

# Untersuchung der Rolle der nukleären Klasse I Histon-Deacetylasen 1 und 8 in der Pathogenese des Ewing-Sarkoms

Nadja Nehls

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung einer Doktorin der Medizin (Dr. med.) genehmigten Dissertation.

Vorsitz: apl. Prof. Dr. Stefan Thorban

Prüfer\*innen der Dissertation:

1. Prof. Dr. Günther Richter
2. Priv.-Doz. Dr. Irene Teichert-von Lüttichau
3. apl. Prof. Dr. Rainer Burgkart

Die Dissertation wurde am 19.12.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.07.2023 angenommen.

*Den kleinen Helden in der Kinderonkologie gewidmet*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Publikation</b> .....	<b>I</b>
<b>2</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>II</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
3.1	Ewing-Sarkom .....	1
3.2	EZH2 und PRC2-Komplex .....	4
3.3	HDAC.....	5
3.4	Ziel der Arbeit.....	7
<b>4</b>	<b>Material</b> .....	<b>8</b>
4.1	Instrumente und Gerätschaften.....	8
4.2	Chemikalien, Reagenzien und Lösungen .....	13
4.3	Assays und Kits .....	16
4.3.1	TaqMan® Genexpressions-Assay für qRT-PCR.....	17
4.4	Standard-Medium für Zellkulturen.....	18
4.5	Universelle Lösungen.....	18
4.6	Zellzyklusanalyse.....	19
4.6.1	Puffer und Lösungen für Zellzyklusanalysen .....	19
4.7	Western Blot.....	19
4.7.1	Puffer und Lösungen für Western Blot Analysen .....	19
4.7.2	Gel für SDS-PAGE.....	20
4.8	Antikörper für Western Blot (WB) und Immunhistochemie (IC) .....	21
4.9	Inhibitoren und Chemotherapeutika .....	23
4.9.1	HDAC-Inhibitoren .....	23
4.9.2	PRC2-Komplex-Inhibitoren .....	23
4.9.3	Chemotherapeutika .....	24
4.10	Bakterienstämme .....	24
4.11	Humane Zelllinien und Tumorzelllinien .....	24
4.12	Mausstämme .....	25
4.13	Expressionsvektoren.....	26
4.13.1	Expressionsvektor für induzierbare RNA-Interferenz.....	26
4.13.2	Expressionsvektor für CRISPR/Cas9 <i>Knockouts</i> .....	27

<b>5</b>	<b>Methoden</b>	<b>29</b>
<b>5.1</b>	<b>Kultivierung und Behandlung der Tumorzellen</b>	<b>29</b>
5.1.1	Bestimmung der Zellzahl	29
5.1.2	Kryokonservierung und Reaktivierung der Tumorzellen	29
<b>5.2</b>	<b>RNA-Isolation</b>	<b>30</b>
5.2.1	Bestimmung der Quantität und Qualität der isolierten RNA	30
<b>5.3</b>	<b>cDNA-Synthese</b>	<b>30</b>
<b>5.4</b>	<b>Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)</b>	<b>31</b>
<b>5.5</b>	<b>Proliferationsassay</b>	<b>31</b>
<b>5.6</b>	<b>Kombinationsindexanalyse</b>	<b>32</b>
<b>5.7</b>	<b>Western Blot</b>	<b>32</b>
5.7.1	Reaktivierung der PVDF-Membran	33
<b>5.8</b>	<b>Ko-Immunpräzipitation (Co-IP)</b>	<b>33</b>
<b>5.9</b>	<b>Lentivirus-vermittelte und Tetracyclin-induzierbare RNA-Interferenz</b>	<b>33</b>
5.9.1	Replikation und Isolierung von DNA-Plasmiden	34
5.9.2	Lentivirale Verpackung	34
5.9.3	Lentivirale Infektion von EwS-Zellen	34
5.9.4	Lentivirale Infektion von EwS-Zellen mit CRISPR/Cas9-HDAC1 <i>Knockout</i>	35
<b>5.10</b>	<b>CRISPR/Cas9 <i>Knockouts</i></b>	<b>35</b>
5.10.1	Lentivirus-vermittelte CRISPR/Cas9 <i>Knockouts</i>	35
5.10.2	sgRNA-Sequenz	35
5.10.3	CRISPR/Cas9 <i>Knockouts</i> Einzelzell-Klone	36
<b>5.11</b>	<b>Invasionsassay</b>	<b>36</b>
<b>5.12</b>	<b>Koloniebildende Zellenassay</b>	<b>37</b>
<b>5.13</b>	<b>Differenzierungsassay</b>	<b>38</b>
<b>5.14</b>	<b>Immunhistochemie: <math>\gamma</math>-H2AX-Assay</b>	<b>38</b>
<b>5.15</b>	<b>Zellzyklusanalyse</b>	<b>38</b>
<b>5.16</b>	<b>Mircoarrayanalyse</b>	<b>39</b>
<b>5.17</b>	<b><i>In vivo</i> Versuche</b>	<b>40</b>
<b>5.18</b>	<b>Histologie</b>	<b>40</b>
<b>5.19</b>	<b>Statistische Auswertungen</b>	<b>41</b>
<b>6</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>42</b>
<b>6.1</b>	<b>Expression der HDAC der Klasse I (spezifisch HDAC1 und 8) im Ewing-Sarkom</b>	<b>42</b>



<b>6.2</b>	<b>HDACi als mögliche Kombinationstherapie des EwS .....</b>	<b>43</b>
6.2.1	Deregulation malignitätsrelevanter Genexpressionen durch HDAC (Klasse I) Inhibition..	43
6.2.2	Entinostat und Romidepsin erhöhen die Differenzierungsfähigkeit von EwS-Zellen ....	45
6.2.3	Geisteigerte Acetylierung der Histone H3K9/14 und H3K27 nach Behandlung mit HDACi .....	46
6.2.4	HDACi erhöhen die Empfindlichkeit von EwS-Zellen für Chemotherapeutika .....	47
<b>6.3</b>	<b>Die Kombinationstherapie EEDi mit HDACi zeigt antitumorale synergistische Effekte ..</b>	<b>51</b>
6.3.1	Abnahme der Trimethylierung von Histon H3K27 nach Behandlung mit EED- oder EZH2-Inhibitoren .....	51
6.3.2	Auswirkungen von Kombinationstherapien mit EEDi auf die Zellproliferation <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> .....	51
6.3.3	HDAC1 (und HDAC2) interagieren mit dem PRC2-Komplex .....	53
<b>6.4</b>	<b>Die Rolle von HDAC1 in der Pathogenese des Ewing-Sarkoms.....</b>	<b>54</b>
6.4.1	EwS-Zellen mit HDAC1 <i>Knockout</i> zeigen eine signifikant verringerte Proliferationsfähigkeit <i>in vitro</i> .....	54
6.4.2	Reduziertes Wachstum von EwS-Tumoren mit HDAC1 <i>Knockout in vivo</i> .....	55
6.4.3	HDAC1 <i>Knockouts</i> zeigen eine verlängerte G1-Phase (Zellzyklus) sowie signifikant mehr Doppelstrangbrüche.....	56
6.4.4	Apoptose- und Mitoseverhalten von HDAC1 <i>Knockout</i> EwS-Tumoren im Mausmodell ...	57
6.4.5	Die Relevanz von HDAC1 für kontaktunabhängiges Wachstum und für die Fähigkeit zur Invasion .....	58
6.4.6	Deregulation malignitätsrelevanter Genexpressionen durch HDAC1 <i>Knockout</i> .....	59
6.4.7	Kompensationsmechanismen von HDAC1 <i>Knockouts</i> auf Proteinebene .....	60
6.4.8	HDAC1 <i>Knockouts</i> erhöhen die Empfindlichkeit von EwS-Zellen für Erstlinienchemotherapeutika .....	60
<b>6.5</b>	<b>Die Rolle von HDAC8 in der Pathogenese des Ewing-Sarkoms.....</b>	<b>61</b>
6.5.1	HDAC8 allein hat keinen bis nur wenig Einfluss auf die Proliferations- und die Invasionsfähigkeit.....	63
6.5.2	Synergistische antitumorale Effekte der HDAC8 Suppression in HDAC1 <i>Knockouts</i> ...	64
<b>7</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>66</b>
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>73</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>74</b>
<b>10</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>76</b>
<b>11</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>77</b>
<b>12</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>91</b>

## 1 Publikation

Die vorliegende Arbeit wurden veröffentlicht in:

Journal of Experimental & Clinical Cancer Research (IF 12,658)

2021 Oct 15; 40(1):322. doi: 10.1186/s13046-021-02125-z

*Class I histone deacetylases (HDAC) critically contribute to Ewing sarcoma pathogenesis.*

Schmidt O\*, **Nehls N\***, Prexler C, von Heyking K, Groll T, Pardon K, Garcia HD, Hensel T, Gürgen D, Henssen AG, Eggert A, Steiger K, Burdach S und Richter GHS (2021).

\*geteilte Erstautorenschaft

## 2 Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
cALL	engl. <i>Common</i> -Akute lymphoblastische Leukämie
Cas9	engl. <i>CRISPR-associated protein 9</i>
cDNA	Komplementäre DNA
CFD-Scores	engl. <i>Cutting Frequency Determination-Score</i>
CHF	Chronische Herzinsuffizienz
Co-IP	engl. <i>Co-Immunoprecipitation</i>
CoREST	engl. <i>Co-repressor of repressor element-1 silencing transcription factor</i>
CRISPR	engl. <i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CRP	C-reaktives Protein
CTCL	Kutanes T-Zell-Lymphom
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxyribonucleosid Triphosphat
DPBS	engl. <i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
EDTA	engl. <i>Ethylene-diamine-tetra-acetic acid</i>
EED	engl. <i>Embryonic ectoderm development</i>
EEDi	EED-Inhibitor
EGR2	engl. <i>Early growth response 2</i>
ERG	ETS Transkriptionsfaktor
ETS	engl. <i>Erythroblast transformation specific family</i>
EwS	Ewing-Sarkom
EWSR1	engl. <i>EWS RNA binding protein 1</i>
EZH2	engl. <i>Enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit</i>
EZH2i	EZH2-Inhibitor
FAM	Fluoresceinamidite
FBS	engl. <i>Fetal bovine serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLI1	Proto-Onkogen, ETS Transkriptionsfaktor
G	Gauge
GAP43	engl. <i>Growth associated protein 43</i>
GAPDH	Glyceraldehyd-2-Phosphat Dehydrogenase

GFAP	engl. <i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GSEA	engl. <i>Gene set enrichment analysis</i>
$\gamma$ -H2AX	Phosphorylierung von Histon H2A an Serin 139
H.-E.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
H2A	Histon 2A
H2B	Histon 2B
H3	Histon 3
H3K27	Histon 3 Lysin 27
H3K27ac	Histon 3 Lysin 27 Acetylierung
H3K27me3	Histon 3 Lysin 27 Trimethylierung
H4	Histon 4
HAT	Histon-Acetyltransferasen
HBSS	engl. <i>Hank's buffered salt solution</i>
HCl	Hydrogenchlorid
HDAC	Histon-Deacetylase
HDACi	HDAC-Inhibitor
HRP	engl. <i>Horseradish peroxidase</i>
i.p.	Intraperitoneal
IC	Immunhistochemie
IgG	Immunglobulin G
IMDM	engl. <i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
ITS	Insulin-Transferrin-Selen
KOH	Kaliumhydroxid
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LSD1	Lysin-spezifische Demethylase 1A
MGB	engl. <i>Minor groove binder</i>
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
mRNA	Messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomografie
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NTC	engl. <i>Non-template control</i>
NSE	engl. <i>normalized enrichment score</i>
NuRD	engl. <i>Nucleosome Remodeling and Deacetylation</i>
p21	Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor 1A
p53	Tumor-Protein p53
PAM	engl. <i>Protospacer adjacent motif</i>

PARP	Poly-ADP Ribose Polymerase
PBS	engl. <i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	engl. <i>Polymerase chain reaction</i>
PI	Propidiumiodid
PNET	Peripher neuroektodermaler Tumor
PRC2	engl. <i>Polycomb repressor complex 2</i>
PTCL	Peripheres T-Zell-Lymphom
PVDF	Polyvinyliden Fluorid
qRT-PCR	engl. <i>Quantitative real-time PCR</i>
RMA	engl. <i>Robust multichip average</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase A	Ribonuklease A
Rpd3	engl. <i>reduced potassium dependency 3</i>
rpm	engl. <i>Revolutions per minute</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkriptase
s.c.	Subkutan
SAHA	engl. <i>Suberoylanilide hydroxamic acid</i>
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	engl. <i>Standard error of the mean</i>
sgRNA	engl. <i>Single Guide RNA</i>
shRNA	engl. <i>Small hairpin RNA</i>
sin3	Swi-independent 3
SIRT7	Sirtuin 7
SMAD	engl. <i>Small mothers against decapentaplegic homolog</i>
SUZ12	engl. <i>Suppressor of zeste 12 homolog</i>
TBS	engl. <i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	TBS-Tween-20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-Diamin
TGF- $\beta$ RII	engl. <i>Transforming growth factor-beta receptor, type II</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	2-[4-(2,4,4-trimethylpentan-2-yl)phenoxy]ethanol
TRIzol	engl. Total RNA isolation reagent
TSA	Trichostatin A
V	Volt

## 3 Einleitung

### 3.1 Ewing-Sarkom

#### Allgemeines

Das Ewing-Sarkom (EwS) ist ein hochmaligner Knochen- und Weichteiltumor mit früher Metastasierung im Kindes- und Jugendalter. (Balamuth & Womer, 2010) Trotz steigender Fortschritte in der Therapie des EwS, mit einer 5-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit von über 80% (Dirksen, Koch, et al., 2020; Womer et al., 2012), ist die Prognose bei Metastasierung oder bei einem Rezidiv infaust mit einer 5-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit von unter 20%. (Grier et al., 2003)

Darüber hinaus führen die derzeitigen Therapieschemata, vorrangig Tumorresektion, Polychemotherapie und Bestrahlung, zu akuten und langfristigen Nebenwirkungen und verkürzen die Lebenserwartung der Überlebenden. (Armstrong et al., 2014; Ginsberg et al., 2010) Die Entwicklung neuartiger therapeutischer Strategien ist notwendig, um Behandlungsergebnisse für Patient\*innen mit rezidivierender und metastasierter Erkrankung zu verbessern und gleichzeitig Folgeschäden der Therapie zu minimieren.

#### Epidemiologie und Ätiologie

Das EwS stellt nach dem Osteosarkom den zweithäufigsten primären Knochentumor im Kindes- und Jugendalter dar. Bis zu etwa ein Drittel der Krankheitsfälle werden im ersten Lebensjahrzehnt diagnostiziert, wobei der Häufigkeitsgipfel im zweiten Lebensjahrzehnt liegt. (Balamuth & Womer, 2010; Bernstein et al., 2006) Etwa 3/1.000.000 Kinder unter 15 Jahren werden mit einem EwS diagnostiziert. (Dirksen, 2022) Im Erwachsenenalter tritt das EwS deutlich seltener auf und manifestiert sich häufiger in Form eines Weichteiltumors. (Karski et al., 2013) Epidemiologisch tritt das EwS häufiger bei Kaukasiern auf mit einer Geschlechterverteilung zu Gunsten des männlichen Geschlechts (m:f 1,5:1). (Bernstein et al., 2006; Dirksen, 2022) Mögliche Ursache könnten Allele für das GGAA-Motiv sein, die häufiger in der kaukasischen als in der afrikanischen Bevölkerung zu finden sind und durch die Bindung von EWS-FLI1 (Fusionsprotein des EwS, siehe Pathologie) zu einer Hochregulation von beispielsweise *EGR2* (early growth response 2) führen, welches als einer der Treiber in der Karzinogenese des Ewing-Sarkoms gilt. (Grünewald et al., 2015)

#### Pathologie

Histologisch erscheint das EwS als klein-, blau- und rundzelliger Tumor und ähnelt somit anderen (pädiatrischen) kleinzelligen Rundzelltumoren, wie beispielsweise dem Lymphom,

Rhabdomyosarkom, kleinzelligen Osteosarkom, Neuroblastom oder dem desmoplastischen Rundzelltumor. Das EwS muss daher Immunhistochemisch und molekularpathologisch abgegrenzt werden. Alle EwS sind histopathologisch als hochmaligne (*Grading* 3) klassifiziert. (Dirksen, 2022)

EwS sind durch tumorspezifische, balancierte chromosomale EWSR1/ETS Translokationen charakterisiert. Die häufigste Translokation entsteht zwischen Chromosom 11 und 22 (q24;q12), wodurch ein EWSR1-FLI1 Fusionsprotein gebildet wird. Bei der zweithäufigsten Translokation t(21;22)(q22;q12) ist ein EWSR1-ERG Fusionsprotein nachweisbar. (Delattre et al., 1992; Lessnick & Ladanyi, 2012; Mackintosh et al., 2010) Viel seltener werden andere somatische Mutationen beobachtet, die in der EwS-Pathogenese involviert sind. (Agelopoulos et al., 2015; Brohl et al., 2014; Crompton et al., 2014; Gröbner et al., 2018; Tirode et al., 2015) Entscheidende Gene werden durch das Fusionsprotein EWS-FLI1 dereguliert: EWS-FLI1 bindet als aberranter Transkriptionsfaktor DNA mit GGAA-Mikrosatelliten, wodurch diese in aktive Enhancer umgewandelt werden. (Riggi et al., 2014) Dies führt zur erhöhten Expression von nachgeschalteten Onkogenen was folglich zur Tumorentstehung beiträgt. (Gangwal et al., 2008) Beispielsweise führt EWS-FLI1 zu einer Hochregulation von EZH2, welches unter anderem wichtig für die Differenzierungs- und Metastasierungsfähigkeit ist (siehe Kapitel 3.2). (Richter et al., 2009) Trotz gleicher Translokation beobachtet man unterschiedliche Verläufe der Erkrankung, die nahelegen, dass neben den genetischen Veränderungen epigenetische Einflüsse, wie beispielsweise DNA-Methylierungen (Sheffield et al., 2018) und Histon-Modifikationen (Richter et al., 2009) die Karzinogenese beeinflussen. Zusammengenommen ist anzunehmen, dass die genetische EWS-FLI1-Translokation eng mit globalen und genspezifischen, epigenetischen Veränderungen verbunden ist und somit eine heterogene Tumorbiologie bedingt. (Burdach et al 2009) Derartige epigenetische Prozesse bieten neue Therapieziele, deren Modifikation von prognostischer Bedeutung sein könnte.

Aufgrund des gleichen molekularen Profils – trotz unterschiedlicher Differenzierungsgrade – wurden die ursprünglich als „Ewing-Sarkom Familie“ definierten Sarkomentitäten (Ewing-Sarkom, peripher neuroektodermale Tumore (PNET) und atypische Ewing-Sarkome) in der überarbeiteten WHO-Klassifikation für Weichteil- und Knochentumore 2013 einheitlich als „Ewing-Sarkom“ klassifiziert. (Delattre et al., 1994; Jo & Doyle, 2016; Van Doorninck et al., 2010)

Seit der Erstbeschreibung von James Ewing, der das EwS als „diffuses Endotheliom des Knochens“ charakterisierte (Ewing, 1972), wurden verschiedene Hypothesen über die Ursprungszelle des EwS aufgestellt, die bis heute nicht abschließend bewiesen werden konnten. Führend ist die Hypothese, dass das EwS aus einer Vorläuferzelle der primitiven Neuralleiste stammt, die sich im Schwellenbereich zur mesenchymalen und endothelialen

Differenzierung befindet (Riggi et al., 2005; Staeger et al., 2004), wobei nach ektopischer Expression von EWS/FLI1 auch ein neuronaler Phänotyp beobachtet werden konnte, sodass auch alternativ eine Transdifferenzierung als Hypothese für das EwS gelten könnte. (Hullieskovan et al., 2005; Richter et al., 2009)

### **Klinik/ Leitsymptom**

Die Symptome des EwS sind meist unspezifisch und werden häufig fehldiagnostiziert. Somit wird die Diagnose häufig erst im Verlauf gestellt. (Ferguson & Turner, 2018) Typisch sind lokale Schmerzen, welche meist intermittierend, bei Belastung oder selten auch nachts auftreten. Kindliche Bagateltraumata erschweren die Diagnose, wobei sich häufig eine Diskrepanz zwischen Traumamechanismus und Symptomausprägung zeigt. (Widhe & Widhe, 2000) Weitere Symptome sind eine lokale Schwellung sowie im Verlauf ein motorischer Funktionsverlust und in seltenen Fällen auch pathologische Frakturen. Laborchemisch finden sich, besonders bei großen Tumoren, erhöhte Serumspiegel für LDH, Ferritin und CRP sowie ein beschleunigtes BSG. (Dirksen, 2022) B-Symptome sind selten und meist mit einem disseminierten Krankheitsstadium assoziiert. (Grünewald, Cidre-Aranaz, Surdez, Tomazou, De Álava, et al., 2018)

### **Diagnostik und Therapie**

Neben der ausführlichen Anamnese und klinischen Untersuchung sind die lokale Bildgebung (Röntgen und MRT) und die bioptische Sicherung essenziell in der Diagnosestellung. Bei Bestätigung der Verdachtsdiagnose wird eine Ausbreitungsdiagnostik (Staging) mittels Bildgebung und Knochenmarkspunktion durchgeführt und die Organfunktionen vor Therapiestart ermittelt. (Dirksen, Brodowicz, et al., 2020) Die meisten Primärtumore sind in den langen Röhrenknochen der Extremitäten (meist diaphysär), im Becken, dem Thorax oder der Wirbelsäule lokalisiert. (Jedlicka, 2010) Bei etwa einem Viertel der Patient\*innen liegt bei Diagnosestellung bereits eine Fernmetastasierung vor. In absteigender Reihenfolge sind pulmonale Metastasen (50%) führend, gefolgt von ossären Metastasen (25%) sowie ein Befall des Knochenmarks (20%). (Grief, 1997) Je nach Ausbreitungsgrad sowie dem Vorliegen von definierten Risikofaktoren (beispielsweise schlechtes Ansprechen auf neoadjuvante Chemotherapie), erfolgt die Therapie in definierten Gruppen. Aufgrund der signifikant schlechteren Prognose müssen in der Stadieneinteilung eine fernmetastasierte von einer lokoregionalen Erkrankung abgegrenzt werden. (Dirksen, Bhadri, et al., 2020; Haeusler et al., 2010; Ladenstein et al., 2010) Grundsätzlich besteht die Behandlung des EwS aus einer systemischen, medikamentösen Therapie (neoadjuvante und adjuvante Chemotherapie) und einer lokalen Therapie (Operation und/ oder Bestrahlung). (Gaspar et al., 2015; Grünewald, Cidre-Aranaz, Surdez, Tomazou, de Álava, et al., 2018) Die Therapieintensität richtet sich



nach dem Rezidivrisiko, in Abhängigkeit von den vorliegenden Risikofaktoren und der Tumorausbreitung, sodass in dezidierten Fällen beispielsweise eine autologe Stammzelltransplantation als Therapieoption durchgeführt wird. Im metastasierten Stadium kommen zusätzlich Lokaltherapien der Metastasen in Betracht. (Dirksen et al., 2019; Haeusler et al., 2010)

Aktuell existiert kein einheitlicher Standard für die Behandlung von Rezidiven (Dirksen, 2022), die momentan in laufenden Studien mit neuen Kombinationstherapien oder experimentellen Ansätzen behandelt werden. Beispielsweise zeigte eine Phase II Studie mit dem Tyrosinkinase Inhibitor Cabozantinib ein Ansprechen in 26% der Patient\*innen mit einem Rezidiv (Italiano et al., 2020).

### **3.2 EZH2 und PRC2-Komplex**

Ursprünglich wurde die allgemeine Karzinogenese als eine Akkumulation von genetischen Veränderungen betrachtet, die durch den sequenziellen Erwerb von Mutationen, mit konsekutiver Aktivierung von Proto-Onkogenen und dem Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen, bedingt ist. Heute ist jedoch bekannt, dass die Karzinogenese ein komplexer Prozess ist, in welchem auch epigenetische Veränderungen eine relevante Auswirkung haben. (Sparmann & Van Lohuizen, 2006)

Die Histon-Methyltransferase EZH2 (Enhancer of Zeste, Drosophila, Homolog 2) ist ein Teil des PRC2-Komplexes (Polycomb-Repressor-Complex 2), der sich weiter aus den core-Proteinen EED- (embryonic ectoderm development) und SUZ12 (Zeste-Suppressor) zusammensetzt. (Di Croce & Helin, 2013)

Innerhalb des PRC2-Komplexes besitzt EZH2 eine Methyltransferase-Aktivität und schaltet Zielgene durch Methylierung von Lysin 27 auf Histon 3 (H3K27) ab. Um eine stabile Histon-Methyltransferase-Aktivität zu erlangen, muss EZH2 mit zwei seiner nicht-katalytischen Partner (EED und SUZ12) komplexiert sein. (R. Cao & Zhang, 2004) Für die suppressive Aktivität des PRC2-Komplexes scheinen HDAC eine zentrale Rolle zu spielen, so beobachteten Varambally et al., dass das EZH2-vermittelte Gen-Silencing durch HDAC-Inhibitoren (HDACi) rückgängig gemacht werden kann, da der PRC2-Komplex über EED mit HDAC2 interagieren kann. (Varambally et al., 2002) Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in humanen Zellen der PRC2-Komplex auch mit HDAC1 interagiert. (Kuzmichev et al., 2002; Van Der Vlag & Otte, 1999)

In der Ontogenese spielt EZH2 eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung einer Stammzell-Expressionssignatur (Sparmann & Van Lohuizen, 2006) und wirkt vermutlich als Regulator in der Stammzell-Regeneration und Differenzierung. (Caretta et al., 2004; Lund & van Lohuizen, 2004). Korrespondierend scheint in der Karzinogenese die Rolle des PRC2-Komplexes bzw. von EZH2 in der Regulierung der Stammzellenerhaltung ein onkogenener Treiber zu sein.

(Sparmann & Van Lohuizen, 2006) Dementsprechend ist EZH2 in vielen Tumoren überexprimiert, beispielsweise im Mamma-, Prostata-, Endometriumkarzinom und dem Melanom. (Bachmann et al., 2006) Substanzielle Anstiege der EZH2-Expression finden sich in fortgeschrittenen Tumorstadien und konnten mit der Tumoraggressivität korreliert werden, mit entsprechend negativer prognostischer Wirkung. (Bachmann et al., 2006; Kleer et al., 2003; Varambally et al., 2002)

Es konnte gezeigt werden, dass EWS-FLI1 zu diversen epigenetischen Veränderungen, wie der globalen Modifikation der Histon-H3K27-Acetylierung sowie der H3K27-Trimethylierung in EwS führt, sodass Modifikationen der HDAC-Aktivität ein allgemeines Merkmal von EwS zu sein scheint. (Riggi et al., 2014; Tomazou et al., 2015)

Richter et al. konnten zeigen, dass die EZH2 Überexpression bei EwS, durch die Bindung des Fusionsproteins EWS-FLI1 an den EZH2-Promotor bedingt ist, die die EZH2-Expression in EwS induziert. Ergebnisse nach Suppression von EZH2 durch RNA-Interferenz (RNAi) zeigten, dass EZH2 für die Aufrechterhaltung eines undifferenzierten, reversiblen, hochgradig malignen Stammzell-Phänotyps in EwS wesentlich ist. Daneben zeigte die Inhibition der EZH2-Expression durch RNAi eine Unterdrückung des kontaktunabhängigen Wachstums *in vitro* und verzögerte die Tumorentwicklung und Metastasierung *in vivo*. (Richter et al., 2009) Das Fusionsprotein EWS-FLI1 nutzt somit EZH2 (als ein Schlüsselenzym einer Stammzelle), um epigenetisch maligne Eigenschaften der Tumorzelle zu induzieren. (Burdach et al. 2009) Untersuchungen zeigten, dass die Auswirkungen der Suppression von EZH2 nach RNAi durch die Behandlung von EwS-Zellen mit verschiedenen HDAC-Inhibitoren (HDACi) wie Trichostatin A (TSA) oder Entinostat (MS-275) nachgeahmt werden kann. Die ähnliche Wirksamkeit nach HDACi Behandlung deutet darauf hin, dass epigenetische Veränderungen eine essenzielle Rolle in der Karzinogenese des EwS spielen und diese hierdurch modifiziert werden kann. (Richter et al., 2009)

### **3.3 HDAC**

Die epigenetische Regulation der Genexpression wird unter anderem über die Modifikation von Histonen gesteuert, die mit der DNA das Nukleosom bilden und die strukturelle Einheit des Chromatins darstellen. Die Wicklung der DNA um ein Histon-Oktamer (bestehend aus jeweils zwei Einheiten der Histonproteine H2A, H2B, H3 und H4) definiert das Nukleosom. Sie bedingt eine Chromatinstruktur, die die Zugänglichkeit zu einzelnen DNA-Sequenzen steuern kann. (R. Kornberg, 1974; R. D. Kornberg & Content, 1977) Ein Schlüsselmechanismus in der epigenetischen Genregulation ist, neben diversen Modifikationen wie unter anderem der Methylierung, die Acetylierung der Histone, die durch Histon-Deacetylasen (HDAC) und Histon-Acetyltransferasen (HAT) gesteuert wird. (Eckschlager et al., 2017) Die

Histonacetylierung ist in transkriptionsaktiven Regionen des Genoms angereichert, insbesondere an proximalen Promotoren und Enhancern, und erleichtert die Bindung von Transkriptionsfaktoren. (Kazanets et al., 2016) Umgekehrt entfernen HDAC Acetylierungen von Histonen und führen im Allgemeinen zur Inhibition der Transkription. (Chen et al., 2015) Neben der Histonacetylierung und -deacetylierung wird auch der Acetylierungsstatus von Nicht-Histon-Proteinen modifiziert und folglich multiple zelluläre Funktionen verändert, wie beispielsweise mRNA-Splicing, Translation oder andere Proteininteraktionen. (Spange et al., 2009)

Daneben können Störungen der Chromatinstruktur zu einer unangemessenen Genexpression und genomischer Instabilität führen, wodurch Zellveränderungen und mögliche maligne Transformationen entstehen können. Proteine, die die Chromatinorganisation kontrollieren, sind daher Schlüsselakteure in der Tumorentstehung. (Sparmann & Van Lohuizen, 2006)

Bisher wurden 18 verschiedene HDAC in Säugetieren identifiziert, die anhand ihrer Homologie zu Hefe in vier Klassen unterteilt werden. (Gregoretti et al., 2004; Ruijter et al., 2003) HDAC1, 2, 3 und 8 bilden gemeinsam die Klasse I und weisen eine Homologie mit dem Hefe-Transkriptionsregulator Rpd3 auf. HDAC der Klasse I sind gewöhnlich im Zellkern lokalisiert und werden ubiquitär exprimiert. (Haberland et al., 2009)

Es wurde beobachtet, dass Konzentrationen von HDAC der Klasse I in verschiedenen Tumorzellen erhöht sind, jedoch je nach Tumorart divergieren (Eckschlager et al., 2017): Beispielsweise ist HDAC1 in Prostata- und gastrointestinalen Tumoren sowie in Mammakarzinomen überexprimiert. (Choi et al., 2001; Halkidou et al., 2004; Zhang et al., 2005) Daneben wird HDAC8 in Neuroblastom-Zellen und in myeloproliferativen Neoplasien erhöht exprimiert. (Adhikari et al., 2018; Oehme et al., 2009)

Die Inhibition von HDAC (HDAC-Inhibitoren, HDACi) hat mannigfaltige Auswirkungen auf die Tumorgenese. Neben einer Verlangsamung des Tumorzellzyklus, kommt es zur Induktion der Differenzierung und zur Apoptose, Verringerung der Angiogenese und Modulation der Immunreaktion. (Eckschlager et al., 2017) Die inhibitorischen Mechanismen der Tumorentwicklung von HDACi sind jedoch nicht einheitlich und hängen neben weiteren Faktoren von der Tumorart sowie dem HDACi und seiner Dosis ab. (Kretsovali et al., 2012) Richter et al. konnten zeigen, dass die Proliferation von EwS-Zellen durch die Behandlung mit dem HDACi Trichostatin A (TSA) signifikant eingeschränkt wird, während das Wachstum anderer pädiatrischer klein- und blauzelliger Tumore (hier Neuroblastom- und cALL-Zelllinien) nicht gehemmt wird. (Richter et al., 2009)

HDACi lassen sich in verschiedene strukturelle Gruppen einteilen: Hydroxamsäuren, zyklische Peptide, Benzamide und kurzkettige Fettsäuren. (Falkenberg & Johnstone, 2014)

Zur Gruppe der Hydroxamsäuren gehört (neben anderen HDACi) TSA. TSA ist ein pan-HDAC-Inhibitor und wird wegen seiner Toxizität nur in Laborexperimenten verwendet. (Eckschlager et al., 2017)

Romidepsin gehört zur Gruppe der zyklischen Peptide, inhibiert HDAC1 und 2 und wurde für die Behandlung von kutanen T-Zell-Lymphomen (CTCL) und peripheren T-Zell-Lymphomen (PTCL) zugelassen. (Smolewski & Robak, 2017; Ververis et al., 2013)

HDACi Entinostat (MS-275) wird zur Gruppe der Benzamide gezählt und inhibiert HDAC1 und 3. Entinostat zeigt eine vielversprechende Wirksamkeit beispielsweise bei Patient\*innen mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom, Brustkrebs oder Nierenzellkarzinom. (Juergens et al., 2011; Pili et al., 2017; Trapani et al., 2017) Daneben konnten vielversprechende Ergebnisse von Entinostat in Kombination mit Immuncheckpoint-Inhibitoren, so bei Blasenkarzinom oder metastasierten Uvula Melanomen gezeigt werden. (Ny et al., 2021; Truong et al., 2021)

### **3.4 Ziel der Arbeit**

Das Ziel dieser Dissertation war die Untersuchung der Relevanz einzelner HDAC-Proteine (spezifisch HDAC1 und 8) und ihre möglichen zellulären und epigenetischen Regulationsmechanismen in der EwS-Tumorgenese. HDACi hemmen in der Regel eine Gruppe von HDAC-Genen. Um herauszufinden, welche Rolle einzelne HDAC in der Pathogenese von EwS spielen könnten, wurden mit Hilfe der CRISPR/Cas9 Technologie EwS *Knockout*-Zellen, sowie mit RNAi EwS *Knockdown*-Zellen von Klasse I HDAC (spezifisch HDAC1 und 8) hergestellt. Die tumorbiologischen Veränderungen dieser Deletionsmutanten wurden charakterisiert. Untersucht wurde, ob der Verlust einzelner HDAC einen ähnlichen Tumor-Phänotyp, wie die Suppression von EZH2 in EwS generiert. Gleichzeitig sollte geprüft werden, ob HDAC-Deletionsmutanten sensitiver auf EwS-geeignete Chemotherapeutika reagieren. Weiterhin sollte die Auswirkung spezifischer HDAC-Inhibitoren, wie Trichostatin A, Romidepsin, Entinostat oder PCI-34051 (spezifisch für HDAC8) an EwS-Zelllinien als Mono- und Kombinationstherapie untersucht werden, um die Grundlagen für mögliche Kombinationstherapien von HDAC-Inhibitoren mit geeigneten Chemotherapeutika zu legen.

