen unspezifisch und konzentrationsabhängig (100 µM) stimuliert, wie z. B. MAPKAP-Kinase 2, c-Raf, p70 S6Kinase und die Protein-Kinase A, wodurch unter anderem die Proliferation und Differenzierung der Zellen beeinflusst werden kann (Cuenda et al., 1995). Das Protein p38 hingegen kann hierdurch schon ab Konzentrationen von 1-10 µM gehemmt werden. Der proliferationsmindernde Effekt und die darauf folgenden qRLT-PCR Ergebnisse für SB 203580 bei der gewählten Konzentration von 30 µM der vorliegenden Arbeit sind daher am ehesten auf unspezifische Hemmung oben genannter Proteine zurückzuführen. Der Kinaseinhibitor SB 202190 (50 µM) induziert bei T-Lymphozyten eine caspase-abhängige Apoptose (Nemoto et al., 1998). Bei den getesteten Ewing-Zellen der vorliegenden Arbeit konnte durch diese Substanz jedoch kein nennenswerter proliferationsmindernder Effekt beobachtet werden.

Nach Behandlung der Ewing-Zellen mit den MEK/MAPK-Inhibitoren P215, U0126, SB 202190 und SB 203580 ließ sich dagegen in der qRLT-PCR-Messung ein ähnliches Expressionsmuster für die Gene GPR64, BGN, PGF und CHM1 wie auch für LIPI, DKK2 und ITM2A erkennen. Das Gen PGF wies bei den Zelllinien A673 und SK-N-MC nach Behandlung mit SB 20190 eine stark verminderte Expression im Vergleich zur Kontrolle auf. Entsprechendes konnte bereits durch Bellik et al. (2005) gezeigt werden, indem die durch PGF bedingte Proliferation hypoxischer Zellen durch den p38 MAP-Kinase-Inhibitor SB 202190 und den PI3-Kinase-Inhibitor LY 294002 gemindert werden konnte. PGF phosphoryliert u.a. in den glatten Muskelzellen der Gefäße auf Hypoxie-Stimulation die Enzyme Akt und MAPK (Bellik et al., 2005), was über die Aktivierung des Flt-1-Rezeptors (fms-ähnliche Tyrosinkinase) zur Proliferation der Zellen führt und deren Apoptose verhindert (Landgren et al., 1998; Neufeld et al., 1999). Auch für die chemische Substanz SB 203580 konnte durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ein ähnlicher Effekt auf das Gen PGF aufgezeigt werden, wobei sich für die Zelllinien A673 und SB-KMS-KS1 die niedrigste Expression dieses Gens ergab. Im direkten Vergleich konnte die Proliferation der Zellen durch den Kinaseinhibitor SB 202190 stärker beeinflusst werden als durch SB 203580. In der durchgeführten qRLT-PCR zeigte sich jedoch kein nennenswerter Unterschied in der Genexpression zwischen beiden Substanzen. Die Zelllinie SK-N-MC reagierte von allen Zellen am empfindlichsten auf die Inkubation mit SB 202190. Dies zeigte sich neben der stärksten Suppression von EWS/FLI1 innerhalb der MAP-Kinaseinhibitoren nachfolgend auch in der Expression der Gene BGN, CHM1, GPR64 und PGF, die unter die Detektionsgrenze supprimiert wurden. Wegen der hohen Varianz der Kontrolle war die Suppression der aufgeführten Gene jedoch nicht statistisch signifikant.

---

Die verwendeten MEK/MAPK-Inhibitoren dieser Arbeit führten, mit Ausnahme von U0126, zu einer geringeren Proliferationsminderung, v.a. im Vergleich mit den Histondeacetylase-Inhibitoren. Dennoch war U0126 neben TSA einer der einzigen Kinaseinhibitoren, der auf alle getesteten Ewing-Zellen in ähnlichem Maße proliferationshemmend wirkte. Damit übereinstimmend bewirkte U0126 auch in der qRLT-PCR-Messung eine klare Expressionsminderung von EWS/FLI1 bei allen 3 getesteten Zelllinien (signifikant, außer SB-KMS-KS1, wegen hoher Variabilität in der Versuchsgruppe).

## 4.3 PI3K-Pathway-beeinflussende Substanzen

### 4.3.1 LY 294-002 und Wortmannin

Schon seit längerem ist der IGF-1R-Signaltransduktionsweg für seine Beteiligung an der Entstehung, dem Wachstum und der Metastasenbildung von Tumoren und für deren Resistenz gegenüber Chemotherapeutika wie Doxorubicin bekannt (Scotlandi et al., 1998). Dies wird neben dem bereits erwähnten MAP-Kinase-Regulationsweg über die Enzymkaskaden Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) und die Protein-Kinase B (Akt) vermittelt, die apoptotische Prozesse in Zellen verhindern und somit deren Überleben sichern (Abb. 1). In Versuchen von Scotlandi et al. (1996) erbrachte die Antikörper-vermittelte Inhibition des IGF-1-Pathways bei der Askin-Tumor-Zelllinie SK-N-MC eine verminderte Migrationsfähigkeit und geringere Koloniebildung im Softagar, was als Modell für die Transformation und das Wachstum von Zellen *in vivo* dient. In Versuchen von Kang et al. (2010) konnte durch Inhibition des IGF-1-Rezeptors mittels Epigallocatechingallat (aus Grünem Tee) die Zellproliferation und das Überleben der Ewing-Tumorzellen zeit- und dosisabhängig durch Induktion der Apoptose und des Zellzyklusstopps beeinflusst werden. Diese Eigenschaften des IGF-1-Regulationsweges konnten ebenfalls durch den Einsatz von PI3K-Inhibitoren wie Wortmannin, Rapamycin und LY 294-002 gehemmt werden und führten über einen synergistischen Gebrauch mit Doxorubicin, einem in der Behandlung des Ewing-Tumors gebräuchlichen Induktions-Chemotherapeutikums, zu höheren Apoptoseraten als es jede einzelne chemische Substanz hätte bewirken können (Toretzky et al., 1999). Eine direkte Antikörper-vermittelte Inhibition des IGF-1-Rezeptors führte ebenfalls zu verbesserter Doxorubicin-Wirkung und vermehrter Apoptose. Andererseits konnte durch die exogene Zufuhr von IGF-1 die durch die PI3-Kinase-Inhibitoren verursachte Wachstumshemmung der Zellen wieder aufgehoben werden (Benini et al., 2004). Dies stützt den direkten Zusammenhang zwischen IGF-1 und der PI3-Kinase-Kaskade. Wortmannin stellte sich bei diesen Versuchen als potenterer Inhibitor im Vergleich zu LY 294-002 dar, was sich in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht bestätigen ließ. Alle PI3-Kinaseinhibitoren der vorliegenden Arbeit führten zu reduziertem Zellwachstum, wohingegen dieses durch Inkubation mit LY 294-002 am deutlichsten zu verzeichnen war. Auch bei der anschließenden qRLT-PCR-Messung ergab die Inkubation mit LY 294-002 die stärkste Suppression aller Gene bei der Zelllinie SB-KMS-KS1. Mit Ausnahme der Gene CHM1 und ID2 wurde diese sogar unter den detektierbaren Bereich supprimiert. Eine mögliche Abhängigkeit von EWS/FLI1 ergab sich für die Gene LIPI und CHM1, bei denen die Expression bei allen Zelllinien

analog zu EWS/FLI1 herunter reguliert war. In der Expression von EWS/FLI1 unterschieden sich die PI3-Kinaseinhibitoren LY 294-002 und Wortmannin nicht nennenswert. Es ist davon auszugehen, dass die durch den Kinaseinhibitor LY 294-002 ausgelöste Wachstumsminde- rung der Ewing-Zellen wie beim Multiplen Myelom auf einem konzentrationsabhängigen Stopp des Zellzyklus in der G0/G1-Phase und zusätzlich eingeleiteter apoptotischer Prozesse beruht (Pene et al., 2002). Dementsprechend ist der PI3-Kinase-Pathway für das Überleben der Ewing-Zellen entscheidend. Dies ist von der PI3-Kinase-induzierten Aktivierung des Enzyms Akt (Proteinkinase B) abhängig, welches seinerseits u.a. den Tumorsuppressor p53 aktiviert, der als Transkriptionsfaktor nach DNA-Schädigung entweder die Genexpression in der G2-Phase des Zellzyklus stoppt und DNA-Reparaturprogramme oder schließlich apoptotische Prozesse einleitet (Downward, 2004).

Anhand der zuvor durchgeführten BrdU-Assays wurden in der vorliegenden Arbeit die Konzentrationen der Kinaseinhibitoren LY 294-002 und Wortmannin im Vergleich zu der Arbeit von Bellik et al. (2005) höher gewählt (Bellik et al, 2005: LY 294-002 (10-30  $\mu$ M); SB 202190 (1-10  $\mu$ M)). Hierdurch konnte mit der Konzentration von 80  $\mu$ M für LY 294-002 das Gen PGF bei den Zelllinien SB-KMS-KS1 und SK-N-MC sogar unter den detektierbaren Bereich supprimiert werden, wohingegen es bei den Zellen A673 stark überexprimiert wurde. Wegen der hohen Varianz von Kontrolle und behandelten Zellen war das Ergebnis für PGF jedoch wenig aussagekräftig.

Für die mit Wortmannin behandelten Zellen ergab die qRLT-PCR ein einheitliches Bild, mit Expressionserhöhung des Gens PGF bei allen getesteten Ewing-Zellen, insbesondere jedoch erneut bei der Zelllinie A673. Das Gen PGF ist in der Lage, über die Phosphorylierung der Enzyme Akt (Proteinkinase B) und MAP-Kinase deren Aktivierung auszulösen und schließlich die Proliferation der Zellen zu steuern, was über PI3-Kinase-Inhibitoren wie LY 294-002 (Bellik et al., 2005) und Wortmannin (Ferby et al., 1996) wieder aufgehoben werden kann. Der mögliche Zusammenhang zwischen der Expression des Gens PGF und der Zellproliferation konnte auch anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit hergestellt werden, wobei die Zellen mit der stärksten Proliferationsminde- rung im BrdU-Assay auch die geringste Expression des Gens PGF in der qRLT-PCR nach Behandlung mit allen getesteten PI3-Kinase-Inhibitoren aufwiesen. Auch Beobachtungen von Errico et al. (2004) zeigten die Beteiligung des Gens PGF an der Differenzierung, Proliferation und Migration von Endothel-Zellen, was es zu einer wichtigen Zielstruktur z.B. auch bei der Bekämpfung des Mamma-Karzinoms macht (Taylor und Goldenberg, 2007). Nach Behandlung mit Wortmannin erwies sich die Überexpression der Gene GPR64 und BGN bei der Zelllinie SK-N-MC wie auch ihre Suppression bei der Zelllinie A673 der vorliegenden Arbeit als statistisch signifikant (GPR64:  $p=0,0216$  bei A673,  $p=0,0079$  bei SK-N-MC; BGN: bei A673 nicht signifikant;  $p=0,028$  bei SK-N-MC). Ein einheitliches Muster der Genexpression bei allen drei Zelllinien ergab sich neben EWS/FLI1 lediglich für LIPI, das bei allen behandelten Zellen eine erhöhte Expression aufwies.

Die insgesamt uneinheitliche Genexpression der getesteten Ewing-Zelllinien beruht möglicherweise auf einer uneinheitlichen autokrinen Expression an IGF-1 infolge unterschiedlich ausgeprägter EWS/FLI1-Expression bei den Zellen schon in unbehandeltem Zustand (Yee et al., 1990), wie auch auf deren differierenden Gehalt an Akt. Dieser Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Des Weiteren ist davon auszugehen, dass sich schon bei den verschiedenen un-

behandelten Ewing-Zellen die Expression von Genen, die am Zellzyklus beteiligt sind, unterscheidet. Zu diesen sind neben dem Fusionstranskript EWS/FLI1 u.a. auch ID2 und EZH2 zu zählen, die positiven Einfluss auf das Zellwachstum nehmen. Dadurch könnte sich auch die hohe Variabilität der Genexpression der durch PI3-Kinaseinhibitoren beeinflussten Zellen erklären.

Da für den spezifischen PI3-Kinase-Inhibitor LY 294-002 die mittlere inhibitorische Wirkung ( $IC_{50}$ ), bei der 50% des zu antagonisierenden Substrats *in vivo* gehemmt wird, bei 1,4  $\mu$ M liegt, die qRLT-PCR-Messungen für diese Substanz in der vorliegenden Arbeit jedoch auf Konzentrationen von 80  $\mu$ M beruhen, ist davon auszugehen, dass die beobachteten Effekte auch auf unspezifische Beeinflussung zurückzuführen sind. Hierbei handelt es sich um die in Tumorzellen gehäuft vorkommende Casein-Kinase 2 (CK2), deren Inhibition durch LY 294-002 proliferative Prozesse der Zellen über das Enzym Phospholipase C und den Calcium-Signalweg verändert (Gharbi et al., 2007). Wortmannin hemmt mit seiner  $IC_{50}$  von 5 nM spezifisch die PI3-Kinase der Klassen I-III. In höheren Konzentrationen wie sie auch in dieser Arbeit gewählt wurden, hemmt Wortmannin jedoch auch unspezifisch Enzyme wie MAPK p38 und mTOR (mammalian target of Rapamycin) (Vanhaesebroeck et al., 2001). Dennoch stellen die PI3-Kinase-Inhibitoren eine wichtige Substanzgruppe für die Entwicklung neuer Therapien gegen maligne Erkrankungen dar. So konnten in bisher durchgeführten klinischen Studien durch die Anwendung von PI3-Kinase-Inhibitoren bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) in Hinblick auf Proliferationsminderung und verkürztes Zellüberleben der Tumorzellen gute Erfolge erzielt werden.

