

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

Epigenetische Regulation von EZH2 in soliden Tumoren
des Kindesalters am Beispiel des Rhabdomyosarkoms

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Behrendt, Lucas

2024

Dekan: Professor Dr. rer. nat. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. med. S. Warmann

2. Berichterstatterin: Professorin Dr. K. Schilbach-Stückle

Tag der Disputation: 07.02.2024

Epigenetische Regulation von EZH2 in soliden Tumoren des Kindesalters am Beispiel des Rhabdomyosarkoms © 2024 by Lucas Benjamin Behrendt is licensed under Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International. To view a copy of this license, visit <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1 Solide Tumore im Kindesalter	5
1.1.1 Rhabdomyosarkom	5
1.2 Epigenetik	10
1.2.1 Funktion und Bedeutung des Polycomb Repressive Komplexes	14
1.2.2 EZH2 und seine Bedeutung in der Tumorentstehung	21
1.4 Zielsetzung der Arbeit	27
2. Material und Methoden	28
2.1 Material	28
2.1.1 Verbrauchsmaterialien	28
2.1.2 Geräte/Hilfsmittel	28
2.2 Methoden	29
2.2.1 Zellkultivierung	29
2.2.2 Western Blot	35
2.2.3 Viabilitäts-Assay	40
2.2.4 Fluoreszenz-basierte Durchflusszytometrie	41
2.2.4.1 Apoptose-Assay	42
2.2.4.2 Zellzyklus	44
2.2.5 Wound-Healing-Assay	45
2.2.6 Colony forming assay	46
2.2.7 Sphäroide/3D-Kultur	47
2.3 Statistische Verfahren	48
3. Ergebnisse	50
3.1 Erhöhte EZH2 Expression in RMS Zelllinien	50
3.2 Inhibition von EZH2 verringert Zellviabilität	50
3.3 FACS	53

3.3.1	Apoptose Induktion durch epigenetische Inhibitoren.....	53
3.3.2	Zellzyklus-Arrest durch EPZ005687	55
3.4	Geringer Einfluss auf 2D-Migration durch EPZ005687, DZNep und AdOx	59
3.5	Reduktion des Metastasierungspotenzials durch epigenetische Inhibitoren <i>in vitro</i>	63
3.6	EPZ005687 und DZNep mit komplexen Auswirkungen auf Mikrometastasen	66
4.	Diskussion	70
5.	Zusammenfassung	78
6.	Danksagung	79
7.	Erklärung zum Eigenanteil.....	80

1. Einleitung

1.1 Solide Tumore im Kindesalter

Aus dem deutschen Kinderkrebsregister geht hervor, dass eines von 407 Neugeborenen vor dem 15. Geburtstag an einer malignen Neoplasie erkrankt. Generell erkranken etwas mehr Jungen als Mädchen an einer Krebserkrankung, wobei das höchste Risiko in den ersten Lebensjahren der Kinder besteht (Erdmann F, 2020).

Die häufigste Krebserkrankung im Kindesalter umfasst die Gruppe der Leukämien mit einem Anteil von ca. 30%. Die häufigsten soliden Tumoren gehören zur Gruppe der ZNS-Tumoren mit etwa 24% (Abb. 1).

Relative Häufigkeiten der an das deutsche Kinderkrebsregister gemeldeten Erkrankungsfälle nach Diagnose-Hauptgruppen

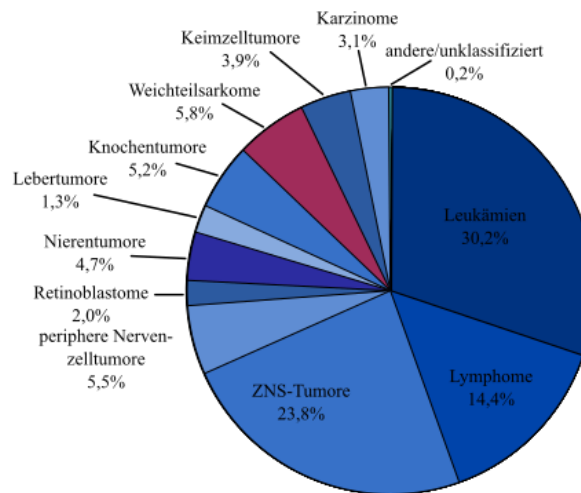


Abb. 1: Relative Häufigkeit von Krebserkrankungen zwischen 2009 und 2017 bei Kindern bis zum 18. Lebensjahr (Erdmann F, 2020)

Weichteilsarkome umfassen, je nach Quelle, zwischen 5,8% bis 7% aller malignen Erkrankungen im Kindesalter und sind die dritthäufigste solide Tumor-Entität in der Altersgruppe unter 18 Jahren (Hawkins et al., 2013). Der Name leitet sich vom griechischen Wort „*sarkoma*“ ab, was so viel wie „Geschwür des Fleisches“ bedeutet.

1.1.1 Rhabdomyosarkom

Epidemiologie

Mit einem Anteil von 60% sind die Rhabdomyosarkome (RMS) die größte Untergruppe der Weichteilsarkome bei Kindern unter 15 Jahren. Im Schnitt erkranken weltweit 4,8

Kinder pro einer Millionen an einem RMS (2016; Ries, 1999). Für Deutschland gibt das Kinderkrebsregister eine Erkrankungshäufigkeit von 1/7.200 Kindern bis 14 Jahre an. Damit ist das RMS der dritthäufigste extrakranielle solide Tumor im Kindesalter nach dem Neuroblastom und dem Nephroblastom (Wilms-Tumor). Das RMS hat im Kindesalter zwei Häufigkeitsgipfel mit Peaks zwischen dem zweiten und sechsten Lebensjahr, sowie zwischen dem zehnten und achtzehnten Lebensjahr. Dies lässt sich auf die zwei wichtigsten histologischen Subtypen des RMS, die im späteren Verlauf näher erläutert werden, zurückführen (Miller, 1995).

Im Erwachsenenalter kommen RMS mit einer deutlich verminderten Inzidenz von 3,6/100.000 für Männer und 2,7/100.000 für Frauen vor und sind damit insgesamt selten.

Ätiologie

Obwohl in den letzten Jahrzehnten viel über die klinischen und pathologischen Charakteristika des RMS geforscht wurde, bleibt die Entstehung dieser Tumoren bisher meist unbekannt (Shrestha et al., 2013). Man nimmt an, dass die Entstehung mit Entwicklungsstörungen von Muskelvorläuferzellen und ihrer Differenzierung zusammenhängt (Dasgupta et al., 2016). Embryologisch betrachtet entstehen RMS aus Mesenchym – embryonalem Gewebe aus dem sich später Bindegewebe, Knochen und der Muskel-Sehnen-Apparat entwickeln. Für das embryonale RMS (ERMS) bestehen zu circa 5% Assoziationen z.B. mit genetischen Syndromen wie dem LiFraumeni-Syndrom, Beckwith-Wiedemann-Syndrom oder mit TP53-Mutationen (Felix et al., 1992; Plon, 2010; Shuman et al., 1993). Darüber hinaus konnten durch epidemiologische Fall-basierte Studien einige Umweltfaktoren wie z.B. pränatale Röntgenstrahlung oder elterlicher Drogenmissbrauch als Risikofaktoren für RMS identifiziert werden (Grufferman et al., 1984; Grufferman et al., 2009; Grufferman et al., 1993).

Systematik & Histologie

Seit 1958 wird das RMS in drei histologische Subkategorien eingeteilt (Enterline and Horn, 1958). Mit ca. 60-75% ist das ERMS die häufigste Form, bei dem das Hauptmanifestationsalter sich zwischen Geburt und dem zwölften Lebensjahr befindet (Ognjanovic et al., 2009). Es tritt bevorzugt im Kopf-Hals-Bereich, aber auch retroperi-

toneal oder urogenital auf. Histologisch sind runde oder spindelförmige Rhabdomyoblasten mit eosinophilem Zytoplasma charakteristisch, die entweder eng gepackt oder lose verteilt vorliegen (Patton and Horn, 1962). Weitere histologische Subtypen beim ERMS sind der vor allem paratestikulär vorliegende bastmattenartige Spindelzell-Typ und der botryoide/traubenförmige Typ (Agamanolis et al., 1986; Parham and Barr, 2013; Parham and Jenkins, 1994).

Das alveoläre RMS (ARMS), auch juveniles RMS genannt, stellt mit etwa 25% die zweithäufigste Subgruppe dar (Ognjanovic et al., 2009). Hier liegt das Erkrankungsalter vor allem zwischen dem 12. und 25. Lebensjahr. Auch das ARMS findet sich häufig im Kopf-Hals-Bereich, ebenso an den Extremitäten. Histologisch lassen sich Pseudoalveolen beschreiben, die durch Hohlräume zwischen den undifferenzierten Rundzellen entstehen (Enterline and Horn, 1958; Parham and Barr, 2013).

Häufig beim ARMS vorkommende balancierte Translokationen setzen sich aus den Chromosomen 2 oder 1 und 13 ((t2;13) oder t(1;13)) zusammen (Douglass et al., 1991). Durch die Translokation t(2;13)(q35;q14) entsteht ein onkogenes Fusionsprotein PAX3-FOXO1, durch die Translokation t(1;13)(p36;q14) ein Fusionsprotein aus PAX7 und FOXO1. Beide Translokationen gehen mit einer erhöhten PAX Aktivität einher. Das hohe Level an PAX3-FOXO1 ist dabei unabhängig von der Anzahl der Kopien. Beim Fusionsprotein PAX7-FOXO1 resultiert es aus der Abhängigkeit der Kopien-Amplifizierung *in vivo* (Davis and Barr, 1997). Die erhöhte Aktivität führt zu einer Acetylierung an Histon 3 Lysin 27 (H3K27) und einer daraus resultierenden Aktivierung untergeordneter onkogener Signalwege wie z.B. des *insulin-growth factor 2 (IGF2)*, *N-myc Protoonkogen-Protein (MYCN)* oder *fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4)* (Skapek et al., 2019). Die PAX3-FOXO1 Fusion ist häufiger als die PAX7-FOXO1 Fusion (55% zu 23%) und geht mit einem schlechteren Überleben einher (Dasgupta et al., 2016; Davicioni, 2010).

Die Erkenntnis, dass manchen ARMS genetische Translokationen zugrunde liegen, erlaubt eine Einteilung von ARMS in „Fusion-positive“ (FPRMS) und „Fusion-negative“ RMS (FNRMS) (Parham and Barr, 2013). DNA-Strukturanalysen zeigten weiterhin, dass ERMS und fusionsnegative ARMS ähnliche genetische Muster exprimieren, wie z.B. 11p15,5 Allel-Verlust oder sich wiederholende Punktmutationen. Somit können fusionsnegative ARMS mit ERMS in derselben Subgruppe zusammengefasst werden

(Seki et al., 2015; Williamson et al., 2010). Der Verlust des 11p15 Allels beeinflusst wichtige Gene für einen Proliferationsstopp, normale Muskeldifferenzierung und -genexpression wie IGF2 und p57, die an diesem Gen-Locus codieren (Saab et al., 2011).

Die dritte sehr heterogene Gruppe nach Horn und Enterline wird als pleomorph bezeichnet und umfasst undifferenzierte, pleomorphe oder sonstige RMS (Enterline and Horn, 1958; Parham and Barr, 2013).

Die vorliegende Arbeit befasst sich wegen der höheren Relevanz v.a. mit den zwei Erstgenannten Subgruppen, ERMS und ARMS (Enterline and Horn, 1958).

In dieser Arbeit wurde dazu eine spezielle Unterform des ERMS mit spindelzelliger Histologie untersucht (Schleicher et al., 2020).

Symptome & Diagnostik

Das klinische Erscheinungsbild des RMS ist sehr variabel ausgeprägt und steht in engem Zusammenhang mit der Lokalisation des Tumors. Im Kopf-Hals-Bereich, nach der IRS-III (Intergroup Rhabdomyosarcoma) Studie (Crist et al., 1995) mit 35% die häufigste Lokalisation (Andrassy, 2002), reicht das Spektrum von asymptomatischen Verläufen mit indolentem Exophthalmus über Obstruktion der Nase bis hin zu Hirnnervenparesen. Bei urogenitalem Befall, mit 26% die zweithäufigste Lokalisation (Andrassy, 2002), können Dysurie, Obstipation, Hodenschwellung oder Bauchschmerzen erste Hinweise auf ein RMS sein. Die Tumoren der Extremitäten fallen vor allem durch schmerzhaft oder indolente Schwellung auf (Koscielniak, 2017).

Diagnostisch erfolgt, bevor ein Tumor biopsiert wird, meist eine hochauflösende Schnittbilddiagnostik des Primarius, vorzugsweise mittels Magnetresonanztomographie (MRT). Anschließend wird eine Biopsie mit pathomorphologischen, immunhistochemischen und zyto- bzw. molekulargenetischen Analyse zur Sicherung der Diagnose durchgeführt (Yiallourous, 2009). Das Staging umfasst neben der apparativen Tumorausbreitungsdiagnostik eine Knochenmarksbiopsie bei allen G3-Sarkomen, eine Liquordi-

agnostik bei paramenigealem Befall, sowie eine Ganzkörperszintigraphie, z.B. mittels Skelettszintigraphie oder eine Positronen-Emissions-Tomographie/Computer-Tomographie (PET/CT) oder PET/Magnetresonanztomographie (MRT), um das Tumorstadium zu definieren (Koscielniak, 2017; Panda et al., 2017).

Therapie

Die Therapie des RMS ist multimodal und besteht aus einer Kombination von Chemotherapie, Chirurgie und/oder Bestrahlung. Nach neoadjuvanter Chemotherapie wird der Tumor nach Möglichkeit organerhaltend reseziert. Dies ist jedoch nicht immer möglich, so dass andere lokaltherapeutische Konzepte wie eine primäre Bestrahlung oder als ultima ratio ein mutilierender Eingriff diskutiert werden müssen. Eine adjuvante Chemotherapie nach chirurgischer Resektion wird stadienabhängig durchgeführt (Koscielniak, 2017).

Zur Anwendung kommende Chemotherapeutika sind Anthrazykline wie Doxorubicin und Alkylanzien wie Ifosfamid oder auch Dactinomycin und Vincristin (Crist et al., 2001; Koscielniak, 2017). Je nach Subtyp und Staging werden verschiedene Medikamentenkombinationen in unterschiedlicher Intensität und Dauer verabreicht, in Deutschland meist nach Empfehlung der Cooperativen Weichteilsarkom Studiengruppe (CWS) (Niemeyer, 2018).

Bei manchen Tumorlokalisationen, wie z.B. dem urogenitalen RMS, ist eine prä- oder postoperative Bestrahlung indiziert. Aufgrund nicht unerheblicher Nebenwirkungen für das gesunde Gewebe um den Tumor finden mittlerweile spezielle Bestrahlungstechniken wie die Brachytherapie oder die Protonentherapie ihre Anwendung (Fuchs et al., 2016; Haie-Meder et al., 2013; Koscielniak, 2017). Bei parameningealem Befall ist die Bestrahlung die wesentliche Therapieform zur lokalen Tumorkontrolle (Pappo et al., 1995).

Prognose

Entscheidende Prognosefaktoren sind insbesondere Tumorlokalisation und –größe, histologischer Subtyp, sowie Erkrankungsalter und Operabilität. Dank des multimodalen

Therapieansatzes aus Chemotherapie, Chirurgie und Bestrahlung, sowie einer guten prätherapeutischen Risikostratifizierung konnte das mittlere Überleben und die Aussicht auf Heilung in den letzten Jahrzehnten stark verbessert werden (Andrassy, 2002; Arnold and Barr, 2017). So beträgt die Langzeitüberlebenschance (15 Jahre) 69% (Erdmann F, 2020). Jedoch bleiben die Aussichten auf Heilung bei fortgeschrittenem Tumorstadium oder im Falle eines Rezidivs weiterhin schlecht und sind daher Gegenstand aktueller Forschung (Arnold and Barr, 2017). So liegt das mittlere 5-Jahresüberleben bei Rezidiven bei nur 17% (Pappo et al., 1999; Skapek et al., 2019) und bei sehr hohem Risiko bei lokalisierendem Rhabdomyosarkom bei 42% (Koscielniak et al., 2022).

Zur validen Prognoseabschätzung erfolgt nach der Leitlinie der Childrens' Oncology Group (COG) in Abhängigkeit der Radikalität der chirurgischen Resektion sowie dem Nachweis von Lymphknoten- und/oder Fernmetastasen, eine Zuordnung der Patienten in eine von vier klinischen Gruppen (Malempati and Hawkins, 2012; Maurer et al., 1988). Unter Berücksichtigung der Gruppenzuteilung und zusätzlicher Faktoren wie z.B. dem Fusionsstatus und der Tumorlokalisation werden RMS-Patienten weiter in Subgruppen mit niedrigem, Standard-, hohem und sehr hohem Risiko klassifiziert. Diese Risikostratifizierung zeigte sich als zuverlässig, was Therapieentscheidungen und Patientenoutcome betrifft (Dasgupta et al., 2016).

1.2 Epigenetik

Der Terminus „Epigenetik“ kennt viele Definitionen, die unterschiedliche Teilaspekte des heutigen Gesamtbildes beschreiben. Adrian Bird versuchte sich 2007 an einer überarbeiteten inkludierenden Definition: *„the structural adaption of chromosomal regions so as to register, signal or perpetuate altered activity states“*. Die Epigenetik beschreibt, so Bird, strukturelle Veränderungen chromosomaler Regionen mit einhergehender Alteration der Aktivität (Bird, 2007). Man kann sie als übergeordnete Kontroll- und Steuereinheit der Zelle sehen, die eine substanzielle Rolle in Zelldeterminierung und -entwicklung spielt und dabei erbliche und umweltbedingte Änderungen der Genexpression ohne Veränderung der DNA-Sequenz einleitet und transferiert (Bird, 2007).

Robin Holliday erweitert diese Definition um den Begriff der Epimutation (Jeggo and Holliday, 1986), was insofern relevant ist, da Mutationen in der Epigenetik auch an nachfolgende Generationen vererbt werden können (Cubas et al., 1999).

Abb. 2 zeigt den grundsätzlichen Aufbau eines Chromosoms und die Kompaktierung der DNA über Nucleosomen zu Chromatin. Dabei werden folgende zwei Zustände unterschieden: Euchromatin und Heterochromatin. Euchromatin beschreibt eine aufgelockerte Chromatinform, die transkriptionell aktiv ist (Swagatika S., 2016). Heterochromatin ist der Gegenspieler, kondensiert und transkriptionell inaktiv. In der Literatur wird noch weiter in fakultatives Heterochromatin mit möglicher Aktivierung, wie z.B. beim weiblichen X Chromosom und in konstituierendes Heterochromatin unterschieden (Swagatika S., 2016). Jeder dieser Zustände wird über Seitenketten-Modifizierungen der Histone reguliert und geht mit erniedrigten oder erhöhten Ablesehäufigkeiten einher.