## 4 Material

### 4.1 Instrumente und Gerätschaften

Instrumente	Bezeichnung/ Beschreibung	Hersteller
Airflow		Köttermann GmbH & Co, Uetze, D
Autoklav	2540EL	Systec, Wetttenberg, D
Autoklav	V95	Systec, Wetttenberg, D
Bond RXm System		Leica, Wetzlar, D
Durchflusszytometrie	FACSCalibur™	BD Bioscience, Heidelberg, D
Digitale Waage	EW3000-2M	Kern, Balingen-Frommern, D
Digitale Waage	770	Kern, Balingen-Frommern, D
Elektrophoresegerät für die Qualitätskontrolle von Biomolekülen	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Waldbronn, D
Gelkamm für Western Blot		Peqlab, Erlangen, D
Kontrollierte Gefrierbox	Mr. Frosty (Cryo 1°C Freezing Container)	Nalgene, Rochester, NY, USA
Kryoröhrchen	1.5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Kulturplatte	100 mm Ø	Nunc, Naperville, USA
Küvette		Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D

<b>Instrumente</b>	<b>Bezeichnung/ Beschreibung</b>	<b>Hersteller</b>
Elektronische Platte	E-Platte (96-Wellen)	ACEA Biosciences, San Diego, USA
Feindosierspritze	Omnifix-F 9161406V	B. Braun Biotech International, Melsungen, D
Filter für Lösungen	0.22 µm und 0.45 µm	Sartorius, Göttingen, D
Flockeneisbereiter	AF 100	Scotsman Ice Systems, Milan, ITA
Fluoreszenzmikroskop	AxioVert 100	Zeiss, Jena, D
Gefrierschrank (-20°C)	Cool vario	Siemens, München, D
Gefrierschrank (-80°C)	Hera freeze	Heraeus, Hanau, D
Geschlossener Gewebeinfiltrationsautomat	Leica ASP300S	Leica, Wetzlar, D
Handschuhe	Nitril	Sempermed, Wien, AUT
Heizblock	Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg, D
Impedanzbasiertes Echtzeit-Zellanalyse System	xCELLigence Real-Time Cell Analyzer	ACEA Bioscience, San Diego, USA
Inkubator	B20	Heraeus, Hanau, D
Inkubator	Hera cell 150	Heraeus, Hanau, D
Inkubator Schüttler	Certomat® BS-T	Sartorius, Göttingen, D
Insertions Platte für Invasionsassays	24-Multiwellen	Falcon, Oxnard, USA

<b>Instrumente</b>	<b>Bezeichnung/ Beschreibung</b>	<b>Hersteller</b>
Invertiertes Mikroskop	Eclipse TS 100	Nikon, Düsseldorf, D
Kamera	AxioCam MRm-Kamera	Zeiss, Jena, D
Kamera	Coolpix 5400	Nikon, Düsseldorf, D
Kanülen	23 G	B. Braun Biotech International, Melsungen, D
Kleenex® Taschentücher		Kimberly-Clark Professional, Koblenz, D
Kühlschrank (+4°C)	Cool Vario	Siemens, München, D
Labornetzgerät	Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen, D
Liquid Nitrogen Tank	L-240, K Series	Taylor-Wharton, Husum, D
Mikropipetten	0.5-10 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg, D
Mikroskop	DMIL	Leica, Wetzlar, D
Mini Zentrifuge	MCF-2360	LMS Consult GmbH & Co. KG, Brigachtal, D
Multipipette	10-100 µl	Eppendorf, Hamburg, D
Objektträger-Scanner	Aperio AT2	Leica, Wetzlar, D
PVDF Membran	Hybond-P	GE Healthcare, Uppsala, SWE
Petrischalen		Falcon, Oxnard, USA
Photometer	NanoPhotometer™ Pearl	Implen GmbH, München, D

<b>Instrumente</b>	<b>Bezeichnung/ Beschreibung</b>	<b>Hersteller</b>
Einkanalpipetten	2, 5, 10 und 25 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Pipettierhilfe	Easypet	Eppendorf, Hamburg, D
Pipettenspitzen	10, 100, 200 und 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, D
Pipettenspitzen mit Filter	10, 100, 200 und 1000 µl	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, D
Platte ( <i>non-culture</i> ) Invasionsassay	24-Wellen	BD Bioscience, Heidelberg, D
Platte für qRT-PCR	96-Wellen	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Protein- Elektrophoresenkammern	Vertical, Muligel	Biometra, Göttingen, D
Reagenzschüttler	REAX top	Heidolph Instruments, Schwabach, D
Rotationsmikrotom	HM355S	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Röhrchen für Zellkultur	Polypropylen, 15 und 50 ml	Falcon, Oxnard, USA
Röhrchen für Zellkultur	Polystyren, 15 ml	Falcon, Oxnard, USA
Röhrchen für Molekularbiologie, Safelock	1,5 und 2 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Röhrchen für Durchflusszytometrie	5 ml	Falcon, Oxnard, USA



<b>Instrumente</b>	<b>Bezeichnung/ Beschreibung</b>	<b>Hersteller</b>
Skalpell		Feather, Osaka, JPN
Sterile Werkbank		Heraeus, Hanau, D
Thermozykler	iCycler	BioRad, Richmond, USA
Thermozykler	7300 Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Trockenschrank		Memmert, Schwabach, D
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Wasserbad		GFL, Segnitz, D
Wasseraufbereitungssystem	TKA GenPure	TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH, Niederelbert, D
Western Blot Dokumentationssystem	Gel Logic1500 Imaging System	Carestream Health, Stuttgart, D
Western Blot Transfer System	Semi-dry Transfer Apparat Fastblot™	Biometra, Göttingen, D
Whatman Papier für Western Blot		Whatman GmbH, Dassel, D
Slide VI0.4-Kammer-Objektträgers ( <i>μ-Slide VI0.4 chamber slides</i> )		Ibidi GmbH, Gräfelfing, D
Zellkulturplatten	6-, 12- und 24-Wellen Kultur Platte	Techno Plastic Products (TPP) AG, Trasadingen, CH

Instrumente	Bezeichnung/ Beschreibung	Hersteller
Zellkulturplatten	96-Wellen Kultur Platte, F-Boden	Techno Plastic Products (TPP) AG, Trasadingen, CH
Zellkulturflaschen	25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> und 175 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Zellzählkammer	Neubauer	Brand, Wertheim, D
Zentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus, Hanau, D
Zentrifuge	Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau, D
Zentrifuge	Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, D

Tabelle 1: Instrumente und Gerätschaften

## 4.2 Chemikalien, Reagenzien und Lösungen

Produkt	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Aclianblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Acrylamid 30% Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Agar	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Agarose	Invitrogen™, Karlsruhe, D
Ampicillin	Merck, Darmstadt, D
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bromphenol Blau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Produkt	Hersteller
Blasticidin S HCl, Pulver	Thermo Fisher Science, Braunschweig, D
Calcein <sup>AM</sup> Fluoreszenz Färbung	BD Biosciences, Heidelberg, D
Chloroform EMSURE®	Merck, Darmstadt, D
DEPC-behandeltes Wasser	Ambion, Austin, Texas, USA
D-Glucose	Merck, Darmstadt, D
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Doxocyclin	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
DPBS 10x (Dulbecco's phosphate buffered saline)	Invitrogen <sup>TM</sup> , Karlsruhe, D
Ethanol für Molekularbiologie	VWR International, Pennsylvania, USA
FBS (fetal bovine serum)	Gibico <sup>TM</sup> , Darmstadt, D
Glycerol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Glycin	Merck, Darmstadt, D
HBSS (Hank's buffered salt solution)	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Human Methylcellulose Based Media	R&D Systems, Minneapolis, USA
IMDM Medium	Gibico <sup>TM</sup> , Darmstadt, D
Insulin-Transferrin-Selen (ITS-G)	Gibico <sup>TM</sup> , Darmstadt, D
Isofluran	Abbott, Wiesbaden, D
Isopropanol/ 2-Propanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Produkt	Hersteller
Kaliumhydroxid (KOH)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt, D
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, D
Matrigel Matrix	BD Biosciences, Heidelberg, D
Maxima™ Probe/ROX qPCR Master Mix (2x)	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Methanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, D
PBS 10x (phosphate buffered saline)	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, D
PCR Puffer (10x)	Invitrogen™, Karlsruhe, D
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen™, Karlsruhe, D
Paraformaldehyd (16%- Formaldehyd Ampullen) wässrige Lösung	Electron Microscopy Science, Hatfield, Pennsylvania, USA
Polyacrylamide (30% Acrylamid/Bis)	Merck, Darmstadt, D
Puromycin Dihydrochlorid	VWR International, Pennsylvania, USA
Propidiumiodid (PI)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
RNase A (Ribonuclease A)	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
RPMI 1640 Medium	Gibico™, Darmstadt, D
Salzsäure (HCL)	Merck, Darmstadt, D

Produkt	Hersteller
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-Diamin)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tris	Merck, Darmstadt, D
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
TRIzol	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, D
Trypanblau	Invitrogen™, Karlsruhe, D
Trypsin/EDTA	Invitrogen™, Karlsruhe, D
Tween-20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Vectashield Mounting Media mit DAPI	Vector laboratories, Newark, Kalifornien, USA
Vorgefärbte Proteinleiter (BenchMark™)	Thermo Fisher Science, Braunschweig, D
Ziegenserum	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Tabelle 2: Chemikalien, Reagenzien und Lösungen

### 4.3 Assays und Kits

Name	Hersteller
Affymetrix GeneChip Whole	Affymetrix, High Wycombe, GBR
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Waldbronn, D
BD BioCoat™ Angiogenesis System: Endothelial cell invasion	BD Biosciences, Heidelberg, D
ChIP-IT® qPCR Analysis Kit	Biovision, Ilmenau, D

Name	Hersteller
ECL™ Prime Western Blotting System	GE Healthcare, Chicago, IL, USA
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, D
MycoAlert Mycoplasma Detection Kit	Lonza, Basel, CH
NucleoSpin® Plasmid Kit	Macherey-Nagel, Düren, D
RNA Nano Chips	Agilent Technologies, Waldbronn, D
Third Generation Packaging Mix & LentiFectin™ Combo Pack Kit	BioCat, Heidelberg, D
Trans-Lentiviral Packaging Kit	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, D
Universal Magnetic Co-IP Kit	Active motif, Carlsbad, USA

Tabelle 3: Assays und Kits

#### 4.3.1 TaqMan® Genexpressions-Assay für qRT-PCR

Zielgen	Assay ID	Hersteller
GAPDH	Hs02758991_g1	Applied Biosystem, Darmstadt, D
HDAC3	Hs00187320_m1	Applied Biosystem, Darmstadt, D
HDAC8	Hs00954353_g1	Applied Biosystem, Darmstadt, D

Tabelle 4: Genexpressionsassay für qRT-PCR

#### 4.4 Standard-Medium für Zellkulturen

Verwendung	Zusammensetzung
Für die EwS-Zelllinien A673, EW7 und SK-N-MC	500 ml RPMI 1640 50 ml FBS 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin
Für die EwS-Zelllinie CHLA-10	500 ml IMDM 100 ml FBS 5 ml Insulin-Transferrin-Selen 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin

Tabelle 5: Standard-Medium für Zellkulturen

#### 4.5 Universelle Lösungen

Name	Zusammensetzung
1x PBS	900 ml sterile water 100 ml 10x DPBS
1x Trypsin	45 ml PBS 5 ml Trypsin/ETDA
4% Formaldehyd	4% Formalin 55 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2 H <sub>2</sub> O
70% Ethanol	35 ml 100% Ethanol 15 µ DEPC-treated water
Alcianblau Färbelösung	1% Alcianblau in 0,1 N HCL
Calcein Stammlösung	1 mg Calcein AM 1 ml DMSO

Tabelle 6: Universelle Lösungen

## 4.6 Zellzyklusanalyse

### 4.6.1 Puffer und Lösungen für Zellzyklusanalysen

Name	Zusammensetzung
20 x Propidiumiodid (PI) Stammlösung (1 mg/ml)	100 mg Propidiumiodid 100 ml H <sub>2</sub> O Durch einen 0,22-µm-Filter filtriert und lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.
Probenpuffer	1 g Glucose in einem Liter 1 x PBS durch ein 0.22 µm Filter filtriert und bei 4°C aufbewahrt.
Propidiumiodid (PI) Färbelösung	0.5 ml of 20 x PI Stammlösung (50 µg/ml) 100 U/ml RNase A 10 ml Probenpuffer wurden erst kurz vor Gebrauch hinzugefügt.

Tabelle 7: Puffer und Lösungen für Zellzyklusanalysen

## 4.7 Western Blot

### 4.7.1 Puffer und Lösungen für Western Blot Analysen

Name	Zusammensetzung
Laemmli Puffer (2x)	0,125 M Tris HCl 20% Glycerol 4% SDS 0,002% Bromphenolblau In H <sub>2</sub> O gelöst
Laufpuffer (5x)	0,125 M Tris 0,76 M Glycin 0,5% SDS In H <sub>2</sub> O gelöst



Name	Zusammensetzung
Magermilch-Tween-20 Lösung	15 g Magermilch Pulver 300 ml TBS-T 0,05% Tween-20
Trennpuffer (4x)	1,5 M Tris 0,4% SDS In H <sub>2</sub> O gelöst und auf einen pH-Wert von 8,8 mit HCL adjustiert
Sammelpuffer (4x)	0,5 M Tris 0,4% SDS in H <sub>2</sub> O gelöst und auf einen pH-Wert von 6,8 mit HCL adjustiert
Transferpuffer (5x)	25 mM Tris 192 mM Glycin In H <sub>2</sub> O gelöst
TBS (10x)	0,5 M Tris 1,5 M NaCl In H <sub>2</sub> O gelöst
TBS-T	100 ml TBS (10 x) 900 ml H <sub>2</sub> O 500 µl Tween-20

Tabelle 8: Puffer und Lösungen für Western Blot Analysen

#### 4.7.2 Gel für SDS-PAGE

Name	Zusammensetzung
Trenngel (12%)	4.0 ml 30% Acrylamid/Bis (29:1) 2.5 ml Trennpuffer (4x)

Name	Zusammensetzung
	50 µl 10% APS 10 µl TEMED
Sammelgel (4.5%)	0,75 ml 30% Acrylamid/Bis (29:1) 1,25 ml Sammelpuffer (4x) 35 µl 10% APS 5 µl TEMED

Tabelle 9: Gel für SDS-PAGE

#### 4.8 Antikörper für Western Blot (WB) und Immunhistochemie (IC)

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Produktnummer	Verwendung	Hersteller
Anti-HDAC1	Maus	1:100	sc-81598	WB	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D
Anti-HDAC3	Hase	1:5000	ab32369	WB	Abcam, GBR
Anti-HDAC8	Hase	1:500	PA5-29885	WB	Invitrogen™, Karlsruhe, D
Anti- H3K27me3	Hase	1:1000	C15410195	WB	Diagenode, Seraing, D
Anti-H3K27ac	Hase	1:1000	ab4729	WB	Abcam, Cambridge, GBR
Anti- H3K9/14ac (Ac-Histone H3 (D-4))	Maus	1:100	sc-518011	WB	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Produktnummer	Verwendung	Hersteller
Anti- $\beta$ -Tubulin	Hase	1:1000	2146	WB	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main, D
Anti-Actin	Maus	1:1000	sc-47778	WB	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D
Anti-GAPDH	Hase	1:5000	ab181602	WB	Abcam, Cambridge, GBR
Anti-PARP	Hase	1:1000	9532	WB	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main, D
Anti-Caspase 3	Hase	1:1000	9662	WB	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main, D
Anti-phospho-Histone H2A.X (ser139), FITC conjugate	Maus	4:1000	16-202A	IC	Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA
Anti-rabbit IgG HRP	Maus	1:1000	sc-2357	WB	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Produktnummer	Verwendung	Hersteller
Anti-cleaved-Caspase 3 (Asp175), (5A1E)	Hase	1:150	9664	IC	Cell Signaling, Technology, Frankfurt am Main, D

Tabelle 10: Antikörper für Western Blot und Immunhistochmie

## 4.9 Inhibitoren und Chemotherapeutika

### 4.9.1 HDAC-Inhibitoren

Name	Bezeichnung	HDACi	Hersteller
Entinostat	MS-275	Inhibiert HDAC1 stärker als HDAC3	Selleckchem, Houston, Texas, USA
PCI-34051	PCI-34051	HDAC8	Selleckchem, Houston, Texas, USA
Romidepsin	FK228	HDAC1 und HDAC2	Selleckchem, Houston, Texas, USA
Trichostatin A	TSA	HDAC Pan-Inhibitor	Selleckchem, Houston, Texas, USA

Tabelle 11: HDAC-Inhibitoren

### 4.9.2 PRC2-Komplex-Inhibitoren

Name	Bezeichnung	Hersteller
A-395	EED-Inhibitor (EEDi)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
A-395N	Kontrollprobe für EEDi	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Name	Bezeichnung	Hersteller
GSK126	EZH2-Inhibitor (EZH2i)	Selleckchem, Houston, Texas, USA

Tabelle 12: PRC2-Komplex-Inhibitoren

#### 4.9.3 Chemotherapeutika

Name	Hersteller
Doxorubicin	Selleckchem, Houston, Texas, USA
Vincristin	Selleckchem, Houston, Texas, USA

Tabelle 13: Chemotherapeutika

#### 4.10 Bakterienstämme

Der E. coli-Stamm One Shot® TOP10 (Invitrogen™, Karlsruhe, D) mit dem Genotyp *F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG* wurde zur Replikation von Plasmiden für stabile HDAC *Knockdowns* und CRISPR/Cas9 HDAC *Knockouts* durch lentiviralen Gentransfer verwendet.

#### 4.11 Humane Zelllinien und Tumorzelllinien

Name	Beschreibung	Herkunft
A673	EwS-Zelllinie mit Typ-1-Translokation, welche von einem 15-jährigen Mädchen stammt und zunächst als mögliches primäres Rhabdomyosarkom diagnostiziert (Giard et al., 1973) und erst später als EwS-Zelllinie charakterisiert wurde. (Martínez-Ramírez et al., 2003) A673 weist eine p53-Mutation auf. (Sanger COSMIC-Datenbank)	American Type Culture Collection (ATCC), LGC Standards, Teddington, E
CHLA-10	EwS-Zelllinie mit Typ-1-Translokation und p53-Mutation, welche von einem thorakalen PNET eines 14-jährigen Mädchens nach Chemotherapie stammt. (May et al., 2013).	COG Cell Line & Xenograft Repository (www.cogcell.org)

Name	Beschreibung	Herkunft
EW7	EwS-Zelllinie mit Typ-1-Translokation, vom Primärtumor der Skapula stammend. (Javelaud et al., 2000)	Prof. Oliver Delattre, L'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U830, Institut Curie, Paris, F
HEK 293T	Humane Zelllinie, welche mit einem großen T-Zell-Antigen transformiert wurde und verwendet wird, um hohe Titer an rekombinanten Lentiviren herzustellen. (DuBridge et al., 1987; Pear et al., 1993)	GE Healthcare, Uppsala, SWE
SK-N-MC	EwS-Zelllinie mit Typ-1-Translokation, welche aus einer supraorbital lokalisierten Metastase eines 14-jährigen Mädchens stammt. Die Biopsie erfolgte nach mehreren Strahlen- und Chemotherapien eines zuvor fälschlicherweise diagnostizierten Neuroblastoms. (Biedler et al., 1973) SK-N-MC weist eine p53-Mutation auf. (May et al., 2013)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Leibniz Institut DSMZ, Braunschweig, D

Tabelle 14: Humane Zelllinien und Tumorzelllinien

#### 4.12 Mausstämme

Für die *in vivo* Versuche wurde der Mausstamm *BALB/c Rag2<sup>-/-</sup> γ<sub>C</sub><sup>-/-</sup>* aus dem Zentralinstitut für Versuchstiere (Kawasaki, Japan) verwendet.

Der *Rag2<sup>-/-</sup>γ<sub>C</sub><sup>-/-</sup>* Mausstamm entsteht durch Rückkreuzung von zwei immundefizienten Mausstämmen: *Rag2-Knockout*-Mäuse (*Rag2<sup>-/-</sup>*) und *Gamma(c)-Knockout*-Mäuse (*γ<sub>C</sub><sup>-/-</sup>*).

Homozygote *gamma(c)-Knockout*-Mäuse haben eine Deletion der Interleukin-2-Rezeptor-Gamma-Kette, was zu einem vollständigen Verschwinden der natürlichen Killerzellen (NK) führt. Sie produzieren auch weniger, aber immer noch reife B- und T-Zellen. (Disanto et al., 1995)

Im Gegensatz dazu führen homozygote *Rag-2*-Mutanten zu einer völligen Unfähigkeit der V(D)j-Rekombination, sodass keine reifen B- oder T-Zellen produziert werden können. (Shinkai et al., 1992)

Folglich führt die Rückkreuzung dieser beiden Mausstämme zu einem stabilen Phänotyp, der durch das Fehlen jeglicher T-Lymphozyten-, B-Lymphozyten- und NK-Zellfunktion gekennzeichnet ist. (Goldman et al., 1998)

## 4.13 Expressionsvektoren

### 4.13.1 Expressionsvektor für induzierbare RNA-Interferenz

Zielgen	Genset	Vektor	Katalognummer	Format	Hersteller
HDAC8 Homo sapiens Gene ID: 55869	shERWOOD UltramiR HDAC8 shRNA Target Gene Set	pZIP- TRE3G- ZsGreen	TLHSU2300- 55869-pZIP- TRE3G-ZsGreen- GVO-TRI	Glycerol stock	BioCat, Heidelberg, D
HDAC3 Homo sapiens Gene ID: 8841	shERWOOD UltramiR HDAC3 shRNA Target Gene Set	pZIP- TRE3G- ZsGreen	THLSU2300-8841- pZIP-TRE3G- ZsGREEN-GVO- TRI	Glycerol stock	BioCat, Heidelberg, D

Tabelle 15: Expressionsvektor für induzierbare RNA-Interferenz

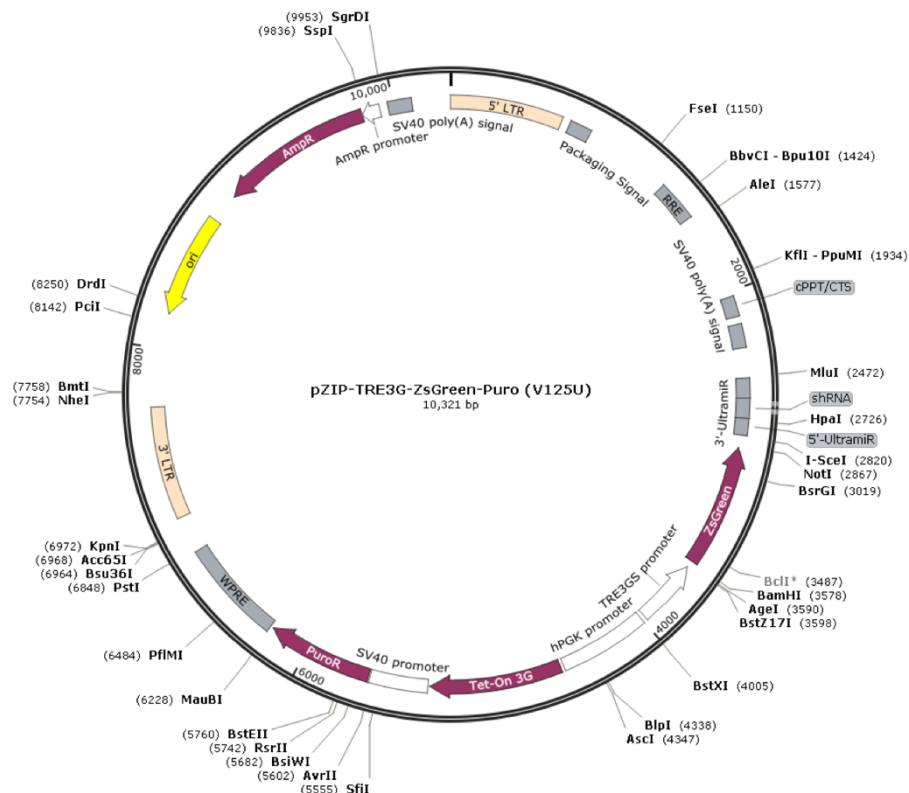


Abbildung 1: Detaillierte Darstellung des pZIP-TRE3G-ZsGreen-Vektors

Quelle: <https://www1.biocat.com/products/TLHSU2300-55869-pZIP-TRE3G-ZsGreen-GVO-TRI>

#### 4.13.2 Expressionsvektor für CRISPR/Cas9 *Knockouts*

Expressionsvektoren für Lentivirus-vermittelte CRISPR/Cas9 *Knockouts* von HDAC1 wurden bei Addgene (Massachusetts, USA) bestellt. Für diese Methode wurden zwei verschiedene Vektoren benötigt, ein lentiCas9-Blast Vektor (Addgene Plasmid-52962, <http://n2t.net/addgene:52962>; RRID:Addgene\_52962), der das Cas9-Protein exprimiert, und ein lentiGuide-Puro Vektor (Addgene Plasmid #52963; <http://n2t.net/addgene:52963>; RRID:Addgene\_52963), der ein chimäres CRISPR-RNA-Element mit anpassbarer sgRNA exprimiert (Sanjana et al., 2014). Beide Vektoren sind in Abbildung 2 dargestellt. Die spezifische sgRNA-Sequenz wurde aus Bibliotheken für optimierte sgRNA entnommen: Brunello und Brie.

<b>Zielgen: HDAC1</b>	
sgRNA Zielsequenz	CATCCGTCCAGATAACATGT
sgRNA <i>top</i> (sgHDAC1_3_top)	CACCGCATCCGTCCAGATAACATGT
sgRNA <i>bottom</i> (sgHDAC1_3_bottom)	AAACACATGTTATCTGGACGGATGC
PAM Sequenz	CGG
Exon Nummer	3
<i>Rule set 2 score</i>	0.6964

Tabelle 16: Spezifische sgRNA-Sequenz für CRISPR/Cas9 HDAC1 *Knockouts*



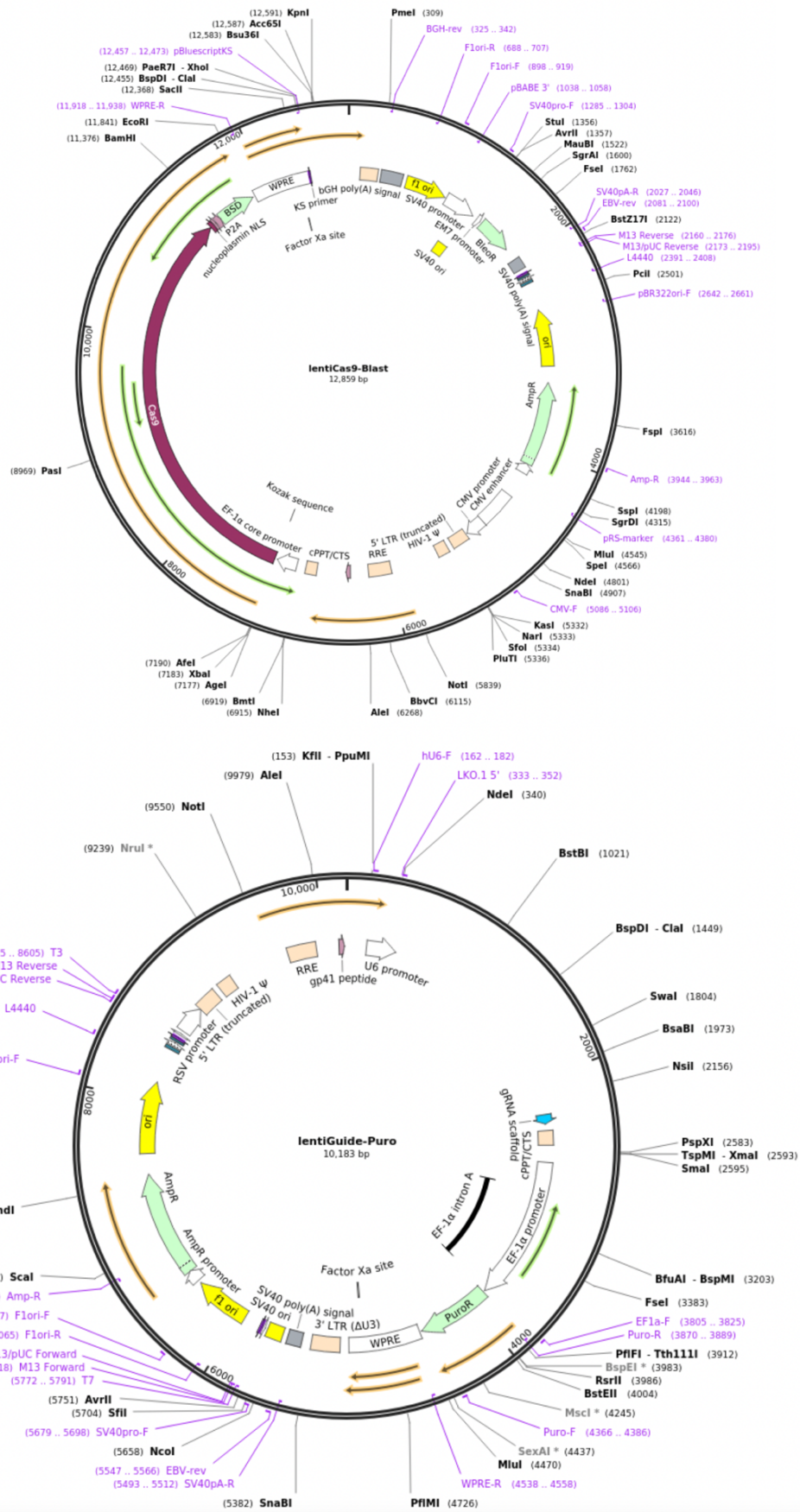


Abbildung 2: Detaillierte Darstellung des lentiCas9-Blast und lentiGuide-Puro Vektors

Quelle: <http://n2t.net/addgene:52962/3X>

## 5 Methoden

### 5.1 Kultivierung und Behandlung der Tumorzellen

Die EwS Zelllinien wurden in einem Standard-Medium kultiviert (Tabelle 5). Um die CRISPR/Cas9-Einzelzellklone zu selektionieren und zu erhalten wurden dem Medium zusätzlich 2 µl/ml Puromycin und 5 µl/ml Blasticidin hinzugegeben. Alle Zellkulturen wurden in einem Inkubator bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> in einer befeuchteten Atmosphäre in Kulturflaschen kultiviert.

Bevor die Zellen die vollständige Konfluenz erreichten, wurden sie im Verhältnis 1:4 bis 1:10 aufgeteilt. Hierfür wurde das Medium entfernt und 2-3 ml 1 x Trypsin hinzugefügt. Die mit Trypsin bedeckten Zellen wurden im Inkubator für zwei bis drei Minuten inkubiert. Sobald sich die Zellen von der Oberfläche lösten, wurde Trypsin durch die Zugabe von Standard-Tumormedium mit FCS-Serum inaktiviert und anschließend für fünf Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert. Nachfolgend wurden die Zellen mit 10 ml kaltem 1 x PBS erneut zentrifugiert und in neuen Kulturflaschen in frischem Standard-Tumormedium verteilt.

Eine Kontamination der Zellkulturen mit Mykoplasmen-Bakterien wurde regelmäßig mit dem MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit (Lonza) gemäß den Herstellerangaben (Lonza Walkersville, Inc., 2011) getestet.

#### 5.1.1 Bestimmung der Zellzahl

Die Anzahl der Zellen wurde mit der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde durch eine Färbung mit Trypanblau geschätzt. Lebensfähige Zellen, die den blauen Farbstoff nicht aufnahmen, wurden gezählt.

#### 5.1.2 Kryokonservierung und Rekultivierung der Tumorzellen

Für die Kryokonservierung der Tumorzellen wurden zwischen  $1 \times 10^6$  und  $1 \times 10^7$  Tumorzellen in 1 ml FBS mit 10% DMSO in 5°C vorgekühlte Kryoröhrchen überführt. Nachfolgend wurden diese für 24 Stunden schonend in einer kontrollierten Gefrierbox (Mr. Frosty), anschließend außerhalb, bei -80°C aufbewahrt. Für die Langzeitlagerung wurden die Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff (-192°C) aufbewahrt.

Zur Rekultivierung der kryokonservierten Tumorzellen wurden diese schonend bei Raumtemperatur aufgetaut. Sobald die Suspension flüssig wurde, wurden die Zellen in 6 ml Standard-Tumormedium gegeben und zwei Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig in Standard-Medium resuspendiert und in eine frische Kulturflasche überführt.

## 5.2 RNA-Isolation

Um die RNA der Zellen zu isolieren, wurden  $10^6$  Zellen mit 0,2 ml TRIzol-Reagenz durch vorsichtiges Schwanken vermengt. Nachfolgend konnte das Homogenat zur späteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren werden. Zur weiteren Isolation wurden, entweder direkt oder nach dem Auftauen, 200  $\mu\text{l}$  Chloroform pro 2 ml Homogenat vermischt und etwa eine Minute lang mittels Vortexer geschüttelt. Anschließend wurde das Homogenat fünf Minuten auf Eis inkubiert und bei  $4^{\circ}\text{C}$  und nachfolgend bei 4500 U/min für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem gleichen Volumenanteil Isopropanol vermischt. Um die RNA zu fällen, wurde die Lösung 30 Minuten bei  $-80^{\circ}\text{C}$  und anschließend 30 Minuten bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Danach wurde die RNA bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 15 Minuten mit 13000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet zweimal mit 70% Ethanol in DEPC-behandeltem Wasser für zehn Minuten bei 13000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde dann etwa drei Minuten lang getrocknet. Die isolierte RNA aus etwa  $4 \times 10^7$  Zellen wurde mit 40-100  $\mu\text{l}$  DEPC-behandeltem Wasser versetzt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 5.2.1 Bestimmung der Quantität und Qualität der isolierten RNA

Die Konzentration der isolierten RNA wurde mit einem Photometer (NanoPhotometer™ Pearl) gemessen. Die RNA-Qualität wurde mit dem Agilent RNA 6000 Nano Kit Guide bestimmt. Die RNA-Proben wurden mit dem Agilent RNA 6000 Nano Kit und dem Elektrophoresegerät für die Qualitätskontrolle von Biomolekülen (Agilent 2100 Bioanalyzer) gemäß den Herstelleranweisungen analysiert (Agilent Technologies, Inc. 2001, 2003-2006, 2013).

## 5.3 cDNA-Synthese

Für die Transkription von RNA in cDNA wurde das High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit verwendet. Dessen Master-Mix enthält MultiScribe™ Reverse Transkriptase (RT), dNTPs, RT-*Random-Primer* und RT-Puffer. Die zu transkribierende RNA wurde, wie in Kapitel 5.2 beschrieben, isoliert.

5,8  $\mu\text{l}$  Master-Mix wurden mit 14,2  $\mu\text{l}$  RNA-Lösung (1  $\mu\text{g}$  RNA in DEPC-behandeltem Wasser) in RNase-freie Röhrchen gegeben und kurz zentrifugiert. Anschließend wurde die Transkription mit dem Thermozykler (iCycler) durchgeführt. Die hierfür eingestellten Temperatur- und Zeitzyklen sind in Tabelle 17 aufgeführt. Die synthetisierte cDNA wurde anschließend entweder bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt oder direkt für weitere Versuche verwendet.