### 4.3.2 Rapamycin

Der PI3-Kinase-Inhibitor Rapamycin ist ebenfalls in der Lage bei Ewing-Zellen die Chimäre EWS/FLI1 über das Enzym mTOR herunterzuregulieren, welches vom EWS/FLI1-Typus abhängig in unterschiedlichem Maße exprimiert wird (Mateo-Lozano et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte die EWS/FLI1-Expression durch Rapamycin lediglich bei der Zelllinie SK-N-MC gehemmt werden. Im Gegensatz dazu führte die mTOR-Blockade durch Rapamycin bei den Ewing-Zellen A673 und SB-KMS-KS1 zu einem ausgeprägten Expressionsanstieg des Gens EWS/FLI1. Auch fiel die für Rapamycin beschriebene Proliferationsminderung der Ewing-Zellen im BrdU-Assay im Vergleich zu den restlichen getesteten Substanzen eher gering aus. Dies stützt die Beobachtungen von Wendel et al. (2004) und Chan (2004), dass mTOR-Inhibitoren wie Rapamycin zwar in der Lage sind, die Chemotherapieresistenz einiger Tumorzellen wie dem Mamma-Karzinom oder dem Nierenzell-Karzinom, in Abhängigkeit ihrer Akt-Aktivität, aufzuheben, jedoch nur in Kombination mit anderen Therapeutika ihre volle antionkogene Wirksamkeit entfalten. Weiterführend ist eine durch Rapamycin induzierte EWS/FLI1-abhängige Runterregulation des Gens ID2 und der Entwicklungsstopp in der G1-Phase des Zellzyklus bei Ewing-Zellen (Mateo-Lozano et al., 2003) wie auch die Hemmung der Proliferation und Differenzierung von Brustdrüsengewebe (Jankiewicz et al., 2006) beschrieben. ID2, welches als Helix-Loop-Helix-Protein die Differenzierung von Zellen inhibiert (Benezra et al., 1990) und gleichzeitig deren Proliferation aufrechterhält (Barone et al., 1994), ist neben dem Ewing-Tumor in

weiteren malignen Neoplasien wie dem Neuroblastom, dem Kolon-Karzinom und dem Adenokarzinom des Pankreas überexprimiert (Nishimori et al., 2002). Anhand des vergleichbaren Proliferationsmusters von EWS/FLI1 und ID2 ist auch in der vorliegenden Arbeit ein Zusammenhang beider Gene nach Behandlung mit Rapamycin zu vermuten. Bei den Zelllinien A673 und SB-KMS-KS1 wurde daher ID2 stark überexprimiert, wohingegen bei der Zelllinie SK-N-MC die Gene EWS/FLI1 und ID2 ( $p=0,002$  für ID2) supprimiert wurden. Nishimori et al. (2002) wie auch Riggi und Stamenkovic (2007) beschrieben eine EWS/FLI1-induzierte Hochregulation des Genes ID2, was sich in der vorliegenden Arbeit für die Zelllinien A673 und SB-KMS-KS1 bestätigen ließ. Anhand der Ergebnisse vorausgegangener Studien und den Resultaten der vorliegenden Arbeit ist die Kopplung dieser beiden Gene nach Behandlung mit Rapamycin für die Ewing-Zellen wahrscheinlich.

Der durch Mateo-Lozano et al. (2003) beschriebene Effekt der Rapamycin-induzierten Downregulation des Genes EWS/FLI1 beschränkte sich jedoch in der vorliegenden Arbeit nur auf die Zelllinie SK-N-MC. Bei den restlichen getesteten Ewing-Zellen wurde durch die Inkubation mit diesem Kinaseinhibitor eine Hochregulation der Gene EWS/FLI1 und ID2 ausgelöst. Dies könnte auf eine geringere Akt-Aktivität mit entsprechend weniger mTOR-Protein bei den Zelllinien A673 und SB-KMS-KS1 im Vergleich zu SK-N-MC zurückzuführen sein. Selbst im unbehandelten Zustand war die Ausgangs-Expression von EWS/FLI1 bei den Zelllinien A673 und SB-KMS-KS1 höher als die von SK-N-MC, weshalb sie möglicherweise über eine vermehrte autokrine IGF-1-Produktion den antiproliferativen Effekt von Rapamycin aufheben können. Letzteres konnte für Rhabdomyosarkom-Zellen nachgewiesen werden, die durch Zugabe von exogenem IGF-1 dem Rapamycin-induzierten Zelltod entkamen (Thimmaiah et al., 2003). Der IGF-1-Pathway, der über die PI3-Kinasekaskade die Enzyme Akt und mTOR direkt aktiviert, verhindert somit den programmierten Zelltod. Darüber hinaus ist bekannt, dass Rapamycin und andere PI3-Kinase-Inhibitoren die durch IGF-1 über Phosphorylierung ausgelöste Aktivierung des Proteins p70S6K blockieren können, welches an der Proliferation der Zellen beteiligt ist und somit den antiproliferativen Effekt dieses Kinaseinhibitors erklärt. Da Rhabdomyosarkome ebenfalls mesenchymalen Ursprungs sind, liegt die Vermutung nahe, dass auch die durch Rapamycin beobachtete Proliferationsminderung der Ewing-Zellen der vorliegenden Arbeit auf diesem Mechanismus beruht. Rapamycin und andere „targeted therapeutics“ wie Imatinib und Bevacizumab zeigten bereits in Phase I und II klinischer Studien bei der Behandlung von Kindern mit soliden Tumoren erfolgversprechende Ergebnisse (Grunewald et al., 2012). So konnte bei 15% der Patienten, bei synergistischer Therapie von Rapamycin mit Dasatinib, Irinotecan oder Temozolomid, eine komplette Remission des Tumors erreicht werden. Zudem traten jedoch auch Fälle mit progressivem Tumorwachstum auf. Die heterogenen Ergebnisse in der Therapie mit Rapamycin wie auch die weiterhin bestehenden unerwünschten Nebenwirkungen wie Infektionen oder toxische Kolitis stellen erneut die Wichtigkeit individueller Therapien und deren Überprüfung mittels geeigneter Biomarker in den Vordergrund.

## 4.4 Stabile siRNA-Infektanten

Das Onkogen EWS/FLI1 kontrolliert die Teilung und Differenzierung der Ewing-Zellen und führt über die Deaktivierung von Tumor-Suppressoren schließlich zum Tumorwachstum (Sakimura et al., 2005). Durch Ouchida et al. (1995) konnte die Tumorgenese von Ewing-Zellen durch die Einführung von antisense-Nukleotiden *in vivo* aufgehoben werden, was erneut die entscheidende Rolle von EWS/FLI1 für den Ewing-Tumor aufzeigt.

Um die vom EWS/FLI1-Fusionsgen ausgehende Entwicklung des Ewing-Tumors und die daran beteiligte Gengruppe näher charakterisieren zu können, wurden in dieser Arbeit mittels retroviralem Gentransfer bei der Ewing-Zelllinie A673 small interfering RNA (siRNA)-Infektanten mit EWS/FLI1-Suppression hergestellt. Die relative Expression des Gens EWS/FLI1 zeigte sich dabei v.a. bei dem Klon Nr. 3 als besonders supprimiert ( $p=0,022$ ), wohingegen der Klon Nr. 2 durch die siRNA in seiner EWS/FLI1-Expression weniger beeinträchtigt wurde, was eventuell an einer geringeren Expression der siRNA durch verminderte zelluläre Aufnahme bei der Transfektion zustande kam. Die EWS/FLI1-Inhibition führte zu einer Proliferationsminderung der Ewing-Zellen, was sowohl in den BrdU-Assays mit den getesteten chemischen Substanzen und der anschließenden qRLT-PCR als auch durch verzögertes Wachstum der EWS/FLI1-spezifischen siRNA-Klone unter Kulturbedingungen zu beobachten war. Diese bereits durch Prieur et al. (2004) beschriebene Wachstums-minderung der Zelllinie A673 nach Einführung der EWS/FLI1-spezifischen siRNA beruht einerseits auf veränderten Vorgängen im Zellzyklus durch das Silencing des EWS/FLI1-Transkriptes. Hierbei kommt es über eine Induktion der für den Wechsel von der G1- zur Synthese-Phase wichtigen cyklin-abhängigen Kinase-Inhibitoren p21 und p27, wie auch durch eine verminderte Expression von G1-Cyclin, Cyclin D1 und E schließlich zum Entwicklungsstopp der Ewing-Zellen in der G0- bzw. G1-Phase des Zellzyklus (Matsumoto et al., 2001). Andererseits ist der Proliferationsrückgang dieser Zellen mit einer erhöhten Apoptoserate, welche über die Induktion des IGFBP-3-Gens (insulin like growth factor binding protein 3) eingeleitet wird, zu erklären. Das IGFBP-3 verhindert dabei die Interaktion zwischen IGF-1 und seinem spezifischen Tyrosinkinaserzeptor IGF-1R, was über eine geringere Aktivierung des Enzyms Akt zu verminderter Zellproliferation und gesteigerter Apoptose der Zellen führt. Auch durch den Zusammenhang zwischen siRNA vermitteltem EWS/FLI1-Silencing und Aktivierung des NOTCH-Regulationsweges kann unter anderem die Akkumulation des p53-Proteins im Zellkern über vermehrte p21-Expression den Entwicklungsstopp bei Ewing-Zellen einleiten und somit das weitere Tumorwachstum unterbinden (Ban et al., 2008). Beim Ewing-Tumor finden sich in <10% Mutationen des Tumor-Suppressorgens p53 (Kovar et al., 1997). Auch auf genetischer Ebene wirkt sich die Inhibition von EWS/FLI1 aus, was die Induktion der Expression entscheidender Gene der mesenchymalen Differenzierung wie SOX9 zur Folge hat, wodurch die Zellen in ihren mesenchymalen Zustand zurückgeführt werden (Tirode et al., 2007). Diese Gene werden in undifferenzierten MSC nicht exprimiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Gene ID2, GPR64 des Klons Nr. 2 und die Gene BGN und PGF aller drei Klone zum Teil stark überexprimiert. Die Suppression des Genes GPR64 bei Klon-Nr. 1 und

3 ( $p=0,011$  bei Klon-Nr. 1;  $p=0,011$  bei Klon-Nr. 3), die Überexpression des Genes BGN bei Klon-Nr. 1, 2 und 3 wie auch die Induktion des Genes PGF bei Klon-Nr. 1 ( $p=0,0001$ ) erwiesen sich als statistisch signifikant. Alle übrigen untersuchten Gene waren supprimiert.

Ein konkreter EWS/FLI1-induzierter Zusammenhang konnte in vorausgegangenen Arbeiten für die Gene DKK2, ITM2A, EZH2, CHM1 (Staege et al., 2004a) wie auch bei den Genen ID2, GPR64 (Riggi et al., 2008) und LIPI (Foell et al., 2008) festgestellt werden. Diese Gene sind in der Regel beim Ewing-Tumor hochreguliert. Durch die Einführung der EWS/FLI1-spezifischen siRNA in die Ewing-Zelllinie A673 wurde die Expression der oben genannten Gene parallel zur Reduktion des Fusionsgenes EWS/FLI1 verringert, was ihre Kopplung an das EWS/FLI1-Gen beweist. Sowohl Nishimori et al. (2002) als auch Riggi et al. (2007) beschrieben eine EWS/FLI1-induzierte Hochregulation des Genes ID2, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde. Das Produkt von ID2 inhibiert die Differenzierung von Zellen, was womöglich mitunter den undifferenzierten Charakter des Ewing-Tumors bedingt. Darüber hinaus hemmt ID2 die Wirkung der cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren p16 und p21 antagonistisch und führt somit über einen EWS/FLI1-ähnlichen Mechanismus zu gesteigertem Zellwachstum (Lasorella et al., 1996). Biglykan (BGN), welches als nichtkollagenes Protein an der Osteoblasten-Differenzierung beteiligt ist, scheint wegen seiner anhaltenden hohen Expression trotz EWS/FLI1-siRNA (Klon-Nr. 2  $p=0,007$ ) über einen anderen Mechanismus stimuliert zu werden. Das Gen BGN, welches für Biglykan codiert, ist auf dem X-Chromosom lokalisiert, weshalb Patientinnen mit Turner-Syndrom (45 X0) im Vergleich einen geringeren BGN-Gehalt aufweisen, womit deren Kleinwüchsigkeit zu erklären ist. Auch BGN-defiziente Mäuse fielen im Verlauf ihrer postnatalen Entwicklung durch vermindertes Größenwachstum und osteoporotische Knochendeformation mit erniedrigter Knochenmasse auf (Xu et al., 1998), was aufgrund erniedrigter Osteoblastenzahl bei normaler Osteoklastentätigkeit hervorgerufen wurde. Zusätzlich ist Biglykan für den Bindegewebsstoffwechsel durch die Bindung an Kollagenfibrillen (Schönherr et al., 1995), als auch für das Überleben neokortikaler Neurone wichtig (Kappler et al., 1997). Auch das Gen GPR64 ist über seine Bindung an den Runt-related Transkriptionsfaktor 2 (Runx2) entscheidend an der osteogenen Differenzierung beteiligt (Teplyuk et al., 2008). Da sich der Ewing-Tumor bevorzugt in Zeiten erhöhten Skelettwachstums manifestiert, ist es nicht verwunderlich, dass Gene der osteogenen Differenzierung wie BGN (Klon-Nr. 2  $p=0,007$ ), GPR64 (Klon-Nr. 1 und 3  $p=0,011$ ), ITM2A und DKK2 (Klon-Nr. 1  $p=0,044$ ; Klon-Nr. 2  $p=0,022$ ; Klon-Nr. 3  $p=0,044$ ) in Ewing-Tumorzellen, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, überexprimiert sind. Von GPR64 ist zudem bekannt, dass es im Nebenhoden exprimiert wird, weshalb männliche HE6/GPR64 Knockout-Mäuse trotz unauffälliger Morphologie des Nebenhodens infertil sind (Davies et al., 2007). PGF (placental growth factor) induziert die Differenzierung, Proliferation und Migration endothelialer Zellen (Errico et al., 2004) und führt somit durch die Invasion maligner Zellen über die Basalmembran hinweg in das Gefäßsystem zur Bildung von Metastasen (Taylor und Goldenberg, 2007). Mit diesem Wissen lässt sich auch die frühe hämatogene Metastasierung des Ewing-Tumors erklären. Bei den siRNA-Zellen der vorliegenden Arbeit ließ sich zudem eine vom EWS/FLI1-Gehalt abhängige Expressionsinduktion dieses Genes erkennen ( $p=0,0001$  bei Klon-Nr. 1). Neben seiner Beteiligung an der Angiogenese fördert PGF das Wachstum von Tumorzellen. So gelang es Taylor & Goldenberg (2007) durch die