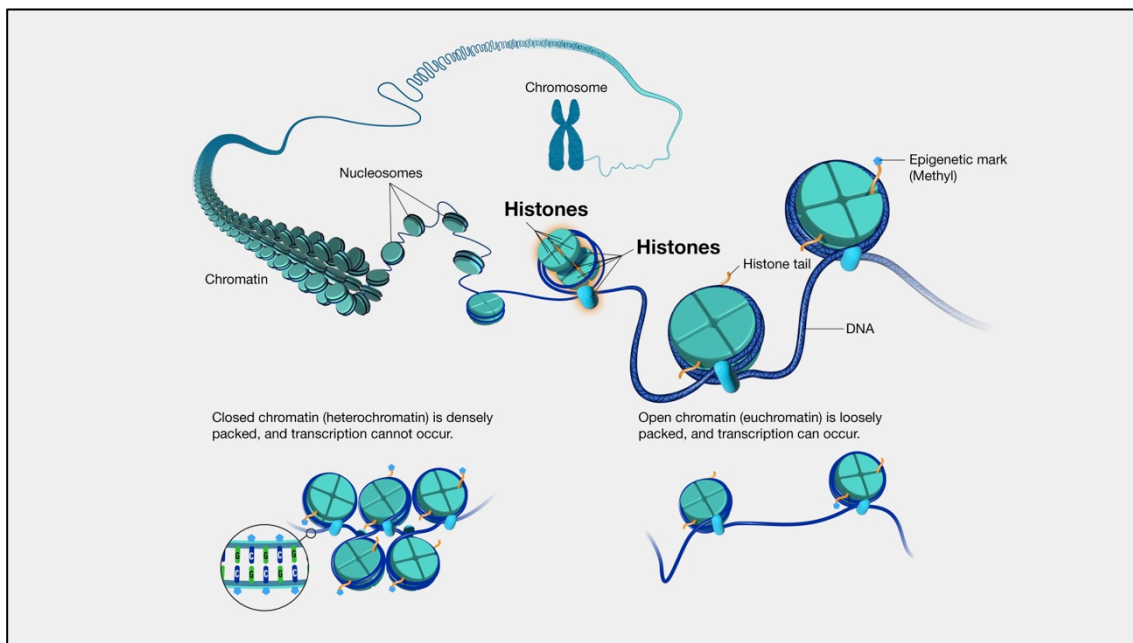


Abb. 2: Kompaktierung des menschlichen Genoms. Aus DNA bestehendes Chromatin steht in Wechselwirkung mit Histon- und Nicht-Histonproteinen. Die DNA windet sich knapp zweimal um einen so genannten Nucleosomkern, bestehend aus acht Histonproteinen (je zwei Histone vom Typ H2A, H2B, H3 und H4). Bei physiologischen Salzkonzentrationen entstehen 30 nm Fasern durch Faltung der Nucleosomen-Kette in eine linksgängige Helix. Die stärkste Kondensation wird in der Metaphase der Mitose erreicht. Lockeres Chromatin nennt man Euchromatin, stark kondensiertes Heterochromatin. (Institute, 2023)

DNA Methylierung ist eine der am meisten erforschten Modifizierungen der DNA. Sie basiert auf der kovalenten Bindung einer Methyl-Gruppe (CH_3) an ein Cytosin-Nukleotid innerhalb einer Cytosin- und Guanin-reichen DNA-Region. Üblicherweise verursacht eine solche Methylierung, ausgeführt von DNA Methyltransferasen (DNMT), eine verringerte Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA und führt zu einer Repression der Gen-Expression (Bird, 2002).

Neben dieser ersten Ebene gibt es eine weitere Möglichkeit epigenetischer Veränderungen: die post-translationalen Modifizierungen von Histonen (PTM). Hierbei werden Aminosäure-Seitenketten im Nukleosom mit verschiedenen chemischen Gruppen in mehreren Levels der Substratmodifizierung beladen (Marchesi I, 2013). Zum Beispiel kann an zahlreichen N-Termini der Histone 3 und 4 eine Lysin-Methylierung in Mono-, Di- oder Trimethylierung etabliert werden. Diese Diversität der Histon PTM's und ihr zeitliches Auftreten hängen vom spezifischen Zellzustand ab, der durch die verschiedenartigen funktionalen Antworten der Zelle gegeben ist (Kouzarides, 2007). So wirkt eine Histon-Acetylierung bei DNA-Replikation, -Reparatur und -Kondensation mit. Histon-Methylierung, Ubiquitinierung und Phosphorylierung haben Einfluss auf Reparatur und Kondensation der DNA-Stränge (Marchesi I, 2013). Eine Acetylierung ist generell ein Marker für transkriptionell aktive Gene. Eine Methylierung kann sowohl ein Marker für repressierte wie aktivierte Gene sein, je nach beteiligten Aminosäure-Seitenketten (Marchesi I, 2013). So ist zum Beispiel die Methylierung an Histon 3 Lysine 4 (H3K4me) ein Zeichen für transkriptionell aktive Gene, während die Methylierungen von H3 Lysine 9 und 27 (H3K9me; H3K27me) als transkriptionell repressierend angesehen werden (Berger, 2007; Fiorentino et al., 2013; Kouzarides, 2007). Abb. 3 gibt eine Übersicht über die möglichen Veränderungen der Histon-Seitenketten und die daran beteiligten Enzymfamilien.

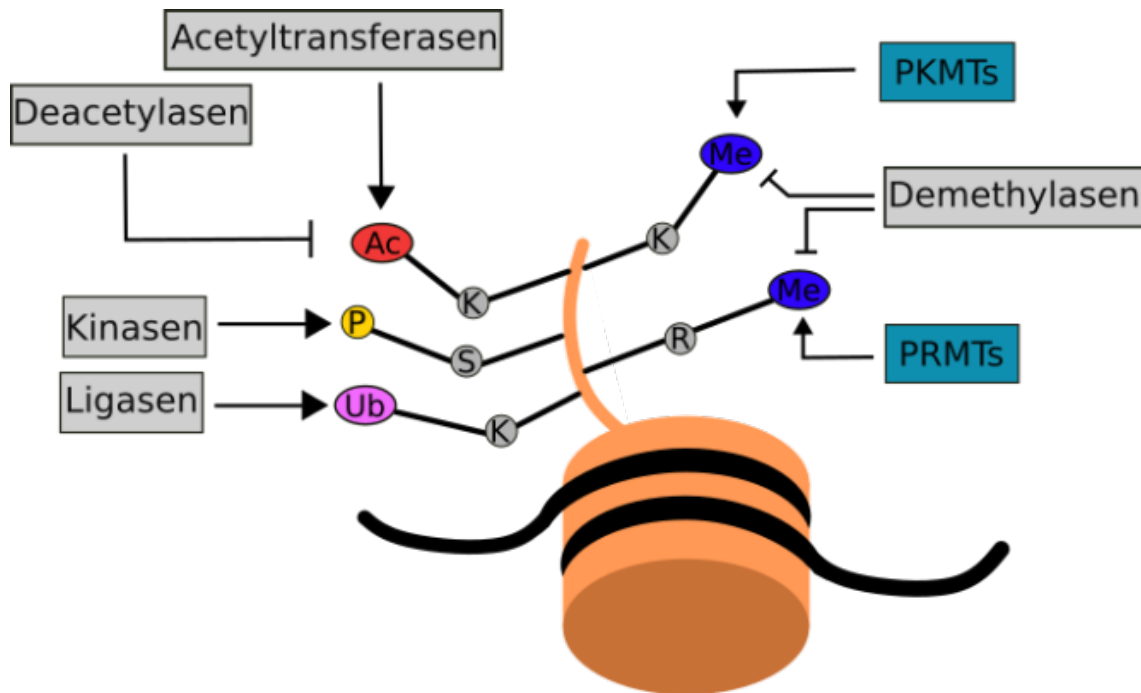


Abb. 3: Darstellung eines Nucleosoms und den posttranslationalen Histon-Modifikationen, die die epigenetische Regulation der Transkription beeinflussen. Modifizierungen an Histonproteinseitenketten umfassen Acetylierung (Ac) durch Acetyltransferasen und Deacetylasen, Phosphorylierungen (P) durch Kinasen, Ubiquitinierungen (Ub) durch Ligasen, und Methylierungen (Me) durch Methyltransferasen und Demethylasen (PKMT = Protein Lysin Methyltransferasen; PRMT = Protein Arginin Methyltransferasen). Diese genannten Enzymfamilien sind verantwortlich für posttranslationale Modifizierungen. (erstellt mit Inkscape; übernommen aus (Copeland et al., 2009)).

Jede Zelle hat dieselbe DNA-Sequenz zur Verfügung und doch unterscheidet sich eine Haut- von einer Haarzelle und eine Herzmuskel- von einer Leberzelle. Diese Unterschiede in Stoffwechselaktivität und Syntheseverhalten wird z.B. durch die Deaktivierung ganzer Genom-Abschnitte über Histon-vermittelte Kompaktierung der Chromosomen und *Silencing* einzelner Gene reguliert.

All dies ist relevant, da es ein differenzierteres Bild unseres modernen Verständnisses der Karzinomentstehung zeichnet. Traditionell wird Krebs als eine genetische Erkrankung verstanden, in der drei bis sieben Treibermutationen innerhalb der DNA-Sequenz zur schrittweisen Entwicklung von menschlichen Tumoren führen (Bishop and Schulten, 1996; Hanahan and Weinberg, 2000). Diese Änderungen schalten Zellfunktion und Zellstoffwechsel auf ungehemmte Proliferation, Evasion des Immunsystems, Widerstand gegen Wachstumshemmung, Induktion von Neovaskularisation und Metastasierung (Hanahan and Weinberg, 2011). Wegweisend für ein derartiges Verständnis der Krebsentstehung waren zum einen die Knudson-Hypothese, die anhand epidemiolo-

gischer Daten einen so genannten *second hit* bei bereits erworbener Stammbaum-Mutation für bilaterale Retinoblastome nachwies. Zum anderen die Theorie der Adenom-Karzinom-Sequenz, die für die Entstehung kolorektaler Karzinome beschrieben ist (Day, 1984; Knudson, 1971).

Der wissenschaftliche Fortschritt der letzten Jahre und Jahrzehnte zeigt, dass diese Sichtweise zu eng gefasst ist. Neben den bereits bekannten DNA-Mutationen spielen epigenetische Veränderungen eine Rolle in der Karzinomentstehung (Sparmann and van Lohuizen, 2006). Da der Charakter einer Zelle über ihre konstituierenden Proteine definiert ist, die wiederum aus der Gen-Expression resultiert (Bird, 2002), muss die bisherige Theorie der Krebsentstehung um einen epigenetischen Aspekt ergänzt werden.

Essentielle Determinanten der DNA-Expression sind DNA-bindende Transkriptionsfaktoren, die die Aktivität oder Repression von Genen über ein Erkennen der Promoter-Region bestimmen. So kann bereits ein *single hit* zur Karzinomentstehung ausreichen bei entsprechendem *Silencing* des gesunden zweiten Allels (Myohanen et al., 1998). Esteller et al. zeigt, dass in der Regel nicht das mutierte Gen, sondern das Wildtyp-Allel inaktiviert wird (Esteller et al., 2001).

Bereits vor 70 Jahren entdeckte Pamela Lewis die Polycomb Repressive Complex Systeme in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Lewis, 1947). Dieses und das Trithorax System (Ingham, 1983) gelten als zwei wichtige Hauptakteure epigenetischer Regulation. Sie wirken antagonistisch zueinander und orchestrieren Zelldifferenzierung und Determinierung, wobei Sie als evolutionär konserviert zu betrachten sind (Schuettengruber et al., 2017).

1.2.1 Funktion und Bedeutung des Polycomb Repressive Komplexes

Bedeutung

In fast jedem mehrzelligen Organismus spielt der Polycomb Repressive Complex (PRC) eine Schlüsselrolle in der Etablierung und Aufrechterhaltung spezifischer Gen-Expression (Laugesen et al., 2016; Margueron and Reinberg, 2011).

Eine Mutation oder Dysfunktion dieser Proteine wirkt sich auf die raumzeitliche Regulation wichtiger Transkriptionsfaktoren aus und zieht charakteristische Veränderungen im Phänotyp nach sich (Laugesen and Helin, 2014). Darüber hinaus hat PRC, in der Literatur auch Polycomb Group (PcG) bezeichnet, Einfluss auf das Proliferationsverhalten, die Seneszenz und die maligne Entartung von Zellen (Jacobs et al., 1999; van Lohuizen, 1991).

Wie bedeutend PRC für die adäquate Entwicklung des Organismus ist, zeigt sich an einer frühzeitig einsetzenden Letalität während der embryonalen Entwicklung bei Mäusen, bei denen die PcG-Gene ausgeschaltet wurden (Margueron and Reinberg, 2011). Trotz oder gerade wegen seiner konservierten Natur reguliert PRC eine Vielzahl von epigenetischen Prozessen, wie zum Beispiel Inaktivierung des X Chromosoms, Zellzykluskontrolle, Spermatogenese und genomisches Imprinting (Chen et al., 2005b; Wang et al., 2001).

Um diese große Bandbreite an regulatorischen Prozessen auszuführen, existieren verschiedene Unterformen der PcG. Die zwei Hauptfamilien sind PRC1 und PRC2, die beide über Chromatin-modifizierende Prozesse *Gen-Silencing* bewirken können (Simon and Kingston, 2009).

Aufbau und Funktionsweise

Beim PRC1 unterscheidet man zwischen zwei Arten – kanonisch und nicht-kanonisch. Der kanonische PRC1 (kPRC1) charakterisiert sich über seine Chromatin-Domäne (CBX). Er setzt sich aus vier Komponenten zusammen und bindet spezifisch an den dreifach methylierten Histon-Subtyp 3 (H3K27me₃). Die einzelnen Bestandteile bestehen aus dem Protein *Polycomb* (Pc), das eine Affinität für H3K27me₃ aufweist, einer Ubiquitin Ligase RING1 A oder B, einem von 5 CBX-Subtypen und dem *polyhomeotic complexes* (PHC) (Laugesen and Helin, 2014). Für jede dieser Untereinheiten gibt es homologe Proteine.

Der nicht kanonische PRC1 (nkPRC1) unterscheidet sich in seiner Bindungsaffinität und Rekrutierung und bindet unspezifisch über das Protein K-spezifische Lysin Demethylase 2b (KDM2B) an 5'-C-Phosphat-G-3' (CpG)-Inseln (Conway, 2017). Diese Inseln sind DNA-Abschnitte mit viel Guanin- und Cytosin-Basen. Sowohl nkPRC1 als auch kPRC1 katalysieren die Monoubiquitinierung von Histon 2 (H2K119) und fördern

so Chromatin-Kompaktierung (Di Croce and Helin, 2013; Eskeland et al., 2010). Besonders erwähnenswert ist das Proto-Onkogen *B-Lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog* (BMI1), auch *polycomb group RING finger protein 4* (PCGF4) genannt, ein Schlüsselement des PRC1, wenn auch ohne enzymatische Aktivität (Cao et al., 2005). Über BMI1 reguliert der PRC1 wichtige Gene, wie die Zellzyklus-Inhibitoren p15 und p14, und Signalwege wie Wnt, Notch, und Hedgehog (Douglas et al., 2008; Liu et al., 2006; Silva et al., 2006). Abb. 4 zeigt Zusammensetzung, Funktion und Zusammenhang der drei verschiedenen Polycomb Repressive Komplexe.

Bemerkenswert ist, dass in diversen Pflanzen- und Tierklassen diese Kernkomponenten des PRC1 Komplexes konserviert sind (Schuettengruber et al., 2017), ein weiterer Hinweis auf die entwicklungsgeschichtlich wichtige Rolle des PRC.

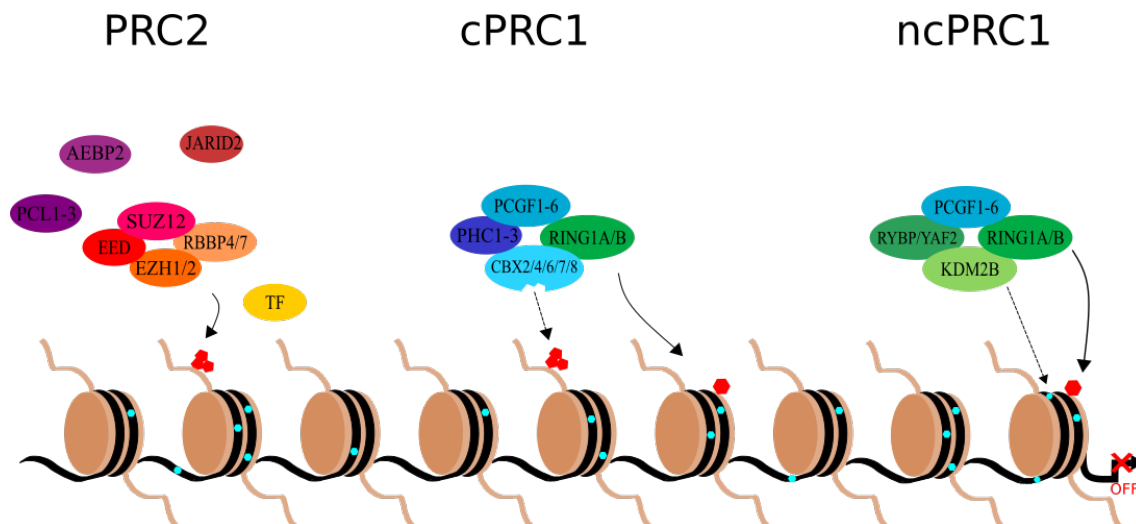


Abb. 4: Schematische Darstellung des Polycomb Repressive Komplexes. PRC2 katalysiert die Trimethylierung (rote Fünfecke) von H3K27. Einige Proteine wie JARID2, AEBP2 und PCL1-3 oder Transkriptionsfaktoren (TF) regulieren die Aktivität des PRC2. kPRC1 (CBX enthaltend) wird über H3K27me3 rekrutiert (gestrichelter Pfeil), nkPRC1 (PRC2-unabhängig) hingegen über CpG Inseln (hellblaue Sechsecke). Beide PRC1 Komplexe katalysieren die Ubiquitinierung von H2K119 (rote Sechsecke). (erstellt mit Inkscape; übernommen aus (Laugesen and Helin, 2014))

PRC2 ist eine Methyltransferase mit Aktivität an Lysin 27 des Histons drei (H3K27) (Laugesen et al., 2016; Pengelly et al., 2013). PRC2 trimethyliert dazu in geringerer Aktivität Lysin 9 des Histonsubtyps drei (H3K9me3) (Czermin et al., 2002).

Die Hauptkomponenten des PRC2 bilden *Enhancer of Zeste 2* (EZH2) oder der paraloge EZH1, *embryonic ectoderm development* (EED), ein WD40 Protein, und das Zink-Finger Protein *Suppressor of Zeste 12* (SUZ12), die zusammen für die katalytische Aktivität *in vitro* benötigt werden (Cao and Zhang, 2004; Laugesen and Helin, 2014). *In*

in vivo haben viele weitere Proteine einen Einfluss auf die Aktivität des PRC2. So erhöhen u.a. das Chaperon RbAp48/46 und das Zink-Finger-Protein *Adipozyten Enhancer Bindungsprotein 2* (AEBP2) die katalytische Aktivität von PRC2, sowie die Bindung und das *gene targeting* Jumonji (JARID2) und *Polycomb-like Protein* (PCL) (Abb. 4) (Smits et al., 2013; Vizan et al., 2015).