	1. Stufe	2. Stufe	3. Stufe	4. Stufe
Zeit (Minuten)	10	120	5	$\infty$
Temperatur (°C)	25	37	85	4

Tabelle 17: Temperatur- und Zeitzyklen für die cDNA-Synthese

#### 5.4 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Die analysierten Genexpressionen wurden mittels qRT-PCR bestimmt und unter der Verwendung des Maxima™ Probe/ROX qPCR Master Mix (2x) und dem jeweiligen TaqMan® Genexpressionsassay durchgeführt. TaqMan® Genexpressionsassays bestanden aus je zwei unmarkierten PCR-Primern und einer mit FAM-Farbstoff markierten TaqMan MGB-Sonde.

10 µl Maxima® Probe/ROX qPCR Master Mix (2x), 1 µl eines TaqMan® Genexpressions-Primer-Assays, 8,5 µl RNase-freies Wasser und 0,5 µl der zu analysierenden cDNA wurden zusammengefügt und in eine Platte für qRT-PCR mit 96-Wellen pipettiert. Die Platte wurde kurz zentrifugiert, bevor sie in den Thermozykler (7300 Real-Time PCR System) eingesetzt und die qRT-PCR nach den folgenden Zyklen durchgeführt wurde:

- Stufe 1:** 1 min 50°C
- Stufe 2:** 10 min 95°C
- Stufe 3:** [15 s 95°C, 1 min 60°C] x 40

Für jedes Zielgen wurden Duplikate analysiert. Die Genexpression wurde auf die Expression von Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert und mit der 2-ddCt-Methode berechnet. Microsoft Excel wurde zur Berechnung des Mittelwerts und der Standardabweichungen verwendet.

#### 5.5 Proliferationsassay

Die Wachstumsraten der Tumorzellen wurden mit einem impedanzbasierten Echtzeit-Zellanalyse System (xCELLigence Real-Time Cell Analyzer) bestimmt. Elektronische Platten mit 96-Wellen und ineinandergreifenden Goldmikroelektroden (E-Platten) wurden verwendet, um die Proliferation der kultivierten und adhärenen Zellen über die elektrische Impedanz als Messwert zu überwachen. Die Impedanzmessung korreliert mit der Zellproliferation in Echtzeit und wird als Zellindex angezeigt. (Ke et al., 2011)

Zur Durchführung wurden je 2-4 x 10<sup>4</sup> Zellen mit 200 µl Standard-Tumormedium in eine E-Platte pipettiert und die Zellimpedanz alle 4 Stunden (relativer Zellindex) für insgesamt bis zu 150 Stunden bzw. bis zum Erreichen der Konfluenz im Inkubator gemessen.

Um das Wachstumsverhalten der Tumorzellen nach Einsatz von Chemotherapeutika und Inhibitoren zu messen, wurde das Experiment bei einer Proliferation von Zellindex 1-2 unterbrochen, vorsichtig 100 µl Standard-Tumormedium von der Oberfläche entfernt und durch die entsprechende, in 100 µl Standard-Tumormedium verdünnte Medikamentendosis ersetzt. Die Proliferationsraten wurden durch den Mittelwert von mindestens drei voneinander unabhängigen durchgeführten Messungen angegeben.

## 5.6 Kombinationsindexanalyse

Die Kombinationsindexanalyse wurde freundlicherweise von Katharina Pardon, Charité – Universitätsmedizin Berlin, durchgeführt. Zur Bewertung der Synergie wurden  $0,5-1 \times 10^4$  Zellen in 96-Well-Platten mit flachem Boden pipettiert. Nach 24 Stunden wurden Doxorubicin und/oder HDACi (FK228 oder MS-275) zugegeben. Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde nach 72 Stunden mit dem Zell-Titer-Glo-Lumineszenz-Reagenz gemäß dem Protokoll des Herstellers (Promega) gemessen. Die Lumineszenz wurde mit einem Promega GlowMax-Multi-Detection-System gemessen. Synergistische Wechselwirkungen wurden mit dem Paket Synergyfinder (L. He et al., 2018) (Paketversion 2.2.4, R Version 4.0.3, RStudio Version 1.3.1093) nach dem Bliss-Algorithmus (Bliss, 1939) analysiert.

## 5.7 Western Blot

$2 \times 10^6$  Zellen wurden in 200 µl 2x Laemmli Puffer resuspendiert. Die Lysate wurden durch eine 23 G Kanüle homogenisiert und bei 70°C für zehn Minuten denaturiert. Anschließend konnten die Lysate entweder als Aliquot bei -80°C für späteren Gebrauch gelagert oder direkt verwendet werden.

Zur weiteren Durchführung wurden je 18 - 25 µl Proteinlysate sowie eine als Größenreferenz dienende vorgefärbte Proteinleiter (BenchMark™) in die Taschen eines zuvor hergestellten Gels für SDS-PAGE (Tabelle 9) pipettiert. Die Gelelektrophorese lief bei 100-120 V und für ca. zwei Stunden, bis die Laufbande am unteren Ende des Gels sichtbar war. Anschließend wurden die separierten Proteine im Gel zwischen Whatman-Filterpapieren auf eine PVDF-Membran mit einem Western Blot Transfer System (Semi-dry Transfer Apparatus Fastblot™) bei  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  für eine Stunde übertragen. Die PVDF-Membran wurde zuvor für 30 Sekunden in Methanol gewaschen und die Whatman-Filterpapiere in 1 x Transferpuffer getränkt. Die mit Protein besetzte PVDF-Membran wurde für eine Stunde mit einer Magermilch-Tween-20 Lösung (Tabelle 8) gewaschen, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nachfolgend wurde die Membran mit den jeweiligen primären Antikörpern über Nacht bei 4°C inkubiert. Alle verwendeten Antikörper wurden in einer Magermilch-Tween-20 Lösung gelöst und entsprechend verdünnt (Tabelle 10). Nach dreimaligem Waschen mit 1x TBS-T für jeweils fünf Minuten wurden die Membranen mit geeigneten sekundären Peroxidase-konjugierten

Antikörpern eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal mit 1 x TBS-T und zusätzlich einmal mit 1 x TBS für jeweils fünf Minuten gewaschen.

Für die Detektion der Antikörper-Antigen-Komplexe wurden die PVDF-Membranen mit den Lösungen des ECL™ Prime Western Blotting Systems nach den Herstelleranweisungen benetzt und mit dem Western Blot Dokumentationssystem (Gel Logic 1500 Imaging System) und der Kodak Molecular Imaging Software (Version 5.0) ausgewertet.

Zur Wiederverwendung der Membran mit weiteren Antikörpern wurde die Membran unmittelbar nach der Detektion in 1 x TBS für ca. zwei Minuten gewaschen. Anschließend konnte die Membran entweder direkt wiederverwendet oder für spätere Versuche getrocknet und aufbewahrt werden (siehe Kapitel 5.7.1). Bei direkter Wiederverwendung wurde die Membran wieder mit Magermilch-Tween-20 Lösung gewaschen, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die weitere Durchführung wurde dann ab diesem Protokollschritt weiter fortgeführt.

#### **5.7.1 Reaktivierung der PVDF-Membran**

Zur Reaktivierung wurde die getrocknete PVDF-Membran 30 - 60 Sekunden mit Methanol und anschließend mit 1 x TBS-T für fünf Minuten gewaschen. Das weitere Verfahren wurde wie in Kapitel 5.7 beschrieben durchgeführt, hier jedoch beginnend ab dem Protokollschritt des Waschvorgangs der PVDF-Membran, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren.

#### **5.8 Ko-Immünpräzipitation (Co-IP)**

Die Co-IP Experimente wurden freundlicherweise von Oxana Schmidt durchgeführt.

Hierfür wurden  $6-10 \times 10^6$  Zellen in einer Zellkulturschale kultiviert, bis die Zellen zu etwa 70% konfluent waren. Anschließend wurden die Zellen mit dem Universal Magnetic Co-IP Kit gemäß den Herstelleranweisungen behandelt und nachfolgend die Elution mittels Western Blot analysiert.

#### **5.9 Lentivirus-vermittelte und Tetracyclin-induzierbare RNA-Interferenz**

Die Expressionsvektoren für die Lentivirus-vermittelte und Tetracyclin-induzierbare RNA-Interferenz wurden für die HDAC3 und HDAC8 Suppression verwendet. Diese wurden mit den pZIP-TRE3G-ZsGreen-Vektoren gemäß den Anweisungen des Herstellers (shERWOOD UltramiR lentiviral inducible shRNA, bacterial glycerol stock) erreicht. Jedes Set enthielt jeweils drei zielgerichtete und eine „nicht-zielgerichtete“ shRNA als Kontrolle (Tabelle 15).

Der pZIP-TRE3G-ZsGreen-Vektor enthielt ein Puromycin-Resistenzgen zur schnellen Selektion der transduzierten Zellen. Er kodierte zusätzlich für ein ZsGreen-Gen, das durch einen Tetracyclin-induzierbaren Promotor reguliert wurde und ein grün fluoreszierendes Signal exprimierte, welches für die Auswahl transfizierter CRISPR/Cas9-*Knockout*-Zellen durch

Zellsortierung notwendig war, da die *Knockouts* bereits eine Puromycin-Resistenz aufwiesen (Kapitel 5.9.4). Die Struktur des shRNA-Expressionsvektors ist in Abbildung 1 dargestellt.

### **5.9.1 Replikation und Isolierung von DNA-Plasmiden**

Die pZIP-TRE3G-ZsGreen-Vektoren (Tabelle 15, Abbildung 1) wurden in One Shot® TOP10 chemisch kompetente *E. coli*-Zellen transformiert und repliziert. Die Isolierung der DNA-Plasmide erfolgte mit dem NucleoSpin® Plasmid-Kit gemäß den Anweisungen des Herstellers (Plasmid DNA purification, User Manual February 2017, Rev. 10, Macherey-Nagel). Die Menge der isolierten Plasmid-DNA wurde mit einem Nanophotometer quantifiziert. Die DNA wurde bei -80°C für die spätere Verwendung (Kapitel 5.9.2) gelagert.

### **5.9.2 Lentivirale Verpackung**

Für die lentivirale Verpackung wurde das 3rd Generation Packaging Mix & LentiFectin™ Combo Pack Kit (LV053-G074) gemäß den Anweisungen des Herstellers des Lentivirus Packaging Protokolls von abm® verwendet. Zusammenfassend wurden HEK 293-Zellen in Petrischalen ausgesät und kultiviert, bis sie adhärent und zu etwa 80% konfluent waren. Danach wurden die Zellen über Nacht mit einem Transfektions-Komplex, bestehend aus den isolierten DNA-Plasmiden, dem Verpackungsmix der 3. Generation (LV053) und dem LentiFectin™ Transfektionsreagenz (G074) in EDTA-freiem Medium inkubiert und später mit FCS versetzt. Der Transfektionskomplex wurde entfernt und durch Kulturmedium für 24 Stunden ersetzt. Danach wurde der im Kulturmedium angereicherte Virusüberstand entnommen, zentrifugiert und steril filtriert. Der erste Virusüberstand sollte einen Virustiter von etwa  $10^6$  IU/ml aufweisen und wurde in Aliquote bei -80°C für die spätere Anwendung aufbewahrt oder direkt verwendet. Ein Aliquot konnte nur einmal für die Transfektion von Tumorzellen aufgetaut werden.

### **5.9.3 Lentivirale Infektion von EwS-Zellen**

$2-4 \times 10^5$  Tumorzellen wurden in 6-Wellen-Kulturplatten in 2 ml Standard-Medium ausgesät. Sobald die Zellen adhärent waren, wurden die Zellen für 48 Stunden mit 1 ml Virusüberstand und 1 ml frischem Standard-Tumormedium inkubiert. Danach wurde der virale Überstand entfernt und für 24 Stunden durch frisches Standard-Tumormedium ersetzt, bevor erfolgreich infizierte Tumorzellen mit 2 µg Puromycin/ml Standard-Tumormedium selektiert wurden. Nach der Selektion wurde 1 µg Doxycyclin/ml Standard-Tumormedium zugegeben, um den Tetracyclin-abhängigen Promotor der shRNAs zu induzieren. Protein-Lysate und RNA-Proben wurden nach 48, 72 und 96 Stunden Induktion entnommen. Western Blots und qRT-PCR wurden zur Analyse der Suppression durchgeführt. Aus jedem Set der Expressionsvektoren (Tabelle 15, Abbildung 1) wurden jeweils drei individuell zielgerichtete Konstrukte zur Gen-

Suppression (shHDAC3.1, 3.2, 3.3 oder shHDAC8.1, 8.2, 8.3) im Vergleich zur Kontrolle (*negative* shRNA) getestet. Das Konstrukt mit der erfolgreichsten Suppression auf mRNA- und Proteinebene wurde ausgewählt und für weitere Experimente verwendet.

#### **5.9.4 Lentivirale Infektion von EwS-Zellen mit CRISPR/Cas9-HDAC1 *Knockout***

Um HDAC3 und HDAC8 in HDAC1 CRISPR/Cas9 *Knockouts* supprimieren zu können, wurde die EwS Zelllinie SK-N-MC mit HDAC1 CRISPR/Cas9 *Knockout* mit induzierbarer RNA-Interferenz transfiziert (Tabelle 15, Abbildung 1). Da die CRISPR/Cas9 *Knockouts* bereits für eine Puromycin-Resistenz kodieren, mussten die erfolgreich transfizierten Zellen nach ihrem grün fluoreszierenden Signal (ZsGreen) sortiert werden. Dies erfolgte durch eine Durchflusszytometrie in der Flow Cytometry Unit der Technischen Universität München (CyTUM) am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene (MIH) (TU München, Medizinische Fakultät am Klinikum rechts der Isar, Trogerstraße 30, 81675 München). Hierfür wurden die Zellen mit 1 µg Doxycyclin/ml Standard-Tumormedium für 48 Stunden inkubiert und anschließend  $1 \times 10^8$  Zellen mit grün fluoreszierendem Signal mittels Durchflusszytometrie sortiert. Nachfolgend wurden die erfolgreich transfizierten Zellen in Standard-Medium mit Puromycin und Blasticidin zum Erhalt der *Knockouts* sowie der supprimierten Gene rekultiviert.

### **5.10 CRISPR/Cas9 *Knockouts***

#### **5.10.1 Lentivirus-vermittelte CRISPR/Cas9 *Knockouts***

CRISPR/Cas9 *Knockouts* wurden durch die Verwendung von zwei Vektoren erreicht: dem lentiCas9-Blast-Vektor (#plasmid-52962) und dem lentiGuide-Puro-Vektor (#plasmid-52963) (Abbildung 2). Ersterer exprimiert das Cas9-Protein, letzterer das chimäre CRISPR-RNA-Element mit anpassbarer sgRNA. Diese Plasmide enthalten ein Blasticidin- (lentiCas9-Blast) und ein Puromycin-Resistenzgen (lentiGuide-Puro) für die Selektion stabiler Transfektanten. Als Kontrollen der jeweiligen CRISPR/Cas9 *Knockouts* wurden Zellen verwendet, die nur mit einem lentiCas9-Blast-Vektor transfiziert worden waren.

Die Aufbereitung, Isolierung und die lentivirale Verpackung der Plasmide sowie die lentivirale Transfektion der EwS-Zellen wurden wie in (Kapitel 5.9.1, 5.9.2 und 5.9.3) beschrieben durchgeführt. Im Unterschied zu den mit stabiler RNA-Interferenz transfizierten Zellen wurde die lentivirale Verpackung mit dem Trans-Lentiviral Packaging Kit gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet.

#### **5.10.2 sgRNA-Sequenz**

Die spezifischen sgRNA-Sequenzen wurden aus den Bibliotheken Brunello und Brie für optimierte sgRNA entnommen. Die Sequenzen sind konzipiert, um die Effektivität der sgRNA



zu maximieren (*Rule Set 2 Scores*) und die unspezifischen Schnittstellen (*off-target Sites*) mit hohen *CFD-Scores* (*Cutting Frequency Determination-Score*), welche ein Korrelat für die Wahrscheinlichkeit von *off-target* Schneideprozessen sind, zu minimieren. (Doench et al., 2016) Diese Bibliotheken stellen daher eine deutliche Verbesserung gegenüber vorhergehenden Bibliotheken dar. Es wurden drei verschiedene sgRNA-Zielsequenzen getestet, um HDAC1 CRISPR/Cas9 *Knockouts* zu erzeugen. Die Sequenz, welche zu erfolgreichen *Knockouts* führte, ist in Tabelle 16 dargestellt. Die spezifischen Oligonukleotide wurden freundlicherweise von Oxana Schmidt bestellt und in den lentiGuide-Puro-Vektor synthetisiert.

### 5.10.3 CRISPR/Cas9 *Knockouts* Einzelzell-Klone

Die transfizierten EwS-Zelllinien EW7, SK-N-MC und CHLA-10 wurden für jeweils drei verschiedene sgRNA-Sequenzen pro Zielgen als Einzelzellklone in einer 96-Wellen-Kultur-Platte subkloniert. Zur Selektion wurden 10 µg/ml und für den Selektionserhalt 5 µg/ml Blasticidin verwendet. Da Puromycin zelltoxisch wirkt, wurde bei der Erstzugabe zunächst 1 µg/ml Puromycin verabreicht und anschließend auf 2 µg/ml zur Selektion und zum Selektionserhalt erhöht. Sobald die Zellen in der 96-Wellen-Kultur-Platte die Konfluenz erreicht hatten, wurden diese in eine 24-Wellen-, anschließend in eine 12-Wellen- und letztlich in eine 6-Wellen-Kultur-Platte ausgesät. Sobald genügend Zellen vorhanden waren, wurde ein Teil der Zellen für die Herstellung von Proteinlysaten zur Western Blot Analyse entnommen (Kapitel 5.7). Western Blot Analysen wurden durchgeführt, um erfolgreiche HDAC1 *Knockouts* durch CRISPR/Cas9 zu identifizieren. Zellen, bei deren Proteinlysate nach Inkubation mit Anti-HDAC1-Antikörpern keine Bande im Western Blot nachweisbar war, wurden als erfolgreiche *Knockouts* gewertet. Von jeder Zelllinie wurden je drei unterschiedlich proliferierende Einzelzellklone mit HDAC1 *Knockout* für die weiteren Experimente ausgewählt, welche zuvor durch das Proliferationsassay (Kapitel 5.5) bestimmt worden waren. Die CHLA-10 HDAC1 *Knockouts* waren empfindlich, weshalb nur ein stabiler Einzelzellklon mit HDAC1 *Knockout* sich weiter kultivieren ließ.

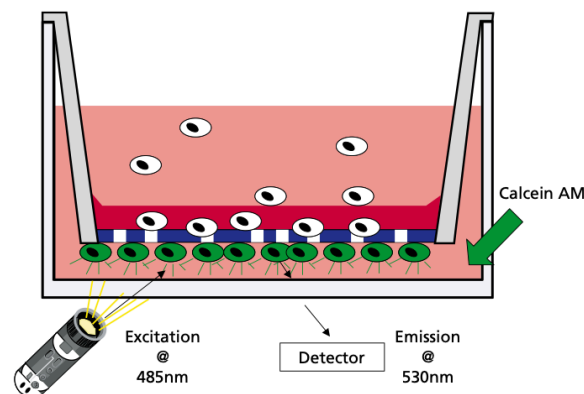
### 5.11 Invasionsassay

Für die Untersuchung der Invasionsfähigkeit der Tumorzellen wurde der quantitative Endothelzellinvasionstest BD BioCoat™ Angiogenesis System (Abbildung 3) verwendet und gemäß den Herstelleranweisungen durchgeführt. Das System bildete zwei Kompartimente, welche durch eine mit Matrigel rekonstruierte Basalmembran getrennt wurden, die eine natürliche Barriere der Zellinvasion nachbilden sollte. Metastatische Zellen exprimieren erhebliche Mengen an matrixabbauenden Enzymen und verleihen so den Endothelzellen die invasiven Eigenschaften, um die Barriere zu passieren. (Benelli & Albini, 1999)

Für das Experiment wurden die zu untersuchenden Tumorzellen in das obere Kompartiment mit Serum-freiem Medium gegeben, wobei das untere Kompartiment Medium mit Serum (10% FCS) enthielt und als Chemoattraktion dienen sollte. Hierdurch sollten die Zellen dazu angeregt werden, die Barriere zu passieren. Für jedes Experiment wurden pro Zelllinie Duplikate analysiert und mit einer Kontrolle verglichen. Die Kontrolle enthielt hierfür im unteren Kompartiment kein Serum.

Zusammenfassend wurden  $5 \times 10^4$  Zellen in 500  $\mu$ l RPMI- oder IMDM-Medium in das obere Kompartiment ausgesät. 700  $\mu$ l Standard-Medium mit 10% FBS wurden in das untere Kompartiment pipettiert.

Nach 48 Stunden Inkubation wurden die Zellen mit einer Calcein<sup>AM</sup>-Lösung (4  $\mu$ g/ml) in vorgewärmter Hank's gepufferter Salzlösung (HBSS) mit 0,15% DMSO für 1,5 Stunden gefärbt und anschließend mit einer AxioCam MRm-Kamera an einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 100) fotografiert. Nur die Zellen, die die Barriere in das untere Kompartiment passiert hatten, wurden erfasst. Die Quantifizierung erfolgte mit dem Image J2 Bildverarbeitungsprogramm *Fiji* (<http://imagej.net/>) und die Berechnung des Mittelwerts und der Standardabweichung mit Microsoft Excel.



**Abbildung 3: BD BioCoat™ Angiogenese-System**

Endothelzellinvasion, Abbildung 1, Seite 3,  
bdbiosciences.com  
(<https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=17822>)

## 5.12 Koloniebildende Zellenassay

Das Verhalten von CRISPR/Cas9 HDAC1 *Knockouts* im koloniebildenden Zellenassay wurde freundlicherweise von Dr. Kristina von Heyking durchgeführt. Hierfür wurden  $5 \times 10^3$  Zellen pro 1,5 ml auf humaner Methylcellulose basierendem Medium (Human Methylcellulose Based Media) für 10-14 Tage im Inkubator kultiviert. Der Versuch wurde gemäß den Herstelleranweisungen durchgeführt.

### **5.13 Differenzierungsassay**

Die Differenzierungsassays wurden freundlicher Weise von Kristina von Heyking unter Verwendung des Matrigel-Matrix-Assays gemäß den Anweisungen des Herstellers (BD Biosciences Handbuch SPC-356234 Rev 5.0) durchgeführt. Zur genauen Durchführung siehe: (Richter et al., 2009).

### **5.14 Immunhistochemie: $\gamma$ -H2AX-Assay**

DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) haben schwerwiegende Folgen für das Überleben der Zellen und die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität. DNA-Schäden in eukaryontischen Zellen führen bei DSBs durch Proteinkinase unmittelbar zur Phosphorylierung der Histon H2A-Variante (H2AX, an Serin 139), wobei  $\gamma$ -H2AX erzeugt wird. Chromatin mit  $\gamma$ -H2AX kann durch Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden und dient als Nachweis für DSBs. (Kinner et al., 2008)

Zur Durchführung des  $\gamma$ -H2AX-Assays wurden  $1-3 \times 10^5$  Tumorzellen pro ml Standard-Tumormedium in jede Kammer eines Slide VI0.4-Kammer-Objektträgers ausgesät und die Zellen für 48 Stunden im Inkubator kultiviert. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen für zehn Minuten mit 4% Paraformaldehyd in kaltem 1 x PBS fixiert. Nachfolgend wurden die Zellen für fünf Minuten mit kaltem 1 x PBS gewaschen und für zehn Minuten mit 1% Triton X-100 in 1 x PBS bei Raumtemperatur permeabilisiert. Daraufhin wurden die Kammern eine Stunde mit 10% Ziegen Serum in 1 x PBS inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, bevor anschließend primäre Antikörper verwendet wurden. Hierfür wurden Anti-phospho-Histon H2A.X (Ser139) Antikörper mit FTC-Konjugierung, in 5%igem Ziegen Serum in 1 x PBS verdünnt, hinzugegeben und in einer lichtdichten Box für eine Stunde inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch drei je fünfminütige Waschvorgänge, mit kaltem 10%igem Ziegen Serum in 1 x PBS, entfernt. Nachfolgend wurden die Zellen mit Vectashield Mounting Media mit DAPI angefärbt (einen Tropfen pro Kammer) und mit einer AxioCam MRm-Kamera an einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 100) fotografiert und mit der AxioVision 4.7.1 Software abgebildet. Die mit blauer Fluoreszenz (DAPI) gefärbten Zellkerne und die mit grüner Fluoreszenz (FTC konjugiert) gefärbten Doppelstrangbrüche wurden gezählt und für die Auswertung jeweils in das Verhältnis gesetzt.

### **5.15 Zellzyklusanalyse**

Die Zellzyklusanalyse beruht auf der Messung des DNA-Gehalts, welcher einen Rückschluss auf die jeweilige Phase des Zellzyklus erlaubt. Der Gehalt lässt sich durch Anfärben der Zellen mit Propidiumiodid (PI) messen, einem fluoreszierenden Molekül, das sich in einem bestimmten Verhältnis mit der DNA verbindet und daher proportional zum DNA-Gehalt ist. (Crowley et al., 2016)

Zur Durchführung wurden die Zellen in ihrer logarithmischen Wachstumsphase dreimal mit kaltem Probenpuffer (Tabelle 7) gewaschen. Anschließend wurden  $1 \times 10^6$  Zellen/ml bei  $4^\circ\text{C}$  mit 12000 U/min für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen tropfenweise mit 1 ml eiskaltem 70%igem Ethanol fixiert, während das Pellet gleichzeitig mit einem Vortexer geschüttelt wurde. Anschließend wurden die Zellen mindestens für 18 Stunden bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert. Nachfolgend wurden die Zellen für fünf Minuten bei hoher Geschwindigkeit zentrifugiert, das Ethanol entfernt und 1 ml PI-Färbelösung zugegeben, während das Pellet vorsichtig geschüttelt wurde. Die Proben wurden in einer lichtdichten Box unter leichtem Schütteln 60 Minuten inkubiert. Das Schütteln und die Inkubationszeit waren wichtig, um die PI-Färbung sowie den Abbau der doppelsträngigen RNA durch RNase A zu gewährleisten. Die Proben wurden anschließend mit einer Durchflusszytometrie (FACScalibur™) analysiert und mit der Cellquest-Software (Becton Dickinson) ausgewertet.

### 5.16 Microarrayanalyse

Die Untersuchung der Genexpression von EwS-Zelllinien und deren Veränderungen nach Behandlung mit Chemotherapeutika, Inhibitoren oder nach HDAC *Knockout* durch die CRISPR/Cas9-Methode erfolgte mittels Microarrayanalyse. Hierzu musste die RNA von EwS-Zellen mit CRISPR/Cas9 HDAC *Knockout* oder nach Behandlung mit Medikamenten isoliert, quantifiziert und qualifiziert werden (Kapitel 5.2 und 5.2.1). Die anschließende Microarrayanalyse wurde freundlicherweise von Oxana Schmidt in der Core Expression Facility unseres Labors durchgeführt. Das Affymetrix GeneChip Whole Transcript Sense Target Labeling Kit wurde zur Amplifikation und Markierung der gesamten RNA gemäß den Herstelleranweisungen verwendet. Das Protokoll ist unter [www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com) verfügbar. Die cRNA wurde anschließend auf einen Affymetrix Human Gene 1.0 ST Array hybridisiert und mit der Affymetrix Software Expression Console, Version 1.1, ausgewertet.

Die Daten wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Günther Richter analysiert. Die Microarray-Daten wurden nach Irizarry et al. (CITE biostat 2003) mit dem Robust multichip average (RMA) Algorithmus ausgewertet, unter Verwendung der Quantil-Normalisierung sowie der Median-Polish Methode. Der Volcano Plot wurde mit R (Version 3.4.4; <https://www.R-project.org/>) erstellt.

Zur Bestimmung der relativen Veränderungen der Genexpression (*fold-change*) wurden die Gene anhand der zur 2. Basis logarithmierten Expressionswerte mittels statistischer Methoden untersucht. Alle Proben Set-IDs ohne abgebildetes Gensymbol wurden vor dem Test entfernt sowie die verbleibenden 21.946 Gene unter Verwendung der moderaten t-Statistik des R-Pakets limma mit Standardeinstellungen auf unterschiedliche Expression getestet. Zur Bestimmung der Überlappung der Hoch- und Herunterregulation der Gene wurde die

Javascript Bibliothek jvonn (Bardou et al., 2014) verwendet. Die Analyse erfolgte über das Metascape-Portal mit Standardeinstellungen für die Anreicherung von Signalwegen unter Verwendung der Datenbanken GO Biological Processes, KEGG Pathway, Canonical Pathway und Reactome Gene Sets (Zhou et al., 2019). Die Array-Daten wurden bei der Gene Expression Omnibus (GEO)-Datenbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE162789>) hinterlegt.

### **5.17 *In vivo* Versuche**

Alle *in-vivo* Versuche wurden an 6 bis 16 Wochen alten immundefizienten BALB/c Rag2<sup>-/-</sup>  $\gamma$ C<sup>-/-</sup> Mäusen durchgeführt (Kapitel 4.12). Die Mäuse wurden in einer isolierten und pathogenfreien Einrichtung, gemäß den institutionellen Richtlinien und der Genehmigung der Regierung von Oberbayern, in der Technischen Universität München des Klinikums rechts der Isar, untergebracht.

EwS-Zelllinien mit HDAC1 *Knockout* sowie deren Kontrolle wurden subkutan (s.c.) in die rechte Flanke der Mäuse injiziert. Pro Versuch wurden  $4 \times 10^6$  Tumorzellen in 200  $\mu$ l 1 x PBS injiziert, wobei die EwS-Zelllinie CHLA-10 zusätzlich 2% FCS in der Injektionslösung enthielt. Jede Gruppe der Einzelzellklone bestand aus vier bis sechs Mäusen. Das Tumorstadium wurde täglich mit einem Messschieber gemessen und dokumentiert. Sobald das Tumorstadium über 1 cm<sup>3</sup> betrug ( $(\text{Länge} \times \text{Breite}^2) / 2$ ), wurde dies als Endpunkt definiert und die Mäuse eingeschläfert. Die Tumore wurden präpariert und für die histologischen Untersuchungen entnommen (Kapitel 5.18).

Die *in vivo* Versuche zur Untersuchung der Kombinationstherapie mit HDACi Romidepsin (FK228) und EEDi (A-395) wurden freundlicher Weise von Oxana Schmidt durchgeführt. Hierfür wurden  $2-3 \times 10^6$  EwS Zellen s.c. injiziert. Sobald der Tumor tastbar war, wurden die Mäuse nach dem Zufallsprinzip in vier Gruppen eingeteilt: Die erste Gruppe erhielt A-395 (250mg/kg Körpergewicht), die zweite FK228 (2mg/kg) und die dritte A-395 in Kombination mit FK228 in der jeweiligen gleichen Dosis. Die vierte Gruppe galt als Kontrollgruppe und wurde mit einer Lösungsmittelkontrolle behandelt. FK228 wurde einmal wöchentlich intraperitoneal (i.p.), A-395 zweimal wöchentlich s.c. über 4 Wochen verabreicht.

### **5.18 Histologie**

Die histologische und immunhistochemische Untersuchung der aus den Mäusen entnommenen Tumore wurde freundlicherweise von PD Dr. Katja Steiger und Tanja Groll (Institut für Pathologie, Fakultät für Medizin, Technische Universität München) durchgeführt. Im Folgenden wird der Prozess zusammengefasst. Zunächst wurden die Tumore für

mindestens 48 Stunden in 10%iger neutral gepufferter Formalinlösung fixiert. Die Dehydratation der Proben wurde unter Standardbedingungen mit einem geschlossenen Gewebeeinfiltrationsautomat (Leica ASP300S) durchgeführt und die Proben anschließend in Paraffin gelagert. Die Tumoren wurde mit einem Rotationsmikrotom (HM355S) bei einer festen Dicke von 2  $\mu\text{m}$  geschnitten. Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.-E.) wurde an den entparaffinierten Schnitten mit Eosin und Mayer's Haemalaun nach einem Standardprotokoll durchgeführt. Für die immunhistochemische Färbung wurde das Bond RXm System verwendet, mit den Reagenzien von Leica und dem gespaltenen Caspase 3-Antikörper (Anti-cleaved-Caspase 3). Alle Schnitte wurden mit einem Objektträger-Scanner (Aperio AT2) gescannt. Die prozentuale Tumorfläche, die von dem gespaltenen Caspase 3-Antikörpern gebunden wurde, wurde erfasst und ausgewertet. Daneben wurde die durchschnittliche Anzahl der Mitosen pro high-throughput scanning system (MI) der Tumorzellen analysiert. Die dargestellten Fotos wurden mit Aperio ImageScope  $\times$  64 (Version 12.4.0.7018, Leica) aufgenommen.

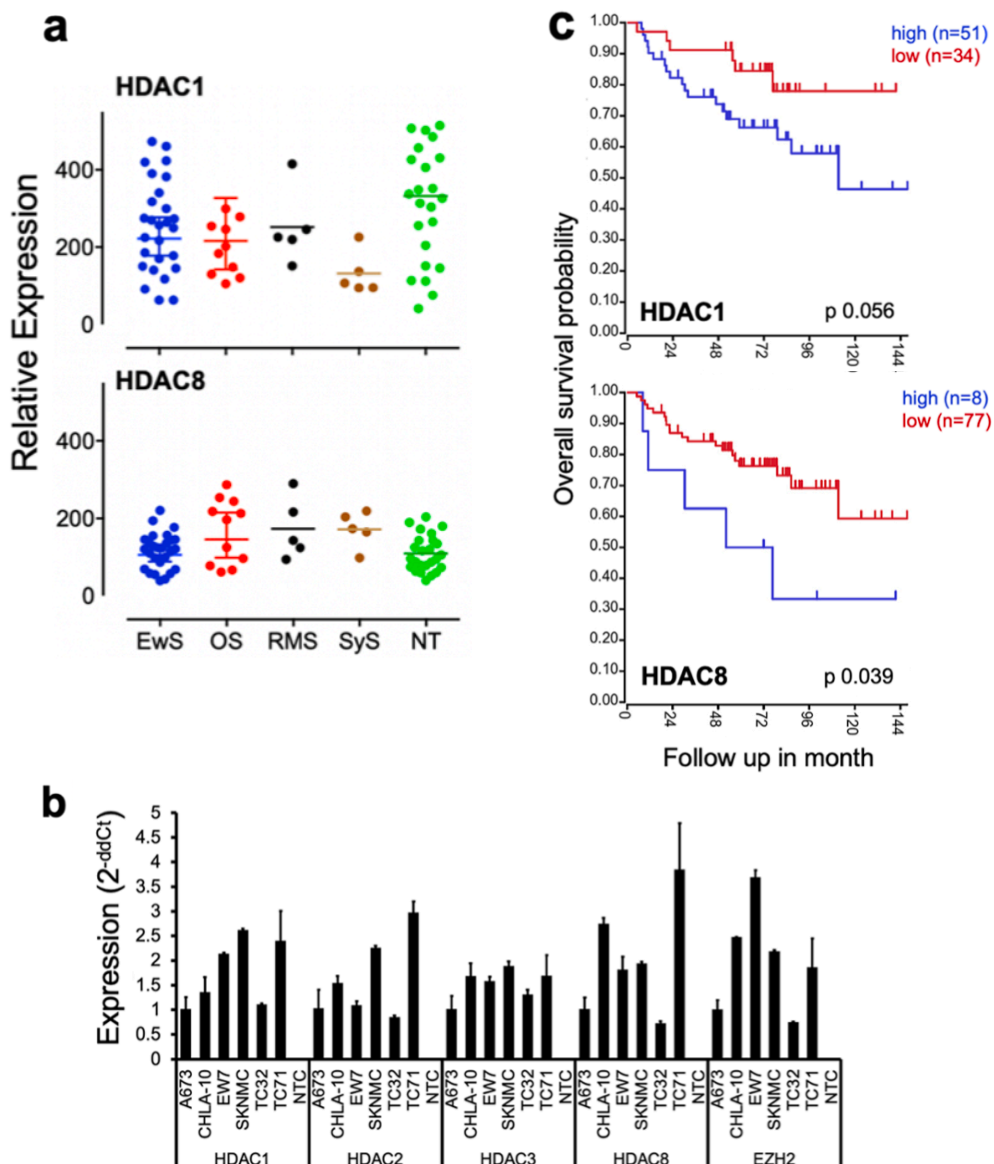
### **5.19 Statistische Auswertungen**

Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (*standard error of the mean*, SEM) aufgeführt. Die statistischen Analysen wurden mit Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) und Prism7 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Zur Signifikanztestung wurde der ungepaarte zweiseitige Student's t-Test oder der Log-Rank-Test verwendet. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet, wobei entweder die exakten p-Werte oder \*p < 0,05, \*\*p < 0,005, \*\*\*p < 0,0005 angegeben wurden. Die Volcano-Plots wurden mit dem Programm R für statistische Berechnungen und Grafiken (<http://www.r-project.org/>) gezeichnet.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Expression der HDAC der Klasse I (spezifisch HDAC1 und 8) im Ewing-Sarkom

Wie in Abbildung 4a dargestellt, werden die Gene der HDAC Klasse I (hier spezifisch nur HDAC1 und HDAC8 dargestellt) in verschiedenen pädiatrischen Sarkomen sowie im EwS exprimiert. Daneben ist in Abbildung 4b dargestellt, dass einzelne HDAC der Klasse I (sowie EZH2) in diversen EwS-Zelllinien exprimiert werden. Die Analyse einer öffentlich zugänglichen Studie mit 85 Patient\*innen (GSE63157) zeigte, dass die Höhe der HDAC-Expression der Klasse I (hier wieder spezifisch nur HDAC1 und HDAC8 dargestellt) mit dem Gesamtüberleben bei EwS korreliert (Abbildung 4c).