Inhibition des PGF-Gens das Wachstum von Brustkrebs-Tumorzellen zu reduzieren. Chondromodulin (CHM1) hingegen verhindert über die Inhibition kapillärer Strukturen die Angiogenese beispielsweise in avaskulären Herzklappen (Yoshioka et al., 2006) und somit deren pathologische Umstrukturierung. Zusätzlich stimuliert es sowohl das Wachstum der Chondrozyten als auch ihre Produktion an Proteoglykan (Hiraki et al., 1997). Anhand der vorliegenden Arbeit konnte auch beim Ewing-Tumor eine starke Überexpression des Genes PGF bei gleichzeitig signifikanter Runterregulation des Genes CHM1 bei allen Klonen gemessen werden, was sie zu wichtigen prognostischen Faktoren als auch zu Zielstrukturen für neue Therapieoptionen macht. Auch das Genprodukt von EZH2 könnte ein für die Prognose des klinischen Outcomes von Ewing-Patienten wichtiger immunhistochemischer Marker sein. Denn sowohl beim Ewing-Tumor als auch beim Prostata-Karzinom, v.a. in bereits metastasierten Stadien, führt die Überexpression von EZH2 zu vermehrtem Tumorwachstum, was die Prognose deutlich verschlechtert und daher mit der Aggressivität des Tumors korreliert (Varambally et al., 2002; Kleer et al., 2003). Lu et al. (2010) bestätigten diesen Zusammenhang durch die Erkenntnis, dass EZH2 über eine parakrine Stimulation der VEGF-Signalkaskade das Wachstum von Ovarial-Karzinomzellen stimuliert. Durch die EWS/FLI1-siRNA der vorliegenden Arbeit konnte die Expression von EZH2 signifikant supprimiert werden.

EZH2 beeinflusst über die Methylierung der DNA andere Gene und greift darüber direkt in Zellprozesse ein (Viré et al., 2006). Zu den beeinflussten Genen zählen neben denen, die am RAS-Regulationsweg beteiligt sind auch jene, die für den Zellzyklus wichtig sind und über EZH2 in ihrer Expression stimuliert werden (Varambally et al., 2002) bzw. die endotheliale und neuroektodermale Differenzierung steuern (Richter et al., 2009). Auch das integral membrane protein 1 (ITM1), welches, wie das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Gen ITM2A, zur Familie der Integralmembran-Proteine gehört, ist eines dieser durch EZH2 überexprimierten Gene (Varambally et al., 2002). Daher ist es denkbar, dass auch ITM2A, welches neben CHM1 an der chondro- und osteogenen Differenzierung beteiligt ist (Pittois et al., 1999), neben seiner Induktion durch EWS/FLI1 auch von EZH2 reguliert wird. Das zur Dickkopf-Familie gehörende Gen DKK2 ist als Antagonist des Wnt-Signalweges neben der terminalen Differenzierung der Osteoblasten zu mineralisierter Knochenmatrix (Li et al., 2005) an der Entstehung unterschiedlicher Tumorentitäten beteiligt. Im malignen Melanom (Kuphal et al., 2006) als auch in gastrointestinalen Tumoren wie dem kolorektalen Karzinom (Sato et al., 2007) ist DKK2 supprimiert. Bei der Familie der Ewing-Tumore hingegen ist die DKK2-Expression hochreguliert, was sich auch in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit widerspiegelt. Die Erklärung dafür ist eine direkte Interaktion von EWS/FLI1 mit der ETS-bindenden Domäne in der Promotorregion des Genes DKK2 (Miyagawa et al., 2009). Das Silencing des EWS/FLI1-Gens in der Zelllinie A673 hatte daher in der vorliegenden Arbeit eine signifikante Runterregulation des Gens DKK2 bei allen Klonen zur Folge. Das an der mesenchymalen Differenzierung beteiligte Gen DKK1 wird dagegen durch EWS/FLI1 gehemmt (Miyagawa et al., 2009), was erneut den mesenchymalen Charakter und den geringen Differenzierungsgrad des Ewing-Tumors unterstreicht. Die durch das EWS/FLI1-Silencing bedingte mögliche Überexpression des Genes DKK1 und die damit verbundene Wiedererlangung des ursprünglichen mesenchymalen Zustands der Ewing-Zellen wurde nicht weiter untersucht, ist jedoch anzunehmen. Das Lipase member 1-Gen (LIP1), welches auch Membran-assoziierte Phospholipase

---

A1 $\beta$  genannt wird, ist über die Produktion an Lysophosphat-Säure direkt am Überleben der Zellen, ihrer Migration (Foell et al., 2008) wie auch an der Ausbildung von Knochenmetastasen (Boucharaba et al., 2006) beteiligt. Durch die Einführung der EWS/FLI1-spezifischen siRNA konnte in der vorliegenden Arbeit für LIPI ein dem EWS/FLI1-Gehalt entsprechender Rückgang der Expression in allen getesteten Klonen nachgewiesen werden, was die Bedeutung dieses Gens als prognostischen Faktor, auch in Hinblick auf mögliche Therapieüberprüfung, unterstreicht.

## 4.5 Mesenchymale Stammzellen (MSC)

Nach Infektion der humanen MSC V54.2 aus peripherem Blut und der aus dem Knochenmark stammenden Zelllinie L87 mit EWS/FLI1 cDNA konnte in dieser Arbeit vor allem für die Klone Nr. 3 der Zelllinie V54.2 und für den Klon Nr. 5 der Zellen L87 ein erhöhter Proteingehalt für EWS/FLI1 im Western-Blot nachgewiesen werden (Abb. 24). In vorausgegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sich mit der Einführung des EWS/FLI1-Genes in die MSC, die an sich keine Expression dieses Gens aufweisen (Abb. 23), deren Phänotyp und immunhistochemisches Erscheinungsbild nachhaltig ändern. So formierten sich die einst spindelartig aussehenden MSC zu den beim Ewing-Tumor charakteristischen kleinen runden Zellnestern. Des Weiteren ist bekannt, dass MSC nach EWS/FLI1-Infektion anstatt der für Stammzellen typischen Oberflächenmoleküle CD10 und CD13 vermehrt das beim Ewing-Tumor vorkommende CD99 exprimieren (Hu-Lieskovan et al., 2005; Miyagawa et al., 2008).

Schließlich induzierte in der vorliegenden Arbeit die Einführung des Fusionsgens in die MSC EWS/FLI1-abhängig die Expression von ID2, DKK2, EZH2 und CHM1. Diese gehören zu der Gruppe von Genen, die entsprechend den Ergebnissen vorausgegangener Arbeiten, bei der Familie der Ewing-Tumore als hochreguliert gelten (CHM1, DKK2, ITM2A, EZH2, ID2, GPR64; Staeger et al., 2004a; Richter et al., 2009; Riggi et al., 2008). Neben den bereits genannten Genen konnten durch die vorliegende Arbeit weitere ermittelt werden, die durch EWS/FLI1 in MSC induziert sind. Hierbei handelt es sich um die Gene BGN (zumindest bei Zelllinie L87), PGF und LIPI. Das Gen LIPI, welches in Ewing-Tumoren hochreguliert, jedoch in Neuroblastom-, und Leukämie-Zelllinien oder unbehandelten MSC nicht nachweisbar ist (Foell et al., 2008), konnte nur in den Klonen mit der höchsten EWS/FLI1-Expression nachgewiesen werden. Eine geringe Expression der Gene ID2 und PGF (Ohnishi et al., 2007) wie auch für EZH2, ITM2A, BGN, CHM1 und GPR64 konnte bereits in unbehandelten MSC nachgewiesen werden. Durch die Infektion mit EWS/FLI1 cDNA konnte deren Expression jedoch stark erhöht werden. Auffallend oft betraf es die aus Knochenmark stammende Zelllinie L87, bei der v.a. Gene verstärkt exprimiert waren, die über ihr chondro- bzw. osteogenes Differenzierungspotenzial bzw. über die Angiogenese am Tumorwachstum beteiligt sind. Zu diesen zählen ID2, BGN, DKK2 und EZH2 wie auch PGF, LIPI und CHM1, die im Vergleich zu ihrer EWS/FLI1-Expression stark induziert wurden. Dabei sind die Gene BGN und DKK2 an der chondro-, osteogenen Differenzierung und Proliferation von Zellen beteiligt. Die Gene PGF und CHM1 hingegen beeinflussen über ihre angiogene Wirkung bzw. LIPI über die Stimulation der Migration von Zellen das

Überleben des Ewing-Tumors maßgeblich. Damit konnte erneut eine durch EWS/FLI1-induzierte Transformation der MSC in Ewing-ähnliche Zellen mit typischem Genexpressionsprofil beobachtet werden.

In Versuchen von Ohnishi et al. (2007) war die Induktion der Gene ID2 und PGF bei Knochenmarks-Stammzellen hypoxiebedingt. Ob dies für die anderen Gene auch zutrifft ist unklar, ist jedoch zumindest für Gene wie PGF anzunehmen, die direkt an der Angiogenese beteiligt sind. Auch in dieser Arbeit konnte bei den EWS/FLI1-infizierten MSC der bereits beschriebene Zusammenhang zwischen PGF und CHM1 erneut festgestellt werden. Denn im Gegensatz zu PGF, welches v.a. bei der EWS/FLI1-infizierten Zelllinie L87 EWS/FLI1-abhängig stark induziert wurde, konnte die Expression von CHM1 v.a. bei V54.2, jedoch auch bei dem Klon mit der höchsten EWS/FLI1-Expression induziert werden. EWS/FLI1 interagiert dabei in seiner Eigenschaft als fehlregulierter Transkriptionsfaktor mit Untereinheiten der RNA-Polymerase II und beeinflusst darüber Splicingvorgänge, die nachfolgend die Transkription unterschiedlichster Gene und schließlich die Translation der mRNA zu Proteinen verändern (Janknecht, 2005). Zu diesen Genen ist u.a. das Enhancer of zeste homolog 2-Gen (EZH2) zu zählen, welches als Histon-Methyltransferase an der Entwicklung der unterschiedlichsten Tumore wie dem Mamma-Karzinom bzw. dem Pankreas-Karzinom (Ougolkov et al., 2008) beteiligt ist. Durch die Suppression des beim Ewing-Tumor verstärkt exprimierten Gens EZH2 mittels siRNA konnte in vorausgegangenen Arbeiten sowohl in *in vitro*-Versuchen als auch *in vivo* eine Proliferationsminderung der Zellen mittels Zellzyklusstopp in der G1/M-Phase als auch eine Größenabnahme des Tumors im Mausmodell mit verminderter Metastasierungsrate in Lunge und Leber erreicht werden (Varambally et al., 2002; Riggi et al., 2008; Richter et al., 2009). Dies und die Tatsache, dass EZH2 Gene der neuroektodermalen und endothelialen Differenzierung reguliert (Richter et al., 2009), beweist die Wichtigkeit des Gens EZH2 in Hinblick auf die Onkogenese des Ewing-Tumors und macht es zu einem wichtigen Target innovativer Therapien. Tirode et al. (2007) berichteten ebenfalls über eine durch die Einführung von EWS/FLI1 induzierte Expression der Gene ID2 und DKK2 bei humanen Stammzellen. Auch Miyagawa et al. (2009) führten die DKK2-Überexpression und gleichzeitige DKK1-Inhibition auf die induzierte EWS/FLI1-Expression in humanen MSC zurück. Während das in die mesenchymale Differenzierung involvierte Gen DKK1 in EFT-Zellen die Inhibition des Tumorwachstums einleiten kann, zeigte DKK2 bislang keinen Effekt auf das Zellwachstum oder Überleben der Zellen, weshalb womöglich von einer indirekten Beeinflussung der Tumorgenese durch DKK2 beim Ewing-Tumor ausgegangen werden muss (Miyagawa et al., 2009). Die von Riggi et al. (2005) durchgeführten Versuche mit mesenchymalen Vorläuferzellen, die nach Infektion mit EWS/FLI1 das beim Ewing-Tumor beschriebene IGF-1 (insulin like growth-factor 1) exprimierten und *in vivo* Tumore mit Ewing-ähnlicher Morphologie und typischen immunhistochemischen Markern hervorriefen, unterstützen erneut den mesenchymalen Ursprung des Ewing-Tumors und entlarven das EWS/FLI1-Fusionsgen als entscheidenden Faktor der malignen Transformation. Jedoch konnte wegen der Zytotoxizität des Fusionsgenes (Deneen und Denny, 2001; Lessnick et al., 2002) in bisherigen Versuchen nicht jede Zellart mit EWS/FLI1 cDNA erfolgreich transfiziert werden. Vielmehr wurde das Wachstum der Zellen durch EWS/FLI1 gehemmt, was durch die vermehrte Expression des Tumor-Suppressorgenes p53 ausgelöst wurde. Da EWS/FLI1 jedoch die am häufigsten beim Ewing-Tumor