EZH2, die katalytisch aktive Untereinheit, sorgt mit seiner SET-Domain (Su(var)3-9, Enhancer of zeste and Trithorax) für die mögliche Mono-, Di- oder Trimethylierung, wobei jeder dieser Zustände funktionell eine andere Bedeutung hat (Margueron and Reinberg, 2011). Die H3K27-Methylierung ist prozessiv; H3K27me3 folgt aus der Methylierung von H3K27me2 und H3K27me2 folgt aus H3K27me, wobei die Trimethylierung der stabilste Zustand ist (Zee et al., 2010). Xu und Kollegen stellten fest, dass die Monomethylierung v.a. mit EZH1, die Di- und Trimethylierung eher mit EZH2 assoziiert sind (Mousavi et al., 2012; Xu et al., 2015). Während PRC2-EZH2 genomweit für die Trimethylierung zuständig ist und hohe Level eng mit Proliferation assoziiert sind, unterdrückt PRC2-EZH1 direkt und stark die Transkription von DNA-*Templates* und komprimiert Chromatin v.a. in nicht-proliferierenden Geweben (Margueron et al., 2008). Neben diesen Funktionen kooperiert PRC2 mit anderen epigenetischen Enzymen. Auch wenn der Mechanismus noch unklar ist, so zeigten Studien, dass PRC2 direkt über DNMT's CpG Methylierung und somit *gene silencing* bewirkt (Vire et al., 2006). Eine weitere funktionale Synergie, um eine Deaktivierung zu stabilisieren und transkriptionale Repression zu verstärken, ergibt sich aus dem Zusammenspiel mit Histon Deacetylasen (HDAC) (Cao and Zhang, 2004; van der Vlag and Otte, 1999).

Regulation des PRC2

Die Regulierung von PRC2 wird eng gesteuert durch verschiedene Mechanismen wie transkriptionelle Regulation, post-translationale Modifikation oder die Rekrutierung anderer molekularer Zielgene (Marchesi I, 2013). Transkriptionell steigend auf die Expression der PRC2-Untereinheit wirken der Transkriptionsfaktor E2F, der den Übertritt von der G1 in die S-Phase stimuliert, und der Transkriptionsfaktor c-Myc/MYC, der die Chromatinstruktur durch Histon-Acetylierung verändert. Hingegen supprimieren Differenzierungsfaktoren wie p16 und pRb die Transkription (Bracken et al., 2003; Koh

et al., 2011; Muller et al., 2001). Weitere Studien zeigten, dass die Menge an exprimierten PRC2s auch über so genannte Micro-Ribonukleinsäure (miRNA), kleine nicht codierende konservative RNA Moleküle, reguliert wird (Marchesi I, 2013).

Der Einfluss posttranslationaler Modifikationen auf die EZH2 Expression ist maßgeblich durch eine Phosphorylierung bedingt, wobei man hier vor allem zwei Gruppen unterscheidet: extrinsisch eingreifende Kinasen und intrinsische Signale wie die Zellzyklus-regulierenden Cyclin-abhängige Kinase1 (CdK1) und CdK2 (Caretto et al., 2011). So sorgt z.B. eine Phosphorylierung von Threonin 345 (Thr345) für eine Rekrutierung von EZH2 an den Zielgenen (Kaneko et al., 2010).

Beide Komplexe, PRC1 und PRC2, sind sowohl unabhängig voneinander als auch synergistisch in der Lage, mittels der beschriebenen Mechanismen ein Abschalten von Genen auszuführen (Leeb et al., 2010). Die Trimethylierung von H3K27 durch PRC2 kann eine Rekrutierung von PRC1 durch die Bindung der PHC Untereinheit induzieren (Kuzmichev et al., 2002). Deshalb kann man in Promoterregionen, die für PRC1 und PRC2 gemeinsame Zielgene darstellen, H3K27me3 als Landmarke für die PcG vermittelte Genrepression ansehen (Richly et al., 2011; Simon and Kingston, 2009).

Muskelzellendifferenzierung und der PRC

Wie in Kapitel 1.1.1 Rhabdomyosarkom erläutert, ist das RMS eine Unterform der Weichteilsarkome. Für das genauere Verständnis epigenetischer und somatischer Mutationen soll daher die normale Muskelzellendifferenzierung und die Bedeutung des PRC in selbiger erläutert werden.

Die myogenen *basic Helix-Loop-Helix* (bHLH) Proteine Myogener Faktor 3 (MyoD) und Myogener Faktor 5 (Myf5) sind spezifisch, wichtig und determinierend für die Differenzierung einer Zelle zu einer Muskelzelle und wirken als aktivierende Transkriptionsfaktoren (Weintraub et al., 1989). Dabei ist Myf5 ein wichtiges Protein für die Differenzierung von epaxialen Myotomen, aus denen sich die Rumpf- und Rückenmuskulatur entwickelt. MyoD positive Progenitor-Zellen hingegen sind für die Entwicklung der Extremitätenmuskulatur wichtig und migrieren vom hypaxialen Myotom in die sich entwickelnden Arme und Beine (Jiwlawat et al., 2018).

Für die Entstehung von Muskelgewebe proliferieren zunächst Myoblasten in Anwesenheit von *fibroblast growth factor* (FGF). Wenn FGF verbraucht ist, beginnen die *PAX3* und/oder *PAX7* exprimierenden Progenitorzellen mit ihrer terminalen Differenzierung und sekretieren u.a. Fibronektin in ihre extrazelluläre Matrix (Buckingham and Relaix, 2015; Menko and Boettiger, 1987). Durch die jetzt exprimierten bHLH Proteine ist das Schicksal der Zelle besiegelt. Sie formt sich zu Myotuben durch die Expression von späten Muskel regulierende Faktoren wie Myogenin G (MyoG), MRF4 und *myosin heavy chain* (MHC) (Jiwlawat et al., 2018), sowie der Herunterregulation von *PAX3* und *PAX7* (Buckingham et al., 2003). Der nächste Schritt ist das *alignment* der Myotuben in Ketten. Verschiedene Zelladhäsionsmoleküle (CAM's) und Integrine steuern das Ausrichten, bevor die Calcium-abhängige Fusion zu Muskelfasern als letzter Schritt stattfindet (Knudsen, 1985; Knudsen et al., 1990).

Myoblasten, die keine Myozyten bilden, dedifferenzieren zu Satellitenzellen. In begrenztem Umfang können diese unter der Basalmembran sitzenden Zellen beim Erwachsenen zur Muskelregeneration beitragen (Gilbert, 2000). Die Regenerationsfähigkeit für Muskelgewebe ist jedoch sehr gering, so dass meist eine bindegewebige Narbe entsteht. Trotzdem ist diese begrenzte Regenerationsfähigkeit ein Hinweis auf die Plastizität epigenetischer Expressionsmuster.

PRC-EZH2 ist besonders in proliferierendem Gewebe, für die Muskulatur in Myoblasten, dominant exprimiert; dabei wird er über *muscle creatin kinase* (*mCK*) als Zielgen rekrutiert (Stojic et al., 2011). PRC2, aktiviert durch den Transkriptionsfaktor Ying Yang 1 (YY1), verhindert zusammen mit der HDAC1 eine verfrühte Differenzierung (Caretta et al., 2004). Neben diesem Effekt erlaubt nur eine Herunterregulation von EZH2 die Aktivierung muskelspezifischer Gene und eine Ausdifferenzierung durch MyoD (Juan et al., 2009). Des Weiteren konnte Caretti et al. zeigen, dass eine erhöhte EZH2 Expression die Differenzierung von Muskelgewebe sogar inhibiert (Caretta et al., 2004).

Die Herabregulierung von EZH2 *in vitro* geht mit einer Hypomethylierung von H3K9 einher (Palacios and Puri, 2006). Eine hohe Expression von acetyliertem H3K9 korreliert deutlich mit aktiven Promoterregionen im Genom (Karmodiya et al., 2012; Li et al., 2007).

Eine Schlüsselstelle der Muskelentwicklung ist das Umschalten des Zellprogramms von Proliferation auf Differenzierung. Diesen Mechanismus zeigt Abb. 5. Die Differenzierung beginnt mit der Dissoziation von PRC2, YY1 und HDAC1 weg von den Muskelloci. Anschließend entfernt die Demethylase UTX den epigenetischen Marker H3K27me3 und ersetzt ihn durch eine Trimethylierung von H3K4 (Caretti et al., 2004; Hong et al., 2007; Marchesi et al., 2014). Sobald H3K27me3 entfernt wurde, können MyoD, Acetyltransferasen (HAT) und andere Transkriptionsfaktoren, die eine Differenzierung einleiten, an die vorher blockierten Muskelloci binden (Caretti et al., 2004). MyoD aktiviert anschließend PRC-EZH1, dessen erhöhte Expression mit transkriptioneller Aktivierung Muskel-spezifischer Gene einhergeht (Mousavi et al., 2012). Auch während der Myogenese regulieren mRNA's EZH2 Expression und PRC2 Aktivität (Marchesi et al., 2014).

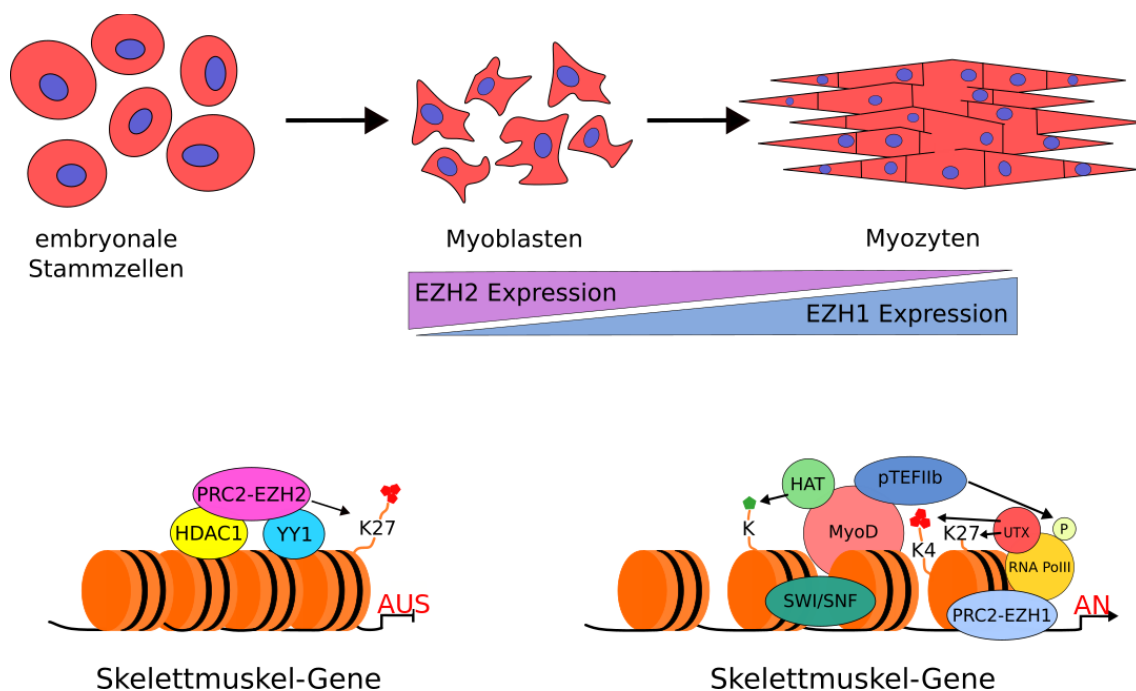


Abb. 5: Rolle des EZH2 während der Muskeldifferenzierung. Regulatorische DNA-Bereiche für Muskel-spezifische Gene werden durch HDAC1 und das an die DNA bindende Protein YY1 okkupiert; dieses wiederum kann EZH2 rekrutieren. Durch die Trimethylierung (rote Fünfecke) von H3K27 und durch die Deacetylierung von Lysin-Resten durch HDAC1 werden die Transkription Skelettmuskel-spezifischer Gene und eine frühzeitige Differenzierung verhindert und die Histone zu Heterochromatin verdichtet. Zu Beginn der Myogenese nimmt die EZH2 Expression ab und wird durch EZH1 an den Muskel-Loci ersetzt. Die Trimethylierung von H3K27 wird durch UTX entfernt und durch die Trimethylierung (rote Fünfecke) von H3K4 ersetzt. MyoD, Acetyltransferasen (HAT mit Acetylierung = grünes Fünfeck) und andere Transkriptionsfaktoren binden an die jetzt euchromatisch organisierten Skelettmuskel-spezifischen Loci. Folglich erhöht sich die transkriptionelle Aktivität und eine Muskeldifferenzierung wird induziert. (erstellt mit Inkscape; übernommen aus (Marchesi et al., 2014))

PAX3 und PAX7, die unter anderem in Satellitenzellen unterhalb der Basalmembran exprimiert werden, treten auch in rhabdoiden Tumorzellen vermehrt auf. Diese erhöhte Expression ist mit Proliferation und Stammzellstatus assoziiert (Aguirre-Arteta et al., 2000; Palacios and Puri, 2006).

Epigenetische Prozesse regulieren den kritischen Übergang vom unreifen proliferierenden Myoblasten zum eigentlichen Muskelgewebe, sowie die Dedifferenzierung von stammzellähnlichen Zellen wie den Satellitenzellen (Robinson D.C.L., 2018). Die These, dass Veränderungen der Epigenetik mit Fehlentwicklung und Tumorgenese zusammen hängen, liegt daher nahe (Esteller, 2007).

1.2.2 EZH2 und seine Bedeutung in der Tumorentstehung

Karzinome präsentieren häufig einen undifferenzierten Stammzell-ähnlichen Phänotyp. Tatsächlich spielen einige Signalwege, die eine Zelle als Stammzelle definieren und diesen Status aufrechterhalten, auch in der Onkogenese eine Rolle (Laugesen and Helin, 2014). Ein modernes Verständnis der Entstehung maligner Erkrankungen zieht epigenetische Veränderungen in onkologische Prozesse mit ein. Die Entdeckungen von zahlreichen sich wiederholenden somatischen Mutationen für Chromatin-regulierende Proteine lassen den Schluss zu, dass eine dysfunktionale und deregulierte Chromatinstruktur eine kausale Rolle bei Krebserkrankungen spielt (You and Jones, 2012). EZH2, die katalytische Untereinheit des PRC2, wird vor allem in proliferierendem Gewebe vermehrt exprimiert. Ein wichtiger Definitionsbaustein für Karzinome ist ihr unreguliertes Proliferationsverhalten, was sich u.a. durch erhöhte EZH2 Expression erklären lässt (Marchesi I, 2013). Es ist jedoch schwierig zu unterscheiden, ob eine erhöhte EZH2 Expression Ursache oder Folge eines onkogenen Prozesses ist (Laugesen et al., 2016).

Einen ersten Hinweis auf eine Beteiligung von PRC an karzinogenen Prozessen lieferte vor knapp 30 Jahren die Entdeckung, dass BMI1 mit dem onkogenen Signalweg Myc in Lymphomen kooperiert (van Lohuizen et al., 1991). Weitere Studien und Analysen zeigten für über 18 verschiedene Krebsarten wie z.B. Prostatakarzinome oder pädiatrische Weichteilsarkome ein Einhergehen einer erhöhten PRC2 Expression mit vermehrtem Lymphknotenbefall und/oder Metastasen, sowie schlechterem *Outcome* (Jiang et al., 2016; Kleer et al., 2003; Ramaglia et al., 2016; Varambally et al., 2002). *Knock-down* Studien zeigten seine Relevanz für ein Aufrechterhalten der Proliferation in

Krebszellen (Bracken et al., 2003). In der Onkogenese treten PRC2 betreffende Mutationen frühzeitig und stabil über den onkotischen Entstehungsprozess auf (Bodor et al., 2013). Zusammengenommen lässt dies auf eine onkogene Triebkraft der erhöhten PRC2 Expression in einigen Tumoren schließen (Jiang et al., 2016; Kleer et al., 2003; van Lohuizen, 1991; Varambally et al., 2002).

Auf molekularbiologischer Ebene sind einige der Hauptangriffspunkte für PRC2 Tumorsuppressorgene wie z.B. der Ink4b/Arf/Ink4a Locus (Muller et al., 2001). Dieser Locus codiert für die Zyklin-abhängigen Kinaseinhibitoren p15 (Ink4b) und p16 (Ink4a) und das Protein Adenosyl-Ribosylierungs-Faktor (ARF). Alle drei Proteine spielen eine Rolle in Tumorsuppressor-Netzwerken, die bei Tumoren deaktiviert sind, und beeinflussen physiologische Schlüsselprozesse, wie z.B. Apoptose und Stammzellerneuerung (Gil and Peters, 2006). Folglich führt eine abnormale Hochregulation von EZH2 zu unkontrollierter Proliferation und Inhibierung der Apoptose, bedingt durch die Kombination von gesteigerter Selbsterneuerung und das Fehlen von Zelldifferenzierung (Richly et al., 2011). EZH2 inhibiert auch miRNA's und weitere Tumorsuppressoren wie p21, Phosphatase und Tensin Homolog (PTEN), mRNA-31 und BIM1, nachgewiesen in verschiedenen Tumorarten wie dem Malignen Melanom, Prostata- und Kolonkarzinom (Asangani et al., 2013; Chen et al., 2005a; Fan et al., 2011; Kirmizis et al., 2004). Abb. 6 zeigt mögliche onkogene Wirkungen des PRC durch die Inhibition von Tumorsuppressoren.