**Abbildung 4: Expression der HDAC der Klasse I (spezifisch HDAC1 und VIII) im Ewing-Sarkom.**

(Siehe Legende auf der folgenden Seite)

**a** Expressionsprofil der Gene HDAC1 und HDAC8 von Proben aus je 27 EwS, 11 Osteosarkomen (OS), 5 Rhabdomyosarkomen (RMS), 5 Synovialsarkomen (SyS) sowie 25 unterschiedlichen Normalgeweben (NT). Die RNA wurde auf Human Gene ST 1.0 Arrays (Affymetrix; GSE45544, GSE73166) hybridisiert und mit einer veröffentlichten Microarray-Studie von Normalgeweben verglichen (GSE45544). **b** Analyse der Expression von HDAC der Klasse I, sowie EZH2, verschiedener EwS-Zelllinien mittels qRT-PCR. **c** Kaplan-Meier-Kurven zur Darstellung der unterschiedlichen Überlebensfunktion nach Expressionsgrad von HDAC1 und HDAC8, welche unter Verwendung des GSE63157-Studiensatzes (n = 85) und des `amc onco-genomics-Softwaretools` (<https://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>) durchgeführt wurde.

## 6.2 HDACi als mögliche Kombinationstherapie des EwS

### 6.2.1 Deregulation malignitätsrelevanter Genexpressionen durch HDAC (Klasse I) Inhibition

Um den Effekt von HDACi in EwS-Zellen zu untersuchen, wurden vier verschiedene EwS-Zelllinien (A673, CHLA-10, EW7 und SK-N-MC) mit verschiedenen HDACi der Klasse I behandelt. Folgende HDACi wurden verwendet: Romidepsin (FK228), Entinostat (MS-275), PCI-34051 oder TSA.

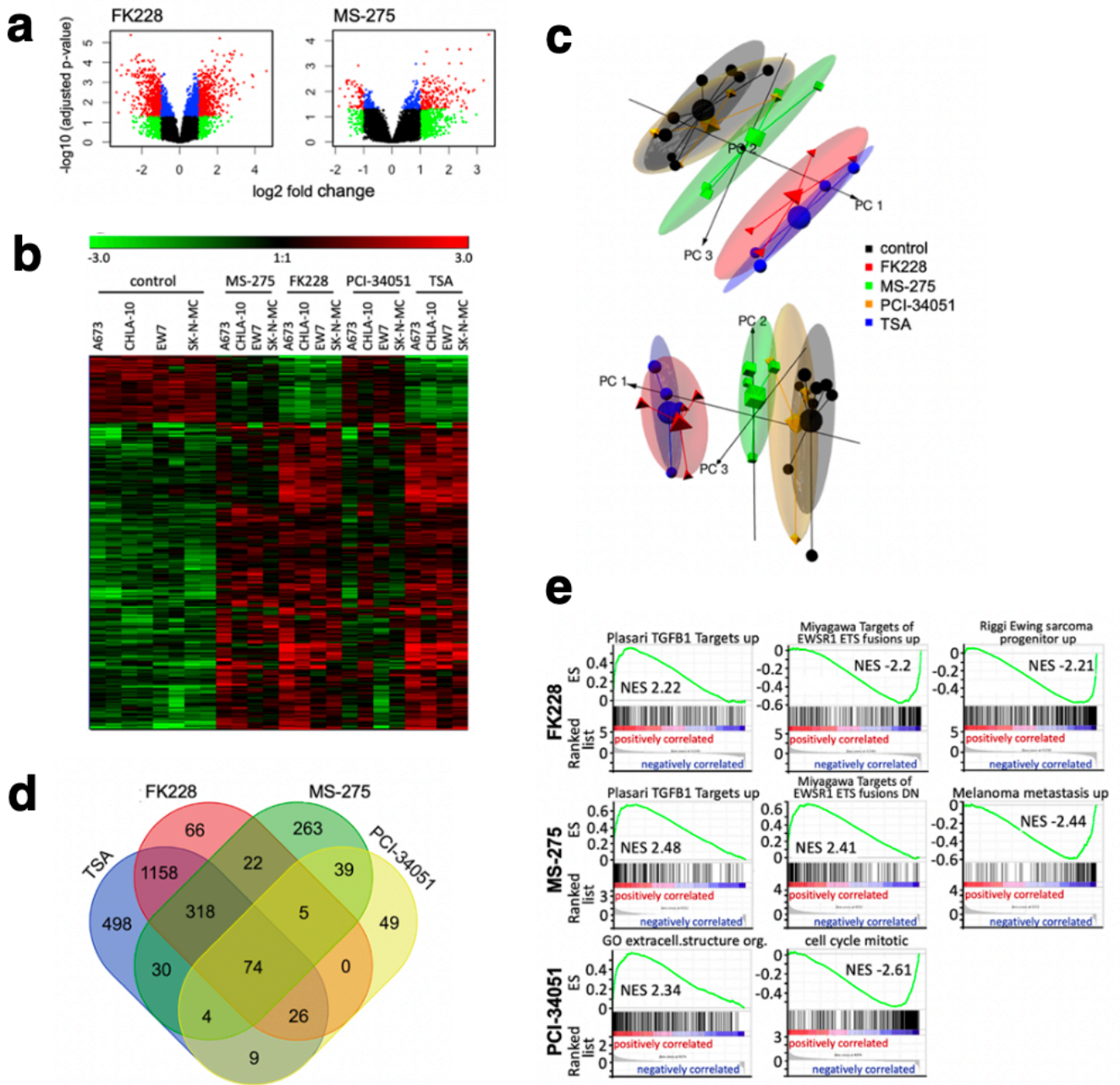
Die Genexpression der behandelten EwS-Zellen wurde mittels Microarrayanalysen untersucht und die Daten mit verschiedenen Analyseprogrammen ausgewertet. Insgesamt konnte eine starke Deregulation der Genexpression nach Behandlung mit HDACi beobachtet werden: Die Vulkandiagramme in Abbildung 5a zeigen Gene, deren Expression nach Behandlung der vier EwS-Zelllinien mit Romidepsin (FK228) oder Entinostat (MS-275) gemittelt dereguliert wurden. Die Behandlung mit Romidepsin führte zu einer Deregulation der Expression von 2312 Genen, nach Entinostat von 475 Genen.

Abbildung 5b zeigt eine Heatmap einer differentiellen Genexpressionsanalyse von EwS-Zellen nach Behandlung mit HDACi. Die Genexpression nach Behandlung mit HDACi (MS-275, FK228, PCI-34051, TSA, DMSO als Kontrolle) wurde mit einer *fold change* von  $\pm 2$  verglichen. Hierbei konnten 390 hoch- und 86 herunterregulierte Gene identifiziert werden. HDACi Romidepsin und TSA führten dabei zur stärksten Deregulation der Genexpression, welche, wie in Abbildung 5c zu sehen, durch eine „Principal component Analyse“ (PCA) gezeigt werden konnte. Daneben konnte die größte Überschneidung der deregulierten Gene bei Romidepsin und TSA beobachtet werden (Abbildung 5d). Darüber hinaus ergaben GSE-Analysen Hoch- und Herunterregulationen von Gengruppen (nach Behandlung mit HDACi), die den Malignitätseigenschaften (zunächst auf der Ebene der Genexpression) des EwS entgegenwirkten (Abbildung 5e), im Einzelnen:

- Die Behandlung mit Entinostat oder Romidepsin führten zur Induktion von Genen, die relevant für die Zelldifferenzierung sind, sowie zu einer Herunterregulation von Genen, die bedeutend für das spezifische EwS Expressionsprofil sind.



- Zusätzlich führte die Behandlung mit Entinostat zur Reduktion von Metastasierungsgenen.
- Die Behandlung mit PCI-34051 führte zur Deregulation von Genen, welche wichtig für das Zellwachstum und das Zellüberleben sind.



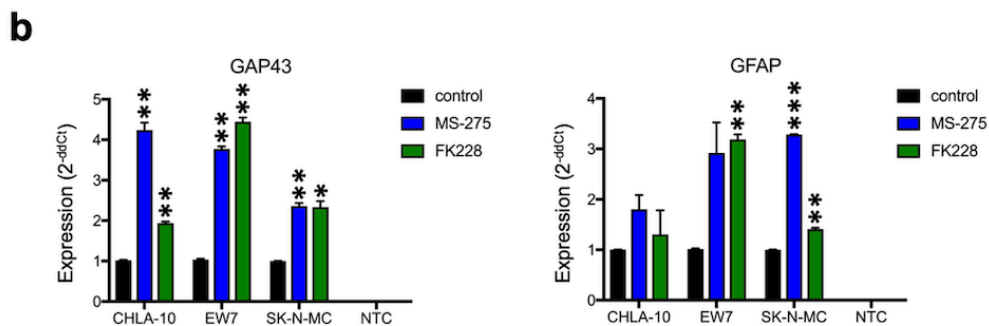
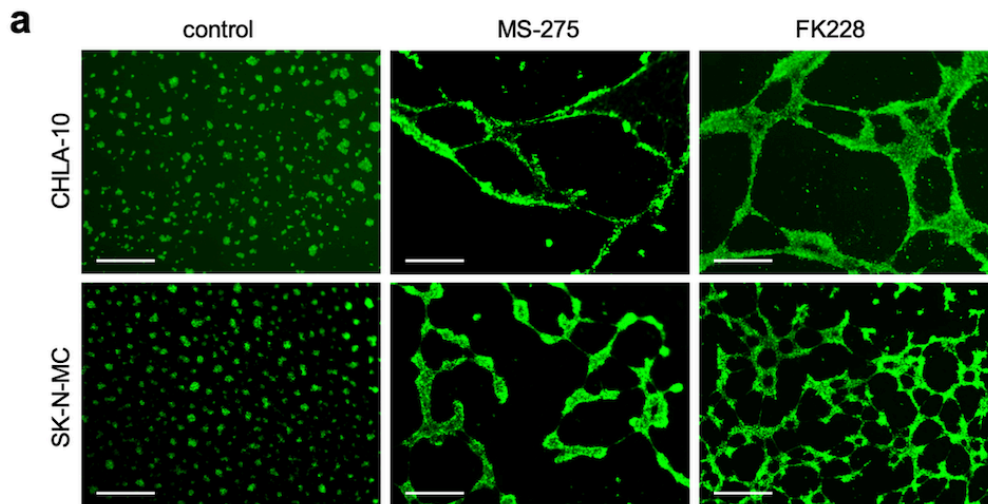
**Abbildung 5: Einfluss der HDACi auf das Expressionsprofil von EwS-Zellen.**

a Vulkandiagramme der deregulierten Gene, gemittelt über vier EwS-Zelllinien (A673, CHLA-10, EW7, SK-N-MC) welche mit FK228 oder MS-275 behandelt und mit deren Kontrolle (DMSO) verglichen wurden. Angegeben sind *fold change* der  $\log_2$ -Expressionswerte (log FC) und adjustierte p-Werte, welche aus den Expressionsanalysen gewonnen wurden. Rot: Gene mit adjustiertem p-Wert < 0,05 (signifikant) und absolutem log FC > 1; blau: Gene mit adjustiertem p-Wert < 0,05 und absolutem log FC  $\leq$  1; grün: Gene mit adjustiertem p-Wert  $\geq$  0,05 und absolutem log FC > 1; schwarz: Gene mit adjustiertem p-Wert  $\geq$  0,05 und absolutem log FC  $\leq$  1.

**b** Heatmap von 476 Genen, die nach HDACi-Behandlung (17-30 h) in vier verschiedenen EwS-Zelllinien  $\pm 2\text{-fold}$  exprimiert wurden. Jede Spalte steht für einen einzelnen Array (*Robust Multichip-Average* (RMA); GSE162785). **c** Principal Component Analysis (PCA) mit 3 Komponenten. Ein Punkt steht für eine Probe der vier verschiedenen EwS-Zelllinien, die mit HDACi behandelt wurden (FK228, MS-275, PCI-34051 oder TSA). Zwei Replikate jeder Zelllinie werden als Kontrollen gezeigt. In jedem Cluster wird der Durchschnitt durch einen großen Punkt symbolisiert. Beide PCA-Diagramme zeigen dieselben Daten aus unterschiedlichen Perspektiven. **d** Venn-Diagramm, welches gemeinsame Gene von EwS-Zellen zeigt, die nach der Behandlung mit HDACi (TSA, FK228, MS-275 oder PCI-34051) unterschiedlich exprimiert wurden (siehe (Yardley et al., 2013); GSE162785). Für das Venn-Diagramm wurden Gene, die  $\pm 2\text{-fold}$  exprimiert wurden, für die Analyse ausgewählt (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>). **e** GSEA-Anreicherungsdiagramme der deregulierten Gengruppen nach HDACi-Behandlung. NES: normalisierter Anreicherungs Wert (*normalized enrichment score*). GSEA: <http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>

### **6.2.2 Entinostat und Romidepsin erhöhen die Differenzierungsfähigkeit von EwS-Zellen**

Wie schon in Kapitel 6.2.1 ausgeführt, zeigen die Genexpressionsanalysen von EwS-Zellen nach Behandlung mit HDACi wie Romidepsin oder Entinostat eine Induktion von Genen, die relevant für die Zelldifferenzierung sind. Diese Ergebnisse waren kongruent zu den Analysen des Differenzierungsassays: Die EwS-Zellen SK-N-MC und CHLA-10 zeigten eine erhöhte Fähigkeit zur endothelialen Differenzierung und eine verstärkte Expression neuronaler Differenzierungsmarker (GAP43 und GFAP) nach Behandlung mit Romidepsin oder Entinostat, siehe Abbildung 6 auf der folgenden Seite.



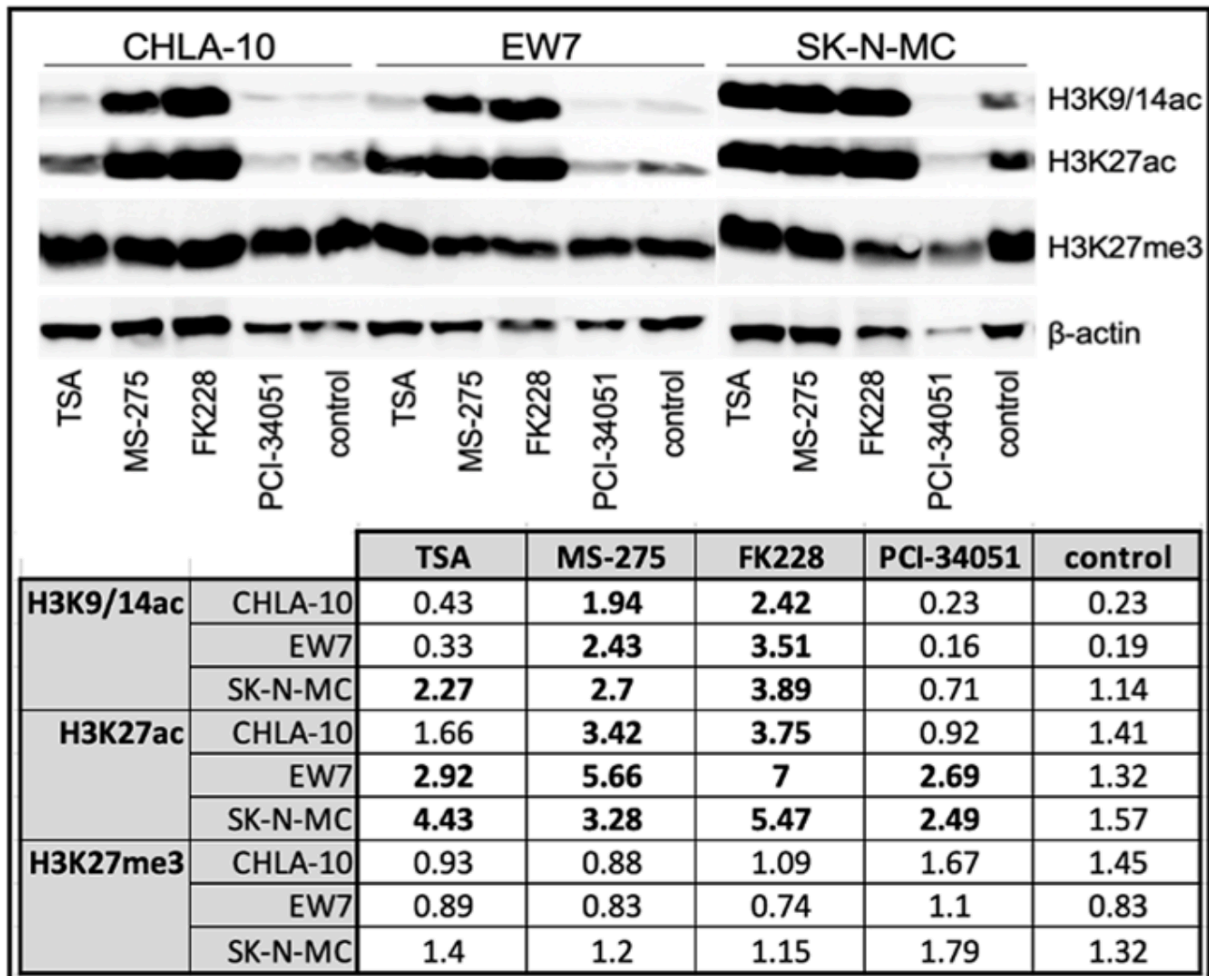
**Abbildung 6: Analyse der Zelldifferenzierung nach Behandlung von EwS Zellen mit HDACi.**

**a** Repräsentative Bilder endothelialer Differenzierungsassays (Maßstab: 0,5 mm) von EwS-Zellen SK-N-MC und CHLA-10 nach Inkubation mit HDACi (3  $\mu$ M MS-275 oder 4 nM FK228) über Nacht und Färbung mit Calcein<sup>AM</sup>. Die Kontrollen wurden mit Lösungsmitteln ohne HDACi und der äquivalenten DMSO Dosis behandelt. **b** qRT-PCR der neurogenen Differenzierungsmarker GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) und GAP43 (*growth associated protein 43*) von den EwS-Zellen CHLA-10, EW7 und SK-N-MC nach sechs Tagen Inkubation mit 0,5  $\mu$ M MS-275 oder 0,2 nM FK228.

### 6.2.3 Geisteigerte Acetylierung der Histone H3K9/14 und H3K27 nach Behandlung mit HDACi

Zur Untersuchung der Histonmodifikation (H3K9/14-Acetylierung, H3K27-Acetylierung, H3K27-Trimethylierung) nach Behandlung von EwS-Zellen mit HDACi, wurden Western Blot Analysen durchgeführt (Abbildung 7). In fast allen untersuchten EwS-Zelllinien konnte ein Anstieg der Acetylierung von Histon H3K27 nach Behandlung mit HDACi beobachtet werden (davon ausgenommen CHLA-10 mit PCI-34051). Ebenso zeigte sich ein allgemeiner Anstieg von H3K9/14ac, jedoch nicht nach Behandlung mit PCI-34051. Weiterhin konnte ein starker Anstieg der Acetylierung nach Behandlung mit Entinostat (MS-275) oder Romidepsin (FK228),

vor allem in CHLA-10 und EW7 beobachtet werden. Im Gegensatz hierzu zeigte die Trimethylierung von Histon H3K27 keine Veränderung nach Behandlung mit HDACi .



**Abbildung 7: Western Blot Analyse der Histonmodifikation von EwS-Zellen nach Behandlung mit HDACi.**

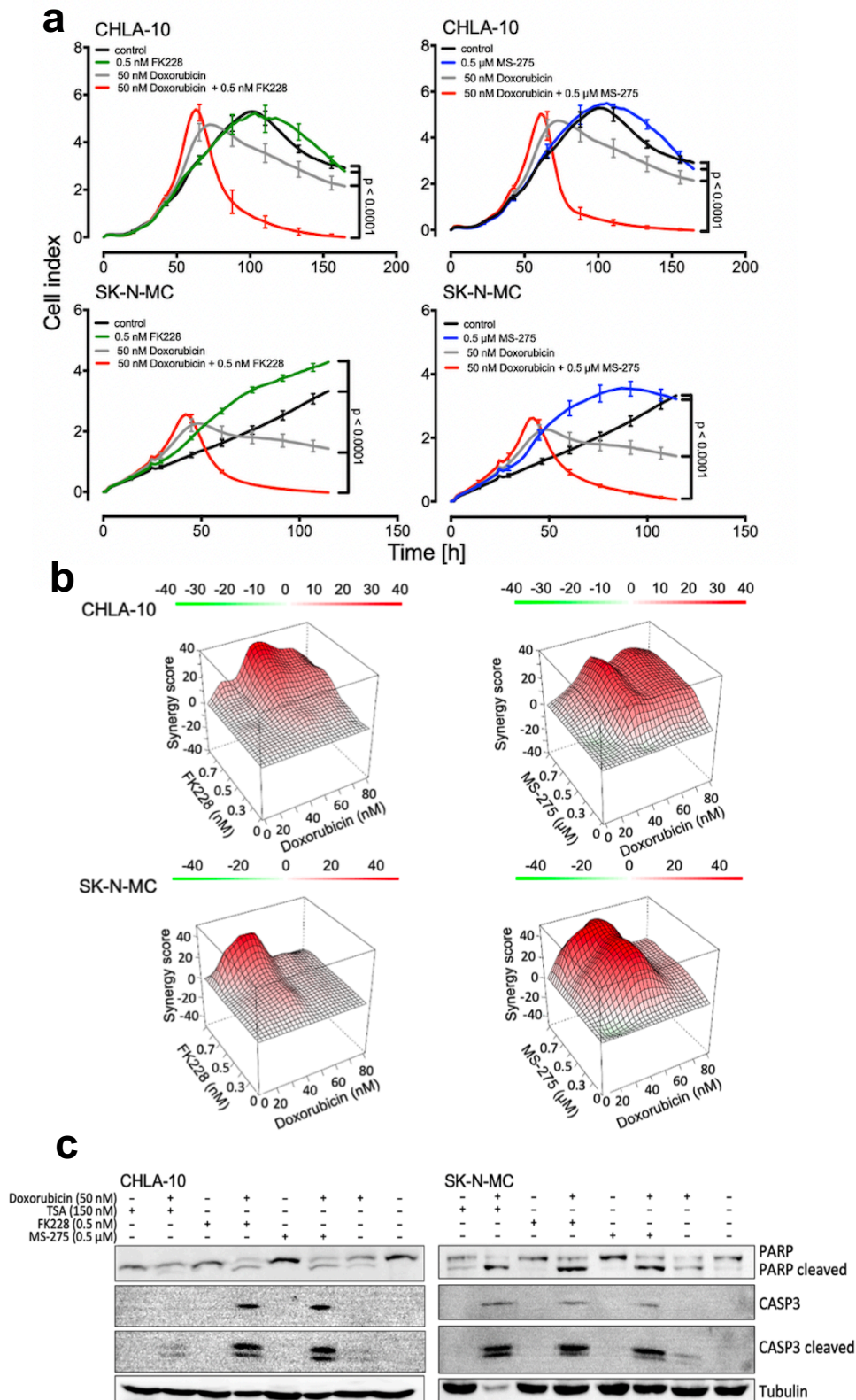
Western Blot Analyse der Histonmodifikation (H3K9/14ac, H3K27ac, H3K27me3) von EwS-Zellen nach Behandlung mit HDACi für 17 Stunden. DMSO wurde in der Äquivalenzdosis zu den HDACi als Kontrolle verwendet.  $\beta$ -Actin diente als Ladekontrolle. Die Tabelle stellt die optischen Dichtewerte der einzelnen Bandsignale dar, welche als Quotient aus dem Einzelwert und der Kontrolle ( $\beta$ -Actin) berechnet wurden. Werte > 1,8 sind fett dargestellt.

#### 6.2.4 HDACi erhöhen die Empfindlichkeit von EwS-Zellen für Chemotherapeutika

Doxorubicin und Vincristin sind Chemotherapeutika in der Erstlinientherapie für Patient\*innen mit EwS. EwS-Zellen zeigten nach Behandlung mit der Kombinationstherapie, bestehend aus Doxorubicin und HDACi, im Vergleich zur Doxorubicin-Monotherapie eine signifikant langsamere Proliferation (Abbildung 8a und 8b). Kongruierend zeigte sich in den EwS-Zellen, die mit der Kombinationstherapie behandelt wurden, eine deutliche Zunahme der Apoptosemarker (gespaltene Caspase 3 und PARP) (Abbildung 8c). Insgesamt konnte eine erhöhte Empfindlichkeit der EwS-Zellen für Doxorubicin beobachtet werden, wenn sie



zusätzlich mit HDACi behandelt wurden. Die Kombinationsindexanalyse (Abbildung 8b) visualisiert die synergistischen Effekte der Kombinationstherapie.



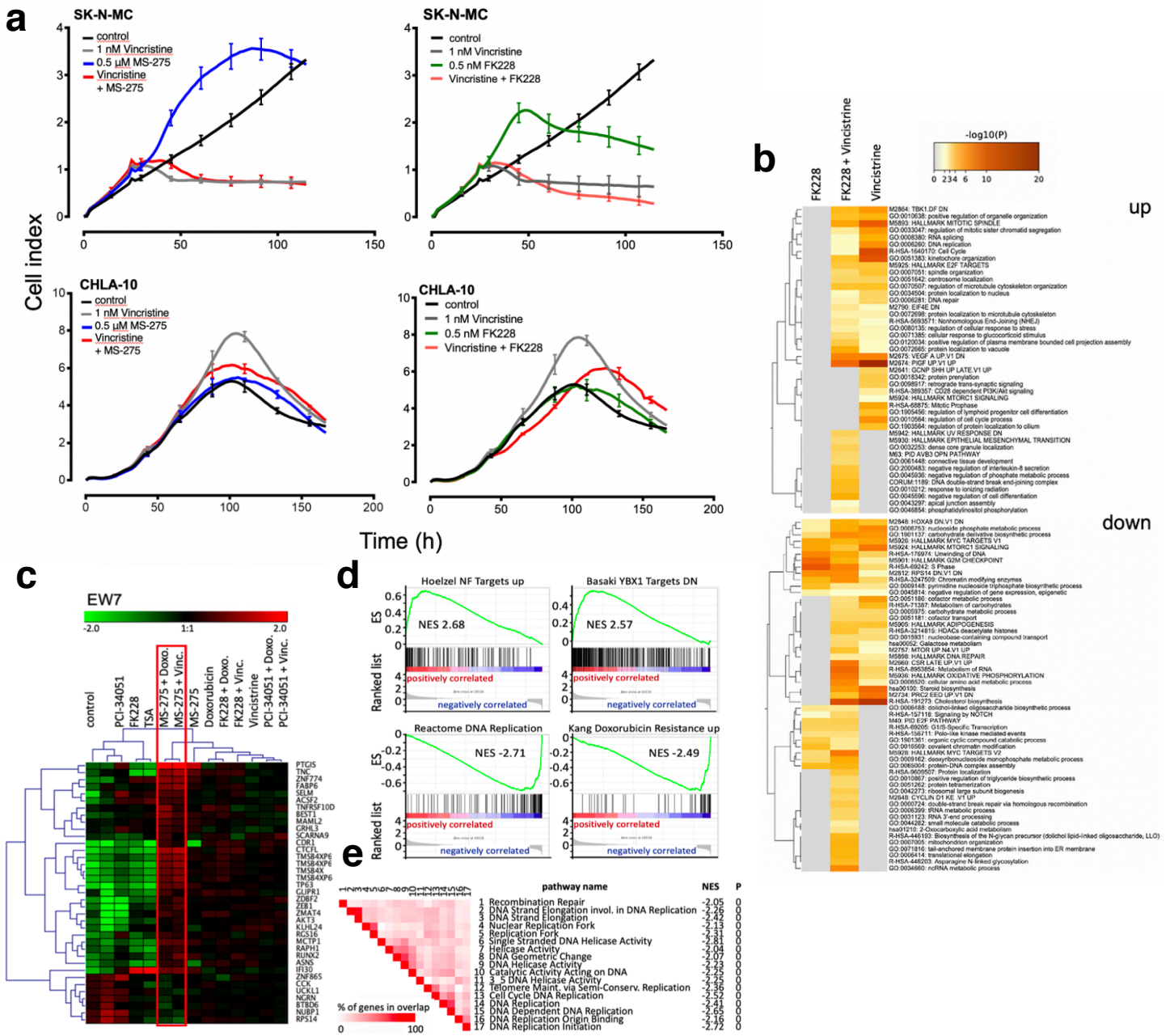
**Abbildung 8: Synergistische Wirkung von HDAC-Inhibitoren mit Doxorubicin.**  
(Siehe Legende auf der folgenden Seite)

**a** Die Proliferationsanalyse von SK-N-MC und CHLA-10 nach Behandlung mit Doxorubicin und/oder HDACi (MS-275 oder FK228) erfolgte mit dem xCELLigence-System. **b** Die Heatmaps zeigen die Überschreitung der „Bliss-Synergie-Scores“ für die Kombinationsbehandlung von Doxorubicin mit HDACi in CHLA-10- oder SK-N-MC. Werte > 1 (rot) entsprechen synergistischen Kombinationen, während Werte < 1 (grün) antagonistische Kombinationen kennzeichnen **c** Western Blot Analyse von Apoptosemarkern (gespaltene Caspase 3 und PARP) nach Behandlung mit Doxorubicin und/oder HDACi. Die EwS-Zelllinie CHLA-10 wurde für 36 Stunden, SK-N-MC für 24 Stunden behandelt. Tubulin diente als Ladekontrolle.

Dagegen konnte bei der Kombinationstherapie bestehend aus Vincristin und HDACi keine Wachstumsverlangsamung beobachtet werden (Abbildung 9a): EwS-Zellen, die mit Vincristin in Kombination mit Entinostat (MS-275) oder Romidepsin (FK228) behandelt wurden, zeigten keinen bis nur einen geringen Unterschied im Vergleich zur Vincristin-Monotherapie. Jedoch zeigte eine Genexpressionsanalyse, dass relevante Gene nur nach der Kombinationstherapie dereguliert werden (Abbildung 9b). Hierbei konnte unter anderem eine Suppression von Genen, welche relevant für die Doppelstrangbruchreparatur sind, festgestellt werden.

Vielfältige Veränderungen zeigte ebenfalls eine Expressionsanalyse von EwS-Zellen nach einer Kombinationsbehandlung mit Entinostat und Doxorubicin (Abbildung 9c - 9e), im Einzelnen:

- Erhöhung der pro-apoptotischen Genexpression
- Erhöhung des Ubiquitin-vermittelten Proteinabbaus
- Steigerung der AKT-Signalisierung
- Verringerung der S-Phasen-Aktivität
- Verringerung der Resistenz gegenüber Doxorubicin



**Abbildung 9: Proliferationsassay und Expressionsanalysen von behandelten EwS-Zellen mit HDAC-Inhibitoren und/oder Vincristin.**

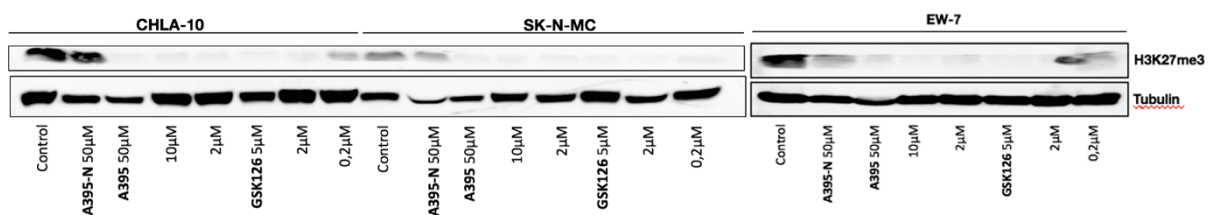
**a** Die Proliferationsanalyse von SK-N-MC (oben) und CHLA-10 (unten) nach Behandlung mit Vincristin und/oder HDACi (MS-275 oder FK228) wurde mit dem xCELLigence-System untersucht.

**b** Genexpressionsanalyse von EwS-Zellen SK-N-MC und CHLA-10, welche mit FK-228 und/ oder Vincristin behandelt und mit ihrer Kontrolle verglichen wurden. Abgebildet ist eine Heatmap, die erhöhte Signalwege und Gengruppen nach Genontologie (basierend auf den 300 am stärksten hoch- und herunterregulierten Genen) darstellt. Der P-Wert wird durch das entsprechende Farbspektrum visualisiert. **c** Heatmap einer Genexpressionsanalyse von EwS-Zellen (EW7) nach Behandlung (17 Stunden) mit HDACi und/ oder Chemotherapeutika (MS-275 mit Doxorubicin oder Vincristin sind rot umrahmt). Dargestellt sind Gene, deren Expression  $\geq 1,5$ -fach dereguliert wurden. Die Microarray-Daten wurden mit ihrer normalisierten Fluoreszenzsignalintensität verwendet („robust multichip average“ (RMA); GSE162785). Jede Spalte entspricht einem Array. **d** GSEA-Analyse der deregulierten Gensätze nach der Kombinationstherapie von HDACi und Chemotherapeutika (MS-275 und Doxorubicin). NES: normalisierter Anreicherungswert (*normalized enrichment score*). GSEA: <http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>. **e** „GSEA-Leading-Edge-Analyse“ der nach der Kombinationsbehandlung (MS-275 mit Doxorubicin) herunterregulierten Gengruppen (Genontologie). Die „Set-to-Set-Analyse“ zeigt eine Korrelation zwischen der Kombinationstherapie (MS-275 mit Doxorubicin) und der Herunterregulation von Gengruppen für die Chromosomenregulation.