vorkommende Translokation ist, muss der von ihr ausgelöste wachstumshemmende Effekt entweder durch weitere Mutationen entkräftet werden oder nur Zellart-abhängig existieren, um das Überleben der Tumorzellen zu gewährleisten. Auch Castellero-Trejo et al. (2005) stellten in ihren Versuchen einen Zusammenhang zwischen EWS/FLI1 und dem Protein p53 fest. So konnte nach Einführung von EWS/FLI1 in die von ihnen untersuchten Knochenmarks-Stammzellen erst ab höheren Zellpassagen dem Ewing-Tumor entsprechende Tumore nachgewiesen werden. Das EWS/FLI1-Transkript war dabei unverändert hoch exprimiert, das Tumor-Suppressor-Protein p53 hingegen in den höheren Passagen vermehrt nachweisbar, sein Transkriptions-Target p21 jedoch nicht, was im Verlauf der Tumorentstehung des Ewing-Tumor auf eine Mutation im p53-Protein schließen lässt. Durch diese Mutation wurde zwar mehr p53-Protein gebildet, dies musste jedoch anhand des gleich bleibenden Gehalts an p21, über das es schließlich wirkt, fehlerhaft sein, weshalb es erst in höheren Zellpassagen zu dem eigentlichen Tumorwachstum kommen konnte. Nur MSC waren in der Lage allein durch die Infektion mit EWS/FLI1 transformiert zu werden (Tirode et al., 2007). Dadurch entgehen Ewing-Tumorzellen wahrscheinlich dem ansonsten durch intaktes Protein p53 ausgelösten programmierten Zelltod. Andererseits wirkt EWS/FLI1 der Differenzierung von Zellen entgegen, indem es in Knochenmarks-Stammzellen die osteogene und adipogene Differenzierung (Torchia et al., 2003) unter anderem über das Gen ID2, wie auch bei Muskelzelllinien die myogene Differenzierung hemmt (Eliazer et al., 2003). Auch eine erhöhte Expression des Genes EZH2 ist dafür bekannt über seine SET-Bindungsdomäne die Differenzierung von Muskelzellen zu inhibieren (Caretto et al., 2004). Sowohl ID2 (Fukuma et al. 2003) als auch EZH2 (Richter et al., 2009; Burdach et al., 2009) sind EWS/FLI1-induzierte Gene und darüber an der Inhibition der Differenzierung des Ewing-Tumors beteiligt. Das Gen EZH2 wird EWS/FLI1-abhängig induziert, was auf einer Bindung des Fusionsgenes an den EZH2-Promotor beruht (Richter et al., 2009; Burdach et al., 2009). Das Genprodukt von EZH2 wirkt über seine SET-Domäne als Methyltransferase, bewirkt das Silencing anderer Gene (Varambally et al., 2002) und fördert zudem die Proliferation von Ewing-Tumorzellen (Richter et al., 2009; Burdach et al., 2009). Hierfür bindet EZH2 mit seinem EED-Protein an die Histon-Deacetylase 2 und verändert darüber die Transkription anderer Gene (Van der Vlag und Otte, 1999). Varambally et al. (2002) fanden heraus, dass dieser Effekt des EZH2 durch HDACis wie TSA aufgehoben werden kann, jedoch nicht die Expression des Genes EZH2 selbst verändert wird. Dies zeigte sich auch in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit durch nur mäßige Expressionsminderung des Genes EZH2 in der qRLT-PCR bei gleichzeitiger ausgeprägter Proliferationsminderung im BrdU-Assay mit den HDACis. Daraus lässt sich schließen, dass EZH2 sowohl von einer intakten SET-Domäne als auch von der endogenen Histon-Deacetylase-Aktivität abhängig agiert. Es bleibt daher zu klären, ob die beobachtete Expressionsminderung der zuvor angesprochenen Gene allein auf HDACi-abhängiger Suppression von EWS/FLI1 beruht oder durch Interaktion mit EZH2 verstärkt wird.

Durch eine Überexpression des Genes ITM2A (integral membrane protein 2A) konnte die myogene Differenzierung jedoch eingeleitet werden (Van den Plas und Merregaert, 2004a, b), weshalb es in diesem Fall als Gegenspieler der Gene EWS/FLI1 und EZH2 fungiert. Der für die Gene EWS/FLI1 und EZH2 beschriebene Effekt beruht jedoch auf unterschiedlichen Mechanismen. Von EWS/FLI1 ist bekannt, dass es die Histon-Acetyltransferase hemmt und somit indirekt über eine vermehrte Aktivität

---

der Histon-Deacetylase das Wachstum des Tumors fördert (Sakimura et al., 2005). Währenddessen bindet EZH2 mit seinem EED-Protein (embryonic ectoderm development), einem Mitglied der Familie der Polycomb-Gruppe, direkt an die Histon-Deacetylase 2 und führt neben der Proliferation des Prostata-Karzinoms (Varambally et al., 2002) zum Wachstum des Ewing-Tumors. Die in dieser Arbeit beobachtete Induktion von EZH2 bei EWS/FLI1-infizierten MSC ist durch die direkte Bindung des Fusionsgens an den EZH2-Promotor ausgelöst und zusätzlich eine vom Histon-Deacetylase-Gehalt der Zellen abhängige Reaktion (Richter et al., 2009).

## 4.6 Vergleich Inhibition mit Kinaseinhibitoren und siRNA

Vergleicht man die Genexpression von EWS/FLI1 nach der Inkubation mit den unterschiedlichen Kinaseinhibitoren und der siRNA-Infektanten der Zelllinie A673, so ergibt sich die stärkste Herunterregulation dieses Gens durch das Silencing der EWS/FLI1-spezifischen siRNA. Auch die Gengruppe um EWS/FLI1 wurde durch die EWS/FLI1-spezifische siRNA am stärksten und einheitlichsten supprimiert. Dies ist durch die Blockade der spezifischen-mRNA zu erklären, wodurch die Transkription der Proteine durch Abschalten bestimmter Gene auf der DNA verhindert wird. Im Gegensatz dazu können die eingesetzten Kinaseinhibitoren nur einzelne Proteine eines Regulationsweges sowohl spezifisch als auch unspezifisch hemmen und somit die nachfolgende Enzymkaskade durch Interaktion unterschiedlicher Pathways nur geringfügig beeinflussen.

Die ausgeprägtesten proliferationsmindernden Effekte unter den eingesetzten Substanzen konnte durch den Histondeacetylase-Inhibitor TSA und den MEK<sub>1/2</sub>-Inhibitor U0126 erzielt werden. Die starke Wirkung des HDACis TSA beruht dabei auf indirektem Einfluss auf die DNA. Der durch U0126 ausgelöste Proliferationsrückgang war sogar bei allen Ewing-Zellen nahezu ähnlich hoch. Die restlichen getesteten MEK/MAPK-Inhibitoren P215, SB 202190 und SB 203580 zeigten im Vergleich zu den PI3-Kinase-Inhibitoren einen eher geringeren Einfluss auf die Proliferation der Ewing-Zellen. Auf genetischer Ebene konnte durch SB 202190 jedoch eine deutliche Runterregulation der getesteten Gene detektiert werden, wenn auch nicht für jede Ewing-Zelllinie in gleichem Maße.

Momentan werden mehrere siRNAs wie z.B. gegen die altersbedingte Makuladegeneration (Phase I) und Atemwegserkrankungen mit dem respiratorischen Synzytial Virus (RSV) (Phase II) in klinischen Studien getestet. Dabei handelt es sich jedoch um leicht zugängliche Organsysteme. Die Schwierigkeit bei der klinischen Anwendung von siRNAs besteht nämlich darin, sie an ihren eigentlichen Zielort zu bringen, bevor sie von Nukleasen abgebaut werden. Des Weiteren können über Kreuzreaktionen andere Gene ausgeschaltet und somit wichtige Regulationswege beeinflusst werden (Tschuch et al., 2008; Anderson et al., 2008; Vankoningsloo et al., 2008). Außerdem muss ein schädlicher Einfluss der für die siRNA benötigten viralen Vektoren auf den Organismus ausgeschlossen sein. Dennoch sind siRNAs Therapeutika der Zukunft, da sie individuelle Therapien ermöglichen und im besten Fall nur an transformierten Zellen wirken und damit das Ende der durch herkömmliche Chemotherapeutika ausgelösten Nebenwirkungen einleiten würden. Bis zu ihrem tatsächlichen therapeutischen Einsatz könnte, anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, zu der konventionellen Therapie des Ewing-

---

Tumor ein synergistischer Gebrauch von PI3-Kinase-Inhibitoren und HDACis, wie auch eine Inhibition des IGF-1-Pathways zur Verbesserung der Prognose des Ewing-Tumors in Betracht gezogen werden. Mögliche Therapieoptionen mit Anti-IGF-Rezeptor-Antikörpern, antiangiogenetischen Substanzen oder der Einsatz von mTOR-Antagonisten werden derzeit in Phase II Studien erprobt.

Aktuelle Studien zeigen allerdings, dass die Beeinflussung einzelner, für die Tumorentstehung wichtiger, Signaltransduktinoswege zu einem verstärkten Tumorwachstum führen kann. Dies beruht auf der Kompensation durch Aktivierung alternativer Signaltransduktionswege (Brough et al., 2011). Um diesen Effekt zu umgehen, versucht man heute die für die Tumorentstehung entscheidenden Gene bzw. Signaltransduktionswege zu identifizieren und gezielt zu beeinflussen. Dies fasst man unter dem Begriff synthetische Letalität zusammen (Brough et al., 2011). Nur die simultane Funktionsveränderung mindestens zweier Signaltransduktionswege führt letztlich zur Hemmung des Tumorwachstums.

---

## Zusammenfassung

Der Ewing-Tumor zählt als ein Vertreter der Gruppe der „small round blue cell tumors“ (SRBCT) zu den zweithäufigsten primären Knochentumoren im Kindes- und Jugendalter mit neuroektodermalem Ursprung und mesenchyalem Differenzierungspotenzial. Trotz optimierter Behandlungsstrategien in den vergangenen Jahrzehnten ist bei Ewing-Patienten mit primärem Befall des Knochenmarks und frühen Rezidiven meist eine ungünstige Prognose zu verzeichnen. Eine Besonderheit der Familie der Ewing-Tumore besteht in einer reziproken Translokation zwischen dem EWS-Gen und Genen der ETS-Familie, die in 85% der Fälle zur Chimäre EWS/FLI1 führt. Dieses Fusionsgen ist als aberranter Transkriptionsfaktor für die maligne Transformation und das Wachstum der Ewing-Zellen verantwortlich. Des Weiteren sind Signaltransduktionswege wie MAPK (Mitogen-aktivierte Protein-Kinase), MEK (Mitogen-aktivierte ERK-regulierende Kinase), IGF/PI3K (Insulin like growth factor/ Phosphatidyl-inositol-3 Kinase) und mTOR (mammalian target of Rapamycin) für das Zellwachstum des Ewing-Tumors und das Ansprechen der Zellen auf Chemotherapeutika von Bedeutung. Die genannten Signalwege stellen daher in Zusammenhang mit EWS/FLI1 wichtige Zielstrukturen für das Verständnis der Genregulation in Ewing-Tumoren dar und verdeutlichen deren Stellenwert für neue Therapieansätze. Daher war es Ziel der vorliegenden Arbeit den Einfluss von Kinaseinhibitoren und Modulatoren der epigenetischen Regulation der Genexpression auf das Wachstum unterschiedlicher Zelllinien der Gruppe der SRBCT und die Beeinflussung der Expression der beim Ewing-Tumor assoziierten Gene zu untersuchen. Zusätzlich wurde der Effekt der Kinaseinhibitoren mit dem des RNA-Interferenz Silencing (RNAi) von EWS/FLI1 bei der Ewing-Zelllinie A673 und mesenchymalen Stammzellen (MSC) (L87 aus Knochenmark; V54 aus peripherem Blut) verglichen, um mögliche direkt durch EWS/FLI1 vermittelte Effekte zu beobachten.

Zu den getesteten Zellen gehörten die Neuroblastom-Zelllinie SIMA, die Vorläufer-Leukämie-Zelllinie cALL-2 wie auch die Ewing-Zellen A673, SB-KMS-KS1 und SK-N-MC. Als MEK/MAPK-Inhibitoren wurden P215, SB 202190, SB 203580 sowie U0126 verwendet und als PI3-Kinase-Inhibitoren LY 294-002, Rapamycin (mTOR) und Wortmannin eingesetzt. Untersucht wurde auch der Einfluss des Histondeacetylase-Inhibitors (HDACi) Trichostatin A (TSA) und des Histonmethyltransferasehemmers Chaetocin. Die jeweiligen Konzentrationen der verwendeten Kinaseinhibitoren wurden in Proliferationsassays (BrdU) ermittelt. Von den getesteten Substanzen führten der HDACi TSA und der MEK-Inhibitor U0126 zur stärksten Verringerung der Proliferation bei allen getesteten Ewing-Zelllinien. Die Neuroblastom-Zelllinie SIMA und die Leukämie-Zellen cALL-2 zeigten sich bei den BrdU-Proliferationsversuchen mit den Histon-modulierenden Substanzen wenig empfindlich und wurden daher nicht weiter auf genetischer Ebene untersucht.