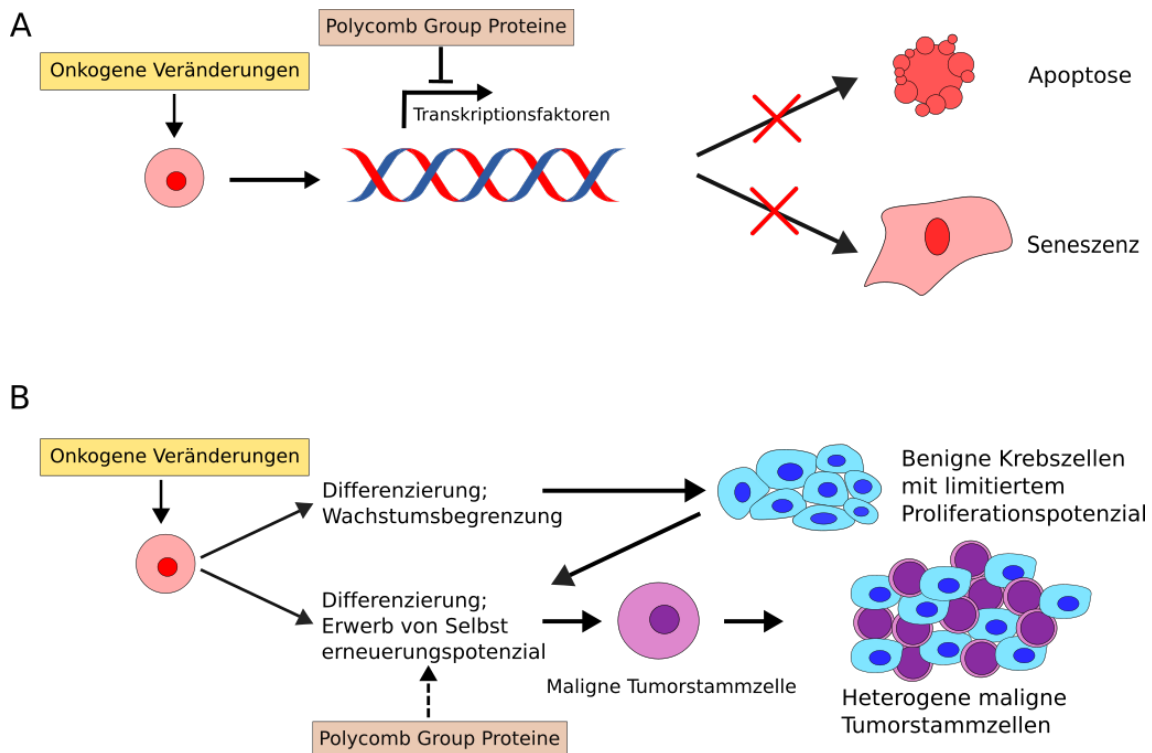


Abb. 6: Potenzielle Funktionen des PRC in der Tumorentwicklung. (A) PcG Proteine unterdrücken die Transkriptionsfaktoren, die normalerweise eine unkontrollierte Proliferation verhindern und zelluläre Schutzmechanismen wie Seneszenz oder Apoptose einleiten. (B) PRC vermittelte Stammzellregulierung könnte ebenfalls für die onkogene Wirkung dieser Proteinfamilie stehen. Tumorzellen, die noch keinen Tumorstammzellstatus erlangt haben, haben ein limitiertes Wachstumspotenzial und werden nur begrenzt und daher benigne Formen annehmen. Durch den Erwerb der Fähigkeit zur Selbsterneuerung, möglicherweise durch die inadäquate PcG Expression, erlangen die vormalig benignen Wachstumsformen maligne Charakteristika wie neoplastisches Wachstum und Tumorstammzellstatus. (erstellt mit Inkscape)

Interessanterweise können zu niedrige PRC2 Level in einigen Geweben einen kanzerogenen Effekt haben. So führen Punktmutationen bei primärer Myelofibrose, myelodysplastischen und myeloproliferativen Syndromen zu einer *Loss-of-Function* Mutation und konsekutiver EZH2 Inaktivierung. Diese wiederum geht mit insgesamt schlechterem Überleben einher, unabhängig von weiteren Risikofaktoren (Ernst et al., 2010; Guglielmelli et al., 2011). Woher dieser Widerspruch kommt, ist Gegenstand aktueller Forschung.

Die Rolle des EZH2 in der Rhabdomyosarkom Entstehung

RMS Zellen exprimieren in unterschiedlichem Maße verschiedene Marker der frühen Muskeldifferenzierung. Dabei scheitern die Tumorzellen im Zellzyklus-Arrest zu verbleiben und ihre Differenzierung zu vervollständigen (Sebire and Malone, 2003). Daraus folgt unkontrollierte Proliferation und inkomplette Myogenese. In der malignen

Entstehung des RMS wurde für ERMS wie für ARMS eine erhöhte EZH2 Expression nachgewiesen (Ciarapica et al., 2009). Die Expressionsmuster von EZH2 sind assoziiert mit der Repression von muskeldifferenzierenden Genen. Im ERMS kann EZH2 sogar Zielgene von MyoD und den Transkriptionsfaktor MyoD selbst unterdrücken (Marchesi et al., 2014). Bei einer Hemmung von EZH2 werden MyoD und Muskel-spezifische Gene vermehrt exprimiert, diese wiederum fördern die Rekrutierung von RNA Polymerase II an Gen-Loci, was zu einer partiellen Wiederherstellung des Phänotyps führt (Marchesi et al., 2012).

In ARMS, mit der genetischen Aberration von PAX3-FOXO1, ist bei *knock-down* von EZH2 ein großer Effekt auf das Zellüberleben zu beobachten. Es wird Apoptose induziert. Dieser Effekt wird über die transkriptionelle Aufhebung der Verdrängung des Fox Protein 32 (FOXO32 oder Atrogin1/MAFbx), ein Gen für die Muskelhomöostase, erzielt (Ciarapica et al., 2014b). Diese Studie zeigte außerdem, dass eine pharmakologische Inhibierung von EZH2 phänotypische und molekulare Effekte wie EZH2 *knock-down in vitro* imitiert und Tumorwachstum *in vivo* verhindert (Ciarapica et al., 2014b). Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass epigenetische Veränderungen von EZH2 eine Schlüsselrolle bei der Stammzell-Dedifferenzierung einnehmen und ihre Modulierung ein potenzieller Angriffspunkt in der Therapie des RMS darstellen kann.

1.3 Verwendete epigenetische Inhibitoren

3-Deazaneplanocin A [DZNep]

DZNep (Merck, Darmstadt, Deutschland) ist ein Inhibitor der S-Adenosyl-Hydrolase und erhöht über diese Inhibierung die S-Adenosylhomocystein (SAH) Konzentration. SAH wiederum inhibiert die Aktivität des Polycomb Repressive Komplexes (PRC) (Fiskus et al., 2009). Zusätzlich erhöht DZNep u.a. p16 und p21, was zu einem G1-Phasen Zellzyklus-Arrest und infolge dessen zu einer Proliferationshemmung führt (Nakagawa et al., 2014; Ueda et al., 2014). DZNep inhibiert die Tri- bzw. Dimethylierung von H3K27 und H4K20 bzw. H3K9 und induziert nachweislich Apoptose über FOXO32 in Krebszellen (Tan et al., 2007). Ein weiterer Effekt von DZNep ist die Rekrutierung von DNMT zu methyliertem Cytosin an den CpG Inseln, um die Promoterregionen bestimmter PRC2 Zielgene zu inhibieren (Vire et al., 2006). Das im Versuch

verwendete DZNep wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und eine Stocklösung von 10mM hergestellt.

Adenosine, dialdehyde [AdOx]

AdOx (Merck, Darmstadt, Deutschland) gilt als genereller Histon Methylierungs-Transferase-Inhibitor. Der Wirkmechanismus basiert auf einer Inhibierung der S-adenosylhomocystein Hydrolase, wodurch S-Adenosylhomocystein akkumuliert. Diese Akkumulation führt zu einer Inhibierung aller Methyltransferasen, deren Methylspender SAM ist (Chen et al., 2004). Das AdOx wurde in einer DMSO Lösung (5 mM) gelöst.

EPZ005687

EPZ005687 (Cayman Chemicals, Michigan, USA) greift an der Su3-9, Enhancer of zeste, Trithorax (SET)-Domain, einer konservativen Protein Domäne des PRC an und hemmt somit dessen Enzymaktivität. Die Bindungsspezifität am PRC ist für EPZ005687 500x größer, verglichen mit 15 anderen Methyltransferasen, wie Knutson et al. zeigt (Knutson et al., 2012; Yamagishi and Uchimaru, 2017), wobei EPZ005687 sowohl an den Wildtyp wie mutiertes EZH2 binden kann (Gan et al., 2018). Auch im Vergleich zur ebenfalls verwendeten Substanz DZNep zeigt EPZ005687 eine konzentrationsabhängige Reduzierung spezifisch für H3K27me (und keine Weiteren an anderen Histonmethyl-Bindungsstellen) (Knutson et al., 2012).

EPZ005687 hat keinen Effekt auf Proliferation und Zellzyklusrate, sowie kaum Einfluss auf die H3K27me bei normalen CD34+ Stammzellen des Knochenmarks (Tang et al., 2014). Allerdings konnte gezeigt werden, dass EPZ005687 durch die verminderte H3K27-Methylierung die Proliferationsrate von Tumorzellen nach frühestens 24h senkt. Dabei ist durchaus mit einer Latenz des wachstumshemmenden Effekts um bis zu 4 Tage zu rechnen (Knutson et al., 2012). Der Proliferationsstopp geht mit einer Zunahme der G1-Phase des Zellzyklus einher, dazu korrelierend nehmen die S- und G2/M-Phase ab. EPZ005687 wurde im Rahmen eines „high-throughput“ Biochemie-Screening entdeckt und zeigte in Studien an Lymphomzellen bisher eine gute Reduzierung der EZH2-Expression (Fioravanti et al., 2018).

Das hier verwendete EPZ005687 wurde in DMSO gelöst und eine Stocklösung von 5 mM hergestellt.

Die nachfolgende Abbildung soll die Wirkweise der Inhibitoren nochmals verdeutlichen.

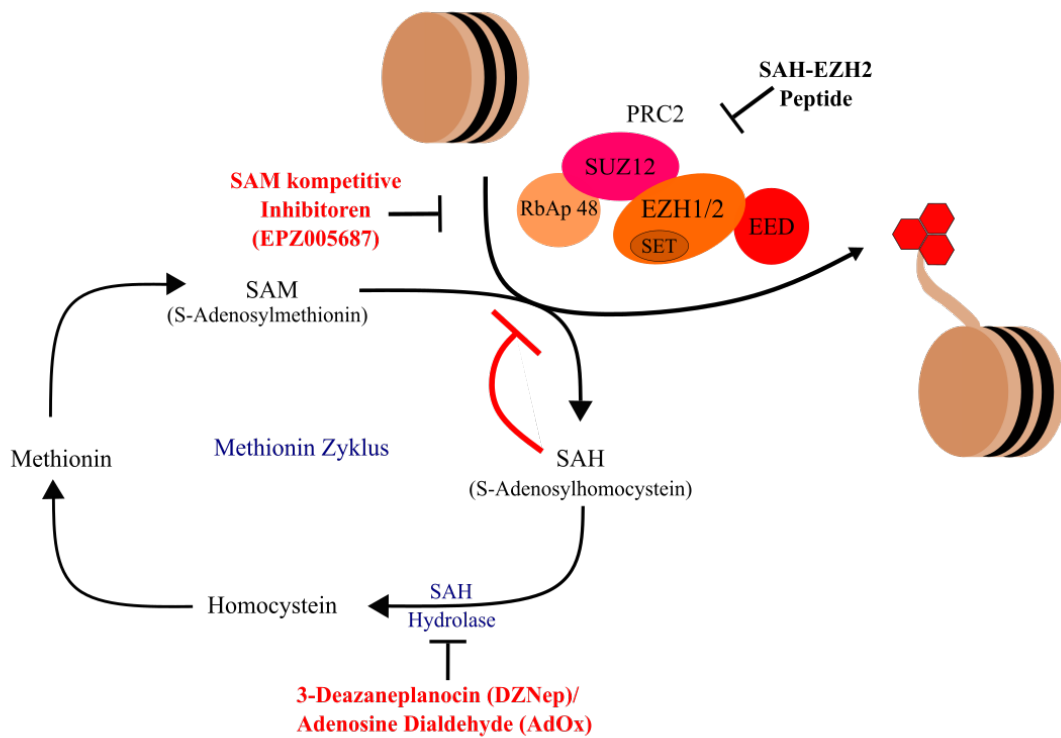


Abb. 7: Methionin Zyklus und Wirkweise verschiedener EZH2 Inhibitoren. DZNep und AdOx wirken als Inhibitoren der SAH Hydrolase, was zu einer SAH Akkumulation mit Inhibierung der EZH2 Aktivität und weiterer Methyltransferasen führt (vgl. roter Pfeil). So genannte SAM Inhibitoren konkurrieren kompetitiv mit SAM um die SAH-Bindungsstelle. Hierzu zählt EPZ005687. Zuletzt sei noch auf die SAH-EZH2 Peptide hingewiesen, die die PRC2 Zusammenlagerung und somit seine Funktion stören (erstellt mit Inkscape).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Für fortgeschrittene Tumorstadien oder Rezidive ist das mittlere Überleben beim RMS im Kindesalter weiterhin schlecht. Zudem können durch die multimodalen Therapien schwere Akut-Toxizitäten und langfristige Nebenwirkungen auftreten. Insbesondere bei bestimmten RMS-Risikosituationen, wie dem ARMS-Subtyp, fortgeschrittener lokaler Tumorausbreitung oder bei Fernmetastasierung besteht Handlungsbedarf im Hinblick auf die Etablierung neuer Therapiemöglichkeiten und -strategien. Diese sollten auf die Minimierung von Spätfolgen und akuten Nebenwirkungen, sowie auf die erfolgreiche Behandlung der Tumorerkrankung abzielen.

Die neueren Erkenntnisse über geänderte Cytosin-Methylierungsmuster und epigenetische Mutationen verändern grundlegend unser Verständnis von Krebserkrankungen. Dies wird auch Einfluss auf die Diagnostik und Therapie von Malignomen haben. Mit epigenetischen Inhibitoren in klinischer Erprobung geht die Medizin erste Schritte in diese Richtung; an deren Ende könnte die Etablierung epigenetischer Therapien als weiterer Baustein multimodaler und individualisierter Behandlung stehen. Ziel der vorliegenden Arbeit ist eine mögliche epigenetische Regulation in soliden Tumoren des Kindesalters am Beispiel des Rhabdomyosarkoms (*in vitro*) zu evaluieren und damit einen ersten Schritt zu einer möglichen epigenetischen Therapie zu gehen. Hierzu wurde der Einfluss der epigenetischen Inhibitoren AdOx, DZNep und EPZ005687 auf die RMS-Zelllinien RD, RH30 und SRH im Hinblick auf die EZH2-Expression, das Wachstumsverhalten und die Apoptose untersucht.

Dabei untersucht die vorliegende Arbeit folgende drei Kernfragen:

- Welchen Einfluss haben die Substanzen AdOx, DZNep und EPZ005687 auf die RMS-Zelllinien RD, RH30 und SRH im Hinblick auf die Expression von EZH2, das Wachstumsverhalten und die Apoptose?
- Wie vergleichbar oder unterschiedlich sind die verwendeten Inhibitoren, auch im Hinblick auf ihren zugrunde liegenden Wirkmechanismus?
- Ergeben sich aus den gewonnenen Ergebnissen Konsequenzen zu neuen therapeutischen Ansätzen bei Rhabdomyosarkomen?

2. Material und Methoden

2.1 Material

Allgemein verwendete Verbrauchsmaterialien und Geräte sind hier aufgeführt. Die für jeden Versuch spezifisch verwendeten Stoffe sind unter den einzelnen Unterpunkten zu finden.

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Übersicht Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Desinfektionsspray, Descosept AF	Dr. Schuhmacher GmbH, Malsfeld
Einwegpinzetten, steril	Servopax GmbH, Wesel
Entsorgungsbeutel, PP autoklavierbar	BRAND GmbH und Co KG, Wertheim
Handschuhe nitrile, powder-free	Abena GmbH, Zörbig
Handschuhe Peha-Soft nitrile GUARD	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Pasteur-Kapillarpipetten 230nm	Wilhelm Ulbrich GdHR, Mainz
Pipette, Eppendorf Reference	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten (Falcon serologisch) (2, 5, 10 und 25ml)	Corning Incorporated, New York, USA
Pipettenspitzen (0,5 -20 µl, Kristall E)	Ratiolab GmbH, Dreieich
Pipettenspitzen (100-200 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (1000 µl)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Reaktionsgefäße (Safe Lock, 0,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (Safe Lock, 1,5-2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Zellkulturflaschen (Cellstar 125cm ² , 75cm ²)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturplatten (6, 12, 96 Well)	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen - konischer Boden (15ml & 50ml)	Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen

2.1.2 Geräte/Hilfsmittel

Tabelle 2: Geräte und Hilfsmittel

Bezeichnung	Hersteller
Eismaschine	Scotsman, Ipswich, Großbritannien
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr, Ochsenhausen
MilliQ-Wasseraufbereitungsanlage	Millipore, Molsheim, Frankreich

Pipettierhilfe Pipetboy acu Integra	Bioscience AG, Chur, Schweiz
Sterilbank (Msc-Advantage)	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Stoppuhr TachoSil	Inspirion GmbH, Bremen
Taschenrechner (Sharp EL-243S)	Sharp Devices Europe GmbH, München
Tischabzug	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG, Wangen
Ultraschallreiniger Sonorex RK 106	Bandelin electronic GmbH & Co KG, Berlin
Vakuumpumpe EcoVac	Schuett-biotec GmbH, Göttingen
Vortex-Schüttler VF2	Janke & Kunkel, Labortechnik, Staufen
Zentrifuge Multifuge 1S-R	Heracus, Hanau

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultivierung

Zelllinien

Für die Experimente wurden sowohl Rhabdomyosarkom (RMS)-Zelllinien vom alveolären (RH30) als auch embryonalen Subtyp (RD und SRH) verwendet. Als gesundes Muskelgewebe bzw. als Vergleichsgewebe zum RMS wurden humane Skelettmuskelzellen (SkMc) verwendet.

RD

Die Zelllinie RD (ATCC, Manassas, USA) wurde aus dem RMS-Rezidiv eines 7-jährigen Mädchens kultiviert. Zum Entnahmezeitpunkt war bereits mit Cyclophosphamid und Bestrahlung vortherapiert worden. RD Zellen zeigen eine Amplifikation des Transkriptionsfaktors MYC und eine Mutation des NRAS-Gens mit Überexpression von Sprouty RTK Signaling Antagonist 1 (SPRY1) (Felix et al., 1992; Hinson et al., 2013).

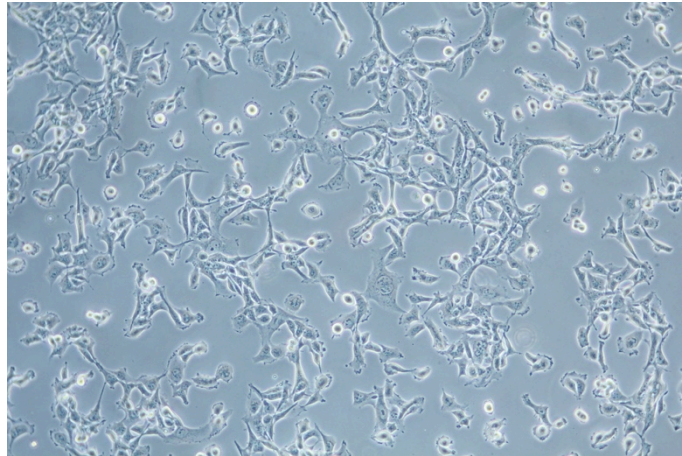


Abb. 8: RD-Zelllinie. Das Foto zeigt die embryonale Zelllinie RD unter Standard-Kulturbedingungen (eigene Aufnahme)

RH30

Die Zelllinie RH30 (DSMZ, Braunschweig) entstammt ursprünglich aus einer Knochenmetastase mit Primarius in der hinteren Schädelgrube von einem 16-jährigen jungen Mann mit undifferenziertem alveolärem Rhabdomyosarkom. RH30 Zellen sind durch eine Translokation $t(2;13)(q35;q14)$ charakterisiert, was zu einem Fusionsgen PAX3-FOXO1A führt und eine Zuordnung in die FPRMS-Subgruppe erlaubt. Die Zellen exprimieren ein mutiertes p53 und hohe Spiegel von Myogenin und MyoD, wichtige Differenzierungsmarker der Myogenese (Hinson et al., 2013; Rodriguez-Perales et al., 2004).