## 6.3 Die Kombinationstherapie EEDi mit HDACi zeigt antitumorale synergistische Effekte

### 6.3.1 Abnahme der Trimethylierung von Histon H3K27 nach Behandlung mit EED- oder EZH2-Inhibitoren

Die EwS-Zelllinien CHLA-10, SK-N-MC und EW7 wurden für 72 Stunden mit einem EED-Inhibitor (A-395) oder einem EZH2-Inhibitor (GSK-126) behandelt. Die folgende Western Blot Analyse zeigte eine Abnahme der Trimethylierung von Histon H3K27 (H3K27me3) nach Behandlung mit A-395 sowie eine konzentrationsabhängige Abnahme nach der Behandlung mit GSK-126 (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Abnahme von H3K27me3 nach Behandlung mit EEDi oder EZH2i**

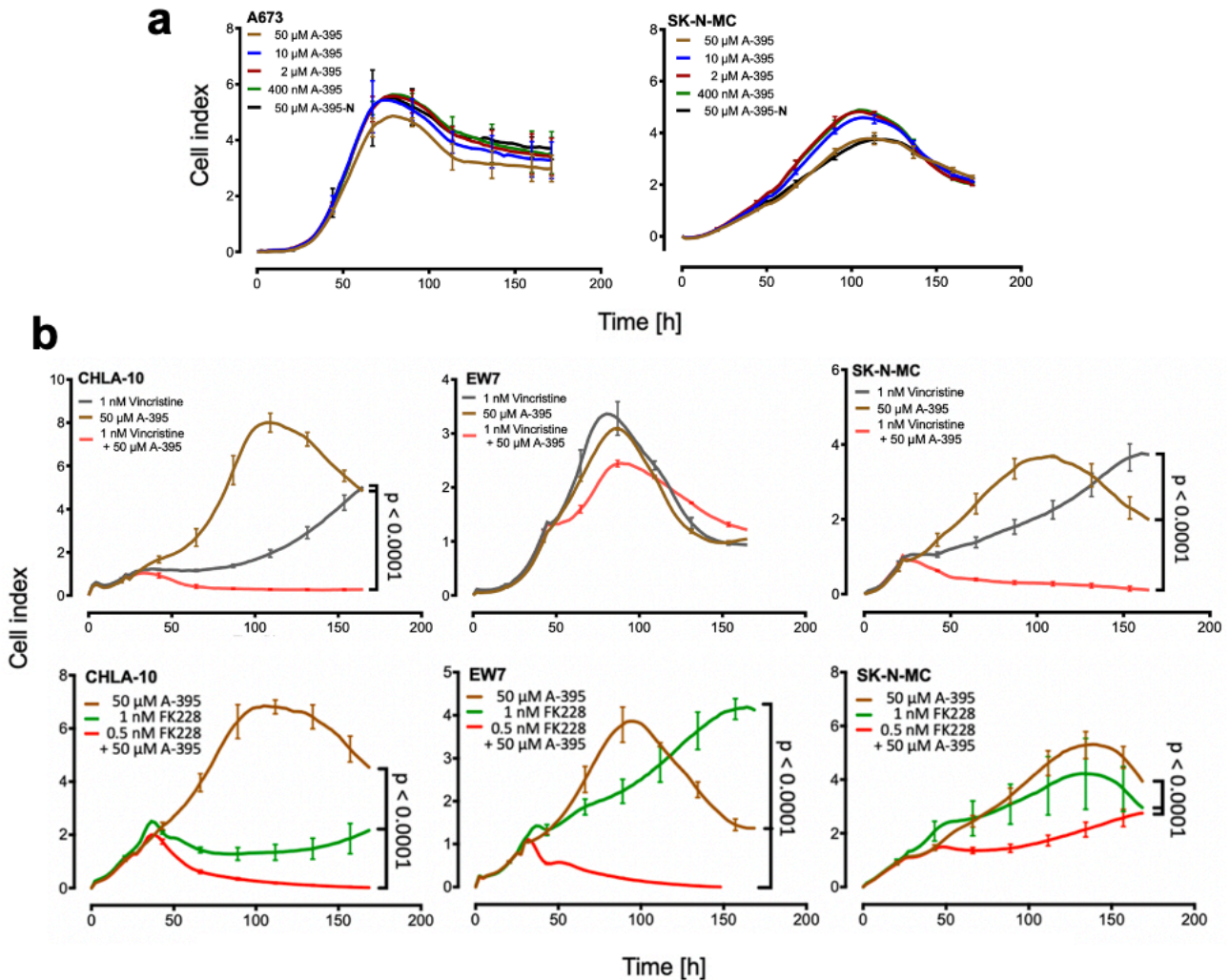
Western Blot Analyse von H3K27me3 nach Behandlung mit EEDi (A-395) oder EZH2i (GSK-126). Die EwS-Zellen (CHLA-10, SK-N-MC und EW7) wurden für 72 Stunden behandelt. Tubulin diente als Ladekontrolle.

### 6.3.2 Auswirkungen von Kombinationstherapien mit EEDi auf die Zellproliferation *in vitro* und *in vivo*

EEDi (A-395) als Monotherapie zeigte keine Auswirkung auf die Proliferation von EwS-Zellen (Abbildung 11a), jedoch konnte eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Vincristin beobachtet werden, wenn Vincristin mit EEDi kombiniert wurde: Abbildung 11b (oben) zeigt die Proliferationsanalysen von EwS-Zellen, welche mit EEDi und/oder Vincristin behandelt wurden. Zu erkennen ist eine signifikante Inhibition der Proliferation nach der Kombinationstherapie, jedoch nur bei SK-N-MC und CHLA-10, nicht bei EW7.

Dagegen konnte nach der Kombinationstherapie mit EEDi und HDACi in allen untersuchten EwS-Zellen, also auch in EW7, eine signifikante Inhibition der Proliferation beobachtet werden (Abbildung 11b (unten)).



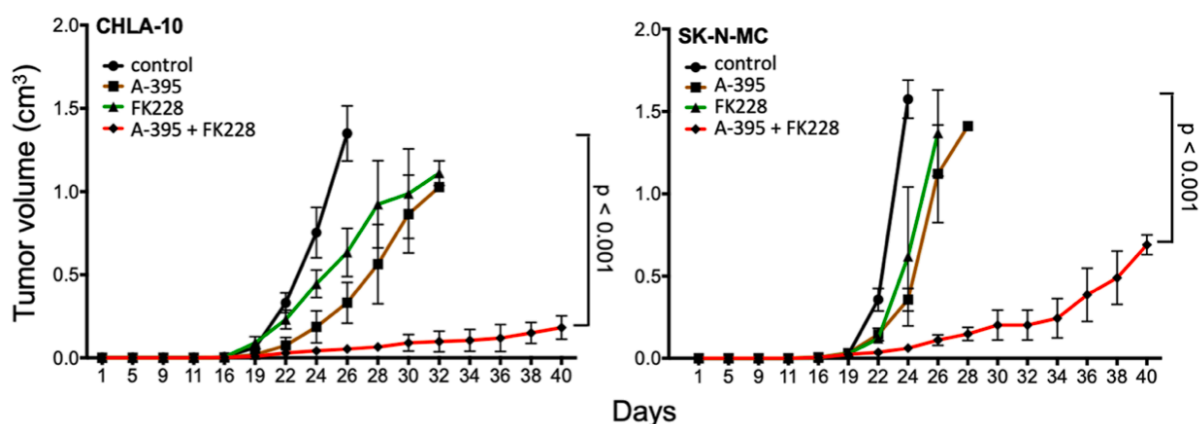


**Abbildung 11: Auswirkungen von EEDi (als Monotherapie und in Kombination mit Vincristin oder HDACi) auf die Zellproliferation *in vitro*.**

Die abgebildeten Proliferationsanalysen (a und b) wurden mit dem xCELLigence-System durchgeführt. **a** Proliferationsanalyse von EwS-Zellen (A673 und SK-N-MC) nach Behandlung mit EEDi (A-395) in verschiedenen Konzentrationen (400nM - 50µM). Als Kontrolle wurde die Kontrollsubstanz A-395-N verwendet (50µM). **b** Untersuchung der Kombinationstherapie von EEDi entweder mit Vincristin (oben) oder mit dem HDACi FK228 (unten) auf die Proliferationsfähigkeit von EwS-Zellen. Die roten Proliferationskurven entsprechen den jeweiligen Kombinationsbehandlungen.

Vergleichbare synergistische Effekte von EEDi mit HDACi wurden auch *in vivo* beobachtet. Das lokale Tumorwachstum von EwS-Zellen (SK-N-MC und CHLA-10) in Mäusen wurde durch die Therapie mit EEDi (A-395) und Romidepsin (FK228) signifikant verlangsamt (Abbildung 12).

Als mögliche synergistische Effekte der Kombinationstherapie konnten erhöhte Apoptosemarker in den entnommenen Tumoren (und auch in *in vitro* Untersuchungen) festgestellt werden, sowie eine verringerte Mitoserate im Vergleich zur Monotherapie. (Schmidt et al., 2021) Genexpressionsanalysen zeigten außerdem eine verringerte Expression von pädiatrischen Tumormarkern und Angriffspunkten einer reprimierten EZH2 Expression nur nach der Kombinationstherapie ((Schmidt et al., 2021): Zusatzdatei 2: Abb. S8b, c, d).

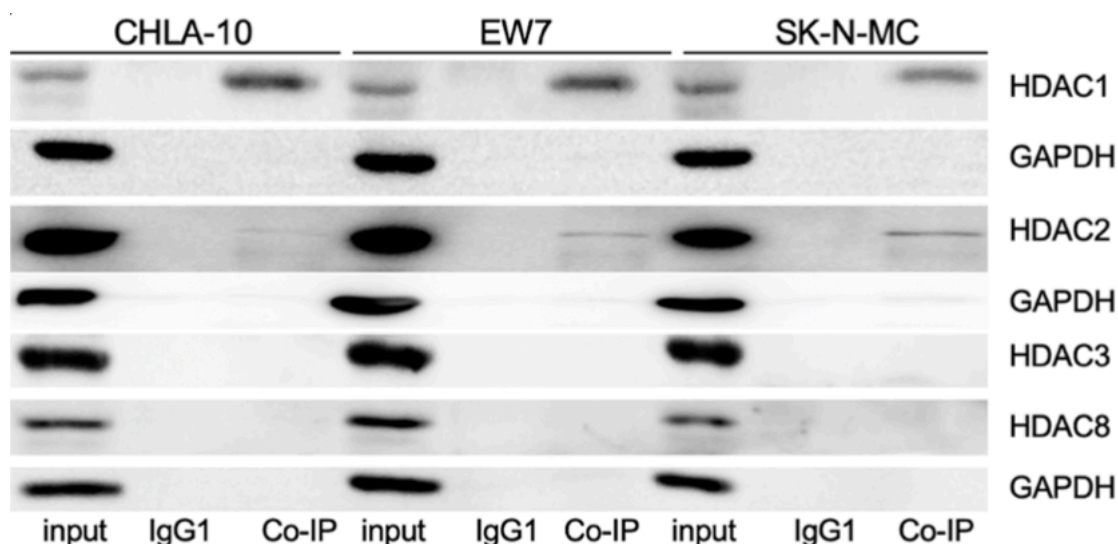


**Abbildung 12: Lokales Tumorwachstum von EwS-Zellen unter der Kombinationstherapie EEDi und HDACi in vivo.**

Das lokale Tumorwachstum wurde in Mäusen nach s.c. Injektion von EwS-Zellen (CHLA-10 oder SK-N-MC) untersucht. Die Mäuse wurden nach dem Zufallsprinzip in vier Gruppen eingeteilt, wobei jede Gruppe aus fünf Mäusen bestand. Sobald die Tumore palpabel waren, wurden die Mäuse für vier Wochen mit A-395 (2x/Woche) und/oder FK228 (1x/Woche) mittels intraperitonealer (i.p.) Injektion therapiert. Der Kontrollgruppe wurde eine Kontrolllösung (DMSO) injiziert.

### 6.3.3 HDAC1 (und HDAC2) interagieren mit dem PRC2-Komplex

Zur näheren Untersuchung synergistischer Effekte von EEDi und HDACi wurden Co-IP-Experimente von EwS-Zellen (CHLA-10, EW7 und SK-N-MC) durchgeführt, die eine Interaktion des PRC2-Komplexes insbesondere mit HDAC1 sowie mit HDAC2 (Abbildung 13) bestätigten. Eine Interaktion des PRC2 Komplexes mit HDAC3 oder HDAC8 konnte nicht beobachtet werden.

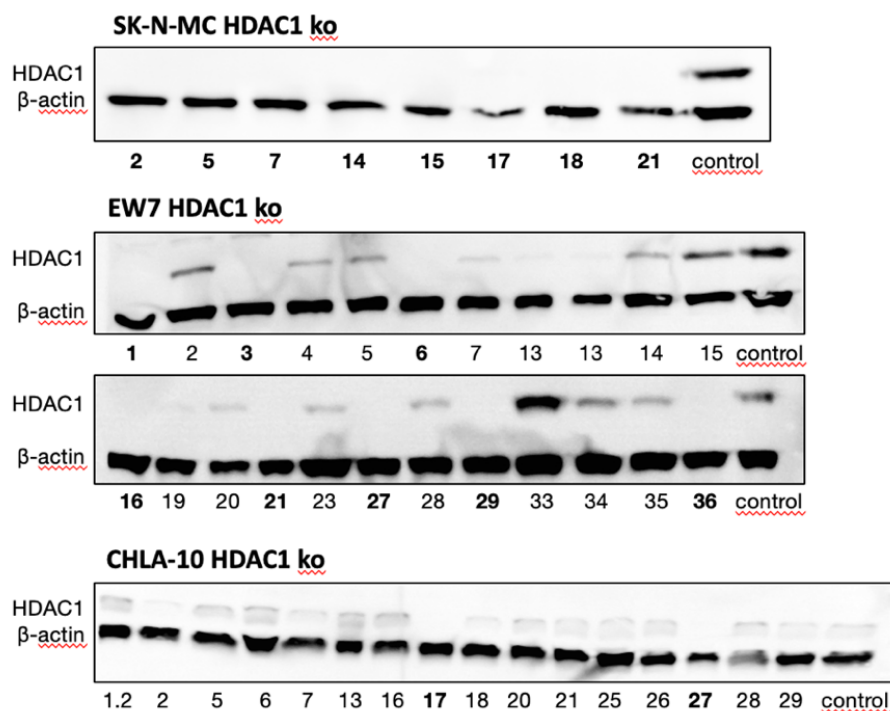


**Abbildung 13: Interaktionsanalyse (Co-IP) des PRC2-Komplexes mit HDAC der Klasse I.**

Co-IP von EwS-Zellen (CHLA-10-, EW7- und SK-N-MC) unter Verwendung von Anti-EED-Antikörpern. Anschließend wurden die Proteine durch eine Western Blot Analyse auf HDAC1, 2, 3 und 8 analysiert. GAPDH diente als Ladekontrolle.

## 6.4 Die Rolle von HDAC1 in der Pathogenese des Ewing-Sarkoms

Die meisten HDACi hemmen eine Gruppe von HDAC-Genen, insbesondere die Gene der HDAC Klasse I (HDAC 1, 2, 3 und 8) (Tabelle 11). Um herauszufinden, welche Rolle HDAC1 in der Pathogenese des Ewing-Sarkoms spielt, wurde HDAC1 mit der CRISPR/Cas9 Methode in verschiedenen EwS-Zelllinien ausgeschaltet. Erfolgreich generierte HDAC1 *Knockouts* wurden durch die Western Blot Analyse detektiert (Abbildung 14). In EW7 und SK-N-MC konnten mehrere HDAC1 *Knockouts* isoliert werden, in CHLA-10 erwiesen sich HDAC1 *Knockouts* als sehr empfindlich: Es konnten nur zwei HDAC1 *Knockouts* detektiert werden, von denen wiederum nur ein *Knockout* stabil kultiviert werden konnte (HDAC1-17).



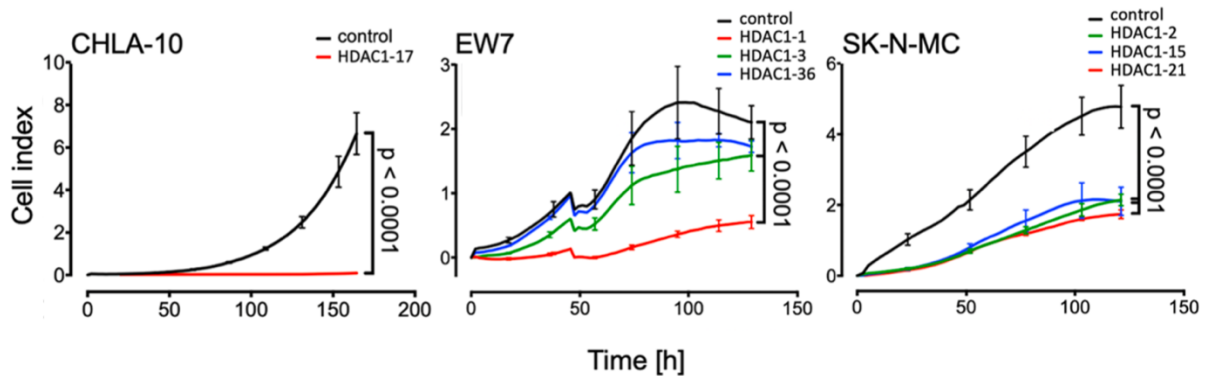
**Abbildung 14: Western Blot Analyse zur Detektion von CRISPR/Cas9 HDAC1 *Knockouts* in drei verschiedenen EwS-Zelllinien.**

Western Blot Analysen mehrerer Einzelzellklone von CHLA-10, EW7 und SK-N-MC nach Transfektion mit sgRNA (HDAC1) und Cas9 sowie deren Kontrolle (nur Cas9). Die Proteinbanden wurden mit Antikörpern gegen HDAC1 nachgewiesen.  $\beta$ -Actin-Antikörper dienten als Ladekontrolle. Die Klone wurden nummeriert, wobei die fett nummerierten Klone als HDAC1 *Knockouts* gewertet wurden.

### 6.4.1 EwS-Zellen mit HDAC1 *Knockout* zeigen eine signifikant verringerte Proliferationsfähigkeit *in vitro*

Proliferationsanalysen von HDAC1 *Knockouts* in EwS-Zellen zeigten eine signifikant verringerte Proliferationsfähigkeit im Vergleich zu ihrer Kontrolle (Abbildung 15). Jedoch weisen die HDAC1 *Knockouts* einer EwS-Zelllinie nicht nur eine langsamere, sondern auch,

wie insbesondere bei der EwS-Zelllinie EW7 zu beobachten, eine unterschiedliche Proliferationsrate untereinander auf.

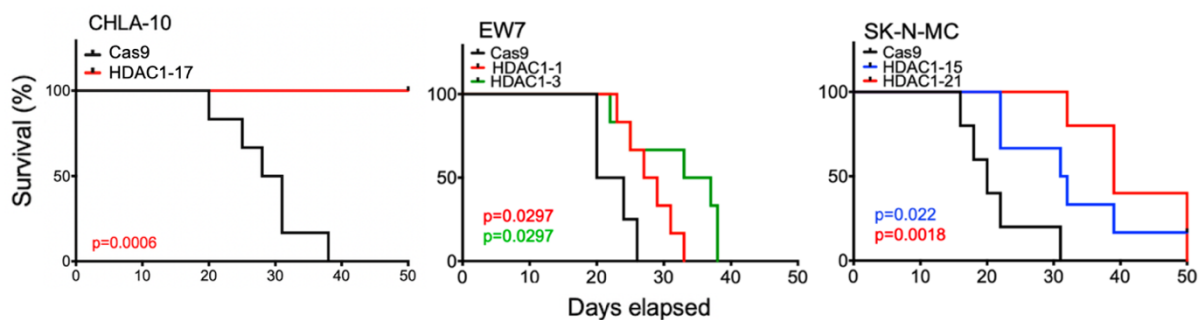


**Abbildung 15: Proliferationsanalysen von HDAC1 *Knockouts* in EwS-Zellen.**

Die Proliferation von bis zu drei EwS-Einzelzellklonen mit HDAC1 *Knockouts* von jeweils drei verschiedenen EwS-Zelllinien (CHLA-10, EW7 und SK-N-MC) wurde mit dem xCELLigence-System untersucht.

#### 6.4.2 Reduziertes Wachstum von EwS-Tumoren mit HDAC1 *Knockout in vivo*

Um herauszufinden, ob HDAC1 *Knockouts* auch *in vivo* eine verringerte Fähigkeit zur Tumorpheriferation aufweisen, wurde das lokale Tumorstwachstum von CRISPR/Cas9 HDAC1 *Knockouts* der EwS-Zelllinien CHLA-10, EW7 und SK-N-MC analysiert. In einem *xenograft* Mausmodell zeigten HDAC1 *Knockouts* in allen Zelllinien ein reduziertes lokales Tumorstwachstum im Vergleich zu ihrer Kontrolle. Die Proliferation der Tumore, bzw. die Dauer bis zum Erreichen des definierten Endpunktes (Tumorstvolumen  $\geq 1 \text{ cm}^3$ ) sind in den Kaplan-Meier Kurven in Abbildung 16 dargestellt.



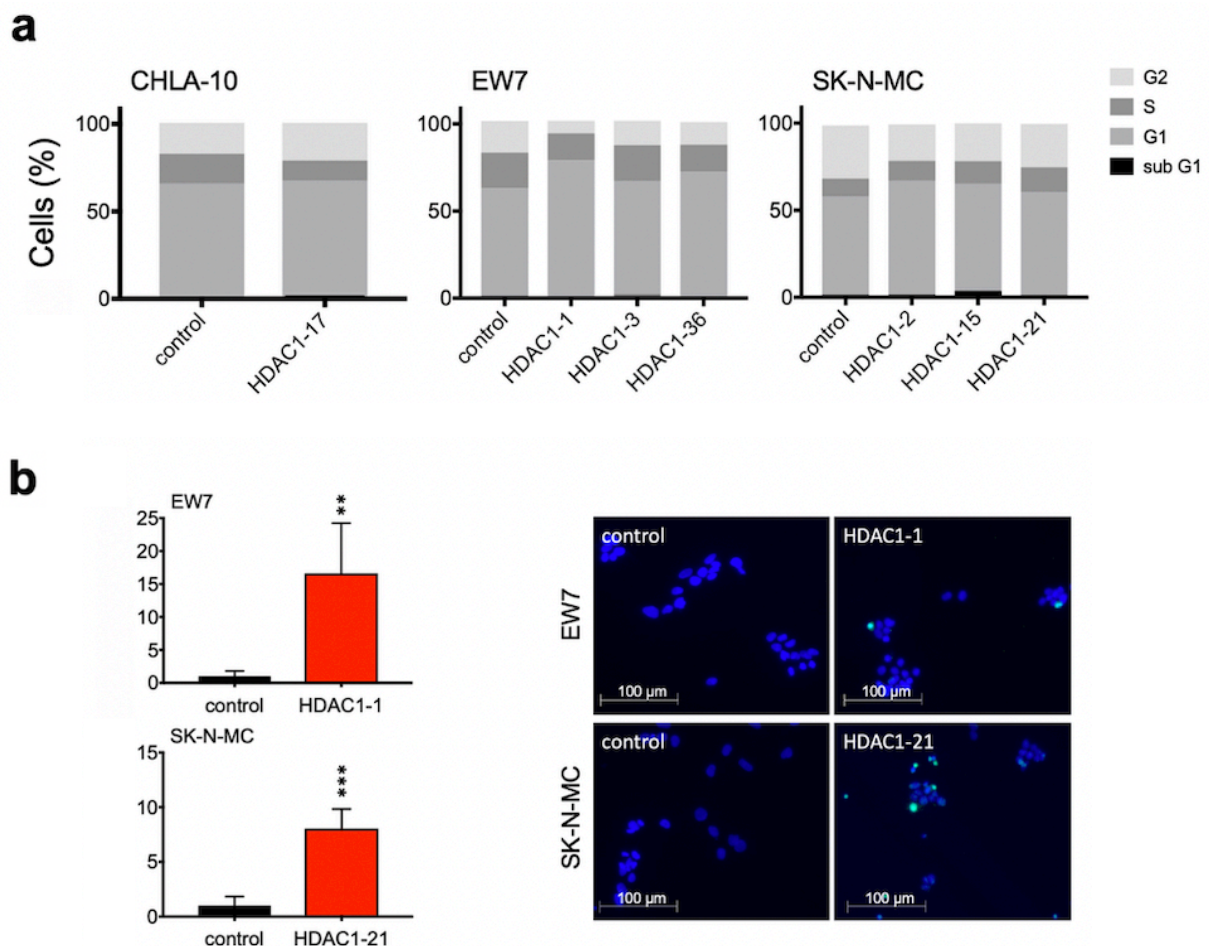
**Abbildung 16: Lokales Tumorstwachstum von CRISPR/Cas9 HDAC1 *Knockouts* in EwS-Zellen *in vivo*.**

Darstellung des lokalen Tumorstwachstums *in vivo* und dessen Dauer in Tagen bis zum Erreichen der Endpunkte (Tumorstvolumen  $\geq 1 \text{ cm}^3$ ).  $4 \times 10^6$  EwS-Zellen mit HDAC1 *Knockout* (bzw. mit Cas9 als Kontrolle) wurden s.c. in die rechte Flanke der Mäuse injiziert. Jede Gruppe bestand aus sechs Mäusen. Die Tumore wurden regelmäßig gemessen und die Werte dokumentiert.



### 6.4.3 HDAC1 *Knockouts* zeigen eine verlängerte G1-Phase (Zellzyklus) sowie signifikant mehr Doppelstrangbrüche

Zur Untersuchung der reduzierten Proliferationsfähigkeit von EwS-Zellen mit HDAC1-*Knockout* wurde eine Zellzyklusanalyse durchgeführt (Abbildung 17a). Es konnte gezeigt werden, dass EwS-Zellen mit HDAC1 *Knockout* eine verlängerte G1-Phase des Zellzyklus aufwiesen, insbesondere in den Zelllinien SK-N-MC und EW7, weniger deutlich in CHLA-10. Eine erhöhte Sub-G1-Phase, welche eine erhöhte Apoptoserate signalisieren würde, wurde nur in einem HDAC1 *Knockout* Klon (HDAC1-15) der EwS-Zelllinie SK-N-MC beobachtet. Jedoch zeigten immunzytochemische Untersuchungen zum Nachweis von Doppelstrangbrüchen ( $\gamma$ -H2AX-Assay) signifikant mehr Doppelstrangbrüche in HDAC1 *Knockouts* von SK-N-MC und EW7 als in deren Kontrolle (Abbildung 17b).

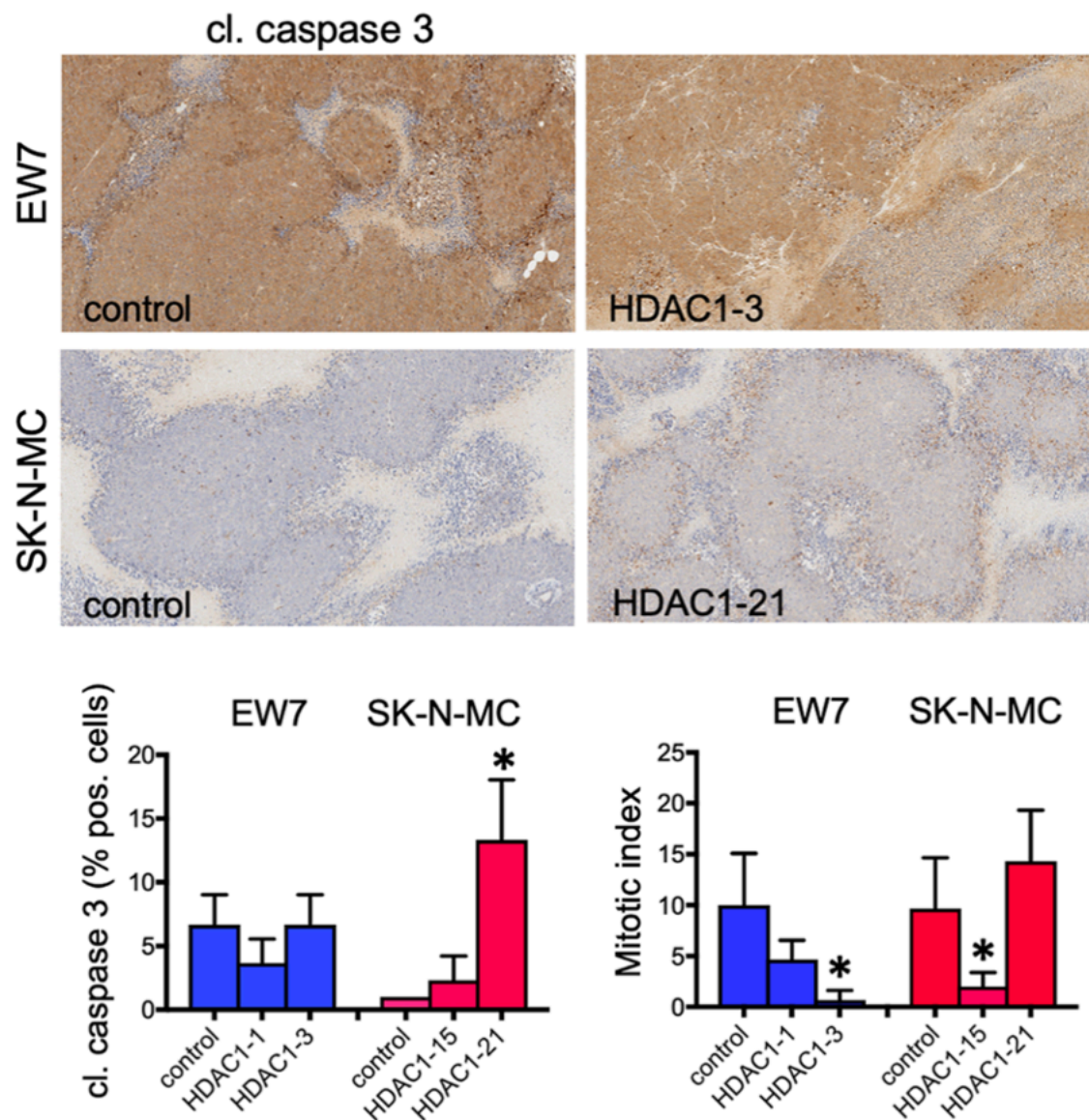


**Abbildung 17: Zellzyklusanalyse und immunzytochemische Untersuchung ( $\gamma$ -H2AX Assay) von HDAC1 *Knockouts* in EwS-Zellen.**

**a** Die Zellzyklusanalyse von EwS-Zellen mit HDAC1 *Knockout* sowie von ihren Kontrollen (Cas9), wurden durch eine Propidiumiodid-Färbung und eine Durchflusszytometrie durchgeführt. Der prozentuale Anteil der einzelnen Zellzyklen wurde als Balkendiagramm dargestellt. **b** Immunzytochemische Untersuchung zum Nachweis von Doppelstrangbrüchen ( $\gamma$ -H2AX-Assay) von EwS-Zellen mit HDAC1 *Knockout*. Links: Quantitative Darstellung der Doppelstrangbrüche von HDAC1 *Knockouts* im Vergleich zu ihrer Kontrolle (Cas9). Rechts: Repräsentative Aufnahme des  $\gamma$ -H2AX-Assays; grün fluoreszierende Signale kennzeichnen Doppelstrangbrüche (Anti-phospho-Histon H2A.X (Ser139) Antikörper mit FTC-Konjugation), blau fluoreszierende Signale entsprechen den Zellkernen, welche mit DAPI gefärbt wurden.

#### 6.4.4 Apoptose- und Mitoseverhalten von HDAC1 *Knockout* EwS-Tumoren im Mausmodell

Im Anschluss an die Untersuchung des lokalen Tumorwachstums *in vivo* (Kapitel 6.4.2, Abbildung 16), wurden die Tumore nach Erreichen des definierten Endpunktes (Tumorvolumen  $\geq 1 \text{ cm}^3$ ) den Mäusen entnommen und immunhistochemisch untersucht (Abbildung 18): EwS-Tumore mit HDAC1 *Knockout* zeigten eine verringerte Mitoserate im Vergleich zu ihrer Kontrolle, mit Ausnahme von SK-N-MC HDAC1-21. Daneben zeigten die Tumore der Zelllinie SK-N-MC mit HDAC1 *Knockout* erhöhte Apoptosemarker (gespaltene Caspase 3), jedoch nicht in EW7.

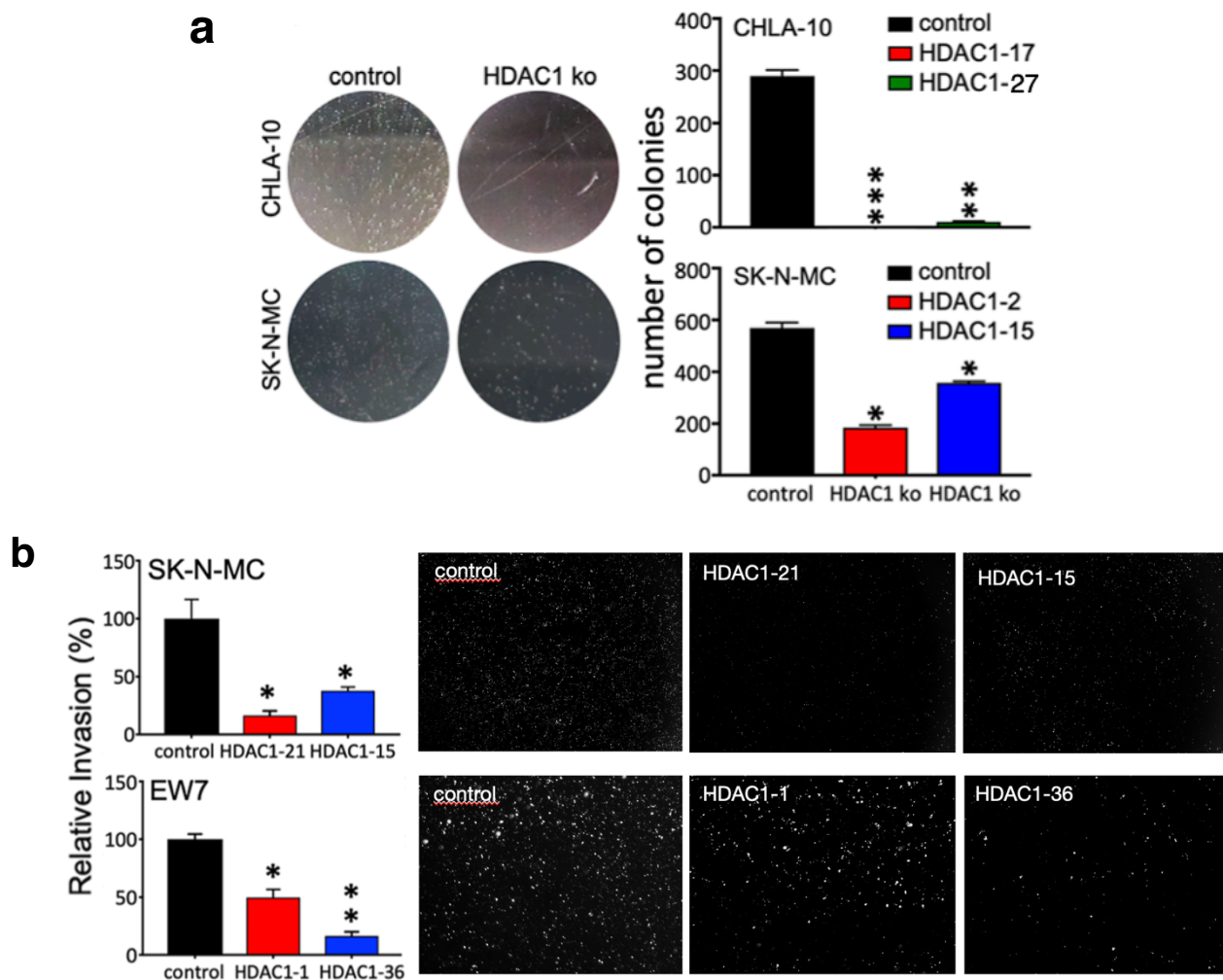


**Abbildung 18: Immunhistochemische Untersuchung der Apoptose- und Mitoserate von HDAC1 *Knockout* EwS-Tumoren im Mausmodell.**

Oben: Repräsentative Schnittaufnahmen (10-fache Originalvergrößerung) der HDAC1 *Knockout* EwS-Tumore und deren Kontrollen (Cas9) nach immunhistochemischer Untersuchung mit Antikörpern gegen gespaltene Caspase 3 (cl. caspase 3). Unten (links): Quantitative Darstellung der mit Antikörpern (cl. caspase 3) gebundenen Tumore. Die pro Tumor gebundenen Zellen (in fünf Feldern) wurden in Prozent angegeben. Unten (rechts): Darstellung der Anzahl der Mitosen pro zehn „High-Power“-Felder pro Tumor.