Die Genexpressionsanalysen der Ewing-Zellen mittels quantitativer Real-Time-PCR (qRLT-PCR) erbrachten für die getesteten Kinaseinhibitoren eine positive Korrelation von Proliferationshemmung und Expressionssuppression des EWS/FLI1-Transkriptes, mit Ausnahme von Rapamycin (für A673, SB-KMS-KS1), SB 202190 (für A673 und SB-KMS-KS1) und SB 203580 (SB-KMS-KS1). Im

---

Einzelnen war die Expression von BGN, CHM1, DKK2, EZH2, GPR64 und LIPI nach Inkubation mit den Histon-modulierenden Substanzen TSA (für SB-KMS-KS1 und SK-N-MC) und Chaetocin für alle getesteten Ewing-Zellen, bei den MEKs/MAPKs SB 202190 (für SK-N-MC), SB 203580 (für A673), den PI3Ks LY 294-002 (für SB-KMS-KS1) und Rapamycin (für SB-KMS-KS1) herunter reguliert. Hierbei handelte es sich um Zellen, deren EWS/FLI1-Expression durch die chemische Inhibition stark abnahm, was sich in den BrdU-Assays durch eine verminderte Proliferation bemerkbar machte. Im Vergleich aller getesteten Zellen konnte die Genexpression der Zelllinie SB-KMS-KS1 durch die Inkubation mit den Kinaseinhibitoren am stärksten supprimiert werden. Bei den Substanzen TSA (für die Gene EWS/FLI1, DKK2, CHM1, LIPI, PGF), U0126 (für die Gene DKK2, GPR64, ITM2A, LIPI), LY 294-002 (für die Gene EWS/FLI1, BGN, DKK2, EZH2, GPR64, ITM2A, LIPI, PGF) und Rapamycin (für die Gene EWS/FLI1, BGN, DKK2, EZH2, GPR64, LIPI, PGF) sogar unter die Detektionsgrenze der qRLT-PCR. Zusätzlich konnte durch Behandlung mit den Histon-modulierenden Substanzen TSA und Chaetocin der für den unreifen Phänotyp der Stammzellen verantwortliche epigenetische Mechanismus aufgedeckt werden, der zur EWS/FLI1 induzierten Expression von EZH2 und zur Suppression von Differenzierungsantigenen führt (Richter et al., 2009), was vermutlich die geringe neuroektodermale Differenzierung dieses Tumors bedingt. Von Richter et al. (2009) konnte zudem die Beteiligung des Genes EZH2 bei maligner Transformation von Zellen *in vitro* und bei der Metastasierung im Mausmodell nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass die stärkste Beeinflussung der Zellproliferation, verbunden mit dem Rückgang der EWS/FLI1-Expression, durch den Einsatz der siRNA erreicht werden konnte. Hierdurch wurden die Gene CHM1, DKK2, ITM2A und LIPI von der EWS/FLI1-Expression abhängig bei allen Ewing-Zellen supprimiert, während die Gene BGN, ID2 und PGF überexprimiert wurden. Des Weiteren lassen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit durch Vergleich der Genexpression der EWS/FLI1-infizierten mesenchymalen Zelllinie L87 und der EWS/FLI1-siRNA-Infektanten A673 mit den unbehandelten MSC darauf schließen, dass die Gene BGN, CHM1, EZH2, ID2, LIPI und PGF durch EWS/FLI1 zum Teil signifikant induziert werden. Im Gegensatz dazu wird das Gen ITM2A durch die Einführung des Fusionstranskriptes EWS/FLI1 in die MSC L87 supprimiert. Diese Gene sind wahrscheinlich über ihr chondro- und osteogenes Differenzierungspotenzial bzw. im Fall der Gene PGF und CHM1 über die Angiogenese am Tumorwachstum beteiligt und daher von besonders großer Bedeutung für eine therapeutische Beeinflussung des Tumorwachstums *in vivo*. Durch die Manifestation des Ewing-Tumors v.a. zu Zeiten erhöhten Knochenwachstums ist die Überexpression einzelner potentiell am Knochenstoffwechsel beteiligter Gene nicht weiter verwunderlich. Darüber hinaus bietet die direkte Beteiligung der Gene EZH2, LIPI, PGF und CHM1 am Überleben der Ewing-Zellen, deren Wachstum und Metastasierungsrisiko einen prognostischen Nutzen für das klinische Outcome der Patienten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten auf die Beteiligung weiterer, an der Tumorentwicklung beteiligter und EWS/FLI1 regulierter Gene hin. Zudem konnte die Wirksamkeit von Kinaseinhibitoren und spezifischer siRNA gegen EWS/FLI1 anhand der Proliferationsminderung der Zellen *in vitro* gezeigt werden. Diese Versuche bieten somit erfolgversprechende Ansätze für die Entwicklung neuer Therapieoptionen für die kurative Behandlung des Ewing-Tumors.



## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Stefan Burdach, Direktor der Kinder- und Poliklinik Schwabing der Technischen Universität München, für die Vergabe des Themas sowie für Korrektur und Begutachtung der vorliegenden Arbeit und Herrn Dr. rer. nat Günther Richter, Leiter der Arbeitsgruppe Funktionelle Genomik pädiatrischer Krebskrankheiten, für die umfassende Betreuung der praktischen Arbeiten und die hilfreichen Anregungen der schriftlichen Ausarbeitung.

Für die geduldige Einarbeitung in die Arbeitstechniken und die Unterstützung bei Problemen im Labor bedanke ich mich bei Frau Colette Zobywalski.

Meiner Schwester Sabrina Löwel danke ich für die Hilfe bei der Gestaltung des Layouts der Arbeit und meinem Ehemann Daniel Grabner für seine Geduld und konstruktive Kritik.

Nicht zuletzt geht besonderer Dank an meine Eltern für die finanzielle Unterstützung meines Studiums, ihre aufmunternden Worte und für ihr Interesse am Fortgang der Arbeit.



---

## Literaturverzeichnis

- Anderson E, Boese Q, Khvorova A and Karpilow J (2008) Identifying siRNA-induced off-targets by microarray analysis. *Methods Mol Biol* 442: 45-63.
- Angerwall L and Enzinger FM (1975) Extraskelletal neoplasm resembling Ewing's sarcoma. *Cancer* 36: 240-251.
- Arvand A and Denny CT (2001) Biology of EWS/ETS fusions in Ewing's family tumors. *Oncogene* 20(40): 5747-5754.
- Askin FB, Rosai J, Sibley RK, Dehner LP and McAlister WH (1979) Malignant small cell tumor of the thoracopulmonary region in childhood. A distinctive clinicopathologic entity of uncertain histogenesis. *Cancer* 43: 2438-2451.
- Aurias A, Rimbaut C, Buffe C, Dubousset J and Mazabraud A (1983) Chromosomal translocations in Ewing's sarcoma. *N Engl J Med* 309: 496-497.
- Bacci G, Ferrari S, Bertoni F, Rimondini S, Longhi A, Bacchini P, Forni C, Manfrini M, Donati D and Picci P (2000) Prognostic factors in nonmetastatic Ewing's sarcoma of bone treated with adjuvant chemotherapy: analysis of 359 patients at the Istituto Ortopedico Rizzoli. *J Clin Oncol* 18: 4-11.
- Ban J, Bennani-Baiti IM, Kauer M, Schaefer KL, Poremba C, Jug G, Schwentner R, Smrzka O, Muehlbacher K, Aryee DN and Kovar H (2008) EWS-FLI1 suppresses NOTCH-activated p53 in Ewing's sarcoma. *Cancer Res* 68(17): 7100-7109.
- Barone MV, Pepperkok R, Peverali FA and Philipson L (1994) Id proteins control growth induction in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(11): 4985-4988.
- Baserga R (1995) The insulin-like growth factor I receptor: a key to tumor growth? *Cancer Res* 55(2): 249-52.
- Bellik L, Vinci MC, Filippi S, Ledda F and Parenti A (2005) Intracellular pathways triggered by the selective FLT-1-agonist placental growth factor in vascular smooth muscle cells exposed to hypoxia. *Br J Pharmacol* 146(4): 568-75.
- Benezra R, Davis RL, Lockshon D, Turner DL and Weintraub H (1990) The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* 61(1): 49-59.
- Benini S, Manara MC, Cerisano V, Perdichizzi S, Strammiello R, Serra M, Picci P and Scotlandi K (2004) Contribution of MEK/MAPK and PI3-K signaling pathway to the malignant behavior of Ewing's sarcoma cells: therapeutic prospects. *Int J Cancer* 108(3): 358-66.

- Bhatia S, Krailo MD, Chen Z, Burden L, Askin FB, Dickman PS, Grier HE, Link MP, Meyers PA, Perlman EJ, Rausen AR, Robison LL, Vietti TJ and Miser JS (2007) Therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia after Ewing sarcoma and primitive neuroectodermal tumor of bone: a report from the Children's Oncology Group. *Blood* 109: 46–51.
- Boucharaba A, Serre CM, Guglielmi J, Bordet JC, Clézardin P and Peyruchaud O (2006) The type 1 lysophosphatidic acid receptor is a target for therapy in bone metastases. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(25): 9643-9648.
- Bridge JA, Fidler ME, Neff JR, Degenhardt J, Wang M, Walker C, Dorfman HD, Baker KS and Seemayer TA (1999) Adamantinoma-like Ewing's sarcoma: genomic confirmation, phenotypic drift. *Am J Surg Pathol* 23: 159–165.
- Brough R, Frankum JR, Costa-Cabral S, Lord CJ, Ashworth A (2011) Searching for synthetic lethality in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 21(1): 34-41. Epub 2011 Jan 20.
- Burdach S, Jürgens H, Peters C, Nurnberger W, Mauz-Korholz C, Korholz D, Paulussen M, Pape H, Dilloo D and Koscielniak E (1993) Myeloablative radiochemotherapy and hematopoietic stem-cell rescue in poor-prognosis Ewing's sarcoma. *J Clin Oncol* 11: 1482–1488.
- Burdach S, van Kaick B, Laws HJ, Ahrens S, Haase R, Körholz D, Pape H, Dunst J, Kahn T, Willers R, Engel B, Dirksen U, Kramm C, Nürnberger W, Heyll A, Ladenstein R, Gadner H, Jürgens H, Go el U (2000) Allogeneic and autologous stem-cell transplantation in advanced Ewing tumors. An update after long-term follow-up from two centers of the European Intergroup study EICESS. Stem-Cell Transplant Programs at Düsseldorf University Medical Center, Germany and St. Anna Kinderspital, Vienna, Austria. *Ann Oncol* (11): 1451-1462.
- Burdach S, Jürgens H (2002) High-dose chemoradiotherapy (HDC) in the Ewing family of tumors (EFT). *Crit Rev Oncol Hematol* 41: 169-189.
- Burdach S, Meyer-Bahlburg A, Laws HJ, Haase R, van Kaik B, Metzner B, Wawer A, Finke R, Göbel U, Haerting J, Pape H, Gadner H, Dunst J, Juergens H. (2003) High-dose therapy for patients with primary multifocal and early relapsed Ewing's tumors: results of two consecutive regimens assessing the role of total-body irradiation. *J Clin Oncol*. 21(16): 3072-3078.
- Burdach S (2004) Treatment of advanced Ewing tumors by combined radiochemotherapy and engineered cellular transplants. *Pediatr Transplant* 8 Suppl 5: 67-82.
- Burdach S, Plehm S, Unland R, Dirksen U, Borkhardt A, Staeger MS, Müller-Tidow C and Richter GHS (2009) Epigenetic maintenance of stemness and malignancy in peripheral neuroectodermal tumors by EZH2. *Cell Cycle* 8(13): 1991-1996.
- Burdach S, Thiel U, Schöniger M, Haase R, Wawer A, Nathrath M, Kabisch H, Urban C, Laws HJ, Dirksen U, Steinborn M, Dunst J and Jürgens H (2010) Total body MRI-governed involved compartment irradiation combined with high-dose chemotherapy and stem cell rescue improves longterm survival in Ewing tumor patients with multiple primary bone metastases. *Bone Marrow Transplant*. 45(3): 483-489.