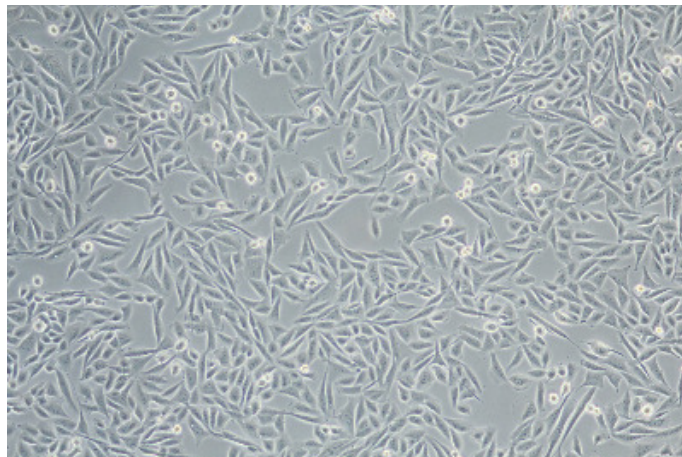


Abb. 9: RH30-Zelllinie. Das Foto zeigt die alveoläre Zelllinie RH30 unter Standard-Kulturbedingungen aufgenommen mit AxioVision

SRH

Die Zelllinie SRH wurde 2020 am UKT Tübingen von Dr. Sabine Schleicher etabliert und ist aus einem spindelzelligem, sklerosierendem embryonalen Rhabdomyosarkom isoliert worden. Die Zelllinie stammt aus einem Unterschenkelresektat einer 24-jährigen Frau und weist einen komplex aberranten Chromosomensatz mit u.a. Nachweis einer Trisomie 12q und einer Deletion 6q23 auf. Diese Zelllinie zeigt eine Überexprimierung des *Maus-Doppel-Minute 2 (MDM2)* Gens, was zu einer Inaktivierung von p53 führt. Initial war das Tumorstadium pT2b, pNx, pMx, L0, V0. Das anschließende Staging zeigte mehrere Knochenmetastasen im Lendenwirbelsäulen-, Schädel- und Femurbereich, im Verlauf auch intrapulmonale und intrahepatische Metastasen. Initial wurde mit einem Chemotherapie-Protokoll von 2002 nach Guidance der Cooperativen Weichteilsarkom Studiengruppe (CWS) mit Vincristin Actinomycin D, Ifosfamid und Adriamycin (VAIA III) behandelt. Bei Progress der Grunderkrankung nach über einem halben Jahr wurde die Therapie auf Carboplatin/Etoposid kombiniert mit oralem Trofosfamid umgestellt. Leider jedoch ohne Erfolg, so dass die Patientin kurz darauf verstarb (Schleicher et al., 2020).

Aufgrund der Neuartigkeit der Zelllinie sind in der vorliegenden Arbeit nur Zellviabilität und 2D-Migration zur SRH-Zelllinie untersucht worden.

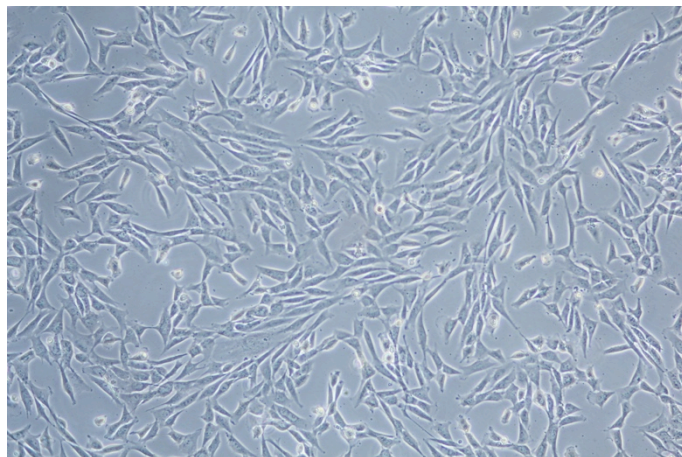


Abb. 10: SRH-Zelllinie. Das Foto zeigt die Zelllinie SRH unter Standard-Kulturbedingungen (eigene Aufnahme)

SkMc

Die Zelllinie SkMc (PromoCell, Deutschland) wird aus verschiedenen Muskeln erwachsener Spender gewonnen. Sie sind *sarcomer myosin* positiv, exprimieren aber kein α -Aktin. Ruhende Satellitenzellen reagieren auf einen Stimulus wie eine Muskelverletzung und beginnen zu proliferieren, sie werden zu Myoblasten. Diese fusionieren anschließend mit den geschädigten Muskelfasern oder mit ihresgleichen und bilden neue Myotuben. SkMc werden als erneut proliferierende Satellitenzellen angesehen (Owens et al., 2013). Die Größe der einzelnen Zellen und die Verdopplungszeit lassen für SkMc nur sehr begrenzt Untersuchungen zu.

Subkultivierung

Das zur Routinekultivierung verwendete Zellkulturmedium setzte sich zu 88 % aus Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (w 3,7 g/L NaHCO₃ w 4,5 g/L D-Glucose, w/o Na-Pyruvate; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) und den Zusätzen Fetal Calf Serum (FCS; 10 %; BioChrom GmbH, Berlin), 1 % Streptomycin/Penicillin (je 10.000 µg/ml; BioChrom GmbH, Berlin) und 1 % L-Glutamin (200 mM; BioChrom GmbH, Berlin) zusammen. Die verwendeten Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen verschiedener Grundflächen (75 cm² oder 125 cm², entspricht T-75 oder T-125) in einem Brutschrank bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert. Um sauber und steril zu arbeiten wurden jegliche Arbeitsschritte unter einer biologischen Sicherheitswerkbank der Klasse II, welche vor und nach Benutzung desinfiziert wurde, durchgeführt. Auch die verwendeten Materialien waren vor Gebrauch autoklaviert, steril verpackt oder wurden desinfiziert. Mit Ausnahme der Antikörper und Enzyme wurden alle Reagenzien vor Benutzung bei 37 °C im Wasserbad erwärmt.

Die Zellen wurden mit täglichen lichtmikroskopischen Kontrollen auf Konfluenz untersucht und bei einer 80-90 % Konfluenz passagiert. Zum Passagieren wurde zunächst das Medium mit Pasteur-Pipetten abgesaugt und die Zellen mit Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) gewaschen. Die adhärennten Zellen wurden anschließend enzymatisch mit Trypsin-EDTA bei 37 °C inkubiert um sie vom Flaschenboden zu lösen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von frischem Zellkulturmedium gestoppt und die Zellen im benötigten Volumen resuspendiert. Zur Weiterverarbeitung konnte nun ein Teil der

Zellen entnommen, verworfen oder in eine neue Kulturflasche überführt werden. Abschließend wurde die Zellkulturflasche mit Zellkulturmedium je nach Flaschengröße befüllt und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ weiter kultiviert.

Tabelle 3: Zur Subkultivierung verwendete Materialien und Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank BBD 6220	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH, Darmstadt
PBS (ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Mikroskop Axioskop 40	Carl Zeiss, Oberkochen
Mikroskop Leica DMi1	Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar
Pasteur-Kapillarpipetten 230mm	Wilhelm Ulbrich GdbR, Mainz
Trypanblau (0,4%)	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
Trypsin (Trypsin/EDTA, 0,05%, Gibco)	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Wasserbad Typ 1003	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Zellkulturflaschen (Cellstar, 75cm ² , 125 cm ²)	Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen

Kryokonservierung und Auftauen

Zur Kryokonservierung wurden 1.5 bis 2 Mio. Zellen im Einfriermedium (Tabelle 4) resuspendiert und in 1,5 ml Kryoröhrchen aliquotiert. Die Kryoröhrchen mit der Zellsuspension wurde in einem Gefrierbehälter, der mit Isopropanol befüllt war um ein gleichmäßiges Einfrieren um 1 °C/min zu gewährleisten, im -80 °C Gefrierschrank eingefroren. Für eine längerfristige Einlagerung wurden die Zellen bei -196 °C in Flüssigstickstoff aufbewahrt.

Das Auftauen der eingefrorenen Zellen wurde im Wasserbad bei 37 °C begonnen. Nachdem die Zellen aufgetaut waren, wurden sie in warmem Zellkulturmedium resuspendiert und bei 1500 rpm für 5 min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Pellet resuspendiert und die Zellen in frisches Zellkulturmedium in eine T-75 Zellkulturflasche überführt und bei 37 °C inkubiert. Bereits nach 24 h erfolgte der erste Mediumwechsel um restliches DMSO zu entfernen. Vor Verwendung der Tumorzellen für Zellversuche wurden die Zellen ein- bis zweimal passagiert, um eine vollständige Regeneration zu gewährleisten.

Tabelle 4: Verwendete Geräte und Reagenzien zum Einfrieren und Auftauen

Bezeichnung	Hersteller
Gefrierbehälter (5100 Cryo „Mr. Frosty“)	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Hochleistungs-Laborgefriergerät Forma Scientific -80 °C Freezer	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Kryoröhrchen Cryo.s	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Einfríermedium: <ul style="list-style-type: none"> ▪ 90 % FCS (fetales Kälberserum) ▪ 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) 	Biochrom GmbH, Berlin AppliChem GmbH, Darmstadt
Stickstofftank CryoSystem 4000 Chart	MVE BioMedical, Ball Ground, USA

Zellzahlbestimmung

Um eine gleiche Basis für jeden Versuch und die gleiche Zellzahl für verschiedene Versuchsdurchläufe zu erhalten, wurden die Zellen vor der weiteren Verwendung gezählt und auf 1×10^6 Zellen/ml Stammlösung eingestellt. Nach dem Passagieren der Zellen wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl des Vitalfarbstoffs Trypanblau vermischt und 10µl dieses Gemischs auf eine Neubauer-Zählkammer pipettiert.

Trypanblau hat die Eigenschaft, tote Zellen ohne intakte Zellmembran anzufärben. Gesunde Zellen hingegen erscheinen unter dem Mikroskop ungefärbt-weißlich, da die Substanz die Zellmembran nicht passieren kann (Strober, 2001).

Die viablen Zellen in den vier Eckquadranten der Zählkammer wurden ausgezählt und die Zellzahl mit folgender Formel bestimmt:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{n}{4 (\text{Quadrate})} \times V \times 10^4$$

n = gezählte Zellen

V = Verdünnungsfaktor (1:1 Verhältnis → *V*=2)

ml = Gesamtvolumen der Zellsuspension

10 = Volumenfaktor eines Quadrates

Anschließend werden die Zellen zentrifugiert (1500 rpm, 5 min bei RT), der Überstand verworfen und mit dem berechneten Volumen auf 10^6 Zellen/ml eingestellt.

2.2.2 Western Blot

Der Western Blot dient der Detektion und Separierung von Proteinen nach qualitativen und semiquantitativen Kriterien. Diese molekularbiologische Technik trennt nach vorhergegangener Lyse der Zellen zunächst alle Proteine mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) – abhängig von Molekulargewicht, verwendetem Gel und Ladung – auf und überträgt sie auf eine Trägermembran (Blotting). Hier wurde mit der vertikalen, diskontinuierlichen Natrium-Dodecyl-Sulfat-PAGE (SDS-PAGE) gearbeitet. Diese zeichnet sich durch Denaturierung der Proteine und Aufbrechen der Disulfidbrücken durch β -Mercaptoethanol aus. Zudem lagert sich SDS an die Proteine und sorgt für eine negative Ladung, so dass nur nach molekularem Gewicht aufgetrennt wird. Die Dicke einer Bande, in Relation zum housekeeping Gen, gibt dabei Aufschluss über die Menge an Protein. Dabei gilt, je dicker die Bande in Relation zum housekeeping Gen, desto mehr Protein desselben Typs war in den Zellen vorhanden (Hnasko and Hnasko, 2015; Mahmood and Yang, 2012).

Herstellung der Proteinproben

Zur Herstellung der Zellysatsproben für die Expression von EZH2 wurden unbehandelte Zellen mit definierten Zellzahlen (Tabelle 5) nach 24h geerntet und weiter verarbeitet.

Tabelle 5: EZH2-Expression - verwendete Zellzahlen je Zelllinie in [ml] – Western Blot

24h		
RD	RH30	SRH
3×10^5	4×10^5	5×10^5

Dabei werden die Zellen mit PBS gewaschen und abtrypsiniert. Die gelösten Zellen werden in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und auf Eis gehalten. Nach der Zentrifugation (5 min, 1500 rpm bei 4 °C) wurde der Überstand verworfen und die Zellen mit Zell-Lysepuffer, Menge entsprechend der Pelletgröße, resuspendiert. Nach zwanzigminütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellysate für 20 min bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C zur weiteren Verwendung eingefroren.

Proteinbestimmung mittels Bradford-Assay

Um den Proteingehalt der Zelllysate zu bestimmen, wurde der Bradford-Assay angewandt.

Dieser basiert auf der Komplexbildung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blau G-250 mit den Seitenketten der Proteine und führt zu einem Farbumschlag in Abhängigkeit der Proteinmenge. Darüber hinaus verschiebt sich das maximale Absorptionsspektrum durch die Bindung des Farbstoffes von 470 nm auf 595 nm, was wiederum Rückschlüsse über den Proteingehalt bei der Absorptionsmessung mit 595 nm zulässt (Georgiou et al., 2008).

Je 800 µl destilliertes (bidest) Wasser wurden mit 200 µl Bradford-Reagenz und mit 1 µl des jeweiligen Lysats in einer Küvette gut vermischt und die Lichtabsorption bei 595 nm Wellenlänge in einem Spektralphotometer gemessen. Durch den Vergleich mit einem Standard – hier wird Lysispuffer statt Lysat hinzupipettiert - wurden die photometrischen Messungen mithilfe des Bovinen Serumalbumins (BSA)-Standardkurve ausgewertet, so dass die nötige Proteinkonzentration pro Elektrophorese-Probe berechnet werden konnte. Dabei wurden 30 µg Protein pro Probe im Western Blot eingesetzt.

Reduzierung

Vor dem eigentlichen Blotting müssen tertiäre und quartäre Strukturen zerstört werden, um Messfehler und Interaktionen zu verhindern. Dazu werden die Lysate mit dem Probenpuffer Roti®-Load 1 (reduzierend, modifiziert nach Lämmli K929.1, Hersteller: Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) versetzt und für 5min auf 95 °C erhitzt. Dieser enthält u.a. 8 % SDS und 20 % β-Mercaptoethanol, wobei SDS die Proteine in ihre primäre Aminosäuresequenz denaturiert und gleichzeitig mit einer negativen Ladung versetzt. β-Mercaptoethanol ist ein Reduktionsmittel, was u.a. Schwefelbrücken spaltet.

SDS-PAGE

Wie Eingangs beschrieben, trennt die SDS-PAGE die denaturierten Proteine mittels vertikal angelegter Spannung nach relativer Größe der Polypeptidketten im Polyacrylamidgel auf. Zuerst wurde das 12 % Trenngel (siehe Tabelle 6) in einen Gießstand gegossen und mit Isopropanol überschichtet, um Luftpfeinschlüsse zu vermeiden. Nach vollständiger Polymerisation wurde es mit dem 4 % Sammelgel überschichtet (Tabelle 6) und ein Kamm für die Proteinprobentaschen eingelegt. Anschließend wurden die

Gele in eine PAGE-Kammer eingebaut, die auf Eis aufgetauten Proben und Proteinleiter in die jeweiligen Taschen pipettiert und bei konstanten 120 V über 90 min als Laufbedingungen mit SDS-Puffer (siehe Tabelle 6) angelegt.

Tabelle 6: Übersicht über verwendete Gele. Volumina in [ml]

Substanz	Trenngel 12% (20ml)	Sammelgel 4% (6ml)
Acrylamid Mix (30%)	8,0	1,0
Ammoniumpersulfat (10%)	0,2	0,06
H ₂ O	6,6	4,2
SDS (10%)	0,2	0,06
TEMED	0,008	0,006
1,5 M Tris (pH 8,8)	5,0	0,75

Protein Transfer und Western Blot

Zur Übertragung der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran, wurde das Gel auf die Nitrozellulose-Membran gelegt, mit Filterpapieren (Whatman Papier) und Schwämmen umgeben und in einer Kassette luftblasenfrei eingeschlossen. Anschließend wurde die Kassette in eine Blotkammer mit Transferpuffer (siehe Tab. 7) gestellt, mit Eis gekühlt und für 90 min. bei konstanten 300 mA geblotet.

Immundetektion

Für die Visualisierung der Zielproteine müssen zunächst alle freien Bindungsstellen abgesättigt werden, damit die verwendeten Antikörper nur spezifisch an die Proteinbanden binden können. Dafür wurde die Membran für 1 h bei RT in 10 % Milchpulver geblockt und anschließend mit dem Primäantikörper EZH2 (D2C9) XP® Rabbit (Cell Signaling mAb #5246 S; 1:1000 in 5 % BSA/TBS-T) für 2h bei RT inkubiert. Verglichen wird die EZH2 Expression gegen das House Keeping Gen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) über den Primäantikörper GAPDH Rabbit (Cell Signaling #2118 S; 1:1000 in 5 % BSA/TBS-T). Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T (Tabelle 7) für je 10 min erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper Anti-rabbit IgG HRP-linked Antibody (Cell Signaling #7074 S; 1:3000 in 5 % MP/TBS-T), durch 1 h Inkubation bei RT. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBS-T für 10 min und der Zugabe von Western Blot Detektionslösung erfolgte die Detektion mittels Chemo-

lumineszenz Odyssey Fc Imaging System. Dabei wurde der Western Sure Pen für die Darstellung der Größenmarker benötigt.