### 6.4.5 Die Relevanz von HDAC1 für kontaktunabhängiges Wachstum und für die Fähigkeit zur Invasion

HDAC1 *Knockouts* zeigen im Vergleich zu ihren Kontrollen eine signifikant verringerte Koloniebildungsfähigkeit (Abbildung 19a), was für eine reduzierte Fähigkeit zu kontaktunabhängigem Wachstum spricht. Darüber hinaus konnte im Invasionsassay eine signifikant verringerte Invasionsfähigkeit von EwS-Zellen mit HDAC1 *Knockout* beobachtet werden (Abbildung 19b).



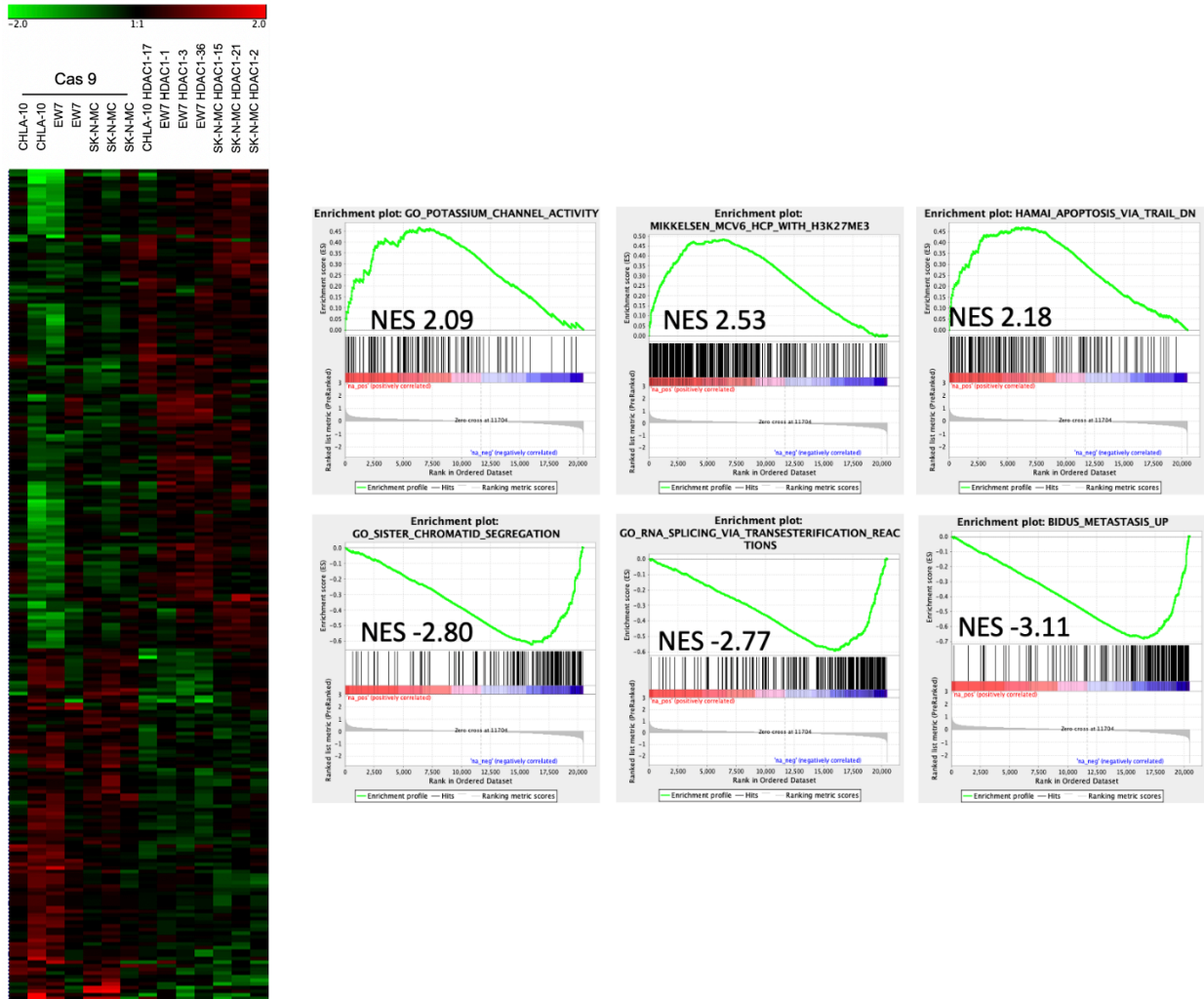
**Abbildung 19: Ergebnisse des kolonienbildenden Zellenassays und des Invasionsassays von HDAC1 *Knockouts*.**

**a** Links: Repräsentative Aufnahmen des kolonienbildenden Zellenassays von CHLA-10 und SK-N-MC mit HDAC1 *Knockout* sowie deren Kontrollen (Cas9). Rechts: Quantitative Darstellung der Anzahl der gebildeten Kolonien. **b** Links: Quantitative Ergebnisse des Invasionsassays (Verhältnis von HDAC1 *Knockouts* und deren Kontrollen (Cas9)). Unten rechts: Repräsentative schwarzweiß Aufnahmen (40x) des Invasionsassays unter dem Fluoreszenzmikroskop nach 48 Stunden Inkubation.



### 6.4.6 Deregulation malignitätsrelevanter Genexpressionen durch HDAC1 *Knockout*

Micorarray- und GSE-Analysen von EwS-Zellen mit HDAC1 *Knockout* zeigten eine Deregulation malignitätsrelevanter Genexpressionen (Abbildung 20). Im Einzelnen konnte eine Hochregulation von Genen beobachtet werden, welche die Empfindlichkeit für Apoptose erhöhen und welche relevant für Zelldifferenzierung sind. Daneben zeigte sich eine Suppression von Genen, die wichtig für Zellzyklusprogression, „RNA-Splicing“ und die Fähigkeit zur Metastasierung sind.



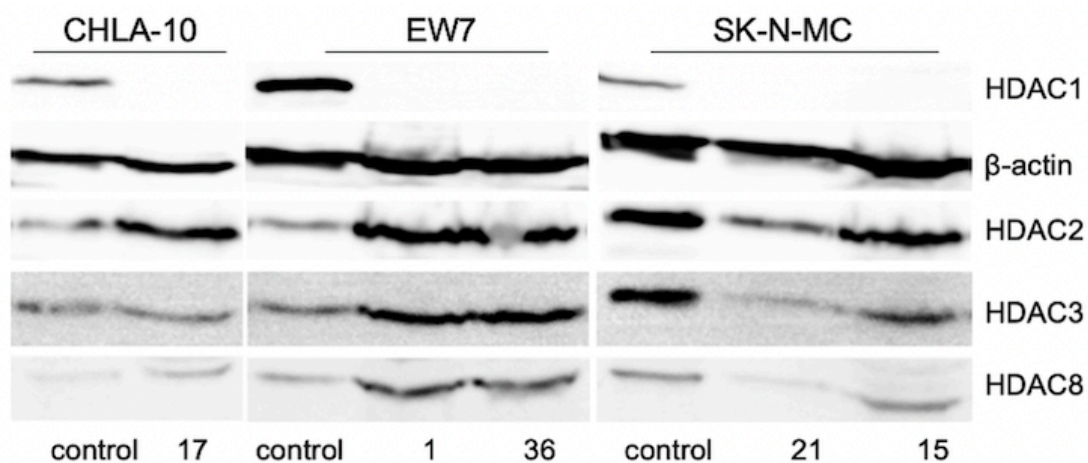
**Abbildung 20: Genexpressionsanalysen von EwS-Zellen mit HDAC1 *Knockout*.**

Links: Heatmap der 229 differenziell exprimierten Gene von EwS-Zellen mit HDAC1 *Knockout* im Vergleich zu ihrer Kontrolle (Cas9). Jede Spalte steht für einen einzelnen Array. Es wurden Microarray-Daten mit ihren normalisierten Fluoreszenzsignalintensitäten verwendet („robust multichip average“ (RMA); GSE162786). Rechts: GSEA-Anreicherungsdiagramme der hoch- und herunterregulierten Gengruppen von EwS-Zellen mit HDAC1 *Knockout*. NES: normalisierter Anreicherungs Wert (*normalized enrichment score*). GSEA: <http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>.



#### 6.4.7 Kompensationsmechanismen von HDAC1 *Knockouts* auf Proteinebene

Western Blot Analysen von HDAC1 *Knockouts* zeigten eine inhomogene Induktion und Suppression von Proteinen der HDAC Klasse I (HDAC1, 2, 3 und 8) (Abbildung 21). Im Einzelnen konnte in EW7 HDAC1 *Knockouts* eine Hochregulation von HDAC2, 3 und 8 beobachtet werden. Ein ähnliches Phänomen ließ sich bei CHLA-10 mit HDAC1 *Knockout* beobachten, im Unterschied dazu zeigte jedoch HDAC3 eine weniger deutliche Hochregulation. Dagegen konnte eine Suppression von HDAC2, 3 und 8 für SK-N-MC HDAC1 *Knockout* Nummer 21 beobachtet werden. Divergierend dazu zeigte HDAC1 *Knockout* Nummer 15 keine Herunterregulation von HDAC8 sowie eine geringere Herunterregulation von HDAC3. Zusammenfassend zeigten sich die Kompensationsmechanismen der HDAC1 *Knockouts* nicht nur zwischen den Zelllinien (CHLA-10, EW7 und SK-N-MC), sondern auch innerhalb einer Zelllinie (SK-N-MC HDAC1 *Knockouts*).

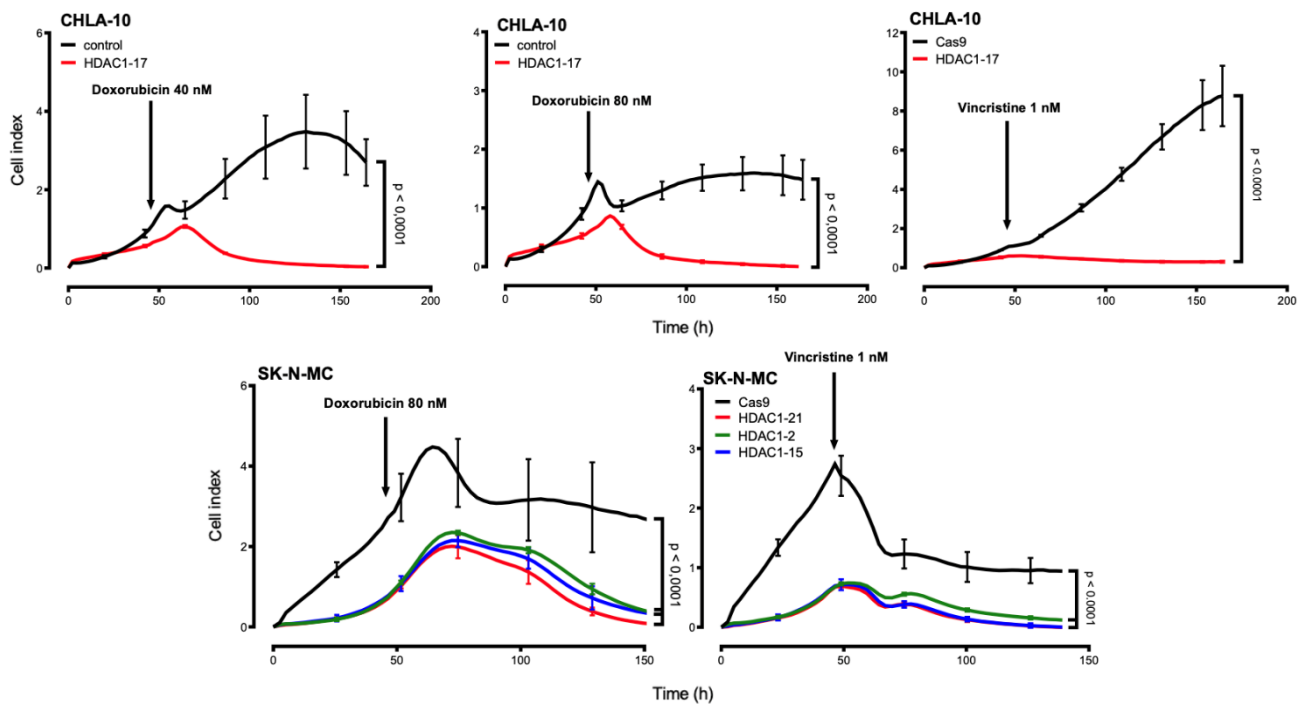


**Abbildung 21: Kompensationsmechanismen von HDAC1 *Knockouts* in EwS-Zellen auf Proteinebene.**

Western Blot Analyse von HDAC Klasse I in EwS-Zellen mit HDAC1 *Knockout*. Der Proteingehalt wurde mit HDAC1-, HDAC2-, HDAC3- und HDAC8-Antikörpern nachgewiesen. β-Actin diente als Ladekontrolle.

#### 6.4.8 HDAC1 *Knockouts* erhöhen die Empfindlichkeit von EwS-Zellen für Erstlinienchemotherapeutika

Wie in Kapitel 6.2.4 (Abbildung 8) gezeigt, erhöhen HDACi die Empfindlichkeit der EwS-Zellen gegenüber Erstlinientherapeutika, insbesondere gegenüber Doxorubicin. Um herauszufinden, ob HDAC1 an diesem Phänomen beteiligt ist, untersuchten wir die Proliferation von HDAC1 *Knockouts* unter der Behandlung mit Doxorubicin oder Vincristin (Abbildung 22). Zu erkennen ist eine signifikante Blockade der Proliferation von HDAC1 *Knockouts* nach Gabe von Chemotherapeutika. Die erhöhte Empfindlichkeit der HDAC1 Zellen lässt sich sowohl nach Gabe von Doxorubicin als auch nach Gabe von Vincristin beobachten.

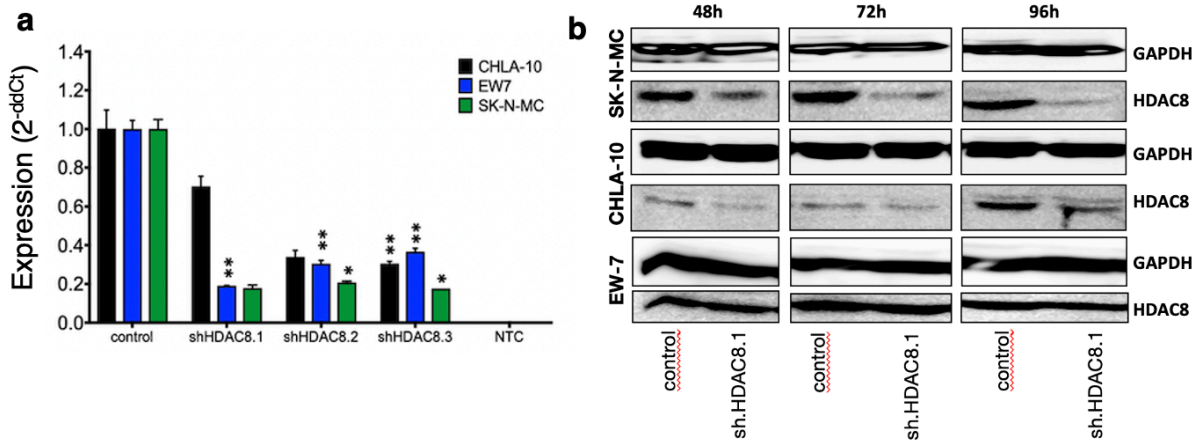


**Abbildung 22: Proliferationsanalysen von HDAC1 *Knockouts* nach Behandlung mit Erstlinientherapeutika.**

Die Analyse der Proliferation von SK-N-MC und CHLA-10 mit HDAC1-*Knockout* nach Behandlung mit Doxorubicin oder Vincristin erfolgte mit dem xCELLigence-System.

## 6.5 Die Rolle von HDAC8 in der Pathogenese des Ewing-Sarkoms

Verschiedene Versuche, stabile HDAC8 CRISPR/Cas9 *Knockouts* in EwS-Zelllinien zu erzeugen, waren nicht erfolgreich, sodass sich die hierfür verwendeten sgRNAs als nicht wirksam erwiesen. Daher wurde die Rolle von HDAC8 in der Pathogenese des EwS durch die Transduktion mit induzierbaren shRNA-Konstrukten weiter untersucht. HDAC8 *Knockdowns* wurden durch qRT-PCR und Western Blot Analysen bestätigt (Abbildung 23). Die Western Blot Analysen zeigten eine deutliche Herunterregulation von HDAC8 durch shRNA HDAC8.1 für SK-N-MC ab 72 Stunden und für CHLA-10 ab 48 Stunden Induktion mit Doxycyclin. Generell zeigte sich jedoch bei CHLA-10 im Vergleich zu SK-N-MC eine geringere Suppression von HDAC8. EW7 zeigte zwar eine verringerte HDAC8-Expression mittels qRT-PCR, jedoch nicht auf Proteinebene.

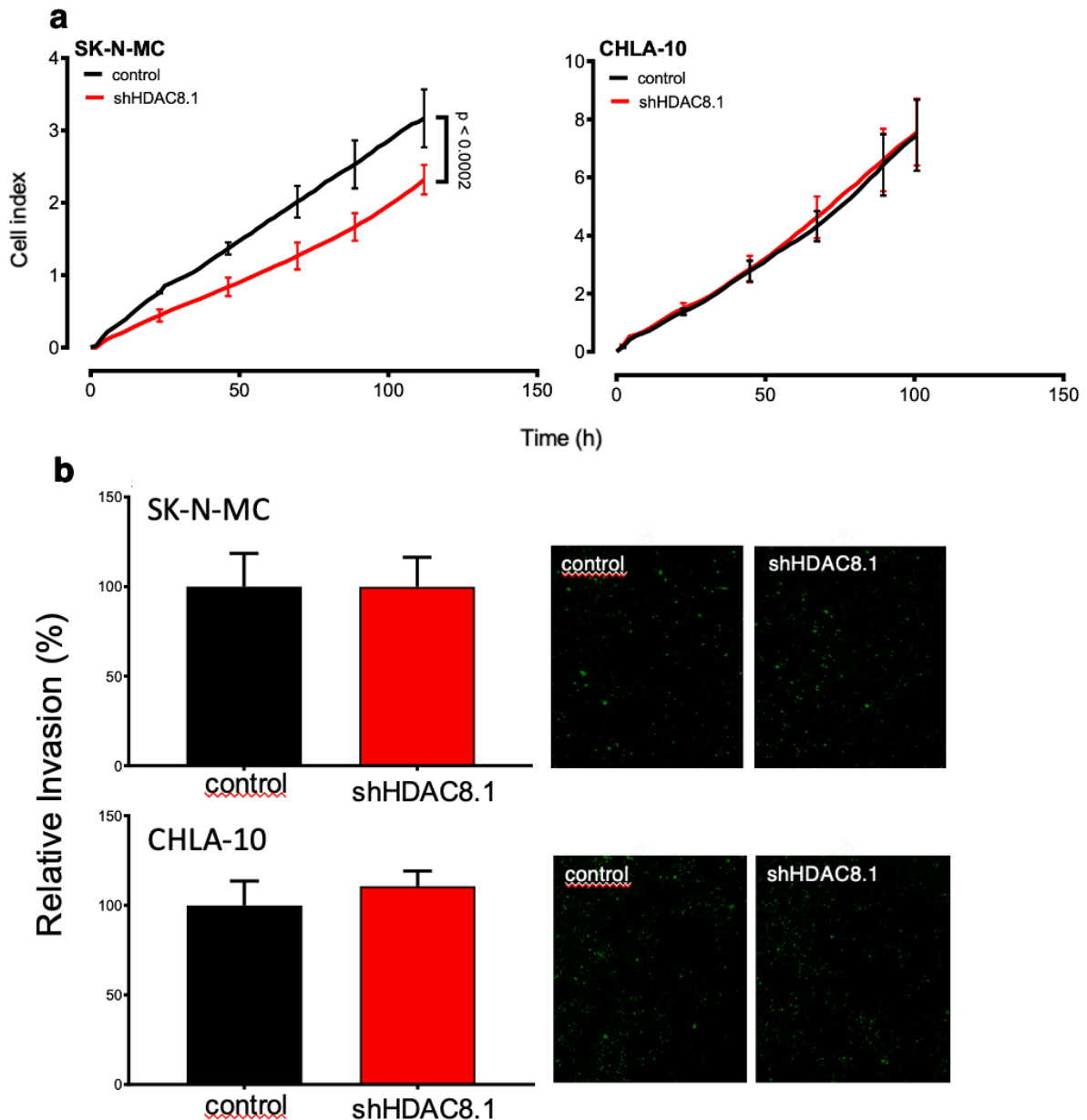


**Abbildung 23: HDAC8 Herunterregulation nach Transfektion mit transienter shRNA in EwS-Zellen CHLA-10, SK-N-MC und EW7.**

**a** Ermittlung der HDAC8 Expression durch qRT-PCR nach Induktion mit Doxycyclin von drei verschiedenen shRNAs (HDAC8.1, 8.2 und 8.3) für 72 Stunden. **b** Untersuchung von HDAC8 auf Proteinebene durch Western Blot Analyse, nach Induktion der shRNA von HDAC8.1 nach 48, 72 und 96 Stunden. Der Proteingehalt wurde mit HDAC8 Antikörpern nachgewiesen. GAPDH galt als Ladekontrolle.

### 6.5.1 HDAC8 allein hat keinen bis nur wenig Einfluss auf die Proliferations- und die Invasionsfähigkeit

In Abbildung 24a sind die Proliferationsanalysen von EwS-Zelllinie SK-N-MC und CHLA-10 nach HDAC8 Suppression dargestellt. Eine verringerte HDAC8-Expression in SK-N-MC zeigte eine signifikante Inhibition der Proliferation, jedoch nicht in CHLA-10. Daneben zeigten Untersuchungen von Invasionsassays mit Matrigel, dass EwS-Zellen mit HDAC8 Suppression keinen Unterschied der Invasionsfähigkeit aufwiesen (Abbildung 24b).

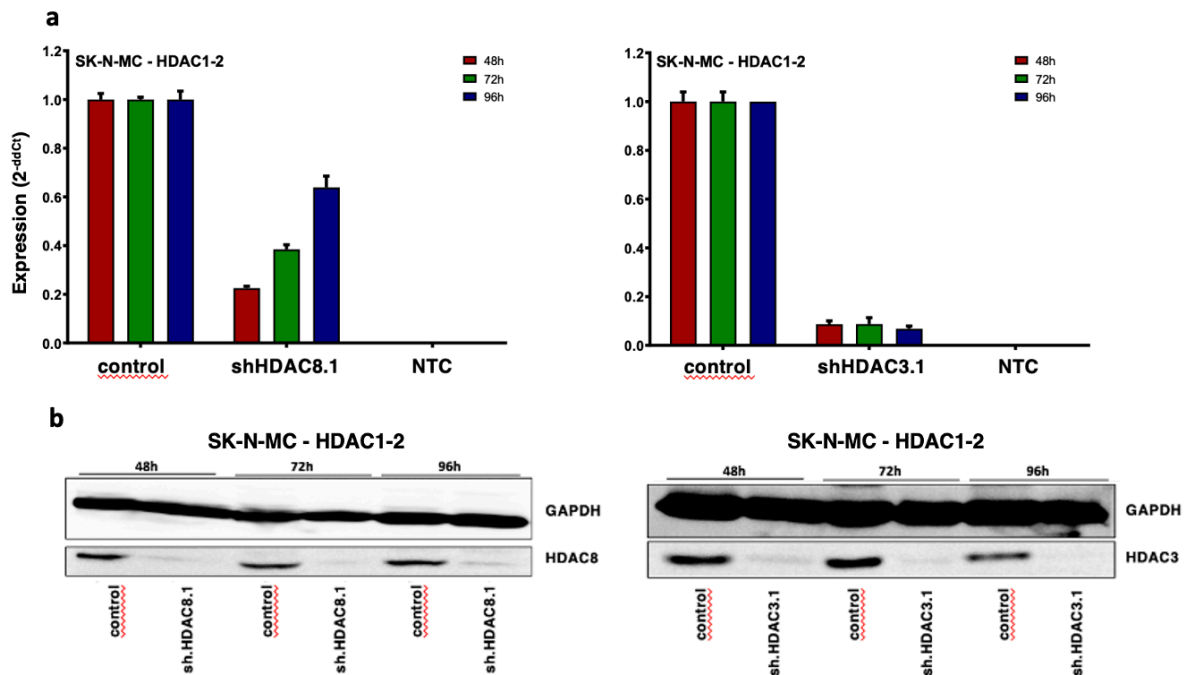


**Abbildung 24: Proliferations- und Invasivitätsanalysen nach HDAC8 Suppression.**

Die Zellen wurden zuvor für 48 Stunden mit Doxycyclin induziert und anschließend während der Experimente permanent behandelt, um die HDAC8 Suppression aufrechtzuerhalten. **a** Die Proliferation wurde mit dem xCELLigence-System gemessen. **b** Links: Quantitative Ergebnisse des Invasionsassays mit Matrigel. Rechts: Abgebildet sind repräsentative mikroskopische Aufnahmen der migrierten Zellen nach 48 Stunden Inkubation.

## 6.5.2 Synergistische antitumorale Effekte der HDAC8 Suppression in HDAC1 *Knockouts*

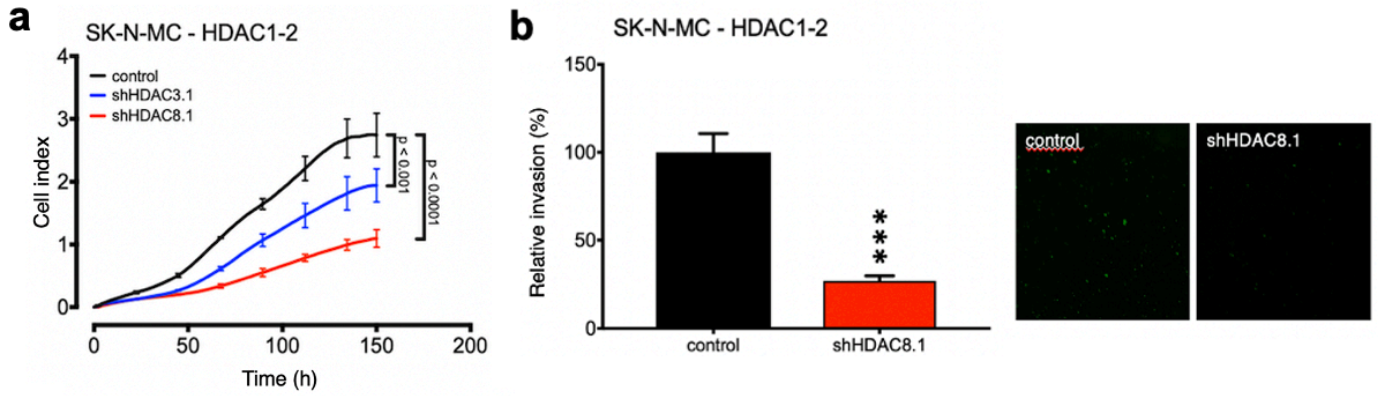
Für die weiteren Versuche wurden HDAC1 *Knockouts* mit shRNA für HDAC8 (oder HDAC3) transfiziert. Abbildung 25 zeigt die erfolgreiche Suppression von HDAC8 bzw. HDAC3 durch RNAi in CRISPR/Cas9 HDAC1 *Knockouts*.



**Abbildung 25: HDAC1 *Knockouts* mit HDAC8/HDAC3 Suppression.**

**a** qRT-PCR der HDAC8- (links) und HDAC3- (rechts) Expression nach Suppression von HDAC8/HDAC3 mit RNAi in CRISPR/Cas9 HDAC1 *Knockout* (SK-N-MC HDAC1-2). Die Zellen wurden zuvor für 48, 72 oder 96 Stunden mit Doxycyclin zur Induktion der RNAi inkubiert. **b** Western Blot Analysen von CRISPR/Cas9 HDAC1 *Knockout* und HDAC8/HDAC3 *Knockdown* mit RNAi nach 48, 72 oder 96 Stunden Induktion mit Doxycyclin. Der Proteingehalt wurde mit Antikörpern gegen HDAC8/HDAC3 bestimmt.

Wie in Kapitel 6.4.1 (Abbildung 15) gezeigt, hatte HDAC1 einen signifikanten Einfluss auf die Proliferation sowie auf die Invasion von EwS-Zellen (Kapitel 6.4.3, Abbildung 17b). Dagegen zeigte HDAC8 allein einen geringen bis keinen Effekt (Kapitel 6.5.1, Abbildung 24). Demgegenüber konnte jedoch eine stärkere Blockierung der Proliferation gezeigt werden, wenn in HDAC1 *Knockouts* zusätzlich HDAC8 supprimiert wurde (Abbildung 26a, rote Kurve). Als Nebenversuch wurden in HDAC1 *Knockouts* auch HDAC3 supprimiert. Auch hier konnte eine stärkere Blockierung der Proliferation im Vergleich zu HDAC1 *Knockouts* ohne HDAC3 Suppression gezeigt werden (Abbildung 26a, blaue Kurve). Jedoch war die Kombination aus HDAC1 und HDAC8 derjenigen von HDAC1 und HDAC3 überlegen. Darüber hinaus zeigten HDAC1 *Knockouts* mit HDAC8 Suppression eine geringere Invasionsfähigkeit im Vergleich zu HDAC1 *Knockouts* ohne HDAC8 Suppression (Abbildung 26b).



**Abbildung 26: Synergistische Effekte von HDAC1 *Knockouts* mit HDAC8/HDAC3 Suppression.**

Die Zellen (SK-N-MC mit HDAC1 *Knockout* und HDAC8/3 *Knockdown*) wurden vor Versuchsstart jeweils für 48 Stunden und anschließend permanent mit Doxycyclin behandelt, um die Suppression von HDAC8/3 aufrecht zu erhalten. **a** Die Proliferation wurde mit dem xCELLigence-System gemessen. **b** Links: Quantitative Ergebnisse des Invasionsassays mit Matrigel. Rechts: Abgebildet sind repräsentative mikroskopische Aufnahmen der migrierten Zellen nach 48 Stunden Inkubation.

## 7 Diskussion

Die Rolle von HDAC der Klasse I in der Pathogenese des EwS ist ein komplexer Prozess, der in der vorliegenden Arbeit näher untersucht wurde.

Gene der HDAC Klasse I werden in verschiedenen pädiatrischen sowie in erwachsenen Tumorentitäten – hier spezifisch für HDAC1 und 8 untersucht – hoch exprimiert. So ließ sich auch in verschiedenen EwS-Zelllinien die Expression von HDAC der Klasse I nachweisen, wobei die Analyse einer öffentlich zugänglichen Studie mit 85 Patient\*innen zeigte, dass das Expressionsniveau einzelner HDAC der Klasse I, so auch HDAC1 und HDAC8, mit dem ereignisfreien Überleben bei EwS einhergeht. Dies ließ sich auch bei anderen Tumorentitäten beobachten: Beispielsweise korreliert die Expression von HDAC1 mit der Progression sowie der Prognose von Lungenkrebs und gastrointestinalen Tumoren (L.-L. Cao et al., 2017; Minamiya et al., 2011). Des Weiteren wurde eine hohe HDAC8-Expression mit einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium und einer schlechten Überlebensrate beim Neuroblastom beobachtet (Oehme et al., 2009; Rettig et al., 2015).