- 
- Caretti G, Di Padova M, Micales B, Lyons GE and Sartorelli V (2004) The Polycomb Ezh2 methyltransferase regulates muscle gene expression and skeletal muscle differentiation. *Genes Dev* 18(21): 2627-38. Erratum in: *Genes Dev* 2005 19(6): 768.
- Castillero-Trejo Y, Eliazer S, Xiang L, Richardson JA and Ilaria RL Jr (2005) Expression of the EWS/FLI-1 oncogene in murine primary bone-derived cells results in EWS/FLI-1-dependent, ewing sarcoma-like tumors. *Cancer Res* 65: 8698-8705.
- Cavazzana AO, Miser JS, Jefferson J and Triche TJ. (1987) Experimental evidence for a neural origin of Ewing's sarcoma of bone. *Am J Pathol.* 127(3):507-18
- Chan S (2004) Targeting the mammalian target of rapamycin (mTOR): a new approach to treating cancer. *Br J Cancer* 91: 1420–1424.
- Chen Q-R, Vansant G, Oades K, Pickering M, Wei JS, Song YK, Monforte J and Khan J (2007) Diagnosis of the Small Round Blue Cell Tumors Using Multiplex Polymerase Chain Reaction. *J Mol Diagn* 9(1): 80–88.
- Cironi L, Riggi N, Provero P, Wolf N, Suvà ML, Suvà D, Kindler V and Stamenkovic I (2008) IGF1 is a common target gene of Ewing's sarcoma fusion proteins in mesenchymal progenitor cells. *PLoS One* 3(7): e2634.
- Conrad C, Gottgens B, Kinston S, Ellwart J and Huss R (2002) GATA transcription in a small rhodamine 123(low)CD34(+) subpopulation of a peripheral blood-derived CD34(-)CD105(+) mesenchymal cell line. *Exp Hematol* 30(8): 887-95.
- Cotterill SJ, Ahrens S, Paulussen M, Jurgens HF, Voute PA, Gadner H and Craft AW (2000) Prognostic factors in Ewing's tumor of bone: analysis of 975 patients from the European Intergroup Cooperative Ewing's Sarcoma Study Group. *J Clin Oncol* 18(17): 3108-14.
- Cuenda A, Rouse J, Doza YN, Meier R, Cohen P, Gallagher TF, Young PR, Lee JC (1995) SB203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett* 364(2): 229-33.
- Davies B, Behnen M, Cappallo-Obermann H, Spiess AN, Theuring F and Kirchhoff C (2007) Novel epididymis-specific mRNAs downregulated by HE6/Gpr64 receptor gene disruption. *Mol Reprod Dev* 74(5): 539-53.
- de Alava E, Kawai A, Healey JH, Fligman I, Meyers PA, Huvos AG, Gerald WL, Jhanwar SC, Argani P, Antonescu CR, Pardo-Mindan FJ, Ginsberg J, Womer R, Lawlor ER, Wunder J, Andrulis I, Sorensen PH, Barr FG and Ladanyi M (1998) EWS-Fli1 fusion transcript structure is an independent determinant of prognosis in Ewing's sarcoma. *J Clin Oncol* 16: 1248-1255.
- de Alava E, Gerald WL (2000) Molecular biology of the Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor family. *J Clin Oncol* 18: 204-213.
- DeChadarevian J-P, Vekemans M and Seemayer T (1984) Reciprocal translocation in small-cell sarcomas. *N Engl J Med* 311: 1702.

- 
- Delattre O, Zucman J, Plougastel B, Desmaze C, Melot T, Peter M, Kovar H, Joubert I, de Jong P and Rouleau G (1992) Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature* 359(6391): 162-165.
- Deneen B and Denny CT (2001) Loss of p16 pathways stabilizes EWS/FLI1 expression and complements EWS/FLI1 mediated transformation. *Oncogene* 20(46): 6731-6741.
- Dockhorn-Dworniczak B, Schäfer KL, Dantcheva R, Blasius S, van Valen F, Burdach S, Winkelmann W, Jürgens H and Böcker W (1994) Molecular genetic detection of t(11;22)(q24;12) translocation in Ewing sarcoma and malignant peripheral neuroectodermal tumors. *Pathologe* 15(2): 103-112.
- Dockhorn-Dworniczak B, Schäfer KL, Dantcheva R, Blasius S, van Valen F, Burdach S, Winkelmann W, Jürgens J and Böcker W (1994) Detection of EWS-/FLI-1 gene fusion transcripts by RT-PCR as a tool in the diagnosis of tumors of the Ewing sarcoma group. *Verh Dtsch Ges Pathol* 78: 214-219.
- Dohjima T, Lee NS, Li H, Ohno T and Rossi JJ. (2003) Small interfering RNAs expressed from a Pol III promoter suppress the EWS/Fli-1 transcript in an Ewing sarcoma cell line. *Mol Ther.* 7(6):811-6.
- Dorfman H and Czerniak B (1995) Bone cancers. Radiation-induced sarcomas and chemotherapy-related acute leukemias are the most frequent secondary malignancies. *Cancer* 75 (Suppl): 203–210.
- Downward J (2004) PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin Cell Dev Biol* 15(2): 177-182.
- Dunst J, Ahrens S, Paulussen M, Burdach S, Jürgens H (2001) Prognostic impact of tumor perfusion in MR-imaging studies in Ewing tumors. *Strahlenther Onkol* 177(3): 153-159.
- Eliazer S, Spencer J, Ye D, Olson E, Ilaria RL, Jr (2003) Alteration of mesodermal cell differentiation by EWS/FLI-1, the oncogene implicated in Ewing's sarcoma. *Mol Cell Biol* 23: 482-492.
- Ellis L, Hammers H and Pili R (2009) Targeting tumor angiogenesis with histone deacetylase inhibitors. *Cancer Lett* 280(2): 145-153.
- Enneking WF (1983) Musculoskeletal tumor surgery. Churchill Livingstone, New York.
- Errico M, Riccioni T, Iyer S, Pisano C, Acharya KR, Persico MG and De Falco S (2004) Identification of placenta growth factor determinants for binding and activation of Flt-1 receptor. *J Biol Chem* 279(42): 43929-43939.
- Ewing J (1921) Diffuse endothelioma of bone. *Proc N Y Pathol Soc* 21: 17–24.
- Ferby I, Waga I, Kume K, Sakanaka C and Shimizu T (1996) PAF-induced MAPK activation is inhibited by wortmannin in neutrophils and macrophages. *Adv Exp Med Biol* 416: 321-326.
- Fizazi K, Dohollou N, Blay JY, Guérin S, Le Cesne A, André F, Pouillart P, Tursz T and Nguyen BB (1998) Ewing's family of tumors in adults: multivariate analysis of survival and long-term results of multimodality therapy in 182 patients. *J Clin Oncol* 16: 3736–3743.

- 
- Foell JL, Hesse M, Volkmer I, Schmiedel BJ, Neumann I and Staeger MS (2008) Membrane-associated phospholipase A1 beta (LIPI) Is an Ewing tumour-associated cancer/testis antigen. *Pediatr Blood Cancer* 51(2): 228-34.
- Folpe AL, Goldblum JR, Rubin BP, Shehata BM, Liu W, Dei Tos AP and Weiss SW (2005) Morphologic and immunophenotypic diversity in Ewing family tumors. *Am J Surg Pathol* 29: 1025–1033.
- Fukuma M, Okita H, Hata J and Umezawa A. (2003) Upregulation of Id2, an oncogenic helix-loop-helix protein, is mediated by the chimeric EWS/ets protein in Ewing sarcoma. *Oncogene*. 9;22(1):1-9.
- Geryk-Hall M and Hughes DP (2009) Critical signalling pathways in bone sarcoma: candidates for therapeutic interventions. *Curr Oncol Rep* 11(6): 446-453.
- Gharbi SI, Zvelebil MJ, Shuttleworth SJ, Hancox T, Saghir N, Timms JF and Waterfield MD (2007) Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002. *Biochem J* 404(1): 15-21.
- Gourmelen M, Le Bouc Y, Girard F and Binoux M (1984) Serum levels of insulin-like growth factor (IGF) and IGF binding protein in constitutionally tall children and adolescents. *J Clin Endocrinol Metab* 59(6): 1197-1203.
- Greiner D, Bonaldi T, Eskeland R, Roemer E and Imhof A (2005) Identification of a specific inhibitor of the histone methyltransferase SU(VAR)3-9. *Nat Chem Biol* 1(3): 143-145.
- Grunewald TG, Greulich N, Kontny U, Frühwald M, Rutkowski S, Kordes U, Scheurlen W, Schmidt W, Stachel D, Metzler M, Mittler U, Graf N, Benesch M and Burdach S (2012). Targeted Therapeutics in Treatment of Children and Young Adults with Solid Tumors: an Expert Survey and Review of the Literature. *Klin Padiatr* 224(3):124-131. Epub 2012 Apr 20.
- Haeusler J, Ranft A, Boelling T, Gosheger G, Braun-Munzinger G, Vieth V, Burdach S, van den Berg H, Juergens H, Dirksen U (2010) The value of local treatment in patients with primary, disseminated, multifocal Ewing sarcoma (PDMES). *Cancer* 116(2): 443-50.
- Hauben E, van den Broek LC, Van Marck E and Hogendoorn PC (2001) Adamantinoma-like Ewing's sarcoma and Ewing's-like adamantinoma: the t(11;22), t(12;22) status. *J Pathol* 195: 218–221.
- Helman LJ, Meltzer P (2003) Mechanisms of sarcoma development. *Nat Rev Cancer* 3(9): 685-94.
- Helton KJ, Fletcher BD, Kun LE, Jenkins JJ and Pratt CB (1993) Bone tumors other than osteosarcoma after retinoblastoma. *Cancer* 71(9): 2847-2853.
- Hense HW, Ahrens S, Paulussen M, Lehnert M, Jürgens H (1999) Descriptive Epidemiology of Ewing Tumors - Analyses of the German Patients of (EI) CESS 1980-1997. *Klin Padiatr* 211(4): 271-275.
- Hiraki Y, Inoue H, Iyama K, Kamizono A, Ochiai M, Shukunami C, Iijima S, Suzuki F and Kondo J. (1997) Identification of chondromodulin I as a novel endothelial cell growth inhibitor. Purification and its localization in the avascular zone of epiphyseal cartilage. *J Biol Chem* 272(51): 32419-32426.

- Hu-Lieskovan S, Zhang J, Wu L, Shimada H, Schofield DE and Triche TJ (2005) EWS-FLI1 fusion protein up-regulates critical genes in neural crest development and is responsible for the observed phenotype of Ewing's family of tumors. *Cancer Res* 65: 4633-4644.
- Hühn R, Staeger MS, Hesse M, Liebig B and Burdach S (2009) Cleavage of the Ewing Tumour-specific *EWSR1-FLI1* mRNA by Hammerhead Ribozymes. *Anticancer Res* 29: 1901-1908.
- Jaffe R, Santamaria M, Yunis EJ, Tannery NH, Agostini RM Jr, Medina J and Goodman M (1984) The neuroectodermal tumor of the bone. *Am J Surg Pathol* 8: 885-898.
- Jankiewicz M, Groner B and Desrivieres S (2006) mammalian target of rapamycin regulates the growth of mammary epithelial cells through the inhibitor of deoxyribonucleic acid binding Id1 and their functional differentiation through Id2. *Mol Endocrinol* 20(10): 2369-2381.
- Janknecht R (2005) EWS-ETS oncoproteins: the linchpins of Ewing tumors. *Gene* 363: 1-14.
- Jürgens H, Bier V, Dunst J, Harms D, Jobke A, Kotz R, Köhl J, Müller-Wehrich S, Ritter J, Salzer-Kuntschik M, Sauer R, Sternschulte W, Treuner J, Voûte PA, Weinel P, Winkelmann W, Winkler K, Göbel U (1988) The German Society of Pediatric Oncology Cooperative Ewing Sarcoma Studies CESS 81/86: report after 6 1/2 years. *Klin Padiatr* 200(3): 243-52.
- Kang HG, Jenabi JM, Liu XF, Reynolds CP, Triche TJ, Sorensen PH (2010) Inhibition of the insulin-like growth factor I receptor by epigallocatechin gallate blocks proliferation and induces the death of Ewing tumor cells. *Mol Cancer Ther* 9(5): 1396-407.
- Kappler J, Junghans U, Koops A, Stichel CC, Hausser HJ, Kresse H and Müller HW (1997) Chondroitin/dermatan sulphate promotes the survival of neurons from rat embryonic neocortex. *Eur J Neurosci* 9(2): 306-318.
- Karikó K, Bhuyan P, Capodici J and Weissman D (2004) Small interfering RNAs mediate sequence-independent gene suppression and induce immune activation by signaling through toll-like receptor 3. *J Immunol* 172: 6545-6549.
- Kleer CG, Cao Q, Varambally S, Shen R, Ota I, Tomlins SA, Ghosh D, Sewalt RG, Otte AP, Hayes DF, Sabel MS, Livant D, Weiss SJ, Rubin MA and Chinnaiyan AM (2003) EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(20): 11606-11611.
- Kovar H, Aryee DN, Jug G, Henockl C, Schemper M, Delattre O, Thomas G and Gadner H (1996) Ews/fli-1 antagonists induce growth inhibition of Ewing tumor cells *in vitro*. *Cell Growth Differ* 7: 429-437.
- Kovar H, Jug G, Aryee DN, Zoubek A, Ambros P, Gruber B, Windhager R and Gadner H (1997) Among genes involved in the RB dependent cell cycle regulatory cascade, the p16 tumor suppressor gene is frequently lost in the Ewing family of tumors. *Oncogene* 15(18): 2225-32.
- Kovar H (1998) Progress in the molecular biology of ewing tumors. *Sarcoma* 2(1): 3-17.