Tabelle 7: Übersicht über Antikörper, Puffer und Lösungen des Western Blot

Puffer und Lösungen (1l)	Zusammensetzung	Hersteller
Anti-rabbit IgG HRP-linked Antibody #7074 S	1:3000 in 5% Milchpulver, mit TBS-T verdünnt	Cell Signaling Technology Cambridge, Großbritannien
BSA (10 %)	10 ml BSA 40 ml TBS-T	Carl Roth, Karlsruhe
EZH2 (D2C9) XP [®] Rabbit mAb #5246 S	1:1000 in 5% BSA, mit TBS-T verdünnt	Cell Signaling Technology Cambridge, Großbritannien
GAPDH Rabbit mAb #2118 S	1:3000 in 5% BSA, mit TBS-T verdünnt	Cell Signaling Technology Cambridge, Großbritannien
Milchpulver (5 %)	5 mg Magermilchpulver 45 mg TBS-T	Carl Roth, Karlsruhe
Milchpulver (10 %)	10 ml Magermilchpulver 40 ml TBS-T	Carl Roth, Karlsruhe
Roti [®] -Load 1 reduzierend	SDS 8%, β -Mercaptoethanol 20%, Glycerin 40%, Bromphenolblau 0,015%	Carl Roth, Karlsruhe
SDS-Laufpuffer (10x)	30,3 g Tris-Base (Trizma Base) 144 g Glycerin 10 g SDS (Natriumlaurylsulfat als Pellet) bidest H ₂ O auf 1000 ml auffüllen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris-gepufferte Saline (TBS) (10x)	24,2 g Tris Base 80 g Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Tris-gepufferte Saline-Tween (TBS-T) (1x)	100 ml TBS (10x) 1 ml Tween 20 899 ml H ₂ O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Transferpuffer (10x)	24 g Tris Base 173 g Glycin bidest H ₂ O auf 1000 ml auffüllen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Tabelle 8: Verwendete Hilfsmittel, Geräte und Reagenzien - Western Blot

Bezeichnung	Hersteller
Acrylamid Stammlösung	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Bovine Serum Albumin (BSA)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Isopropanol	VWR International GmbH, Darmstadt
Küvetten (10x4x45 mm)	Sarstedt AG & Co. Nürmbrecht
LI-COR Image Studio Software	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Mikrozentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Nitrozellulose-Membran	Sartorius AG, Göttingen
Odyssey Fc Imaging System	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Photometer (BioPhotometer D30)	Eppendorf AG, Hamburg
Polyacrylamid-Elektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Polyacrylamidgel-Gießstand	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Protein Assay Farbstoffkonzentrat (Bradford-Reagenz)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Protein-Marker IV10 – 170 kDa	Peglab, Wilmington, USA
Rotiphorese 10x SDS-PAGE	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Thermo-Schüttler PHMT SC20	Grant Instruments, Cambridgeshire, Großbritannien
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Western Blot Detektionslösung (PREMIUM Chemiluminescent)	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Western Sure Pen	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Wet/Tank Blotting System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Whatman Papier (Chromatography Papier 3mm)	Whatman, Maidstone, Großbritannien
Zentrifuge Biofuge 15R	Heraeus, Hanau
Zell-Lysepuffer (1x): <ul style="list-style-type: none"> - 9ml bidest H₂O - 1ml Zell-Lysepuffer (10x) - 1x Protease Inhibitor Cocktail Tablette 	Cell Signaling Technology, Cambridge, GB Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

2.2.3 Viabilitäts-Assay

Mit diesem Assay wird die Viabilität und Stoffwechselaktivität von Zellen durch Umsetzung des wasserlöslichen MTT Reagenz [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid] zu kristallinem Formazan quantifiziert (Terry L Riss, 2013). Diese kolorimetrische Nachweismethode basiert auf der Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH) abhängigen Umsetzung durch mitochondriale Dehydrogenasen und korreliert mit Zellaktivität und somit mit der Viabilität der Zellen (Stockert et al., 2018). Die enzymatisch aktiven Dehydrogenasen finden sich neben den Mitochondrien auch im endoplasmatischen Retikulum (ER). Die gelbliche Lösung des Tetrazoliumsalszes ändert durch die Umsetzung Form und Farbe in violett-bläuliche Formazan-Kristalle, deren Dichte mithilfe eines Plattenspektralphotometers bei einer Wellenlänge von 560 nm durch Lichtabsorption gemessen werden kann. Dabei gilt je mehr Formazankristalle gebildet wurden, desto höher war die Stoffwechselaktivität der Zelle (Gerlier and Thomasset, 1986; Mosmann, 1983).

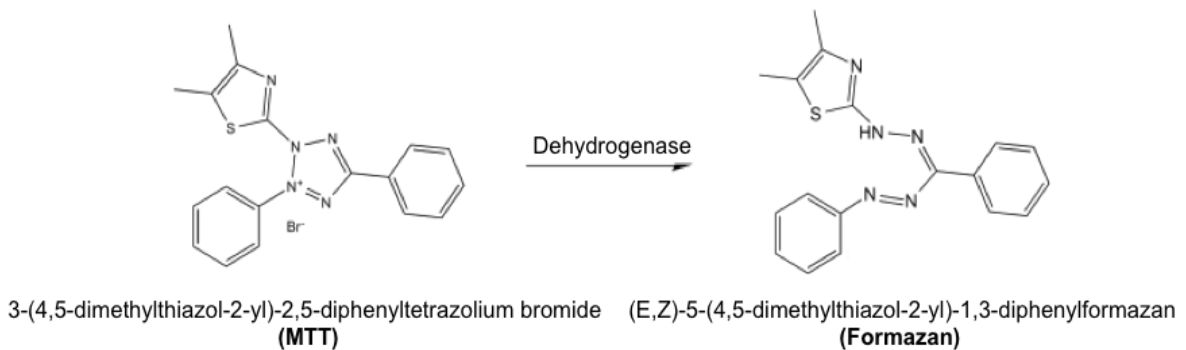


Abb. 11: : Strukturformeln der beim MTT-Assay verwendeten Reagenzien

In Abhängigkeit von der verwendeten Zelllinie (Tabelle 9) wurden zwischen 8×10^3 und 2×10^4 Zellen/Well in 100 μ l Zellkulturmedium auf 96-Well Mikrotiterplatten pipettiert und zum Anwachsen über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Inkubation mit EPZ005687, AdOx und DZNep für 72 h mit Behandlungswechseln alle 24 h mit aufsteigenden Konzentrationen.

Tabelle 9: Zellzahl pro Well - MTT

Zelllinie	Zellzahl (Zellzahl/Well)
RD	$1,5 \times 10^4$
RH30	8×10^3
SRH	2×10^4
SkMc	$1,5 \times 10^4$

Nach 72h Behandlungsdauer wurden 25 µl MTT-Reagenz (5 µg/ml, in PBS gelöst) jedem Well zugegeben und die Platte für 2 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit auf Zellstoff abgekippt und 100 µl Lysepuffer in jede Vertiefung pipettiert. Vor der Messung der Lichtabsorption bei 560 nm am Plattenspektrophotometer wurden die Platten auf dem Plattformschüttler durchgemischt. Die Rohdaten wurden mit der Gen5™ Datenanalyse-Software verarbeitet und anschließend mit Excel bzw. GraphPadPrism 7.0 (La Jolla, USA) analysiert.

Tabelle 10: Verwendete Reagenzien und Geräte - MTT

Bezeichnung	Hersteller
Magnetrührer VarioMAG Monotherm	H&P Labortechnik, München
MTT-Reagenz [5mg/ml])	AppliChem GmbH, Darmstadt
Multipipette (Multipipette Xstream)	Eppendorf AG, Hamburg
Lysepuffer (für 10ml Stocklösung) <ul style="list-style-type: none"> - 9,94ml DMSO (Dimethylsulfoxid) - 0,006ml 99,8% Essigsäure - 1g SDS (Natriumlaurylsulfat in Pelletform) 	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Plattenspektrophotometer ELx800	BioTek Instruments, Bad Friedrichshall
Plattformschüttler Titramax 100	Heidolph Instruments Labortechnik, Schwabach
Zellkulturplatten 96 Well	Sarstedt, Nürnberg

2.2.4 Fluoreszenz-basierte Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, auch *“fluorescent activated cell sorting“* (FACS), ist eine laser-basierte Methode zur qualitativen und quantitativen Analyse von Zellsuspensionen. Sie ermöglicht mittels Umwandlung von optischer in elektronischer Signale eine schnelle und exakte Sortierung von Zellpopulationen, da sie Zellgröße und Zellgranula-

rität, sowie durch Antikörper markierte intra- und extrazelluläre Proteine misst (Adan et al., 2017; Gerlier and Thomasset, 1986; Mosmann, 1983).

Durch Unterdruck wird die zu analysierende Suspension aus dem Proberöhrchen in eine Kapillare angesaugt und dort hydrodynamisch fokussiert. Das bedeutet, dass die Zellen perlschnurartig den Laserstrahl passieren und dabei vom Laserlicht erfasst werden. Dabei entsteht eine messbare Streustrahlung. Diese wird über verschiedene Detektoren, in der Regel Photomultiplier, gemessen und in Volt übersetzt. Dabei wird das gestreute Licht in „im flachen Winkel gebeugtes Licht“ (*forward scattered* = FCS) und in „um 90° gebrochenes Licht“ (*side scattered* = SSC) unterteilt. FCS dient zur Bestimmung der Größe und SSC zur Bestimmung der Granularität. Ebenfalls über SSC-Detektoren und durch farbliche Lichtstrahlen in Blau, Rot und Violett messbar ist ein Energie-Wechsel bei fluoreszierenden Stoffen, die über Antikörper gebunden haben.

Tabelle 11: FACS spezifische Reagenzien und Hilfsmittel

Bezeichnung	Hersteller
Cell WASH solution	Becton Dickinson, Heidelberg
Durchflusszytometer FACS Canto II	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Diva Software Version 8.0	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Flow	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Rinse	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Röhrchen (5ml Rundboden)	Corning Incorporated, New York, USA
FACS-Safe	Becton Dickinson, Heidelberg

2.2.4.1 Apoptose-Assay

Man unterscheidet den aktivierten, genetisch gesteuerten Zelltod, die Apoptose, von der Nekrose, einem akzidentiellen Zelltod durch äußere Faktoren (Elmore, 2007; van Engeland et al., 1998). Beides lässt sich über Annexin V (APC) und Propidium Iodid (PI) in der FACS-Analyse differenzieren (Wlodkowic et al., 2009).

Die Apoptose löst, anders als die Nekrose, keine Entzündungsreaktion im Körper aus und charakterisiert sich über Fragmentierung der Zelle, Abbau der Mitochondrien mit Freisetzung von Cytochrom C und der Exposition des Phospholipids Phosphatidylserin (PS) auf der äußeren Zellmembranschicht. PS findet sich in einer gesunden Zelle nur auf der inneren dem Zytosol zugewandten Zellmembranschicht und wird physiologisch von ATP-abhängigen Flippasen aus der äußeren Schicht nach Innen verschoben. In der

Frühphase der Apoptose stellen die Flippasen ihre Arbeit ein und PS zeigt sich auf der Zelloberfläche. So wird es für den fluoreszenzkonjugierten Apoptose-Marker Annexin V zugänglich (Peng et al. (2001);(Vermees et al., 1995).

Die Nekrose stellt den unkontrollierten Zelluntergang dar, z.B. ausgelöst durch Toxine, Krankheitserreger oder mechanische Schädigung. Durch Membrandefekte kommt es zum unkontrollierten Verlust des Zellinhalts und der Zellintegrität mit den Folgen einer Entzündungsreaktion für das umliegende Gewebe (Walker et al., 1988). Als Marker dient daher der Fluoreszenzfarbstoff PI, der in die Doppelhelix der DNA interkaliert. Das ist nur möglich, wenn die Zellmembran permeabel bzw. nicht mehr intakt ist, da PI nicht membrangängig ist.

Je nach Zelllinie (Tabelle 12) wurden 8×10^4 bis 1×10^5 Zellen auf 12-Well Platten ausgesät und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Behandlung mit EPZ005687 mit $15 \mu\text{M}$, $20 \mu\text{M}$ und einer Lösungsmittelkontrolle mit DMSO, sowie einer unbehandelten Nullkontrolle.

Tabelle 12: Zellzahl pro Well für 72h Apoptose-Messung im FACS

Zelllinie		
RD	RH30	SRH
1×10^5	8×10^4	1×10^5

Nach Behandlungswechseln alle 24h und Abschluss der Behandlung nach 72h wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA gelöst und einschließlich des Überstandes und des zum Waschen verwendeten PBS in FACS-Röhrchen überführt. Nach dem Zentrifugieren (1500 rpm, 5 min bei RT) wurden die Zellen mit Annexin V-Binding-Puffer (1:10) gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe der Fluoreszenz-Marker Annexin V und PI (je $3,5 \mu\text{l}$ / $50 \mu\text{l}$ Zellsuspension) und eine 30-minütige Inkubation im Dunkeln. Abschließend wurden die Proben über APC (Annexin V positive Zellen) und PE (PI positive Zellen) durchflusszytometrisch gemessen, wobei zuvor noch $100 \mu\text{l}$ Annexin V-Binding-Puffer hinzugegeben wurden.

Tabelle 13: für Apoptose verwendete Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
Annexin V	BioLegend, Koblenz
Annexin V binding puffer	Biozol Diagnostica GmbH, Eching
Proponium Iodid Solution [1 mg/ml]	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

2.2.4.2 Zellzyklus

Als Zellzyklus wird der periodische Ablauf von Ereignissen zwischen zwei Zellteilungen bezeichnet. Er untergliedert sich in mehrere Phasen. Die G1-Phase ist durch starke Protein- und RNA-Syntheseaktivität gekennzeichnet, trotzdem liegt ein diploider Chromosomensatz mit 1n DNA-Gehalt vor. Die folgende S-Phase beinhaltet die DNA-Replikation und wird eng über sogenannte Cykline gesteuert. In der G2-Phase, jetzt mit 2n DNA-Gehalt, beginnen sich die Zellkontakte zu lösen und es werden verstärkt mitosespezifische Proteine und RNA synthetisiert. Nun kann die Zelle in die eigentliche Teilung, die M-Phase übergehen, ausgelöst durch den M-Phase stimulierenden Faktor. Vor allem Nervenzellen aber auch andere Zelltypen verlassen diesen Reproduktionszyklus und treten in einen Ruhezustand, die G0-Phase (1n DNA-Gehalt), über. Alle Phasenübergänge und kritischen Prozesse werden streng reguliert, z.B. durch den Transkriptionsfaktor p53, der bei DNA-Schäden hochreguliert wird, oder p21, welcher als Cyclin-Inhibitor interagiert (Karimian et al., 2016; Shaw, 1996).

Die Zellzyklusanalyse am FACS wurde in der vorliegenden Arbeit mit Propidium Iodid (PI) gemessen, ein mit der DNA interkalierendes Molekül. Dies ermöglicht Rückschlüsse über den Chromosomensatz und die Menge an DNA (Pozarowski and Darzynkiewicz, 2004).

Zur Zellzyklusanalyse wurden zunächst RMS-Zellen (RD und RH30) auf 6 Well Platten ausgesät (Tabelle 14) und über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Tumorzellen 48h lang in An- und Abwesenheit von AdOx (10 μ M und 25 μ M), DZNep (10 μ M und 25 μ M) und EPZ (10 μ M und 15 μ M), sowie DMSO (15 μ M und 25 μ M), wobei die Behandlung nach 24 h erneuert wurde, behandelt.

Zur Analyse wurden die RMS Zellen mit 2 ml PBS gewaschen und mittels 250 μ l 0,05 % Trypsin/EDTA abgelöst, anschließend in 2 ml Medium resuspendiert und mittels Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die niedrigste Zellzahl einer Behandlung definierte die entsprechend zu verwendende Zellzahl pro Behandlung, so dass bei Färbung der Zellen in jedem FACS-Röhrchen dieselbe Zellzahl (1×10^6) vorlag.

Nachdem die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und zentrifugiert (1500 rpm, 5 min, 4 °C) wurden, wurden Sie unter Vortexen mit 80 %-igem Ethanol fixiert und für 30 min

auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Färbung mit je 500 µl FXCycle PI/RNase Staining Solution (Invitrogen). Nach weiteren 20 min Inkubation im Dunkeln und bei Raumtemperatur wurden die Zellen am Durchflusszytometer (CANTOII, BD) gemessen.

Tabelle 14: Verwendete Reagenzien und Geräte - FACS-Zellzyklus

Bezeichnung	Hersteller
Aluminiumfolie 300x 0,03mm	Papstar, Kall
PI/TX-100 Solution: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Triton X100 Stammlösung [1%] Lot# 089K01921 ▪ Propidium Iodid (PI) Solution [1mg/ml] Lot# MKBV9923V 	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
80% Ethanol 50ml: <ul style="list-style-type: none"> ▪ 40 ml Ethanol absolute [99,9%] ▪ 10ml bidest H₂O 	VWR International S.A.S., Fontenaysous, Bois, Frankreich
MilliQ-Wasseraufbereitungsanlage	Millipore, Molsheim, Frankreich

2.2.5 Wound-Healing-Assay

Der Wound-Healing-Assay trifft Aussagen über die Fähigkeit und das Verhalten zur Migration von Tumorzellen *in vitro*. Er eignet sich daher besonders für Aussagen über Zell-Matrix- und Zell-Zell-Interaktionen. Einem konfluenten Zellrasen wird eine „Wunde“, ein Scratch, zugefügt und anschließend der Heilungsprozess fotografisch dokumentiert. An den Defekträndern reorganisieren sich die Zellen und exprimieren verschiedenste Adhäsionsmoleküle, die zelluläre Interaktionen steuern und ein Zusammenwachsen des Defekts ermöglichen (Liang et al., 2007).

6-Well Platten wurden mit 6×10^5 Zellen für RD und RH30 und mit 4×10^5 Zellen für SRH in Zellkulturmedium für 24h inkubiert, um einen konfluenten einschichtigen Zellrasen für den weiteren Versuchsablauf zu erhalten. Mit einer Pipettenspitze (100-200µl) wurde dem Zellrasen ein „Defekt“ zugefügt. Nach Waschen mit PBS, um die durch die zugefügte Wunde gelösten Zellen zu entfernen, wurden die Platten mit DZNep und AdOx (5 µM, 10 µM, 25 µM und 50 µM), EPZ005687 (5 µM, 10 µM, 20 µM und 30 µM), DMSO (30 µM und 50 µM), sowie mit Zellkulturmedium für die Negativkontrolle behandelt.

Direkt im Anschluss erfolgte die Fotodokumentation nach 0 h, 24 h und 48 h. Die Auswertung erfolgte mit Axio-Vision 3.1, wobei der Flächeninhalt jedes Scratches gemessen und gegen eine Kontrolle ohne jeweilige Substanz verglichen wurde.

Tabelle 15: Verwendete Reagenzien und Geräte – Wound-Healing-Assay

Bezeichnung	Hersteller
AxioVision 3.1	Carl Zeiss, Jena
EOS Utility	Canon GmbH, Krefeld
Inverses Mikroskop, Axiovert 135	Carl Zeiss, Jena
Kamera Canon EOS 550D	Canon GmbH, Krefeld

2.2.6 Colony forming assay

Der Koloniebildungstest (CFA) ist ein etablierter Assay der Zellbiologie, der die klonogene Wachstumsfraktion einer Zellpopulation unter spezifischer Behandlung untersucht.

Hierbei wird indirekt der klonogene Zelltod determiniert. Dazu wird eine bestimmte Zellzahl ausgesät, damit überlebende Zellen möglichst vereinzelt vorliegen, um Kolonien zu bilden. In welchem Maße die Zellen anschließend die Fähigkeit zur Koloniebildung und Zellteilung aufweisen, wird durch den Vergleich mit einer unbehandelten Kontrolle ermittelt. So kann der Assay zur Evaluation der Effektivität und Wirkungsweise der verwendeten Substanzen beitragen (Franken et al., 2006). Die Planting efficacy (PE), die Fähigkeit Kolonien auszubilden, ist hierbei die Anzahl entstandener Kolonien x100 geteilt durch die Anzahl eingesetzter Zellen (750/Well) in Prozent.