Daneben ergaben vorherige Untersuchungen, dass durch die Behandlung mit HDACi nicht nur die Proliferationsfähigkeit von EwS-Zellen inhibiert wird, sondern auch das EwS-spezifische Expressionsprofil eines malignen Stammzell-Phänotyps in einen differenzierten Tumor-Phänotyp verändert werden kann (Richter et al., 2009). Sonnemann et al. und Jaboin et al. konnten zeigen, dass die Antitumoraktivität des HDACi Entinostat bei EwS durch mannigfaltige Veränderungen bedingt ist, unter anderem die Hemmung der DNA-Synthese, den Stillstand des Zellzyklus, die Erhöhung der Expression von p21 und TGF- $\beta$ RII sowie die Induktion der Apoptose (Jaboin et al., 2002; Sonnemann et al., 2007). Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit in Genexpressionsanalysen beobachtet werden, dass nach der Behandlung mit HDACi der Klasse I (TSA, Romidepsin, Entinostat, PCI-34051) eine Deregulation von Genen nachzuweisen ist, die den Malignitätseigenschaften von EwS entgegenwirken. Beispielsweise konnte sowohl durch die Behandlung von EwS-Zellen mit Entinostat als auch durch die Behandlung mit Romidepsin eine Induktion von Differenzierungsgenen beobachtet werden, wobei die Behandlung mit Entinostat zusätzlich eine Reduktion von für die Metastasierung relevanten Genen zeigte. Interessanterweise zeigte die Behandlung von EwS-Zellen mit Romidepsin (welches vornehmlich HDAC1 und HDAC2 inhibiert) vergleichbare Ergebnisse wie die Behandlung mit dem pan-HDACi TSA: Beide führten (im Vergleich zu Entinostat oder PCI-34051) zur stärksten Deregulation der Genexpression und zeigten zugleich die größte Überschneidung der deregulierten Gene. Somit liegt es nahe, dass vor allem HDAC1 und HDAC2 eine große Rolle in der tumorregulierenden Genexpression von EwS spielen. Dagegen zeigte die Behandlung mit dem HDAC8-Inhibitor PCI-34051 insgesamt eine geringere Veränderung, jedoch eine

Deregulation von Genen, die für das Zellwachstum und -überleben wichtig sind. Kongruierend zu den Genexpressionsanalysen führte die Behandlung von EwS-Zellen mit Entinostat oder Romidepsin auch zu einer erhöhten Fähigkeit für eine endotheliale Differenzierung *in vitro* sowie zu einer verstärkten Expression von Differenzierungsmarkern. Frühere Untersuchungen zeigten, dass Romidepsin und Entinostat eine antiproliferative Aktivität in EwS-Zellen bewirken (Sakimura et al., 2005; Sonnemann et al., 2007), was auch die Beobachtungen dieser Arbeit unterstützt. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass Romidepsin die EWS-FLI1-mRNA-Spiegel sogar verringert (Sakimura et al., 2005). EWS-FLI1 als aberranter Transkriptionsfaktor führt zu epigenetischen Veränderungen an Promotoren, Enhancern und Super-Enhancern, wobei die globalen Veränderungen der Histon-H3K27-Acetylierung sowie der H3K27-Trimethylierung (in Verbindung mit einer veränderten HDAC-Aktivität) ein allgemeines Merkmal von EwS zu sein scheint. Hierdurch beeinflusst EWS-FLI1 direkt die Genexpression und fördert die Malignität, wie beispielsweise vermehrte Angiogenese und Zellmigration sowie die Onkogenese der EwS-Zellen. (Riggi et al., 2014; Tomazou et al., 2015) Derartige epigenetische Veränderungen tragen trotz der genetischen Homogenität der EwS-Zelllinien zu einer intra- sowie intertumoralen Heterogenität auf Transkriptionsebene bei. Entscheidend scheint hierbei auch die Aktivität von EWS-FLI1 zu sein, die unter anderem durch das Tumormilieu (beispielsweise durch Hypoxie) beeinflusst wird. (Aynaud et al., 2020) Western Blot Analysen zeigten eine erhöhte Histon-H3K27-Acetylierung und H3K9/14-Acetylierung nach Behandlung mit HDACi TSA, MS-275 und FK228. Dagegen führte die Behandlung mit HDAC8-Inhibitor PCI-34058 zu keiner Histonveränderung von H3K9/14-Acetylierung bei allen Zelllinien und auch zu keiner Veränderung von H3K27-Acetylierung bei CHLA-10, was darauf hindeutet, dass HDAC8 nicht an diesen Histonmodifikationen beteiligt ist. Daneben wurden keine Veränderung der Trimethylierung von Histon H3K27 nach der Behandlung mit HDACi festgestellt.

Vorherige Untersuchungen mit dem HDACi Suberoylanilidhydroxamsäure (SAHA) (inhibiert HDAC Klasse I und II) zeigten bei soliden Tumoren sowie bei Leukämie als Monotherapie nur eine geringe Wirksamkeit. (Keshelava et al., 2009) Jedoch zeigten *in vitro* und *in vivo* Versuche mit verschiedenen Tumorzellen, dass die Kombinationstherapie, bestehend aus HDACi und antitumoralen Medikamenten wie Chemotherapie und/oder Strahlentherapie, synergistische oder additive Wirkungen haben. (Stiborova et al., 2012)

In der vorliegenden Arbeit konnte beobachtet werden, dass EwS-Zellen sowohl nach Monotherapie mit HDACi Entinostat, Romidepsin sowie TSA *in vitro* eine signifikante Inhibition der Proliferation aufwiesen als auch in der Kombinationstherapie von HDACi und Doxorubicin. Darüber hinaus war bei der Kombinationstherapie, im Vergleich zur Monotherapie, eine deutliche Reduktion der Konzentration von HDACi sowie der Konzentration von Doxorubicin



möglich. Korrespondierend zeigten Western Blot Analysen einen Anstieg der Apoptosemarker nach der Kombinationstherapie. Doxorubicin wird in der Regel als wirksames Chemotherapeutikum bei einer Vielzahl von Krebsarten (wie Leukämie, soliden Tumoren, Weichteilsarkomen) eingesetzt und gilt in der Therapie von EwS Patient\*innen neben Ifosfamid, Cyclophosphamid, Etoposid, Actinomycin D und Vincristin als Chemotherapeutikum der ersten Wahl (Carvalho et al., 2009; Dirksen, 2022). Jedoch liegt eine dosisabhängige toxische Wirkung vor, vor allem auf Kardiomyozyten, wodurch folglich eine kongestive Herzinsuffizienz (CHF) auslösen kann, wenn die kumulative Dosis von 400-700 mg/m<sup>2</sup> bei Erwachsenen und 300 mg/m<sup>2</sup> bei Kindern überschritten wird (Li & Hill, 2014). Die Kombination mit HDACi könnte ein vielversprechender Ansatz sein, um die Chemotherapeutika-Dosis - beispielsweise von Doxorubicin - zu reduzieren. So könnten Langzeitschäden minimiert und darüber hinaus mögliche Resistenzen von EwS-Zellen verhindert bzw. aufgehoben werden. So zeigten Genexpressionsanalysen von EwS-Zellen, die mit Entinostat und HDACi behandelt wurden, eine Verringerung der Resistenz gegenüber Doxorubicin. Interessanterweise konnte in einer Studie gezeigt werden, dass eine Überexpression von HDAC1 in Neuroblastom-Zellen sich als ein Mechanismus der Multimedikamenten-Resistenz darstellt, welche durch die Behandlung mit HDACi aufgehoben werden kann (Keshelava et al., 2007). Eine mögliche Erklärung für den synergistischen Effekt aus HDACi und Chemotherapeutika könnte die DNA-schädigende Wirkung der Chemotherapeutika wie Doxorubicin sein, die durch HDACi-bedingte Überführung der DNA in einen dekondensierten Zustand potenziert wurde (Murakami, 2013; F. Yang et al., 2013). Proliferationsanalysen von EwS-Zellen nach Behandlung mit Vincristin und HDACi zeigten keinen Unterschied im Vergleich zur Monotherapie, jedoch auf Genexpressionsebene: Beispielsweise konnte eine Suppression von Genen beobachtet werden, welche relevant für die Doppelstrangbruchreparatur sind. Aktuell werden pädiatrische Patient\*innen mit soliden Tumoren, einschließlich Ewing- und Rhabdomyosarkomen, für eine Studie rekrutiert, in der der HDACi SAHA in Kombination mit Chemotherapeutika untersucht werden (NCT04308330). Im Gegensatz zu Doxorubicin scheint sich für den HDACi Romidepsin, welcher bisher in klinischen Studien verwendet wurde, ein in Teilen vergleichbares Nebenwirkungsprofil mit Übelkeit, Erbrechen, Müdigkeit und vorübergehender Thrombozytopenie oder Granulozytopenie (Smolewski & Robak, 2017), jedoch ohne kardiotoxischen Effekt. Jedoch müssen noch weitere klinische Studien durchgeführt werden, die die Verträglichkeit von HDACi untersuchen. Weiterhin wird eine Phase-I-Studie mit Entinostat als Monotherapie zur Bestimmung der Dosierung und Sicherheit bei pädiatrischen Patient\*innen mit rezidivierenden oder refraktären soliden Tumoren, jedoch nicht bei EwS oder anderen pädiatrischen Sarkom-Patient\*innen, durchgeführt (NCT02780804). Jedoch zeigten beispielsweise Patient\*innen mit anderen Tumorerkrankungen wie einem/einer myelodysplastischem Syndrom/Leukämie, die

mit niedriger Dosis Azacitidin und dem HDACi Entinostat behandelt wurden, eine gute Verträglichkeit sowie vielversprechende Ergebnisse (Fandy et al., 2009; Gore et al., 2006).

In vorherigen Untersuchungen zeigte Richter et al., dass EZH2 eine zentrale Rolle in der Pathologie des EwS spielt und identifizierte einen EZH2 abhängigen, undifferenzierten Stammzell-Phänotyp in EwS: Die Suppression von EZH2 durch RNAi resultierte in einer Repression sowohl der Tumorentwicklung als auch der Metastasierung von EwS *in vivo*. Ebenso wurde eine Re-Expression von zuvor supprimierten Differenzierungsgenen beobachtet. (Burdach et al., 2009; Richter et al., 2009) Interessanterweise ließen sich die Ergebnisse nach Suppression von EZH2 durch RNAi nicht mit den Behandlungsergebnissen von EZH2-Inhibitoren, wie GSK126 oder GSK343, reproduzieren (Daten nicht gezeigt), obwohl eine Inhibition der H3K27me3 Methylierung beobachtet wurde. Andere Forschungsgruppen machten vergleichbare Beobachtungen bei anderen Tumorarten. Die Inhibition von EZH2 konzentriert sich im Allgemeinen auf die Hemmung seiner Histon-Methyltransferase-Aktivität. Folglich lässt sich vermuten, dass nicht allein die enzymatische Aktivität von EZH2 für die onkogene Transformation verantwortlich ist, sondern auch ihre Präsenz im Chromatin. (Kim et al., 2015) EED ist eine wesentliche Untereinheit von PRC2, die sowohl eine Stabilitätsfunktion als auch eine H3K27me3-Bindungsfunktion hat. Der EED-Inhibitor A-395 unterdrückt nicht nur die EZH2-Aktivität, sondern möglicherweise auch das Vorhandensein von PRC2 im Chromatin. (Y. He et al., 2017) Erwartungsgemäß zeigten in der vorliegenden Arbeit EwS-Zellen nach Behandlung mit EEDi (A-395), wie auch nach Behandlung mit EZH2i (GSK126), eine Abnahme der H3K27-Trimethylierung. Proliferationsanalysen von EwS-Zellen nach Behandlung mit EEDi zeigten keinen Einfluss auf die Proliferation, hingegen führte die Behandlung von EEDi in Kombination mit Chemotherapeutika zu einer Inhibition der Proliferation (mit Ausnahme der EwS-Zelllinie EW7). Weiterführend konnte nach der Kombinationstherapie mit EEDi und HDACi in allen untersuchten EwS-Zellen, inklusive der Zelllinie EW7, eine signifikante Inhibition der Proliferation beobachtet werden. Die synergistische Wirkung von EEDi und HDACi ließ sich auch *in vivo* validieren. Darüber hinaus zeigten Genexpressionsanalysen eine verringerte Expression von pädiatrischen Tumormarkern sowie der EZH2 kontrollierten Gene nur nach der Kombinationstherapie (EEDi und HDACi) von EwS-Tumoren *in vivo* (Schmidt et al., 2021). Kongruierend hierzu konnte durch Co-IP-Experimente eine Interaktion des PRC2-Komplexes über EED mit HDAC1 und HDAC2 in EwS-Zellen bestätigt werden. In neusten Untersuchungen zeigte auch Shaliman et al. synergistische Effekte von EEDi (EED226) in Kombination mit HDACi (Valproinsäure) in Neuroblastom-Zellen (Shaliman et al., 2022).

Embryonale Stammzellen mit HDAC1-Defizit (HDAC1-null-Embryonalstammzellen) zeigen erhebliche Proliferationsdefekte und sind mit einer erhöhten Expression der Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitoren p21 und p27 verbunden (Zupkovitz et al., 2006). Daneben führte die Inhibition von HDAC1 in primären oder onkogen-transformierten Fibroblasten zu einem seneszenzartigen G1-Zellzyklus-Stillstand, begleitet von einer Hochregulierung von p53 und auch p21 (Wilting et al., 2010). Um die Rolle von HDAC1 in der Pathogenese von EwS näher zu untersuchen, wurden CRISPR-Cas9 HDAC1 *Knockouts* in EwS-Zellen hergestellt und analysiert: Für diverse Tumoreigenschaften, wie die Proliferation *in vivo* und *in vitro* sowie die Invasivität von EwS-Zellen konnte in Genexpressionsanalysen von HDAC1 *Knockouts* die wesentliche Rolle von HDAC1 gezeigt werden. Es konnte beobachtet werden, dass EwS-Zellen mit HDAC1 *Knockout* eine verlängerte G1-Phase des Zellzyklus aufwiesen. Eine erhöhte Sub-G1-Phase, welche eine erhöhte Apoptoserate signalisieren würde, wurde nur in einem Klon mit HDAC1 *Knockout* von SK-N-MC beobachtet. Jedoch zeigten immunzytochemische Untersuchungen signifikant erhöhte  $\gamma$ -H2AX-Signale, welche auf eine substantielle Zunahme von Doppelstrangbrüchen hindeuten. Daneben zeigten EwS-Tumore (*in vivo*) mit HDAC1 *Knockout* eine verringerte Mitoserate im Vergleich zu ihrer Kontrolle (mit Ausnahme eines HDAC1 *Knockouts* von SK-N-MC). Weiterhin zeigten Tumore der Zelllinie SK-N-MC mit HDAC1 *Knockout* erhöhte Apoptosemarker. Dies lässt vielfältige sowie heterogene Wirkmechanismen vermuten, die das verringerte Tumorwachstum von HDAC1 erklären und deutet daraufhin, dass derartige Mechanismen der HDAC1 *Knockouts* bei EwS mit einem bestimmten zellulären Stress verbunden sind. Auf ein bestimmtes Stressverhalten konnte auch durch Kompensationsmechanismen der HDAC1 *Knockouts* geschlossen werden: Western Blot Analysen von HDAC1 *Knockouts* der Zelllinie EW7 und CHLA-10 zeigten einen erhöhten (jedoch auch für SK-N-MC einen teilweise inkohärent erniedrigten) Proteingehalt von HDAC2, HDAC3 und HDAC8, was auf kompensatorische Mechanismen durch andere HDAC dieser Klasse hinweist. HDAC1, 2 und 3 wirken als Transkriptions-Ko-Repressoren, wobei HDAC1 und HDAC2 nahezu identisch sind und meist gemeinsam in inhibitorischen Komplexen wie sin3-, NuRD-, CoREST- und PRC2-Komplexen vorkommen (Seto & Yoshida, 2014; X.-J. Yang & Seto, 2008). Die gemeinsamen Funktionen unterstützen ebenso die Beobachtung, dass kompensatorische Deregulationen durch andere HDAC der Klasse I entstehen, ausgelöst durch die spezifische Hemmung von HDAC1. Solche Kompensationen könnten somit durch HDAC<sub>i</sub>, die meist mehrere HDAC gleichzeitig inhibieren, unterdrückt werden.

Zupkovitz et al. beobachteten, dass Embryonalstammzellen mit HDAC1-Defizit (HDAC1-null-Embryonalstammzellen) eine deutliche Verringerung der gesamten HDAC-Aktivität aufweisen, womit folglich HDAC1 eine wichtige Deacetylase in Embryonalstammzellen zu sein scheint (Zupkovitz et al., 2006). Bemerkenswerterweise wurden in den Embryonalstammzellen mit HDAC1-Defizit 3% der Gene herunter- und ~ 5% der Gene hochreguliert (Zupkovitz et al.,

2006), weshalb HDAC1 vermutlich spezifische Genprogramme durch Unterdrückung oder Aktivierung bestimmter Promotoren reguliert. (Haberland et al., 2009) Auch EwS-Zellen mit HDAC1 *Knockout* zeigten in Genexpressionsanalysen eine deutliche Deregulation malignitätsrelevanter Genexpressionen. Trotzdem zeigten die Microarrayanalysen von HDAC1 *Knockouts* weniger deregulierte Gene im Vergleich zu EwS-Zellen nach Behandlung mit HDACi Romidepsin oder Entinostat, welche neben HDAC1 auch HDAC2 oder HDAC3 inhibieren, was auf Kompensationsmechanismen schließen lässt die der Gen-Deregulation entgegenwirken.

Interessanterweise konnte bei HDAC1 *Knockouts* eine signifikant erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika in der Proliferationsanalyse beobachtet werden, ähnlich wie auch nach der Behandlung mit HDACi in Kombination mit Chemotherapeutika, wodurch die Bedeutung von HDAC1 unterstrichen wird. Darüber hinaus ließ sich auch eine Inhibition der Proliferation von HDAC1 *Knockouts* nach Behandlung mit Vincristin beobachten, hingegen jedoch nicht nach der Kombinationsbehandlung von HDACi und Vincristin.

Auch Welch et al. beobachtete synergistische Effekte, wenn EwS-Zellen mit HDACi (Romidepsin) oder Chemotherapeutika mit dem reversiblen LSD1-Inhibitor (SP2509) kombiniert wurden. Sowohl HDAC1 und HDAC2 (werden durch Romidepsin inhibiert) als auch LSD1 sind Teil des NuRD-Komplexes (Welch et al., 2019).

Abgesehen vom Wissen darüber, dass HDAC8 wesentlich zur schlechten Prognose bei beispielsweise Neuroblastomen im Kindesalter beiträgt, ist im Vergleich zu HDAC1, 2 und 3, nur wenig über die Funktionen von HDAC8 bekannt (Delcuve et al., 2013). Während eine Komplexbildung von HDAC8 noch nicht identifiziert werden konnte, konnte für alle anderen Mitglieder der HDAC Klasse I die Bildung von Untereinheiten bei Multiproteinkomplexen gezeigt werden (Delcuve et al., 2013; X.-J. Yang & Seto, 2008). Jedoch zeigten neuere Untersuchungen, dass in Brusttumoren HDAC8 einen Komplex mit dem SMAD3/4-Heterotrimer bildet und den SIRT7-Promotor besetzt: Histon 4 wird deacetyliert und so die SIRT7-Transkription unterdrückt (Tang et al., 2020). SIRT7 wird während der Metastasierung von Brustkrebs herunterreguliert und aktiviert so die TGF-Signalübertragung (Tang et al., 2017). Die Behandlung mit einem HDAC8i beeinträchtigt folglich die TGF-Signalübertragung über die SIRT7-SMAD4-Achse. Die gezielte Inhibition von HDAC8 würde somit therapeutisches Potenzial für Tumorerkrankungen bieten, die mit der TGF-Signalübertragung zusammenhängen. (Tang et al., 2020)

Insgesamt zeigten die Untersuchungen nach spezifischer HDAC8 Suppression in EwS-Zellen jedoch einen geringeren Einfluss in der Pathogenese des EwS: Ein verlangsamtes Zellwachstum konnte nur bei einer EwS-Zelllinie beobachtet werden, daneben zeigte sich kein Unterschied in der Fähigkeit zur Invasion. Dagegen zeigten Proliferationsanalysen von EwS-

Zellen nach Behandlung mit dem HDAC8i PCI-34051 in allen Zelllinien eine vollständige Inhibition der Proliferation, jedoch erst nach einer Medikamentendosis von 50  $\mu$ M (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise war eine ausreichende HDAC8 Inhibition erst nach hohen Dosen von PCI-34051 möglich, im Vergleich zur HDAC8 Suppression mit RNAi. Der Nachweis eines Inhibitionserfolges von HDAC8 - nach HDAC8i Behandlung mit PCI-34051 -auf Expressions- sowie Proteinebene wurde hier jedoch nicht durchgeführt.

Interessanterweise konnte jedoch eine signifikante Reduktion der Proliferation sowie der Invasion nach HDAC8 Suppression in HDAC1 *Knockouts* beobachtet werden, die die Wirkung von HDAC1 *Knockouts* ohne HDAC8 Suppression übertraf. Vergleichbare jedoch in der Wirkstärke schwächer ausgeprägte Effekte zeigten sich auch nach HDAC3 Suppression in HDAC1 *Knockouts*. Somit scheint die Inhibition mehrerer HDAC der Klasse I einen stärkeren Einfluss auf die tumorigenen Eigenschaften zu haben, was wiederum die Hypothese der Kompensationsmechanismen der einzelnen HDAC der Klasse I unterstützt.

## 8 Zusammenfassung

Durch die Aufrechterhaltung des spezifischen Transkriptionsprogramms scheint HDAC1 eine relevante Funktion in der Pathogenese von EwS zu haben. Genexpressionsanalysen von EwS-Zellen nach Behandlung mit HDACi wie TSA inhibierten ein durch EWS-FLI1 spezifisches Expressionsprofil. Darüber hinaus zeigten EwS-Zellen eine Inhibition der Proliferation sowie eine erhöhte Differenzierungsfähigkeit nach Behandlung mit HDACi der Klasse I. HDAC1 *Knockouts* zeigten eine verringerte Proliferation *in vivo* und *in vitro*, eine reduzierte Invasions- und eine erhöhte Differenzierungsfähigkeit. HDAC8 allein stellte sich als weniger bedeutend in EwS heraus, wobei die zeitgleiche Suppression von HDAC8 in HDAC1 *Knockouts* zu einer ebenso verstärkten Inhibition der malignitätsrelevanten Eigenschaften von EwS führte und somit eine kombinatorische Inhibition von HDAC1 mit weiteren HDAC der Klasse I als therapeutisches Ziel in Frage kommt. Sowohl EwS-Zellen mit HDAC1-*Knockout* als auch EwS-Zellen nach Behandlung mit HDACi der Klasse I zeigten eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber Erstlinienchemotherapeutika in der Therapie von EwS. Durch die Kombinationstherapie konnten geringere Dosen von Chemotherapeutika verwendet werden und eine verringerte Expression von Resistenzgenen gegen Doxorubicin beobachtet werden. Folglich können durch den Zusatz von HDACi in der Therapie von EwS-Patient\*innen womöglich Resistenzen aufgehoben sowie geringere Dosen von Chemotherapeutika verwendet werden, wodurch akute und langfristige Nebenwirkungen vermindert werden könnten.

EEDi wie A-395 weisen (im Vergleich zu EZH2-Inhibitoren) vermutlich nicht nur eine inhibitorische Wirkung der EZH2-Aktivität auf, sondern auch eine Unterdrückung der Präsenz von PRC2 im Chromatin. (Y. He et al., 2017) Diese kombinatorische Wirkung von A-395 macht den EEDi zu einem interessanten neuen Medikament für EwS in Kombination mit HDACi: Die beobachtete Interaktion von PRC2 zusammen mit HDAC1 (und HDAC2) in EwS-Zellen liefern eine mechanistische Erklärung für die beobachtete synergistische Wirkung von HDACi in Kombination mit EEDi in EwS *in vitro* und *in vivo* und stellen eine interessante und neuartige Kombinationstherapie von EwS dar.

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Detaillierte Darstellung des pZIP-TRE3G-ZsGreen-Vektors .....	26
Abbildung 2: Detaillierte Darstellung des lentiCas9-Blast und lentiGuide-Puro Vektors .....	28
Abbildung 3: BD BioCoat™ Angiogenese-System .....	37
Abbildung 4: Expression der HDAC der Klasse I (spezifisch HDAC1 und VIII) im Ewing-Sarkom. .....	42
Abbildung 5: Einfluss der HDACi auf das Expressionsprofil von EwS-Zellen. ....	44
Abbildung 6: Analyse der Zelldifferenzierung nach Behandlung von EwS Zellen mit HDACi. .....	46
Abbildung 7: Western Blot Analyse der Histonmodifikation von EwS-Zellen nach Behandlung mit HDACi.....	47
Abbildung 8: Synergistische Wirkung von HDAC-Inhibitoren mit Doxorubicin. ....	48
Abbildung 9: Proliferationsassay und Expressionsanalysen von behandelten EwS-Zellen mit HDAC-Inhibitoren und/oder Vincristin. ....	50
Abbildung 10: Abnahme von H3K27me3 nach Behandlung mit EEDi oder EZH2i.....	51
Abbildung 11: Auswirkungen von EEDi (als Monotherapie und in Kombination mit Vincristin oder HDACi) auf die Zellproliferation <i>in vitro</i> . ....	52
Abbildung 12: Lokales Tumorwachstum von EwS-Zellen unter der Kombinationstherapie EEDi und HDACi <i>in vivo</i> . ....	53
Abbildung 13: Interaktionsanalyse (Co-IP) des PRC2-Komplexes mit HDAC der Klasse I. ...	53
Abbildung 14: Western Blot Analyse zur Detektion von CRISPR/Cas9 HDAC1 <i>Knockouts</i> in drei verschiedenen EwS-Zelllinien. ....	54
Abbildung 15: Proliferationsanalysen von HDAC1 <i>Knockouts</i> in EwS-Zellen. ....	55
Abbildung 16: Lokales Tumorwachstum von CRISPR/Cas9 HDAC1 <i>Knockouts</i> in EwS-Zellen <i>in vivo</i> . ....	55
Abbildung 17: Zellzyklusanalyse und immunzytochemische Untersuchung ( $\gamma$ -H2AXAssay) von HDAC1 <i>Knockouts</i> in EwS-Zellen. ....	56
Abbildung 18: Immunhistochemische Untersuchung der Apoptose- und Mitoserate von HDAC1 <i>Knockout</i> EwS-Tumoren im Mausmodell. ....	57
Abbildung 19: Ergebnisse des kolonienbildenden Zellenassays und des Invasionsassays von HDAC1 <i>Knockouts</i> . ....	58
Abbildung 20: Genexpressionsanalysen von EwS-Zellen mit HDAC1 <i>Knockout</i> .....	59
Abbildung 21: Kompensationsmechanismen von HDAC1 <i>Knockouts</i> in EwS-Zellen auf Proteinebene. ....	60

Abbildung 22: Proliferationsanalysen von HDAC1 <i>Knockouts</i> nach Behandlung mit Erstlinientherapeutika.....	61
Abbildung 23: HDAC8 Herunterregulation nach Transfektion mit transienter shRNA in EwS-Zellen CHLA-10, SK-N-MC und EW7.....	62
Abbildung 24: Proliferations- und Invasivitätsanalysen nach HDAC8 Suppression.....	63
Abbildung 25: HDAC1 <i>Knockouts</i> mit HDAC8/HDAC3 Suppression.....	64
Abbildung 26: Synergistische Effekte von HDAC1 <i>Knockouts</i> mit HDAC8/HDAC3 Suppression.....	65



## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Instrumente und Gerätschaften .....	13
Tabelle 2: Chemikalien, Reagenzien und Lösungen.....	16
Tabelle 3: Assays und Kits .....	17
Tabelle 4: Genexpressions-Assay für qRT-PCR.....	17
Tabelle 5: Standard-Medium für Zellkulturen .....	18
Tabelle 6: Universelle Lösungen .....	18
Tabelle 7: Puffer und Lösungen für Zellzyklus Analysen .....	19
Tabelle 8: Puffer und Lösungen für Western Blot Analysen .....	20
Tabelle 9: Gel für SDS-PAGE .....	21
Tabelle 10: Antikörper für Western Blot und Immunhistochmie .....	23
Tabelle 11: HDAC-Inhibitoren .....	23
Tabelle 12: PRC2-Komplex-Inhibitoren.....	24
Tabelle 13: Chemotherapeutika .....	24
Tabelle 14: Humane Zelllinien und Tumorzelllinien.....	25
Tabelle 15: Expressionsvektor für induzierbare RNA-Interferenz .....	26
Tabelle 16: Spezifische sgRNA-Sequenz für CRISPR/Cas9 Knockouts für HDAC1 .....	27
Tabelle 17: Temperatur- und Zeitzyklen für die cDNA-Synthese .....	31

## 11 Literaturverzeichnis

- Adhikari, N., Amin, S. A., & Jha, T. (2018). Selective and nonselective HDAC8 inhibitors: a therapeutic patent review. *Pharmaceutical Patent Analyst*, 7(6), 259–276.
- Agelopoulos, K., Richter, G. H. S., Schmidt, E., Dirksen, U., Von Heyking, K., Moser, B., Klein, H. U., Kontny, U., Dugas, M., Poos, K., Korsching, E., Buch, T., Weckesser, M., Schulze, I., Besoke, R., Witten, A., Stoll, M., Köhler, G., Hartmann, W., Wardelmann, E., Rossig, C., Baumhoer, D., Jürgens, H., Burdach, S., Berdel, W. E., & Müller-Tidow, C. (2015). Deep sequencing in conjunction with expression and functional analyses reveals activation of FGFR1 in Ewing sarcoma. *Clinical Cancer Research*, 21(21), 4935–4946.
- Armstrong, G. T., Kawashima, T., Leisenring, W., Stratton, K., Stovall, M., Hudson, M. M., Sklar, C. A., Robison, L. L., & Oeffinger, K. C. (2014). Aging and risk of severe, disabling, life-threatening, and fatal events in the childhood cancer survivor study. *Journal of Clinical Oncology*, 32(12), 1218–1227.
- Aynaud, M.-M., Mirabeau, O., Gruel, N., Grossetête, S., Boeva, V., Durand, S., Surdez, D., Saulnier, O., Zaïdi, S., Gribkova, S., Fouché, A., Kairov, U., Raynal, V., Tirode, F., Grünewald, T. G. P., Bohec, M., Baulande, S., Janoueix-Lerosey, I., Vert, J.-P., Barillot, E., Delattre, O., & Zinovyev, A. (2020). Transcriptional Programs Define Intratumoral Heterogeneity of Ewing Sarcoma at Single-Cell Resolution. *Cell Reports*, 30(6), 1767-1779.e6.
- Bachmann, I. M., Halvorsen, O. J., Collett, K., Stefansson, I. M., Straume, O., Haukaas, S. A., Salvesen, H. B., Otte, A. P., & Akslen, L. A. (2006). EZH2 Expression Is Associated With High Proliferation Rate and Aggressive Tumor Subgroups in Cutaneous Melanoma and Cancers of the Endometrium, Prostate, and Breast. *Journal of Clinical Oncology*, 24(2), 268–273.
- Balamuth, N. J., & Womer, R. B. (2010). Ewing's sarcoma. *The Lancet Oncology*, 11(2), 184–192.
- Bardou, P., Mariette, J., Escudié, F., Djemiel, C., & Klopp, C. (2014). jvenn: an interactive Venn diagram viewer. *BMC Bioinformatics*, 15(1), 293.
- Benelli, R., & Albin, A. (1999). In vitro models of angiogenesis: The use of Matrigel. *International Journal of Biological Markers*, 14(4), 243–246.
- Bernstein, M., Kovar, H., Paulussen, M., Randall, R. L., Schuck, A., Teot, L. A., & Juergens, H. (2006). *Pediatric Oncology Ewing's Sarcoma Family of Tumors: Current Management Learning Objectives*. C, 503–519.
- Biedler, J. L., Helson, L., & Spengler, B. A. (1973). Morphology and Growth, Tumorigenicity,

- and Cytogenetics of Human Neuroblastoma Cells in Continuous Culture. *Cancer Research*, 33(11), 2643–2652.
- Bliss, C. L. (1939). the Toxicity of Poisons Applied Jointly. *Annals of Applied Biology*, 26(3), 585–615.
- Brohl, A. S., Solomon, D. A., Chang, W., Wang, J., Song, Y., Sindiri, S., Patidar, R., Hurd, L., Chen, L., Shern, J. F., Liao, H., Wen, X., Gerard, J., Kim, J. S., Lopez Guerrero, J. A., Machado, I., Wai, D. H., Picci, P., Triche, T., Horvai, A. E., Miettinen, M., Wei, J. S., Catchpool, D., Llombart-Bosch, A., Waldman, T., & Khan, J. (2014). The Genomic Landscape of the Ewing Sarcoma Family of Tumors Reveals Recurrent STAG2 Mutation. *PLoS Genetics*, 10(7).
- Burdach, S., Plehm, S., Unland, R., Dirksen, U., Borkhardt, A., Staeger, M. S., Müller-Tidow, C., & Richter, G. H. S. (2009). Epigenetic maintenance of stemness and malignancy in peripheral neuroectodermal tumors by EZH2. *Cell Cycle*, 8(13), 1991–1996.
- Cao, L.-L., Yue, Z., Liu, L., Pei, L., Yin, Y., Qin, L., Zhao, J., Liu, H., Wang, H., & Jia, M. (2017). The expression of histone deacetylase HDAC1 correlates with the progression and prognosis of gastrointestinal malignancy. *Oncotarget; Vol 8, No 24*.
- Cao, R., & Zhang, Y. (2004). SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex. *Molecular Cell*, 15(1), 57–67.
- Caretti, G., Di Padova, M., Micales, B., Lyons, G. E., & Sartorelli, V. (2004). The Polycomb Ezh2 methyltransferase regulates muscle gene expression and skeletal muscle differentiation. *Genes and Development*, 18(21), 2627–2638.
- Carvalho, C., Santos, R., Cardoso, S., Correia, S., Oliveira, P., Santos, M., & Moreira, P. (2009). Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect. *Current Medicinal Chemistry*, 16(25), 3267–3285.
- Chen, H. P., Zhao, Y. T., & Zhao, T. C. (2015). Histone deacetylases and mechanisms of regulation of gene expression. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 20(1–2), 35–47.
- Choi, J. H., Kwon, H. J., Yoon, B. I., Kim, J. H., Han, S. U., Joo, H. J., & Kim, D. Y. (2001). Expression profile of histone deacetylase 1 in gastric cancer tissues. *Japanese Journal of Cancer Research*, 92(12), 1300–1304.
- Crompton, B. D., Stewart, C., Taylor-Weiner, A., Alexe, G., Kurek, K. C., Calicchio, M. L., Kiezun, A., Carter, S. L., Shukla, S. A., Mehta, S. S., Thorner, A. R., de Torres, C., Lavarino, C., Suñol, M., McKenna, A., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Lawrence, M. S., Stojanov, P., Rosenberg, M., Ambrogio, L., Auclair, D., Seepo, S., Blumenstiel, B., DeFelice, M., Imaz-Rosshandler, I., Celis, A. S. C., Rivera, M. N., Rodriguez-Galindo, C., Fleming, M. D., Golub, T. R., Getz, G., Mora, J., & Stegmaier, K. (2014). The genomic

- landscape of pediatric Ewing sarcoma. *Cancer Discovery*, 4(11), 1326–1341.
- Crowley, L. C., Chojnowski, G., & Waterhouse, N. J. (2016). Measuring the DNA content of cells in apoptosis and at different cell-cycle stages by propidium iodide staining and flow cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(10), 905–910.
- Delattre, O., Zucman, J., Melot, T., Garau, X. S., Zucker, J.-M., Lenoir, G. M., Ambros, P. F., Sheer, D., Turc-Carel, C., Triche, T. J., Aurias, A., & Thomas, G. (1994). The Ewing Family of Tumors -- A Subgroup of Small-Round-Cell Tumors Defined by Specific Chimeric Transcripts. *New England Journal of Medicine*, 331(5), 294–299.
- Delattre, O., Zucman, J., Plougastel, B., Desmaze, C., Melot, T., Peter, M., Kovar, H., Joubert, I., de Jong, P., Rouleau, G., Aurias, A., & Thomas, G. (1992). Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature*, 359(6391), 162–165.
- Delcuve, G. P., Khan, D. H., & Davie, J. R. (2013). Targeting class I histone deacetylases in cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 17(1), 29–41.
- Di Croce, L., & Helin, K. (2013). Transcriptional regulation by Polycomb group proteins. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(10), 1147–1155.
- Dirksen, U. (2022). *AWMF Leitlinie: Ewing-Sarkom des Kindes- und -Jugendalters. (2022) S1-Leitlinie 025-006*. 1–18.
- Dirksen, U., Bhadri, V., Brichard, B., Butterfass-Bahloul, T., Cyprova, S., Faldum, A., Gelderblom, H., Hards, J., Hauser, P., Havemann, L., Hjorth, L., Juergens, H., Kanerva, J., Kuehne, T., Ladenstein, R. L., Raciborska, A., Rascon, J., Timmermann, B., Ranft, A., & Koch, R. (2020). Efficacy of add-on treosulfan and melphalan high-dose therapy in patients with high-risk metastatic Ewing sarcoma: Report from the International Ewing 2008R3 trial. *Journal of Clinical Oncology*, 38(15\_suppl), 11501.
- Dirksen, U., Brennan, B., Le Deley, M.-C., Cozic, N., van den Berg, H., Bhadri, V., Brichard, B., Claude, L., Craft, A., Amler, S., Gaspar, N., Gelderblom, H., Goldsby, R., Gorlick, R., Grier, H. E., Guinbretiere, J.-M., Hauser, P., Hjorth, L., Janeway, K., Juergens, H., Judson, I., Krailo, M., Kruseova, J., Kuehne, T., Ladenstein, R., Lervat, C., Lessnick, S. L., Lewis, I., Linassier, C., Marec-Berard, P., Marina, N., Morland, B., Pacquement, H., Paulussen, M., Randall, R. L., Ranft, A., Le Teuff, G., Wheatley, K., Whelan, J., Womer, R., Oberlin, O., & Hawkins, D. S. (2019). High-Dose Chemotherapy Compared With Standard Chemotherapy and Lung Radiation in Ewing Sarcoma With Pulmonary Metastases: Results of the European Ewing Tumour Working Initiative of National Groups, 99 Trial and EWING 2008. *Journal of Clinical Oncology*, 37(34), 3192–3202.
- Dirksen, U., Brodowicz, T., Hards, J., Hartmann, W., Hummel, Y., Reichardt, P., &

- Timmermann, B. (2020). *Onkopedia Leitlinie: Ewing Sarkom*.
- Dirksen, U., Koch, R., Bhadri, V., Brichard, B., Butterfass-Bahloul, T., Cyprova, S., Gelderblom, H., Hauser, P., Havemann, L., Hjorth, L., Juergens, H., Kanerva, J., Kuehne, T., Ladenstein, R. L., Raciborska, A., Rascon, J., Streitbuerger, A., Timmermann, B., Ranft, A., & Faldum, A. (2020). Efficacy of maintenance therapy with zoledronic acid in patients with localized Ewing sarcoma: Report from the international Ewing 2008 trial. *Journal of Clinical Oncology*, *38*(15\_suppl), 11523.
- Disanto, J. P., Müller, W., Guy-Grand, D., Fischer, A., & Rajewsky, K. (1995). Interleukin 2. *PNAS*, *92*(1), 377–381.
- Doench, J. G., Fusi, N., Sullender, M., Hegde, M., Vaimberg, E. W., Donovan, K. F., Smith, I., Tothova, Z., Wilen, C., Orchard, R., Virgin, H. W., Listgarten, J., & Root, D. E. (2016). Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nature Biotechnology*, *34*(2), 184–191.
- DuBridge, R. B., Tang, P., Hsia, H. C., Leong, P. M., Miller, J. H., & Calos, M. P. (1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Molecular and Cellular Biology*, *7*(1), 379–387.
- Eckschlager, T., Plch, J., Stiborova, M., & Hrabeta, J. (2017). Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(7), 1–25.
- Ewing, J. (1972). Diffuse endothelioma of bone. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *22*(2), 95–98.
- Falkenberg, K. J., & Johnstone, R. W. (2014). Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. *Nature Reviews Drug Discovery*, *13*(9), 673–691.
- Fandy, T. E., Herman, J. G., Kerns, P., Jiemjit, A., Sugar, E. A., Choi, S.-H., Yang, A. S., Aucott, T., Dausers, T., Odchimar-Reissig, R., Licht, J., McConnell, M. J., Nasrallah, C., Kim, M. K. H., Zhang, W., Sun, Y., Murgo, A., Espinoza-Delgado, I., Oteiza, K., Owoeye, I., Silverman, L. R., Gore, S. D., & Carraway, H. E. (2009). Early epigenetic changes and DNA damage do not predict clinical response in an overlapping schedule of 5-azacytidine and entinostat in patients with myeloid malignancies. *Blood*, *114*(13), 2764–2773.
- Ferguson, J. L., & Turner, S. P. (2018). Bone cancer: Diagnosis and treatment principles. *American Family Physician*, *98*(4), 205–213.
- Gangwal, K., Sankar, S., Hollenhorst, P. C., Kinsey, M., Haroldsen, S. C., Shah, A. A., Boucher, K. M., Watkins, W. S., Jorde, L. B., Graves, B. J., & Lessnick, S. L. (2008). Microsatellites as EWS/FLI response elements in Ewing's sarcoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(29), 10149–10154.