- 
- Kuphal S, Lodermeier S, Bataille F, Schuierer M, Hoang BH, Bosserhoff AK (2006) Expression of Dickkopf genes is strongly reduced in malignant melanoma. *Oncogene* 25: 5027–5036.
- Kurihara S, Hakuno F, Takahashi S. (2000) Insulin-like growth factor-I-dependent signal transduction pathways leading to the induction of cell growth and differentiation of human neuroblastoma cell line SH-SY5Y: the roles of MAP kinase pathway and PI 3-kinase pathway. *Endocr J* 47(6): 739-751.
- Landgren E, Schiller P, Cao Y and Claesson-Welsh L (1998) Placenta growth factor stimulates MAP kinase and mitogenicity but not phospholipase C-gamma and migration of endothelial cells expressing Flt 1. *Oncogene* 16(3): 359-367.
- Lasorella A, Iavarone A and Israel MA (1996) Id2 specifically alters regulation of the cell cycle by tumor suppressor proteins. *Mol Cell Biol* 16(6): 2570-2578.
- Le Deley MC, Delattre O, Schaefer KL, Burchill SA, Koehler G, Hogendoorn PC, Lion T, Poremba C, Marandet J, Ballet S, Pierron G, Brownhill SC, Nesslerböck M, Ranft A, Dirksen U, Oberlin O, Lewis IJ, Craft AW, Jürgens H, Kovar H (2010) Impact of EWS-ETS fusion type on disease progression in Ewing's sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumor: prospective results from the cooperative Euro-E.W.I.N.G. 99 trial. *J Clin Oncol* 28(12): 1982-1988.
- Lessnick SL, Dacwag CS and Golub TR (2002) The Ewing's sarcoma oncoprotein EWS/FLI induces a p53-dependent growth arrest in primary human fibroblasts. *Cancer Cell* 1(4): 393–401.
- Le Tourneau C, Siu LL (2008) Promising antitumor activity with MGCD0103, a novel isotype-selective histone deacetylase inhibitor. *Expert Opin Investig Drugs* 17(8): 1247-1254.
- Levine RG, Bono CM, Hameed M, Blacksin M, Pavlick AC, Cathcart C and Benevenia J (2002) Ewing sarcoma in an octogenarian: a case report. *J Bone J Surg Am* 84: 445–448.
- Li X, Liu P, Liu W, Maye P, Zhang J, Zhang Y, Hurley M, Guo C, Boskey A, Sun L, Harris SE, Rowe DW, Ke HZ, Wu D (2005) Dkk2 has a role in terminal osteoblast differentiation and mineralized matrix formation. *Nat Genet* 37(9):945-52.
- Lin PP, Brody RI, Hamelin AC, Bradner JE, Healey JH and Ladanyi M (1999) Differential transactivation by alternative EWS-FLI1 fusion proteins correlates with clinical heterogeneity in Ewing's sarcoma. *Cancer Res* 59: 1428–1455.
- Lu C, Han HD, Mangala LS, Ali-Fehmi R, Newton CS, Ozbun L, Armaiz-Pena GN, Hu W, Stone RL, Munkarah A, Ravoori MK, Shahzad MM, Lee JW, Mora E, Langley RR, Carroll AR, Matsuo K, Spannuth WA, Schmandt R, Jennings NB, Goodman BW, Jaffe RB, Nick AM, Kim HS, Guven EO, Chen YH, Li LY, Hsu MC, Coleman RL, Calin GA, Denkbass EB, Lim JY, Lee JS, Kundra V, Birrer MJ, Hung MC, Lopez-Berestein G, Sood AK (2010) Regulation of tumor angiogenesis by EZH2. *Cancer Cell* 18(2): 185-197.
- Ludwig JA (2008) Ewing sarcoma: historical perspectives, current state-of-the-art, and opportunities for targeted therapy in the future. *Curr Opin Oncol* 20: 412-418.

- Manara MC, Landuzzi L, Nanni P, Nicoletti G, Zambelli D, Lollini PL, Nanni C, Hofmann F, García-Echeverría C, Picci P and Scotlandi K (2007) Preclinical in vivo study of new insulin-like growth factor-I receptor – specific inhibitor in Ewing's sarcoma. *Clin Cancer Res* 13: 1322–1330.
- Mandell JW, Hussaini IM, Zecevic M, Weber MJ and VandenBerg SR (1998) In situ visualization of intratumor growth factor signaling: immunohistochemical localization of activated ERK/MAP kinase in glial neoplasms. *Am J Pathol* 153(5): 1411-1423.
- Marks PA, Richon VM and Rifkind RA (2000) Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. SAHA and pyroxamide are lead compounds among the family of hydroxamic acid-based HPCs and are currently in phase I clinical trials. *J Natl Cancer Inst* 92: 1210- 1216.
- Mateo-Lozano S, Tirado O and Notario V (2003) Rapamycin induces the fusion-type independent downregulation of the EWS/FLI1 proteins and inhibits Ewing's sarcoma cell proliferation. *Oncogene* 22: 9282-9287.
- Matsumoto Y, Tanaka K, Nakatani F, Matsunobu T, Matsuda S and Iwamoto Y (2001) Downregulation and forced expression of EWSFLI1 fusion gene results in changes in the expression of G1 regulatory genes. *Br J Cancer* 84(6): 768-775.
- May WA, Lessnick SL, Braun BS, Klemsz M, Lewis BC, Lunsford LB, Hromas R and Denny CT. (1993a) The Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene encodes a more potent transcriptional activator and is a more powerful transforming gene than FLI-1. *Mol Cell Biol*. 13:7393–7398.
- May WA, Gishizky ML, Lessnick SL, Lunsford LB, Lewis BC, Delattre O, Zucman J, Thomas G and Denny CT (1993b) Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(12): 5752-5756.
- Meyer-Wentrup F, Richter G and Burdach S (2005) Identification of an immunogenic EWS-FLI1-derived HLA-DR-restricted T helper cell epitope. *Pediatr Hematol Oncol* 22(4): 297-308.
- Mittal R, Shafika Al Awadi, Omar Sahar und Behbehani AM (2008) Ewing's Sarcoma as Second Malignant Neoplasm after Retinoblastoma: A Case Report. *Med Princ Pract* 17:84–85.
- Miyagawa Y, Okita H, Nakaijima H, Horiuchi Y, Sato B, Taguchi T, Toyoda M, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata J, Umezawa A und Kiyokawa N (2008) Inducible expression of chimeric EWS/ETS proteins confers Ewing's family tumor-like phenotypes to human mesenchymal progenitor cells. *Mol Cell Biol* (7): 2125-2137. Erratum in: *Mol Cell Biol* 2008 28(11): 3882.
- Miyagawa Y, Okita H, Itagaki M, Toyoda M, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata J, Umezawa A, Kiyokawa N (2009) EWS/ETS regulates the expression of the Dickkopf family in Ewing family tumor cells. *PLoS One* 4: e4634.
- Nascimento AG, Unni K, Pritchard D, Cooper KL and Dahlin DC (1980) A clinicopathological study of 20 cases of large-cell (atypical) Ewing's sarcoma of bone. *Am J Surg Pathol* 4: 29–36.

- 
- Nemoto S, Xiang J, Huang S, Lin A (1998) Induction of apoptosis by SB202190 through inhibition of p38beta mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 273: 16415-16420.
- Nishimori H, Sasaki Y, Yoshida K, Irifune H, Zembutsu H, Tanaka T, Aoyama T, Hosaka T, Kawaguchi S, Wada T, Hata J, Toguchida J, Nakamura Y and Tokino T (2002) The Id2 gene is a novel target of transcriptional activation by EWS-ETS fusion proteins in Ewing family tumors. *Oncogene* 21(54): 8302-8309.
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S and Poltorak Z (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* 13(1): 9-22.
- Oberlin O, Patte C, Demeocq F, Lacombe MJ, Brunat-Mentigny M, Demaille MC, Tron P, N'Guyen Bui B and Lemerle J (1985) The response to initial chemotherapy as a prognostic factor in localized Ewing's sarcoma. *Eur J Cancer Clin Oncol* 21: 463-467.
- Ocker M and Schneider-Stock R (2007) Histone deacetylase inhibitors: signalling towards p21cip1/waf1. *Int J Biochem Cell Biol* 39(7-8): 1367-1374.
- Ohnishi S, Yasuda T, Kitamura S and Nagaya N (2007) Effect of hypoxia on gene expression of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mononuclear cells. *Stem Cells* 25(5): 1166-1177.
- Ouchida M, Ohno T, Fujimura Y, Rao VN and Reddy ES (1995) Loss of tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells expressing antisense RNA to EWS-fusion transcripts. *Oncogene* 11: 1049-1054.
- Ougolkov AV, Bilim VN, Billadeau DD (2008) Regulation of pancreatic tumor cell proliferation and chemoresistance by the histone methyltransferase enhancer of zeste homologue 2. *Clin Cancer Res* 14(21): 6790-6796.
- Parkin DM, Stiller CA and Nectoux J (1993) International variations in the incidence of childhood bone tumours. *Int J Cancer* 53: 371-376.
- Paulussen M, Ahrens S, Burdach S, Craft A, Dockhorn-Dworniczak B, Dunst J, Fröhlich B, Winkelmann W, Zoubek A and Jürgens H (1998) Primary metastatic (stage IV) Ewing tumor. Survival analysis of 171 patients from the EICESS studies. *Ann Oncol* 9: 275-281.
- Paulussen M, Fröhlich B, Jürgens H (2001a) Ewing tumour: incidence, prognosis and treatment options. *Paediatr Drugs* 3(12): 899-913.
- Paulussen M, Ahrens S, Braun-Munzinger G, Craft AW, Dockhorn- Dworniczak B, Dörffel W, Dunst J, Fröhlich B, Göbel U, Häussler M, Klingebiel T, Koscielniak E, Mittler U, Rube C, Winkelmann W, Voûte PA, Zoubek A, H. Gadner and H. Jürgens (2001b) Localized Ewing Tumor of Bone: Final Results of the Cooperative Ewing's Sarcoma Study CESS 86. *J Clin Oncol* 19(6): 1818-1829.
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22(2): 153-183.

- 
- Pene F, Claessens YE, Muller O, Vigié F, Mayeux P, Dreyfus F, Lacombe C and Bouscary D. (2002) Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mTOR/P70S6-kinase pathways in the proliferation and apoptosis in multiple myeloma. *Oncogene*. 21(43): 6587-6597.
- Pfeifle C, Reinhardt K, Heins S, Burdach S, Staeger MS (2009) Development and characterization of HAT-sensitive Ewing tumour cells for immunotherapy. *Anticancer Res* 29(11): 4489-4496.
- Pittois K, Wauters J, Bossuyt P, Deleersnijder W and Merregaert J (1999) Genomic organization and chromosomal localization of the *Ihm2a* gene. *Mamm Genome* 10(1): 54-56.
- Prieur A, Tirode F, Cohen P and Delattre O (2004) EWS/FLI-1 silencing and gene profiling of Ewing cells reveal downstream oncogenic pathways and a crucial role for repression of insulin-like growth factor binding protein 3. *Mol Cell Biol* 24: 7275–7283.
- Raitano AB, Halpern JR, Hambuch TM and Sawyers CL (1995) The Bcr-Abl leukemia oncogene activates Jun kinase and requires Jun for transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(25): 11746-11750.
- Ranke MB, Blum WF and Bierich JR (1988) Clinical relevance of serum measurements of insulin-like growth factors and somatomedin binding proteins. *Acta Paediatr Scand Suppl* 347: 114-126.
- Richter GH, Plehm S, Fasan A, Rössler S, Unland R, Bennani-Baiti IM, Hotfilder M, Löwel D, von Luettichau I, Mossbrugger I, Quintanilla-Martinez L, Kovar H, Staeger MS, Müller-Tidow C and Burdach S (2009) EZH2 is a mediator of EWS/FLI1 driven tumor growth and metastasis blocking endothelial and neuro-ectodermal differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(13): 5324-5329.
- Riggi N, Cironi L, Provero P, Suvà ML, Kaloulis K, Garcia-Echeverria C, Hoffmann F, Trumpp A and Stamenkovic I (2005) Development of Ewing's sarcoma from primary bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Cancer Res* 65: 11459-11468.
- Riggi N and Stamenkovic I (2007) The Biology of Ewing sarcoma. *Cancer Lett* 254(1): 1-10.
- Riggi N, Suvà ML, Suvà D, Cironi L, Provero P, Tercier S, Joseph JM, Stehle JC, Baumer K, Kindler V and Stamenkovic I (2008) EWS-FLI-1 expression triggers a Ewing's sarcoma initiation program in primary human mesenchymal stem cells. *Cancer Res* 68(7): 2176-2185.
- Roessner A and Jürgens H (1993) Round cell tumours of bone. *Pathol Res Pract* (10): 111-136.
- Rorie CJ, Thomas VD, Chen P, Pierce HH, O'Bryan JP and Weissman BE (2004) The Ews/Fli-1 fusion gene switches the differentiation program of neuroblastomas to Ewing sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumors. *Cancer Res* 64(4): 1266-1277.
- Rosen G (1976) Management of malignant bone tumors in children and adolescents. *Pediatr Clin North Am* 23(1): 183-213.
- Sakimura R, Tanaka K, Nakatani F, Matsunobu T, Li X, Hanada M, Okada T, Nakamura T, Matsumoto Y and Iwamoto Y (2005) Antitumor effects of histone deacetylase inhibitor on Ewing's family tumors. *Int J Cancer* 116: 784-792.