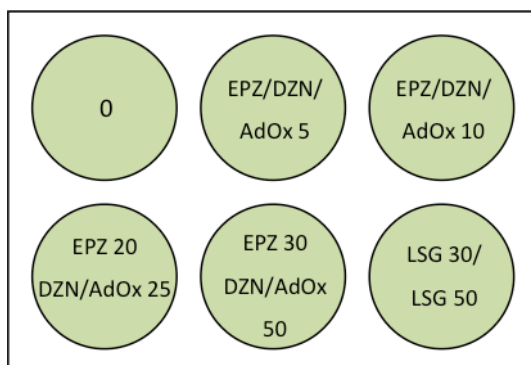


Abb. 12: Behandlungsschema CFA in μM

Für den CFA wurden 750 Zellen/Well in 2 ml Zellkulturmedium angelegt, über Nacht inkubiert und anschließend nach unten abgebildetem Schema (siehe Abb. 12) behandelt. Nach 72 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Zellkulturmedium für weitere Tage ohne Behandlung inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurde die Ausbildung neuer Kolonien

kontrolliert. Nach ca. 10-14 tägiger Kultivierung werden die Wells mit PBS gewaschen

und die Zellen mit eiskaltem 100 %-igem Methanol für 5 min fixiert. Zur Visualisierung der Zellen werden die mit 1 %-Kristallviolett-Lsg. (Tabelle 16) für 30 min (RD Zellen) bzw. für 120 min (RH30 Zellen) inkubiert. Abschließend wurden die Versuchsplatten mit demineralisiertem Wasser gewaschen, so dass nur die sichtbar angefärbten Kolonien zurückbleiben und über Nacht getrocknet.

Die Auswertung des CFA erfolgt über Auszählen der Kolonien (>50 Zellen) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Tabelle 16: Verwendete Reagenzien und Geräte - CFA

Bezeichnung	Hersteller
CELLSTAR® Zellkultur Schalen 35x10mm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Methanol (99%)	VWR International GmbH, Darmstadt
1% Kristallviolett-Lösung: <ul style="list-style-type: none"> ▪ 1g Kristallviolett ▪ mit bidestilliertem H₂O auf 100 ml aufgefüllt 	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

2.2.7 Sphäroide/3D-Kultur

Multizelluläre Tumorsphäroide stellen ein komplexes und der *in vivo* Situation angenähertes Modell dar. Wegen der kugelförmigen Struktur ergeben sich für verschiedene Schichten unterschiedliche Eigenschaften. Die äußere Schicht mit dem höchsten Nähr- und Sauerstoff Angebot proliferiert, die mittlere Schicht besteht aus Zellen in der G₀-Phase und nahe am Zentrum nekrotisieren die Zellen aufgrund des Nähr- und Sauerstoffmangels. Dieser Aufbau imitiert Mikrometastasen und es lassen sich bereits *in-vitro* Erkenntnisse über Expressionsverhalten und Metabolismus gewinnen (Mueller-Klieser, 1987; Sutherland and Durand, 1984; Sutherland et al., 1971).

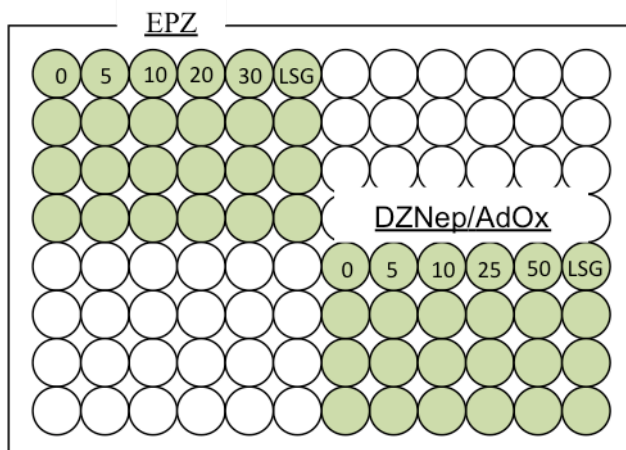


Abb. 13: Behandlungsschema Sphäroide in [µM]

Dieser Assay wurde mit den RMS-Zelllinien RD und RH30 durchgeführt. 2×10^5 Zellen wurden in 100 µl zuvor filtriertem Zellkulturmedium auf eine zellabweisende Rundbodenplatte (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe,

Deutschland) pipettiert. Durch Zentrifugieren (200 rpm, 5 min bei RT) lagerten sich die Zellen zu kugelförmigen Aggregaten zusammen. Nach Inkubation im Brutschrank für 72h wurden die Tumorzellen mit EPZ005687, DZNep und AdOx für 72 h behandelt (Abb. 13). Alle 24 h erfolgte ein Behandlungswechsel, bei dem nur 50µl des Zellkulturmediums abgesaugt wurden. Das Wachstumsverhalten der Sphäroide wurde alle 24 h ab der ersten Behandlung fotografisch dokumentiert und mit AxioVision 3.1 die Änderung des Sphäroid-Umfangs ausgewertet. Die Zelllinie SRH ist für diesen Versuch nicht geeignet (Boehme et al., 2016).

Abschließend wurden die Sphäroide mit 25µl Methylenblau/Well für 24h inkubiert und am VictorX Multilable Plate Reader mit den Wellenlängen 486nm und 535nm (Fluorescein) gemessen. Die weitere Auswertung erfolgte mit Excel und GraphPad Prism 7.0 (La Jolla, USA).

Tabelle 17: Verwendete Geräte und Reagenzien - Sphäroide

Bezeichnung	Hersteller
Nunclon Sphera 96-Well Rundbodenplatte	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Sterilfilter (Easytrainer™ 40µm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Methylenblau	Biochrom GmbH, Berlin
VictorX Multilable Plate Reader	PerkinElmer Inc., Waltham, USA

2.3 Statistische Verfahren

Verfasst wurde die Dissertation mit Hilfe des Textbearbeitungsprogramms Word (Microsoft, Unterschleißheim). Die statistische Auswertung der erhobenen Daten und deren Darstellung erfolgte mit GraphPad Prism 7.0 (La Jolla, USA), wobei die Ergebnisse in Prozent (%), als Mittelwert (MW) und mit Standardfehler des Mittelwerts (SEM) graphisch abgebildet werden. Als statistisch signifikant wurden Werte mit einem p von mindestens kleiner 0,05 erachtet.

*	**	***	****
$P \leq 0,05$	$P \leq 0,01$	$P \leq 0,001$	$P \leq 0,0001$

Abb. 14: Signifikanzverschlüsselung

Für jedes Ergebnis liegt mindestens eine dreifache Durchführung (Angabe durch $n=x$) vor. Es erfolgte die deskriptive Statistik der Daten (teilweise auch mit Windows Excel, (Microsoft, Unterschleißheim)) und anschließend die statistische Prüfung der Hypothese mit der zweifaktoriellen Varianzanalyse ANOVA. Als Testverfahren wurde i.d.R. die Dunnett-Methode eingesetzt. Bei der Versuchsreihe Apoptose wurde aufgrund des direkten Vergleiches zweier Werte der Student-T-Test nach Welch angewendet. Die Abbildungen sind mit dem Open Source Vektor-Graphik Programm Inkscape (Inkscape Community) erstellt.

Tabelle 18: Verwendete Programme

Bezeichnung	Hersteller
Adobe Reader, Adobe Photoshop	Adobe Systems, München
GraphPad Prism, Version 7.0	GraphPad Software, La Jolla, USA
Inkscape: Open Source Scalable Vector Graphics Editor, Version 0.92.3	Inkscape Community
Office 2011 für MAC	Microsoft, Unterschleißheim
Office 365 Education Plus	Microsoft, Unterschleißheim

3. Ergebnisse

3.1 Erhöhte EZH2 Expression in RMS Zelllinien

Der Zusammenhang zwischen erhöhter EZH2 Expression und damit einhergehendem schlechterem Outcome *in vivo* ist bei diversen Tumoren und insbesondere für die ARMS-Zelllinie RH30 und die ERMS-Zelllinie RD gezeigt worden (Ciarapica et al., 2014a).

Um zu evaluieren, ob die verwendeten Zelllinien physiologische Expressionsmuster zeigen, wurde die Proteinkonzentration von EZH2 in den Zelllinien RD, RH30 und SRH mittels Western Blot analysiert. Dabei wurde GAPDH, ein konstitutiv exprimiertes so genanntes *house-keeping* Gen, als Kontrolle verwendet.

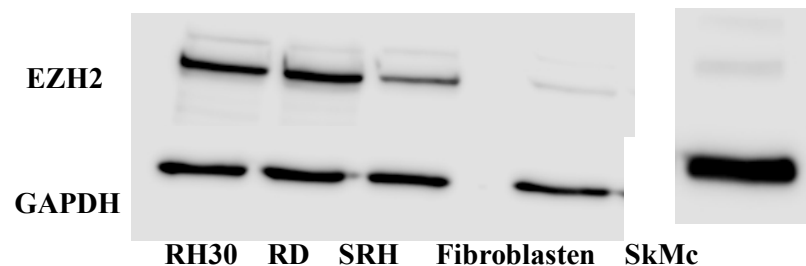


Abb. 15: Messung der Proteinexpression von EZH2 im Vergleich zum House Keeping Gen GAPDH/ β -Catenin in den RMS-Zelllinien RH30, RD, SRH, sowie in Fibroblasten und der Skelettmuskel-Zelllinie SkMc mittels Western Blot . Die verwendeten Zelllinien und spezifischen Antikörper sind annotiert. Die Dicke der Banden ist ein Marker für die Expressionsstärke in den jeweiligen Zelllinien.

Wie in Abb. 15 dargestellt, exprimieren die drei RMS Zelllinien RD, RH30 und SRH vermehrt EZH2 gegenüber Fibroblasten und SkMc. SRH zeigt gegenüber den anderen RMS Zelllinien die geringste EZH2-Expression. Die als gesundes Vergleichsgewebe verwendeten Fibroblasten und Skelettmuskelzellen SkMc exprimieren fast kein EZH2.

3.2 Inhibition von EZH2 verringert Zellviabilität

Um zu prüfen, ob die Inhibition von EZH2 einen potenziellen Therapieansatz für RMS darstellt, wurde die Wirkung der drei verwendeten Inhibitoren auf die Zellviabilität von RMS-Zelllinien *in vitro* mittels MTT-Assay gemessen.

Viabilitätsassay von EPZ005687

Mit steigender Konzentration von EPZ005687 ist eine Abnahme der Viabilität in den verwendeten RMS-Zelllinien RD, RH30 und SRH, sowie SkMc zu beobachten (Abb. 16). Dabei konnten wir leichte Unterschiede zwischen den Zelllinien feststellen.

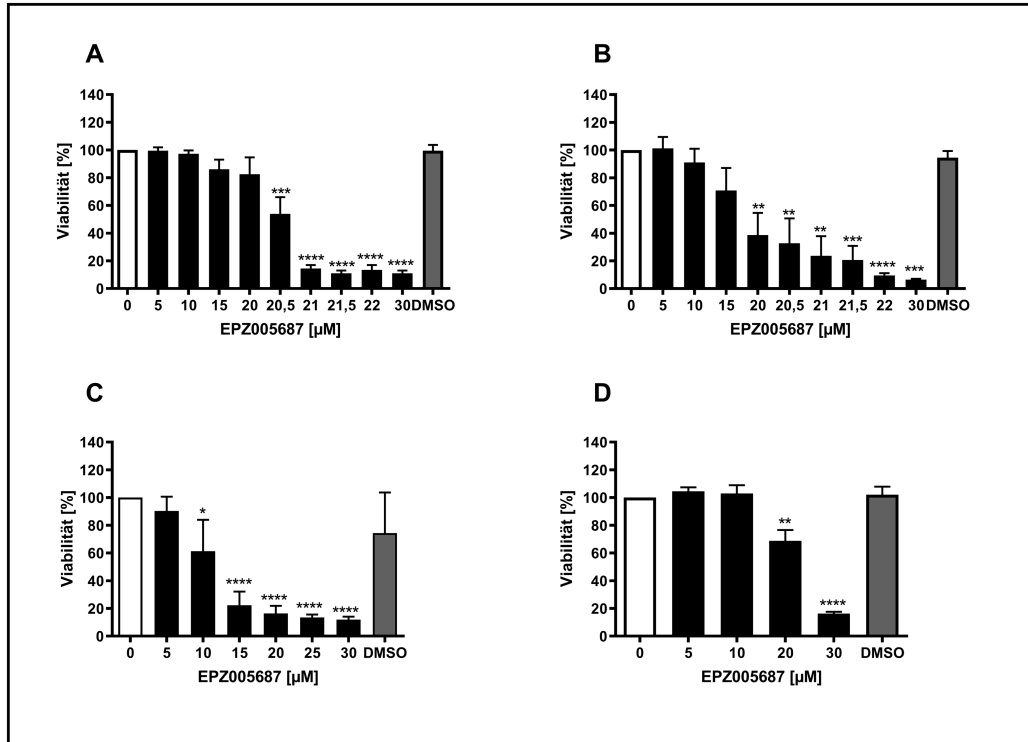


Abb. 16: Viabilitäts-Assays mittels 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide mit EPZ005687 behandelten Zelllinien. MTT-Assay, der die Behandlung der embryonalen Zelllinien RD (A) und SRH (C), der alveolären Zelllinie RH30 (B) und der Skelettmuskelzelllinie SkMc (D) über 72 h mit jeweils 24 stündigen Behandlungswechseln mit EPZ005687 in aufsteigender Konzentration zeigt. Zellen nach Zugabe von DMSO fungierten jeweils als Negativ-Kontrolle.

Für die embryonale RMS-Zelllinie RD (Abb. 16, A, im weiteren Text Abb. 16) zeigt sich eine Abnahme der Viabilität > 50 % nach 72h mit 20,5 μM, für die alveoläre Zelllinie RH30 (Abb. 16, B) bei 20 μM. Insgesamt senkt EPZ005687 für beide RMS-Zelllinien die Viabilität signifikant auf 10 bzw. 11 % des Ausgangswertes. Die Zelllinie SRH zeigt bereits bei 10 μM eine signifikante Abnahme der Viabilität auf unter 60% (Abb. 16, C) und nimmt mit zunehmender Konzentration auf unter 20 % weiter ab. Auch für die Muskelzelllinie SkMc zeigt sich eine signifikante Abnahme um ca. 30 % ab Konzentrationen von 20 μM und höher.

Viabilitätsassay von DZNep

Weitere MMT-Assays wurden mit RD und RH30 Zellen mit ansteigenden Konzentrationen an DZNep durchgeführt.

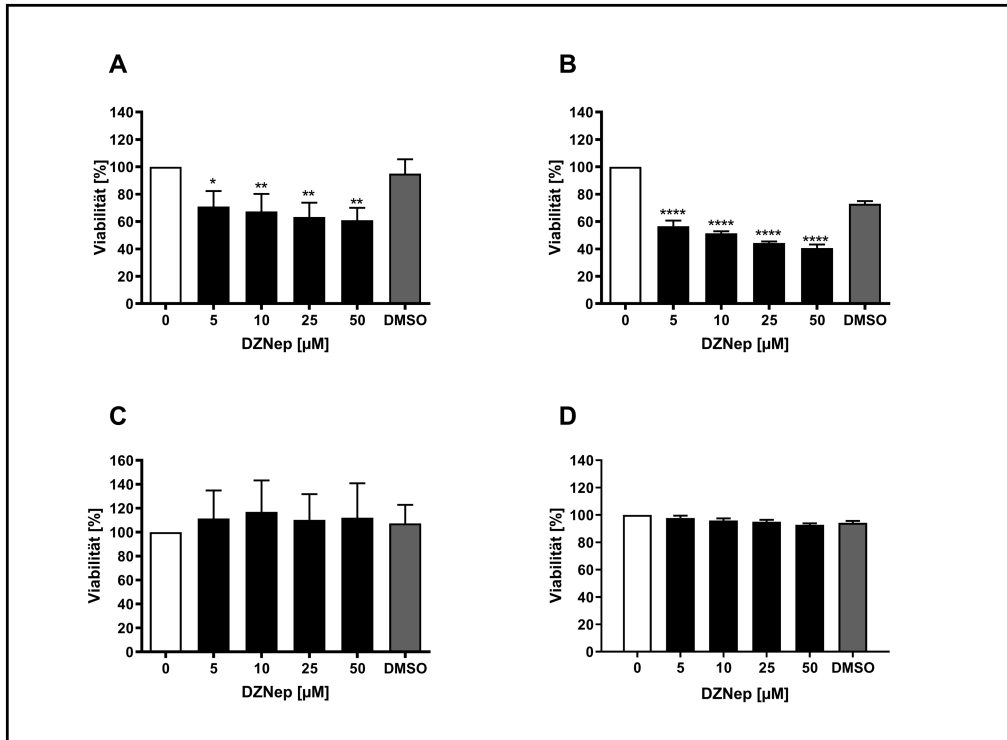


Abb. 17: Viabilitäts-Assays mittels 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide mit DZNep behandelte Zelllinie. MTT-Assay, der die Behandlung der embryonalen Zelllinien RD (A) und SRH (C), der alveolären Zelllinie RH30 (B) und der Skelettmuskelzelllinie SkMc (D) über 72 h mit jeweils 24 stündigen Behandlungswechseln mit DZNep in aufsteigender Konzentration zeigt. Zellen nach Zugabe von DMSO fungierten jeweils als Negativ-Kontrolle. Zellen nach Zugabe von DMSO fungierten jeweils als Negativ-Kontrolle.

Wie in Abb. 17 gezeigt, führt schon eine Inkubation mit 5 μM DZNep zu einer signifikanten Reduktion der Viabilität der RMS-Zelllinien RD und RH30. Dieser Effekt, eine Abnahme der Viabilität auf 60%, bleibt auch bei höheren Konzentrationen bei RD Zellen konstant, bzw. nimmt in Konzentrationen von 50 μM auf 40% bei RH30 zu. Für die RMS-Zelllinie SRH lässt sich kein Effekt auf die Viabilität beobachten. Die Muskelzelllinie SkMc wird nicht durch DNZep beeinflusst.

Viabilitätsassay von AdOx

Als dritten epigenetischen Inhibitor testeten wir AdOx und mögliche Auswirkungen auf die Zellviabilität.

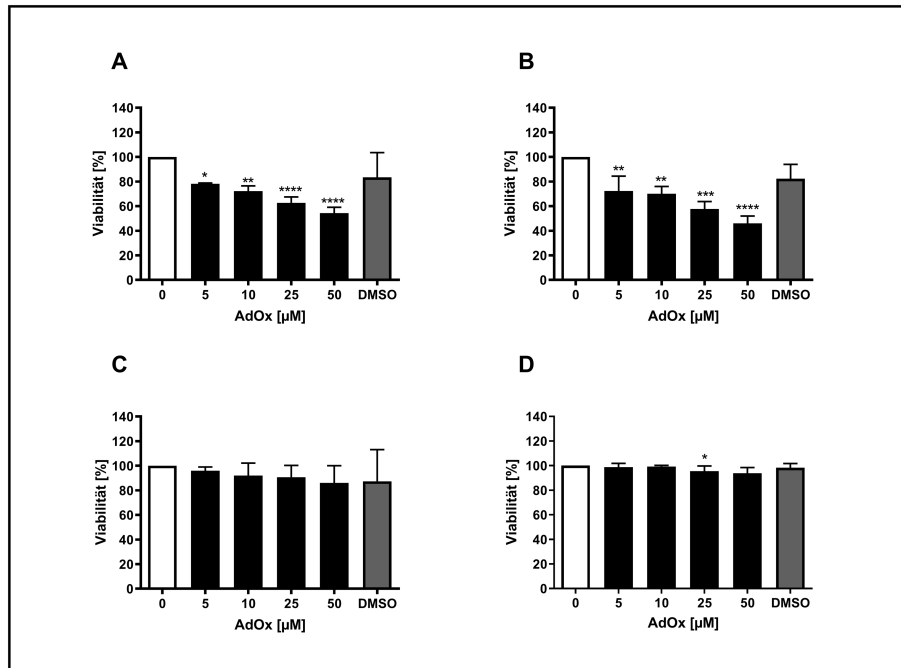


Abb. 18: Viabilitäts-Assays mittels 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide mit AdOx behandelte Zelllinie. MTT-Assay, der die Behandlung der embryonalen Zelllinien RD (A) und SRH (C), der alveolären Zelllinie RH30 (B) und der Skelettmuskelzelllinie SkMc (D) über 72 h mit jeweils 24 stündigen Behandlungswechseln mit AdOx in aufsteigender Konzentration zeigt. Zellen nach Zugabe von DMSO fungierten jeweils als Negativ-Kontrolle.