- Gaspar, N., Hawkins, D. S., Dirksen, U., Lewis, I. J., Ferrari, S., Le Deley, M.-C., Kovar, H., Grimer, R., Whelan, J., Claude, L., Delattre, O., Paulussen, M., Picci, P., Sundby Hall, K., van den Berg, H., Ladenstein, R., Michon, J., Hjorth, L., Judson, I., Luksch, R., Bernstein, M. L., Marec-Bérard, P., Brennan, B., Craft, A. W., Womer, R. B., Juergens, H., & Oberlin, O. (2015). Ewing Sarcoma: Current Management and Future Approaches Through Collaboration. *Journal of Clinical Oncology*, *33*(27), 3036–3046.
- Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., & Parks, W. P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: Establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, *51*(5), 1417–1423.
- Ginsberg, J. P., Goodman, P., Leisenring, W., Ness, K. K., Meyers, P. A., Wolden, S. L., Smith, S. M., Stovall, M., Hammond, S., Robison, L. L., & Oeffinger, K. C. (2010). Long-term survivors of childhood ewing sarcoma: Report from the childhood cancer survivor study. *Journal of the National Cancer Institute*, *102*(16), 1272–1283.
- Goldman, J. P., Blundell, M. P., Lopes, L., Kinnon, C., Di Santo, J. P., & Thrasher, A. J. (1998). Enhanced human cell engraftment in mice deficient in RAG2 and the common cytokine receptor  $\gamma$  chain. *British Journal of Haematology*, *103*(2), 335–342.
- Gore, S. D., Baylin, S., Sugar, E., Carraway, H., Miller, C. B., Carducci, M., Grever, M., Galm, O., Dausers, T., Karp, J. E., Rudek, M. A., Zhao, M., Smith, B. D., Manning, J., Jiemjit, A., Dover, G., Mays, A., Zwiebel, J., Murgo, A., Weng, L.-J., & Herman, J. G. (2006). Combined DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in the treatment of myeloid neoplasms. *Cancer Research*, *66*(12), 6361–6369.
- Gregoret, I., Lee, Y.-M., & Goodson, H. V. (2004). Molecular Evolution of the Histone Deacetylase Family: Functional Implications of Phylogenetic Analysis. *Journal of Molecular Biology*, *338*(1), 17–31.
- Grief, H. E. (1997). The Ewing family of tumors: Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumors. *Pediatric Clinics of North America*, *44*(4), 991–1004.
- Grier, H. E., Krailo, M. D., Tarbell, N. J., Link, M. P., Fryer, C. J. H., Pritchard, D. J., Gebhardt, M. C., Dickman, P. S., Perlman, E. J., Meyers, P. A., Donaldson, S. S., Moore, S., Rausen, A. R., Vietti, T. J., & Miser, J. S. (2003). Addition of Ifosfamide and Etoposide to Standard Chemotherapy for Ewing's Sarcoma and Primitive Neuroectodermal Tumor of Bone. *New England Journal of Medicine*, *348*(8), 694–701.
- Gröbner, S. N., Worst, B. C., Weischenfeldt, J., Buchhalter, I., Kleinheinz, K., Rudneva, V. A., Johann, P. D., Balasubramanian, G. P., Segura-Wang, M., Brabetz, S., Bender, S., Hutter, B., Sturm, D., Pfaff, E., Hübschmann, D., Zipprich, G., Heinold, M., Eils, J., Lawrenz, C., Erkek, S., Lambo, S., Waszak, S., Blattmann, C., Borkhardt, A., Kuhlen,

- M., Eggert, A., Fulda, S., Gessler, M., Wegert, J., Kappler, R., Baumhoer, D., Burdach, S., Kirschner-Schwabe, R., Kontny, U., Kulozik, A. E., Lohmann, D., Hettmer, S., Eckert, C., Bielack, S., Nathrath, M., Niemeyer, C., Richter, G. H., Schulte, J., Siebert, R., Westermann, F., Molenaar, J. J., Vassal, G., Witt, H., Zapatka, M., Burkhardt, B., Kratz, C. P., Witt, O., Tilburg, C. M. V., Kramm, C. M., Fleischhack, G., Dirksen, U., Rutkowski, S., Frühwald, M., Hoff, K. Von, Wolf, S., Klingebiel, T., Koscielniak, E., Landgraf, P., Koster, J., Resnick, A. C., Zhang, J., Liu, Y., Zhou, X., Waanders, A. J., Zwijnenburg, D. A., Raman, P., Brors, B., Weber, U. D., Northcott, P. A., Pajtler, K. W., Kool, M., Piro, R. M., Korbel, J. O., Schlesner, M., Eils, R., Jones, D. T. W., Lichter, P., Chavez, L., & Pfister, S. M. (2018). The landscape of genomic alterations across childhood cancers. *Nature*, *555*(7696), 321–327.
- Grünewald, T. G. P., Bernard, V., Gilardi-Hebenstreit, P., Raynal, V., Surdez, D., Aynaud, M.-M., Mirabeau, O., Cidre-Aranaz, F., Tirode, F., Zaidi, S., Perot, G., Jonker, A. H., Lucchesi, C., Le Deley, M.-C., Oberlin, O., Marec-Bérard, P., Véron, A. S., Reynaud, S., Lapouble, E., Boeva, V., Frio, T. R., Alonso, J., Bhatia, S., Pierron, G., Cancel-Tassin, G., Cussenot, O., Cox, D. G., Morton, L. M., Machiela, M. J., Chanock, S. J., Charnay, P., & Delattre, O. (2015). Chimeric EWSR1-FLI1 regulates the Ewing sarcoma susceptibility gene EGR2 via a GGAA microsatellite. *Nature Genetics*, *47*(9), 1073–1078.
- Grünewald, T. G. P., Cidre-Aranaz, F., Surdez, D., Tomazou, E. M., de Álava, E., Kovar, H., Sorensen, P. H., Delattre, O., & Dirksen, U. (2018). Ewing sarcoma. *Nature Reviews Disease Primers*, *4*(1), 5.
- Grünewald, T. G. P., Cidre-Aranaz, F., Surdez, D., Tomazou, E. M., De Álava, E., Kovar, H., Sorensen, P. H., Delattre, O., & Dirksen, U. (2018). Ewing sarcoma. *Nature Reviews Disease Primers*, *4*(1).
- Haberland, M., Montgomery, R. L., Olson, E. N., Cidre-Aranaz, F., Surdez, D., Tomazou, E. M., de Álava, E., Kovar, H., Sorensen, P. H., Delattre, O., Dirksen, U., Vrwgwr, Rfwfrwfrw, Frrgwgrw, & Rgwrgw. (2009). The many roles of histone deacetylases in development and physiology: Implications for disease and therapy. *Nature Reviews Genetics*, *10*(1), 32–42.
- 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), 443–450.
- Halkidou, K., Gaughan, L., Cook, S., Leung, H. Y., Neal, D. E., & Robson, C. N. (2004). Upregulation and Nuclear Recruitment of HDAC1 in Hormone Refractory Prostate Cancer. *Prostate*, *59*(2), 177–189.

- He, L., Kuleskiy, E., Saarela, J., Turunen, L., Wennerberg, K., Aittokallio, T., & Tang, J. (2018). Methods for High-throughput Drug Combination Screening and Synergy Scoring. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1711, 351–398.
- He, Y., Selvaraju, S., Curtin, M. L., Jakob, C. G., Zhu, H., Comess, K. M., Shaw, B., The, J., Lima-Fernandes, E., Szewczyk, M. M., Cheng, D., Klinge, K. L., Li, H.-Q., Pliushchev, M., Algire, M. A., Maag, D., Guo, J., Dietrich, J., Panchal, S. C., Petros, A. M., Sweis, R. F., Torrent, M., Bigelow, L. J., Senisterra, G., Li, F., Kennedy, S., Wu, Q., Osterling, D. J., Lindley, D. J., Gao, W., Galasinski, S., Barsyte-Lovejoy, D., Vedadi, M., Buchanan, F. G., Arrowsmith, C. H., Chiang, G. G., Sun, C., & Pappano, W. N. (2017). The EED protein–protein interaction inhibitor A-395 inactivates the PRC2 complex. *Nature Chemical Biology*, 13(4), 389–395.
- Hu-Lieskovan, S., Zhang, J., Wu, L., Shimada, H., Schofield, D. E., & Triche, T. J. (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 Research*, 65(11), 4633–4644.
- Italiano, A., Mir, O., Mathoulin-Pelissier, S., Penel, N., Piperno-Neumann, S., Bompas, E., Chevreau, C., Duffaud, F., Entz-Werlé, N., Saada, E., Ray-Coquard, I., Lervat, C., Gaspar, N., Marec-Berard, P., Pacquement, H., Wright, J., Toulmonde, M., Bessedé, A., Crombe, A., Kind, M., Bellera, C., & Blay, J. Y. (2020). Cabozantinib in patients with advanced Ewing sarcoma or osteosarcoma (CABONE): a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*, 21(3), 446–455.
- Jaboin, J., Wild, J., Hamidi, H., Khanna, C., Kim, C. J., Robey, R., Bates, S. E., & Thiele, C. J. (2002). MS-27-275, an inhibitor of histone deacetylase, has marked in vitro and in vivo antitumor activity against pediatric solid tumors. *Cancer Research*, 62(21), 6108–6115.
- Javelaud, D., Wietzerbin, J., Delattre, O., & Besançon, F. (2000). Induction of p21(Waf1/Cip1) by TNF $\alpha$  requires NF- $\kappa$ B activity and antagonizes apoptosis in Ewing tumor cells. *Oncogene*, 19(1), 61–68.
- Jedlicka, P. (2010). Ewing Sarcoma, an enigmatic malignancy of likely progenitor cell origin, driven by transcription factor oncogenic fusions. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 3(4), 338–347.
- Jo, V. Y., & Doyle, L. A. (2016). Refinements in Sarcoma Classification in the Current 2013 World Health Organization Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 25(4), 621–643.
- Juergens, R. A., Wrangle, J., Vendetti, F. P., Murphy, S. C., Zhao, M., Coleman, B., Sebree, R., Rodgers, K., Hooker, C. M., Franco, N., Lee, B., Tsai, S., Delgado, I. E., Rudek, M.



- A., Belinsky, S. A., Herman, J. G., Baylin, S. B., Brock, M. V., & Rudin, C. M. (2011). Combination epigenetic therapy has efficacy in patients with refractory advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Discovery*, 1(7), 598–607.
- Karski, E. E., Matthay, K. K., Neuhaus, J. M., Goldsby, R. E., & DuBois, S. G. (2013). Characteristics and outcomes of patients with Ewing sarcoma over 40 years of age at diagnosis. *Cancer Epidemiology*, 37(1), 29–33.
- Kazanets, A., Shorstova, T., Hilmi, K., Marques, M., & Witcher, M. (2016). Epigenetic silencing of tumor suppressor genes: Paradigms, puzzles, and potential. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1865(2), 275–288.
- Ke, N., Wang, X., Xu, X., & Abassi, Y. A. (2011). Mammalian Cell Viability. *Methods in Molecular Biology*, 740(1), p.7-12.
- Keshelava, N., Davicioni, E., Wan, Z., Ji, L., Sposto, R., Triche, T. J., & Reynolds, C. P. (2007). Histone deacetylase 1 gene expression and sensitization of multidrug-resistant neuroblastoma cell lines to cytotoxic agents by depsipeptide. *Journal of the National Cancer Institute*, 99(14), 1107–1119.
- Keshelava, N., Houghton, P. J., Morton, C. L., Lock, R. B., Carol, H., Keir, S. T., Maris, J. M., Reynolds, C. P., Gorlick, R., Kolb, E. A., Wu, J., & Smith, M. A. (2009). Initial testing (stage 1) of vorinostat (SAHA) by the pediatric preclinical testing program. *Pediatric Blood & Cancer*, 53(3), 505–508.
- Kim, K. H., Kim, W., Howard, T. P., Vazquez, F., Tsherniak, A., Wu, J. N., Wang, W., Haswell, J. R., Walensky, L. D., Hahn, W. C., Orkin, S. H., & Roberts, C. W. M. (2015). SWI/SNF-mutant cancers depend on catalytic and non-catalytic activity of EZH2. *Nature Medicine*, 21(12), 1491–1496.
- Kinner, A., Wu, W., Staudt, C., & Iliakis, G. (2008). Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Research*, 36(17), 5678–5694.
- Kleer, C. G., Cao, Q., Varambally, S., Shen, R., Ota, I., Tomlins, S. A., Ghosh, D., Sewalt, R. G. A. B., Otte, A. P., Hayes, D. F., Sabel, M. S., Livant, D., Weiss, S. J., Rubin, M. A., & Chinnaiyan, A. M. (2003). EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(20), 11606–11611.
- Kornberg, R. (1974). Chromatin Structure : A Repeating Unit of Histones and DNA Chromatin structure is based on a repeating unit of eight. *Science*, 184, 868–871.
- Kornberg, R. D., & Content, H. (1977). *Structure of Chromatin - annurev.bi.46.070177.004435*.
- Kretsovali, A., Hadjimichael, C., & Charmpilas, N. (2012). Histone deacetylase inhibitors in cell

- pluripotency, differentiation, and reprogramming. *Stem Cells International*, 2012.
- Kuzmichev, A., Nishioka, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Reinberg, D. (2002). Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the enhancer of zeste protein. *Genes and Development*, 16(22), 2893–2905.
- Ladenstein, R., Pötschger, U., Le Deley, M. C., Whelan, J., Paulussen, M., Oberlin, O., van den Berg, H., Dirksen, U., Hjorth, L., Michon, J., Lewis, I., Craft, A., & Jürgens, H. (2010). Primary Disseminated Multifocal Ewing Sarcoma: Results of the Euro-EWING 99 Trial. *Journal of Clinical Oncology*, 28(20), 3284–3291.
- Lessnick, S. L., & Ladanyi, M. (2012). Molecular Pathogenesis of Ewing Sarcoma: New Therapeutic and Transcriptional Targets. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 7(1), 145–159.
- Li, D. L., & Hill, J. A. (2014). Cardiomyocyte autophagy and cancer chemotherapy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 71, 54–61.
- Lund, A. H., & van Lohuizen, M. (2004). Polycomb complexes and silencing mechanisms. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(3), 239–246.
- Mackintosh, C., Madoz-Gúrpide, J., Ordóñez, J. L., Osuna, D., & Herrero-Martín, D. (2010). The molecular pathogenesis of Ewing's sarcoma. *Cancer Biology and Therapy*, 9(9), 653–665.
- Martínez-Ramírez, A., Rodríguez-Perales, S., Meléndez, B., Martínez-Delgado, B., Urioste, M., Cigudosa, J. C., & Benítez, J. (2003). Characterization of the A673 cell line (Ewing tumor) by molecular cytogenetic techniques. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 141(2), 138–142.
- May, W. A., Grigoryan, R. S., Keshelava, N., Cabral, D. J., Christensen, L. L., Jenabi, J., Ji, L., Triche, T. J., Lawlor, E. R., & Reynolds, C. P. (2013). Characterization and drug resistance patterns of ewing's sarcoma family tumor cell lines. *PLoS ONE*, 8(12), 4–13.
- Minamiya, Y., Ono, T., Saito, H., Takahashi, N., Ito, M., Mitsui, M., Motoyama, S., & Ogawa, J. (2011). Expression of histone deacetylase 1 correlates with a poor prognosis in patients with adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer*, 74(2), 300–304.
- Murakami, Y. (2013). Histone deacetylases govern heterochromatin in every phase. *The EMBO Journal*, 32(17), 2301–2303.
- Ny, L., Jespersen, H., Karlsson, J., Alsén, S., Filges, S., All-Eriksson, C., Andersson, B., Carneiro, A., Helgadottir, H., Levin, M., Ljuslinder, I., Olofsson Bagge, R., Sah, V. R., Stierner, U., Ståhlberg, A., Ullenhag, G., Nilsson, L. M., & Nilsson, J. A. (2021). The PEMDAC phase 2 study of pembrolizumab and entinostat in patients with metastatic uveal melanoma. *Nature Communications*, 12(1), 1–10.

- Oehme, I., Deubzer, H. E., Wegener, D., Pickert, D., Linke, J. P., Hero, B., Kopp-Schneider, A., Westermann, F., Ulrich, S. M., Von Deimling, A., Fischer, M., & Witt, O. (2009). Histone deacetylase 8 in neuroblastoma tumorigenesis. *Clinical Cancer Research*, *15*(1), 91–99.
- Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L., & Baltimore, D. (1993). Mining information extraction models for HmtDB annotation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(September), 8392–8396.
- Pili, R., Quinn, D. I., Hammers, H. J., Monk, P., George, S., Dorff, T. B., Olencki, T., Shen, L., Orillion, A., Lamonica, D., Fragomeni, R. S., Szabo, Z., Hutson, A., Groman, A., Perkins, S. M., Piekarz, R., & Carducci, M. A. (2017). Immunomodulation by Entinostat in Renal Cell Carcinoma Patients Receiving High-Dose Interleukin 2: A Multicenter, Single-Arm, Phase I/II Trial (NCI-CTEP#7870). *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *23*(23), 7199–7208.
- Rettig, I., Koeneke, E., Trippel, F., Mueller, W. C., Burhenne, J., Kopp-Schneider, A., Fabian, J., Schober, A., Fernekorn, U., von Deimling, A., Deubzer, H. E., Milde, T., Witt, O., & Oehme, I. (2015). Selective inhibition of HDAC8 decreases neuroblastoma growth in vitro and in vivo and enhances retinoic acid-mediated differentiation. *Cell Death & Disease*, *6*(2), e1657–e1657.
- Richter, G. H. S., Plehm, S., Fasan, A., Rössler, S., Unland, R., Bennani-Baiti, I. M., Hotfilder, M., Löwel, D., Von Luettichau, I., Mossbrugger, I., Quintanilla-Martinez, L., Kovar, H., Staeger, M. S., Müller-Tidow, C., & Burdach, S. (2009). EZH2 is a mediator of EWS/FLI1 driven tumor growth and metastasis blocking endothelial and neuro-ectodermal differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(13), 5324–5329.
- Riggi, N., Cironi, L., Provero, P., Suvà, M. L., Kaloulis, K., Garcia-Echeverria, C., Hoffmann, F., Trumpp, A., & Stamenkovic, I. (2005). Development of Ewing's sarcoma from primary bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Cancer Research*, *65*(24), 11459–11468.
- Riggi, N., Knoechel, B., Gillespie, S. M., Rheinbay, E., Boulay, G., Suvà, M. L., Rossetti, N. E., Boonseng, W. E., Oksuz, O., Cook, E. B., Formey, A., Patel, A., Gymrek, M., Thapar, V., Deshpande, V., Ting, D. T., Hornicek, F. J., Nielsen, G. P., Stamenkovic, I., Aryee, M. J., Bernstein, B. E., & Rivera, M. N. (2014). EWS-FLI1 utilizes divergent chromatin remodeling mechanisms to directly activate or repress enhancer elements in Ewing sarcoma The aberrant transcription factor EWS-FLI1 drives Ewing sarcoma yet its molecular function is incompletely understood. We find t. *Cancer Cell*, *26*(5), 668–681.
- Ruijter, A. J. M. de, Gennip, A. H. van, Caron, H. N., Kemp, S., & Kuilenburg, A. B. P. van. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family.

*Biochemical Journal*, 370(3), 737–749.

- Sakimura, R., Tanaka, K., Nakatani, F., Matsunobu, T., Li, X., Hanada, M., Okada, T., Nakamura, T., Matsumoto, Y., & Iwamoto, Y. (2005). Antitumor effects of histone deacetylase inhibitor on Ewing's family tumors. *International Journal of Cancer*, 116(5), 784–792.
- Sanjana, N. E., Shalem, O., & Zhang, F. (2014). Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. In *Nature methods* (Vol. 11, Issue 8, pp. 783–784).
- Schmidt, O., Nehls, N., Prexler, C., von Heyking, K., Groll, T., Pardon, K., Garcia, H. D., Hensel, T., Gürgen, D., Henssen, A. G., Eggert, A., Steiger, K., Burdach, S., & Richter, G. H. S. (2021). Class I histone deacetylases (HDAC) critically contribute to Ewing sarcoma pathogenesis. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 40(1), 1–17.
- Seto, E., & Yoshida, M. (2014). Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(4), a018713.
- Shaliman, D., Takenobu, H., Sugino, R. P., Ohira, M., & Kamijo, T. (2022). The PRC2 molecule EED is a target of epigenetic therapy for neuroblastoma. *European Journal of Cell Biology*, 101(3), 151238.
- Sheffield, N. C., Pierron, G., Klughammer, J., Datlinger, P., Schuster, M., Hadler, J., Surdez, D., Guillemot, D., Lapouble, E., Freneaux, P., Champigneulle, J., Bouvier, R., Pathologie, D., Est, P., & Lyon, H. De. (2018). Europe PMC Funders Group Europe PMC Funders Author Manuscripts DNA methylation heterogeneity defines a disease spectrum in Ewing sarcoma. *Europe PMC*, 23(3), 386–395.
- Shinkai, Y., Rathbun, O Gary, Lam, K. P., Oltz, E. M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A. M., & Alt, F. W. (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell*, 68(5), 855–867.
- Smolewski, P., & Robak, T. (2017). The discovery and development of romidepsin for the treatment of T-cell lymphoma. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 12(8), 859–873.
- Sonnemann, J., Dreyer, L., Hartwig, M., Palani, C. D., Hong, L. T. T., Klier, U., Bröker, B., Völker, U., & Beck, J. F. (2007). Histone deacetylase inhibitors induce cell death and enhance the apoptosis-inducing activity of TRAIL in Ewing's sarcoma cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 133(11), 847–858.
- Spange, S., Wagner, T., Heinzl, T., & Krämer, O. H. (2009). Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(1), 185–198.
- Sparmann, A., & Van Lohuizen, M. (2006). Polycomb silencers control cell fate, development

- and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6(11), 846–856.
- Staeger, M. S., Hutter, C., Neumann, I., Foja, S., Hattenhorst, U. E., Hansen, G., Afar, D., & Burdach, S. E. G. (2004). DNA microarrays reveal relationship of Ewing family tumors to both endothelial and fetal neural crest-derived cells and define novel targets. *Cancer Research*, 64(22), 8213–8221.
- Stiborova, M., Eckschlager, T., Poljakova, J., Hrabeta, J., Adam, V., Kizek, R., & Frei, E. (2012). The Synergistic Effects of DNA-Targeted Chemotherapeutics and Histone Deacetylase Inhibitors As Therapeutic Strategies for Cancer Treatment. *Current Medicinal Chemistry*, 19(25), 4218–4238.
- Tang, X., Li, G., Su, F., Cai, Y., Shi, L., Meng, Y., Liu, Z., Sun, J., Wang, M., Qian, M., Wang, Z., Xu, X., Cheng, Y.-X., Zhu, W.-G., & Liu, B. (2020). HDAC8 cooperates with SMAD3/4 complex to suppress SIRT7 and promote cell survival and migration. *Nucleic Acids Research*, 48(6), 2912–2923.
- Tang, X., Shi, L., Xie, N., Liu, Z., Qian, M., Meng, F., Xu, Q., Zhou, M., Cao, X., Zhu, W.-G., & Liu, B. (2017). SIRT7 antagonizes TGF- $\beta$  signaling and inhibits breast cancer metastasis. *Nature Communications*, 8(1), 318.
- Tirode, F., Surdez, D., Ma, X., Parker, M., Cécile, M., Deley, L., Bahrami, A., Zhang, Z., Lapouble, E., Grossetête-lalami, S., Reynaud, S., Rio-frio, T., Hedlund, E., Wu, G., Chen, X., Pierron, G., Oberlin, O., Zaidi, S., Lemmon, G., & Gupta, P. (2015). *NIH Public Access*. 4(11), 1342–1353.
- Tomazou, E. M., Sheffield, N. C., Schmidl, C., Schuster, M., Schönegger, A., Datlinger, P., Kubicek, S., Bock, C., & Kovar, H. (2015). Epigenome Mapping Reveals Distinct Modes of Gene Regulation and Widespread Enhancer Reprogramming by the Oncogenic Fusion Protein EWS-FLI1. *Cell Reports*, 10(7), 1082–1095.
- Trapani, D., Esposito, A., Criscitiello, C., Mazzarella, L., Locatelli, M., Minchella, I., Minucci, S., & Curigliano, G. (2017). Entinostat for the treatment of breast cancer. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 26(8), 965–971.
- Truong, A. S., Zhou, M., Krishnan, B., Utsumi, T., Manocha, U., Stewart, K. G., Beck, W., Rose, T. L., Milowsky, M. I., He, X., Smith, C. C., Bixby, L. M., Perou, C. M., Wobker, S. E., Bailey, S. T., Vincent, B. G., & Kim, W. Y. (2021). Entinostat induces antitumor immune responses through immune editing of tumor neoantigens. *Journal of Clinical Investigation*, 131(16).
- Van Der Vlag, J., & Otte, A. P. (1999). Transcriptional repression mediated by the human polycomb-group protein EED involves histone deacetylation. *Nature Genetics*, 23(4), 474–478.

- Van Doorninck, J. A., Ji, L., Schaub, B., Shimada, H., Wing, M. R., Krailo, M. D., Lessnick, S. L., Marina, N., Triche, T. J., Sposto, R., Womer, R. B., & Lawlor, E. R. (2010). Current treatment protocols have eliminated the prognostic advantage of type 1 fusions in ewing sarcoma: A report from the children's oncology group. *Journal of Clinical Oncology*, 28(12), 1989–1994.
- Varambally, S., Dhanasekaran, S. M., Zhou, M., Barrette, T. R., Kumar-Sinha, C., Sanda, M. G., Ghosh, D., Pienta, K. J., Sewalt, R. G. A. B., Otte, A. P., Rubin, M. A., & Chinnaiyan, A. M. (2002). The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature*, 419(6907), 624–629.
- Ververis, K., Hiong, A., Karagiannis, T. C., & Licciardi, P. V. (2013). Histone deacetylase inhibitors (HDACIS): Multitargeted anticancer agents. *Biologics: Targets and Therapy*, 7(1), 47–60.
- Welch, D., Kahen, E., Fridley, B., Brohl, A. S., Cubitt, C. L., & Reed, D. R. (2019). Small molecule inhibition of lysine-specific demethylase 1 (LSD1) and histone deacetylase (HDAC) alone and in combination in Ewing sarcoma cell lines. *PloS One*, 14(9), e0222228.
- Widhe, B., & Widhe, T. (2000). Initial Symptoms and Clinical Features in Osteosarcoma and Ewing Sarcoma\*. *JBJS*, 82(5).
- Wilting, R. H., Yanover, E., Heideman, M. R., Jacobs, H., Horner, J., Van Der Torre, J., Depinho, R. A., & Dannenberg, J. H. (2010). Overlapping functions of Hdac1 and Hdac2 in cell cycle regulation and haematopoiesis. *EMBO Journal*, 29(15), 2586–2597.
- Womer, R. B., West, D. C., Krailo, M. D., Dickman, P. S., Pawel, B. R., Grier, H. E., Marcus, K., Sailer, S., Healey, J. H., Dormans, J. P., & Weiss, A. R. (2012). Randomized controlled trial of interval-compressed chemotherapy for the treatment of localized ewing sarcoma: A report from the children's oncology group. *Journal of Clinical Oncology*, 30(33), 4148–4154.
- Yang, F., Kemp, C. J., & Henikoff, S. (2013). Doxorubicin enhances nucleosome turnover around promoters. *Current Biology : CB*, 23(9), 782–787.
- Yang, X.-J., & Seto, E. (2008). The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(3), 206–218.
- Yardley, D. A., Ismail-Khan, R. R., Melichar, B., Lichinitser, M., Munster, P. N., Klein, P. M., Cruickshank, S., Miller, K. D., Lee, M. J., & Trepel, J. B. (2013). Randomized phase II, double-blind, placebo-controlled study of exemestane with or without entinostat in postmenopausal women with locally recurrent or metastatic estrogen receptor-positive breast cancer progressing on treatment with a nonsteroidal aromat. *Journal of Clinical*

*Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 31(17), 2128–2135.

Zhang, Z., Yamashita, H., Toyama, T., Sugiura, H., Ando, Y., Mita, K., Hamaguchi, M., Hara, Y., Kobayashi, S., & Iwase, H. (2005). Quantitation of HDAC1 mRNA Expression in Invasive Carcinoma of the Breast\*. *Breast Cancer Research and Treatment*, 94(1), 11–16.

Zhou, Y., Zhou, B., Pache, L., Chang, M., Khodabakhshi, A. H., Tanaseichuk, O., Benner, C., & Chanda, S. K. (2019). Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nature Communications*, 10(1), 1523.

Zupkovitz, G., Tischler, J., Posch, M., Sadzak, I., Ramsauer, K., Egger, G., Grausenburger, R., Schweifer, N., Chiocca, S., Decker, T., & Seiser, C. (2006). Negative and Positive Regulation of Gene Expression by Mouse Histone Deacetylase1. *Molecular and Cellular Biology*, 26(21), 7913–7928.

## 12 Danksagung

Die abschließenden Worte meiner Promotionsarbeit sind den Personen gewidmet, die dieses Vorhaben ermöglicht und begleitet haben.

Zuallererst möchte ich meinem Betreuer Prof. Dr. rer. nat. Günther Richter für die Möglichkeit danken, an diesem interessanten Thema zu forschen. Seine fachliche Kompetenz, sein Sinn für Genauigkeit und seine unentwegte Betreuung machen ihn zu einem ausgezeichneten Wissenschaftler und überaus guten Mentor. Danke, dass auf dich immer Verlass ist.

Herzlichen Dank an Oxana Schmidt für die umfassende Einarbeitung, die intensive Zusammenarbeit und den täglichen Beistand im Labor.

Danke an alle Labormitglieder für die herzliche und oft so lustige Zeit im Labor sowie für die Zeit, die sie sich genommen haben, um mir bei meinen Fragen immer hilfreich zur Seite zu stehen. Insbesondere möchte ich hier Dr. rer. nat. Kristina von Heyking und Carolin Prexler für Ihre Arbeit danken. Mein herzlicher Dank geht auch an Dr. rer. nat. Andreas Kirschner, Dr. med. Hendrik Gassmann, Dr. med. Ph.D. Sebastian Schober und PD Dr. med. Uwe Thiel.

Des Weiteren gebührt mein Dank Prof. Dr. med. Stefan Burdach und PD Dr. med. Irene Teichert-von Lüttichau für die Unterstützung dieser Arbeit. Und natürlich auch danke an alle hier nicht Genannten, die einen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, meinen Geschwistern und Großeltern ohne die mein Werdegang nicht möglich gewesen wäre und die immer an mich geglaubt haben.

Danke für eure Liebe und eure stetige Unterstützung.

Ganz besonders möchte ich hier meinem Vater danken. Von Laborbesuchen in der Kindheit bis hin zu intensiven Gesprächen über wissenschaftliche Themen – Papa, dein Einfluss auf meine Entwicklung ist nicht in Worte zu fassen.

Nicht zuletzt möchte ich meinem Verlobten Sebastian für seine Unterstützung in jeglicher Hinsicht danken. Deine Geduld, dein Verständnis und deine Denkweise sind nur wenige der vielen Eigenschaften, die ich an dir schätze.