- 
- Salzer-Kuntschik M, Brand G and Delling G (1983) Determination of the degree of morphological regression following chemotherapy in malignant bone tumors. *Pathologie* 4: 135–141.
- Sato H, Suzuki H, Toyota M, Nojima M, Maruyama R, Sasaki S, Takagi H, Sogabe Y, Sasaki Y, Idogawa M, Sonoda T, Mori M, Imai K, Tokino T, Shinomura Y (2007) Frequent epigenetic inactivation of DICKKOPF family genes in human gastrointestinal tumors. *Carcinogenesis* 28: 2459–2466.
- Schaefer KL, Eisenacher M, Braun Y, Brachwitz K, Wai DH, Dirksen U, Lanvers-Kaminsky C, Juergens H, Herrero D, Stegmaier S, Koscielniak E, Eggert A, Nathrath M, Gosheger G, Schneider DT, Bury C, Diallo-Danebrock R, Ottaviano L, Gabbert HE and Poremba C (2008) Microarray analysis of Ewing's sarcoma family of tumours reveals characteristic gene expression signatures associated with metastasis and resistance to chemotherapy. *Eur J Cancer* 44(5): 699-709.
- Schajowicz F (1994) Tumors and tumorlike lesions of bone. Springer Heidelberg.
- Schmidt D, Harms D, Burdach S (1985) Malignant peripheral neuroectodermal tumours of childhood and adolescence. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 406(3): 351-365.
- Schönherr E, Witsch-Prehm P, Harrach B, Robenek H, Rauterberg J and Kresse H (1995) Interaction of biglycan with type I collagen. *J Biol Chem* 270(6): 2776-2283.
- Scotlandi K, Benini S, Sarti M, Serra M, Lollini PL, Maurici D, Picci P, Manara MC and Baldini N (1996) Insulin-like growth factor I receptor-mediated circuit in Ewing's sarcoma/peripheral neuroectodermal tumor: a possible therapeutic target. *Cancer Res* 56(20): 4570-4574.
- Scotlandi K, Benini S, Nanni P, Lollini PL, Nicoletti G, Landuzzi L, Serra M, Manara MC, Picci P and Baldini N (1998) Blockage of insulin-like growth factor-I receptor inhibits the growth of Ewing's sarcoma in athymic mice. *Cancer Res* 58(18): 4127-4131.
- Sebolt-Leopold JS, Dudley DT, Herrera R, Van Becelaere K, Wiland A, Gowan RC, Teclé H, Barrett SD, Bridges A, Przybranowski S, Leopold WR and Saltiel AR (1999) Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo. *Nat Med* 5(7): 810-816.
- Sekyi-Otu A, Bell RS, Ohashi C, Pollak M and Andrulis IL (1995) Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptors, IGF-1, and IGF-2 are expressed in primary human sarcomas. *Cancer Res* 55(1): 129-134.
- Silvany RE, Eliazar S, Wolff NC and Ilaria RL Jr (2000) Interference with the constitutive activation of ERK1 and ERK2 impairs EWS/FLI-1-dependent transformation. *Oncogene* 19(39): 4523-4530.
- Sivaraman VS, Wang H, Nuovo GJ, Malbon CC (1997) Hyperexpression of mitogen-activated protein kinase in human breast cancer. *J Clin Invest* 99(7): 1478-1483. Comment in: *J Clin Invest* 1997 99(7): 1463-1464.

- Staege MS, Hutter C, Neumann I, Foja S, Hattenhorst UE, Hansen G, Afar D and Burdach SE (2004a) DNA microarrays reveal relationship of Ewing family tumors to both endothelial and fetal neural crest-derived cells and define novel targets. *Cancer Res* 64: 8213-8221.
- Staege MS, Hansen G, Baersch G and Burdach S (2004b) Functional and molecular characterization of interleukin-2 transgenic Ewing tumor cells for in vivo immunotherapy. *Pediatr Blood Cancer* 43(1): 23-34.
- Steele J, Torr E, Noakes K, Kalk E, Moss P, Reynolds G, Hubscher S, van Lohuizen M, Adams D and Young L (2006) The polycomb group proteins, BMI-1 and EZH2, are tumour-associated antigens. *Br J Cancer*. 6; 95(9): 1202–1211.
- Stout AP (1918) A tumor of the ulnar nerve. *Proc N Y Pathol Soc* 12: 2–12.
- Tanaka K, Iwakuma T, Harimaya K, Sato H and Iwamoto Y (1997) EWS-Fli1 antisense oligodeoxynucleotide inhibits proliferation of human Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor cells. *J Clin Invest* 99: 239–247.
- Tanaka K, Iwakuma T, Harimaya K, Sato H, Iwamoto Y (1997) EWS-Fli1 antisense oligodeoxynucleotide inhibits proliferation of human Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor cells. *J Clin Invest* 99(2): 239-247.
- Tao Y, Pinzi V, Bourhis J and Deutsch E (2007) Mechanisms of Disease: signaling of the insulin-like growth factor 1 receptor pathway- therapeutic perspectives in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 4: 591–602.
- Taylor AP and Goldenberg DM (2007) Role of placenta growth factor in malignancy and evidence that an antagonistic PIGF/Flt-1 peptide inhibits the growth and metastasis of human breast cancer xenografts. *Mol Cancer Ther* 6(2): 524-531.
- Teplyuk NM, Galindo M, Teplyuk VI, Pratap J, Young DW, Lapointe D, Javed A, Stein JL, Lian JB, Stein GS and van Wijnen AJ. (2008) Runx2 regulates G protein-coupled signaling pathways to control growth of osteoblast progenitors. *J Biol Chem* 283(41): 27585-27597.
- Thalmeier K, Meissner P, Reisbach G, Falk M, Brechtel A and Dörmer P (1994) Establishment of two permanent human bone marrow stromal cell lines with long-term post irradiation feeder capacity. *Blood* 83(7): 1799-1807.
- Thalmeier K, Meissner P, Reisbach G, Hültner L, Mortensen BT, Brechtel A, Oostendorp RA, Dörmer P (1996) Constitutive and modulated cytokine expression in two permanent human bone marrow stromal cell lines. *Exp Hematol* 24(1): 1-10.
- Thiel U, Pirson S, Müller-Spahn C, Conrad H, Busch DH, Bernhard H, Burdach S and Richter GH. (2011) Specific recognition and inhibition of Ewing tumour growth by antigen-specific allo-restricted cytotoxic T cells. *Br J Cancer*. 15;104(6):948-56.

- 
- Thiele CJ, McKeon C, Triche TJ, Ross RA, Reynolds CP, Israel MA. (1987) Differential protooncogene expression characterizes histopathologically indistinguishable tumors of the peripheral nervous system. *J Clin Invest* 80(3): 804-811.
- Thimmaiah KN, Easton J, Huang S, Veverka KA, Germain GS, Harwood FC and Houghton PJ (2003) Insulin-like growth factor I-mediated protection from rapamycin-induced apoptosis is independent of Ras-Erk1-Erk2 and phosphatidylinositol 3'-kinase-Akt signaling pathways. *Cancer Res* 63(2): 364-374.
- Thompson AD, Teitell MA, Arvand A and Denny CT (1999) Divergent Ewing's sarcoma EWS/ETS fusions confer a common tumorigenic phenotype on NIH3T3 cells. *Oncogene* 18(40): 5506-5513.
- Tirode F, Laud-Duval K, Prieur A, Delorme B, Charbord P and Delattre O (2007) Mesenchymal stem cell features of Ewing tumors. *Cancer Cell* 11(5): 421-429.
- Torchia EC, Jaishankar S and Baker SJ (2003) Ewing tumor fusion proteins block the differentiation of pluripotent marrow stromal cells. *Cancer Res* 63: 3464–3468.
- Toretzky JA, Kalebic T, Blakesley V, LeRoith D and Helman LJ (1997a) The insulin-like growth factor-I receptor is required for EWS/FLI-1 transformation of fibroblasts. *J Biol Chem* 272(49): 30822-30827.
- Toretzky JA, Connell Y, Neckers L and Bhat NK (1997b) Inhibition of EWS-FLI-1 fusion protein with antisense oligodeoxynucleotides. *J Neurooncol* 31: 9–16.
- Toretzky JA, Thakar M, Eskenazi AE and Frantz CN (1999) Phosphoinositide 3- hydroxide kinase blockade enhances apoptosis in the Ewing's sarcoma family of tumors. *Cancer Res* 59: 5745–5750.
- Tschuch C, Schulz A, Pscherer A, Werft W, Benner A, Hotz- Wagenblatt A, Barrionuevo LS, Lichter P and Mertens D (2008) Offtarget effects of siRNA specific for GFP. *BMC Mol Biol* 9: 60.
- Tucker MA, D'Angio GJ, Boice JD Jr, Strong LC, Li FP, Stovall M, Stone BJ, Green DM, Lombardi F, Newton W, Hoover RN, Fraumeni JF Jr and For The Late Effects Study Group (1987) Bone sarcomas linked to radiotherapy and chemotherapy in children. *N Engl J Med* 317(10): 588-593.
- Turc-Carel C, Philip I, Berger M-P, Philip T and Lenoir GM (1984) Chromosome study of Ewing's sarcoma (ES) cell lines. Consistency of a reciprocal translocation (11;22)(q24;q12). *Cancer Genet Cytogenet* 12(1): 1-19.
- Ushigome U, Machinami R and Sorensen PH (2002) Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor (PNET). In: Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F, (eds.) *Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone*. Lyon, France: IARC Press. 298-300. World Health Organization Classification of Tumours.
- Van den Plas D and Merregaert J (2004a) Constitutive overexpression of the integral membrane protein Itm2A enhances myogenic differentiation of C2C12 cells. *Cell Biol Int* 28(3): 199-207.

- 
- Van den Plas D and Merregaert J (2004b) In vitro studies on Itm2a reveal its involvement in early stages of the chondrogenic differentiation pathway. *Biol Cell* 96(6): 463-470.
- van der Vlag J and Otte AP (1999) Transcriptional repression mediated by the human polycomb-group protein EED involves histone deacetylation. *Nat Genet* 23(4): 474-478.
- van Doorninck JA, Ji L, Schaub B, Shimada H, Wing MR, Krailo MD, Lessnick SL, Marina N, Triche TJ, Sposto R, Womer RB, Lawlor ER (2010) Current treatment protocols have eliminated the prognostic advantage of type 1 fusions in Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 28(12): 1989-1994.
- Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Ahmadi K, Timms J, Katso R, Driscoll PC, Woscholski R, Parker PJ and Waterfield MD (2001) Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem* 70: 535-602.
- Vankoningsloo S, de Longueville F, Evrard S, Rahier P, Houbion A, Fattaccioli A, Gastellier M, Remacle J, Raes M, Renard P and Arnould T (2008) Gene expression silencing with 'specific' small interfering RNA goes beyond specificity – a study of key parameters to take into account in the onset of small interfering RNA off-target effects. *FEBS J* 275: 2738-2753.
- Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, Ghosh D, Pienta KJ, Sewalt RG, Otte AP, Rubin MA and Chinnaiyan AM (2002) The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 419(6907): 624-629. Comment in: *Nature* 2002 419(6907): 572-573.
- Viré E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, Morey L, Van Eynde A, Bernard D, Vanderwinden JM, Bollen M, Esteller M, Di Croce L, de Launoit Y and Fuks F (2006) The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* 439(7078): 871-874. Erratum in: *Nature* 2007 446(7137): 824. Comment in: *Nature* 2006 439(7078): 794-795.
- Wendel HG, De Stanchina E, Fridman JS, Malina A, Ray S, Kogan S, Cordon-Cardo C, Pelletier J and Lowe SW (2004) Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy. *Nature* 428(6980): 332-337. Comment in: *Nature* 2004 428(6980): 267-269.
- Whang-Peng J, Triche TJ, Knutsen T, Miser J, Kao-Shan S, Tsai S and Israel MA (1986) Cytogenetic characterization of selected small round cell tumor of childhood. *Cancer Genet Cytogenet* 21: 185-208.
- Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ and Greenberg ME (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270(5240): 1326-1331.
- Xu X, Heidenreich O, Kitajima I, McGuire K, Li Q, Su B and Nerenberg M (1996) Constitutively activated JNK is associated with HTLV-1 mediated tumorigenesis. *Oncogene* 13(1): 135-142.
- Xu T, Bianco P, Fisher LW, Longenecker G, Smith E, Goldstein S, Bonadio J, Boskey A, Heegaard AM, Sommer B, Satomura K, Dominguez P, Zhao C, Kulkarni AB, Robey PG, Young MF (1998) Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice. *Nat Genet* 20: 78-82.

- 
- Yee D, Favoni RE, Lebovic OS, Lombana F, Powell DR, Reynolds CP and Rosen N (1990) Insulin-like growth factor I expression by tumors of neuroectodermal origin with the t(11;22) chromosomal translocation. *J Clin Invest* 86(6): 1806-1814.
- Yoshida M, Kijima M, Akita M and Beppu T (1990) Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both *in vivo* and *in vitro* by trichostatin A. *J Biol Chem* 265: 17174–17179.
- Yoshioka M, Yuasa S, Matsumura K, Kimura K, Shiomi T, Kimura N, Shukunami C, Okada Y, Mukai M, Shin H, Yozu R, Sata M, Ogawa S, Hiraki Y and Fukuda K (2006) Chondromodulin-I maintains cardiac valvular function by preventing angiogenesis. *Nat Med* (10): 1151-1159. Comment in: *Nat Med* 2006, 10: 1118-1119.
- Zhou N, Moradei O, Raeppl S, Leit S, Frechette S, Gaudette F, Paquin I, Bernstein N, Bouchain G, Vaisburg A, Jin Z, Gillespie J, Wang J, Fournel M, Yan PT, Trachy-Bourget MC, Kalita A, Lu A, Rahil J, MacLeod AR, Li Z, Besterman JM and Delorme D (2008) Discovery of N-(2-aminophenyl)-4-[(4-pyridin-3-ylpyrimidin-2-ylamino)methyl]benzamide (MGCD0103), an orally active histone deacetylase inhibitor. *J Med Chem* 51(14): 4072-4075.
- Zoubek A, Dockhorn-Dworniczak B, Delattre O, Christiansen H, Niggli F, Gatterer-Menz I, Smith TL, Jürgens H, Gardner H and Kovar H (1996) Does expression of different EWS transcripts define clinically distinct risk groups of Ewing tumor patients? *J Clin Oncol* 14: 245–251.