Für die RMS-Zelllinie RD und RH30 zeigt sich eine konzentrationsabhängige und bereits ab 5 μM signifikante Abnahme der Viabilität auf bis zu 50 % mit ansteigenden Konzentrationen (Abb. 18A und B). AdOx zeigt keine signifikante Veränderung auf die embryonale RMS-Zelllinie SRH. Auch für SkMc zeigen sich keine relevante Reduktion der Viabilität.

3.3 FACS

3.3.1 Apoptose Induktion durch epigenetische Inhibitoren

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Zellviabilität durch die epigenetischen Inhibitoren verringert wird. Es stellt sich die Frage nach dem zugrundeliegenden Mechanismus.

Da frühere Studien EPZ005687 und DZNep mit Apoptose in Verbindung gebracht haben, untersuchten wir nachfolgend Apoptose mittels Annexin V als mögliche Ursache der Zellviabilitätsabnahme *in vitro* (Fioravanti et al., 2018; Tan et al., 2007).

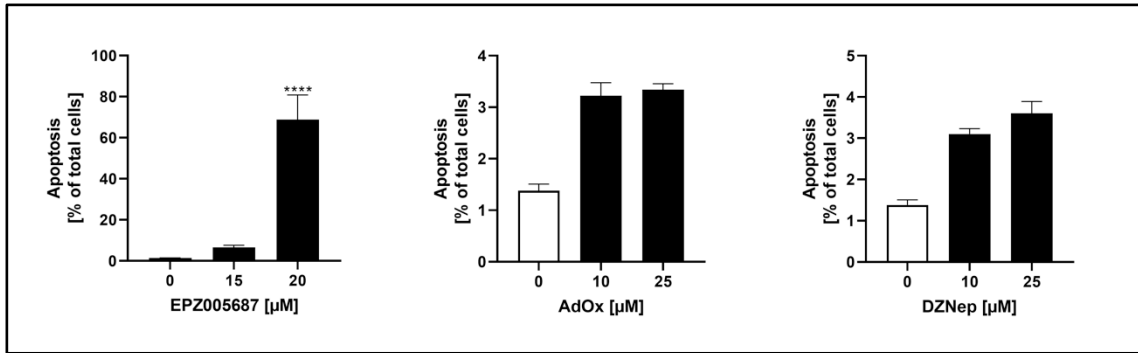


Abb. 19: Wirkung der epigenetischen Inhibitoren auf die Apoptose von RD-Zellen. FACS-Messung der Expression von Annexin V als Apoptose-Marker mit EPZ005687, DZNep und AdOx behandelten Zellen gegen eine unbehandelte Kontrolle nach 72h Behandlungsdauer.

Für die Zelllinie RD zeigt nur der direkte Inhibitor EPZ005687 einen signifikanten Einfluss auf die Apoptose in der höheren Dosierung mit 20 µM (Abb. 19). Dabei nimmt die Zahl Annexin V positiver Zellen bei 20 µM um mehr als 60 % zu. DZNep und AdOx zeigen keine signifikante Zunahme der Annexin V Expression und damit einer apoptotischen Wirkung auf die Zelllinie RD.

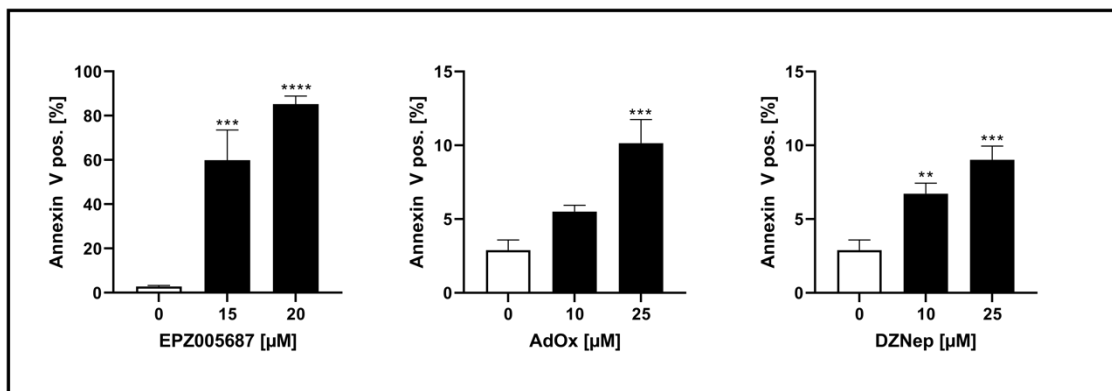


Abb. 20: Wirkung der epigenetischen Inhibitoren auf die Apoptose von RH30-Zellen. FACS-Messung der Expression von Annexin V als Apoptose-Marker mit EPZ005687, DZNep und AdOx behandelten Zellen gegen eine unbehandelte Kontrolle nach 72h Behandlungsdauer.

Für die ARMS-Zelllinie RH30 zeigen alle drei verwendeten epigenetischen Inhibitoren (AdOx, DZNep und EPZ) eine signifikante Zunahme der Annexin V Expression. Dabei hat EPZ005687 den größten Effekt mit >60 % bzw. >80 % für 15 µM bzw. 20 µM. DZNep induziert Apoptose konzentrationsabhängig. Für AdOx wird nur mit der höchsten verwendeten Konzentration 25 µM eine signifikante apoptotische Wirkung von nur 10 % beobachtet.

3.3.2 Zellzyklus-Arrest durch EPZ005687

Als weiterer Wirkmechanismus neben der Apoptose ist ein Wirken im Sinne eines Zellzyklus Arrest in der G1 Phase für epigenetische Inhibitoren beschrieben (Knutson et al., 2012; Nakagawa et al., 2014), zum Teil sogar mit phänotypischer Differenzierung (Ciarapica et al., 2014a). Daher wurden im Folgenden die Anteile der G1, S und G2-Phase des Zellzyklus in den Zelllinien RD und RH30 nach Behandlung mit den drei epigenetischen Inhibitoren untersucht.

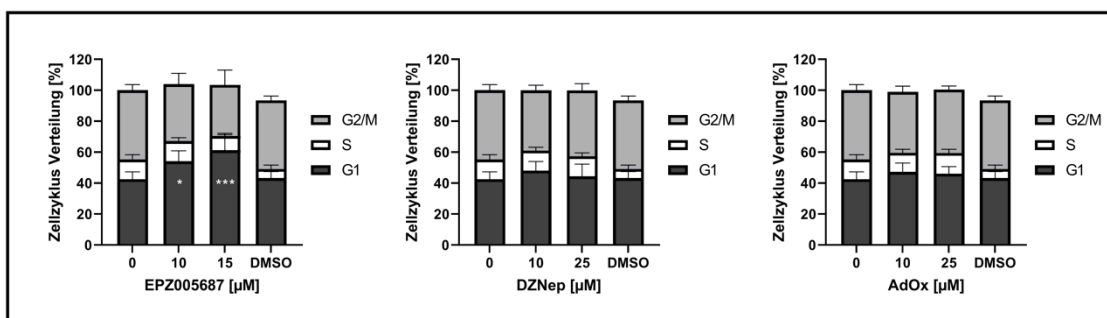


Abb. 21: FACS-Zellzyklus mit der Zelllinie RD. Die Zellen wurden nach 72 h Behandlung mit 24 stündigen Behandlungswechseln der drei verwendeten epigenetischen Inhibitoren auf Zellzyklus-Expression in der G1-Phase, sowie S- und G2-Phase untersucht.

Für die ERMS-Zelllinie RD zeigt sich nur für EPZ005687 ein signifikanter Einfluss auf den Zellzyklus. Bei 15 μM nimmt der Anteil an Zellen, die in der G1-Phase verbleiben, um ca. 20 % im Vergleich zur Nullkontrolle zu (Abb. 21). Für die indirekten EZH2 Inhibitoren lässt sich kein statistisch signifikanter Effekt beobachten.

In der ARMS-Zelllinie RH30 lässt sich nur für EPZ005687 eine Wirkung beobachten. Der Anteil an Zellen in der G1-Phase wird durch EPZ005687 bei 72 h Anwendung signifikant um ca. 15 % erhöht (Abb. 22).

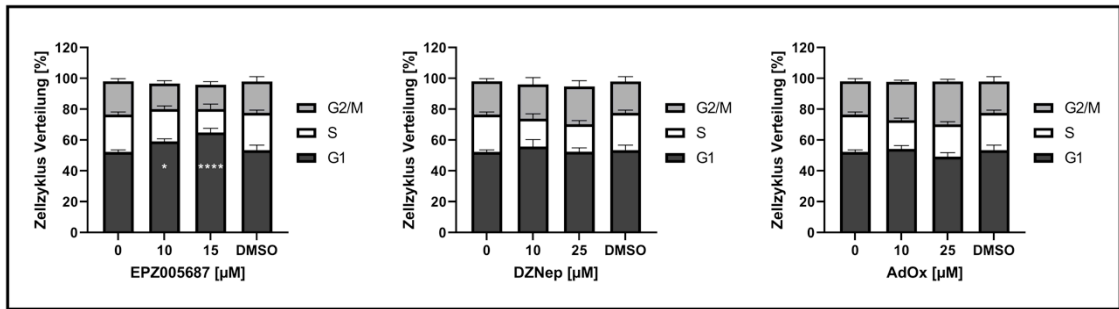


Abb. 22: FACS-Zellzyklus mit der ARMS-Zelllinie RH30. Die Zellen wurden nach 72 h Behandlung mit 24 stündigen Behandlungswechseln der drei verwendeten epigenetischen Inhibitoren auf Zellzyklus-Expression in der G1-Phase, sowie S- und G2-Phase untersucht.

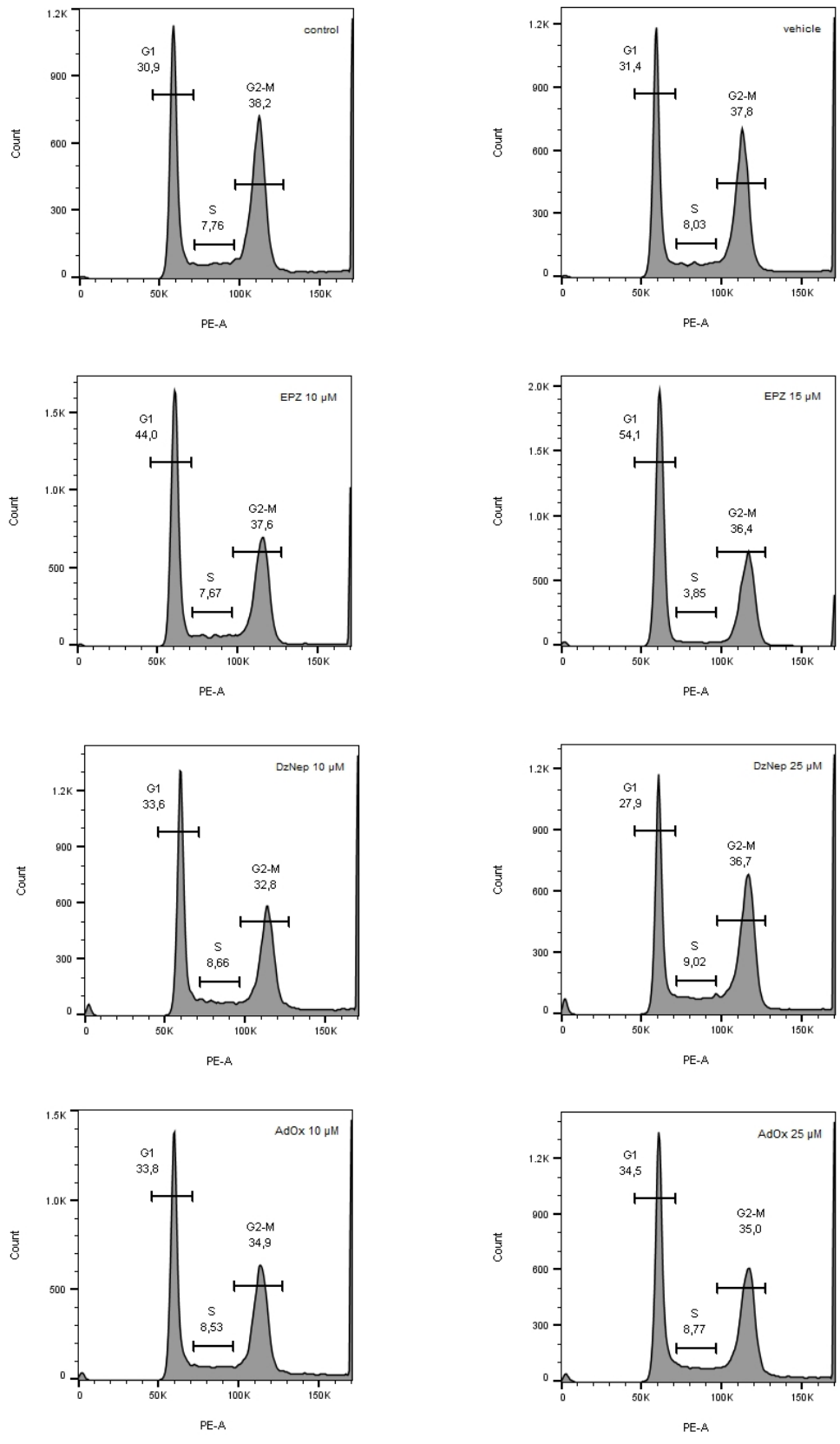


Abb. 23: FACS-Zellzyklus mit der ERMS-Zelllinie RD. Dargestellt sind die Einzelmessungen der FACS-Zellzyklus Analyse.

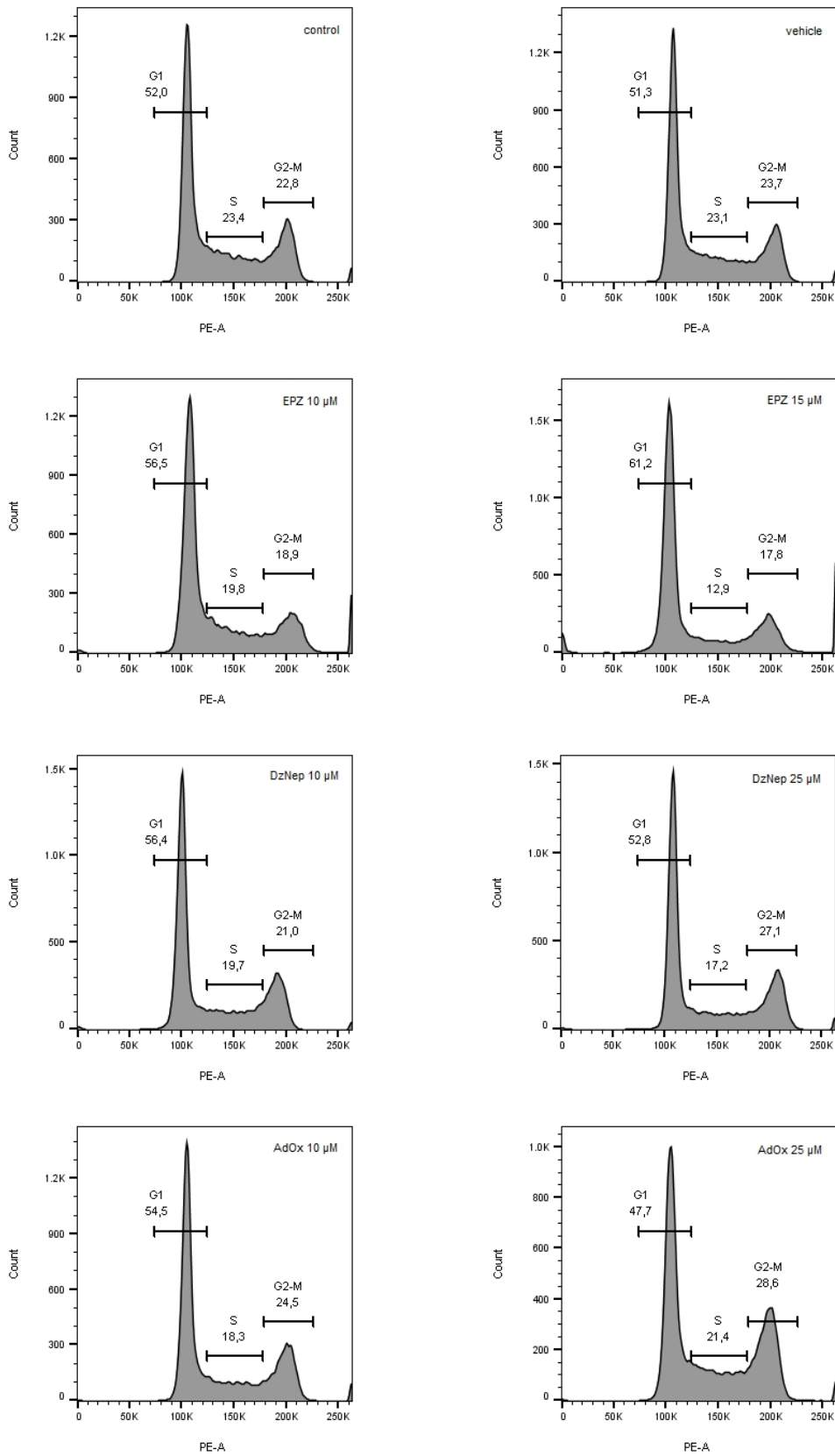


Abb. 24: FACS-Zellzyklus mit der ARMS-Zelllinie RH30. Dargestellt sind die Einzelmessungen der FACS-Zellzyklus Analyse.

3.4 Geringer Einfluss auf 2D-Migration durch EPZ005687, DZNep und AdOx

2D Migration ist ein Indikator für invasives Tumorwachstum und Malignität.

Deswegen wurde im Folgenden untersucht, inwiefern die verwendeten Substanzen einen Einfluss auf die Migration der Zellen haben. Um die Migrationsfähigkeit der Tumorzellen zu untersuchen, wurde wie in 2.2.4.2 beschrieben ein Wound-Healing-Assay durchgeführt.

Migrationsassay mit EPZ005687

Für die Zelllinie RD wurde kein signifikanter Effekt, unabhängig von den verwendeten Konzentrationen, festgestellt (Abb. 25). Eine tendenzielle Abnahme, jedoch ohne Signifikanz, von 20% konnte bei der Zelllinie SRH beobachtet werden. Für die Zelllinie RH30 reduziert sich die zugewachsene Fläche, als Maßstab für die Migrationsfähigkeit, statistisch signifikant ab einer Konzentration von 20 μM . Bei einer Behandlungskonzentration von 30 μM ist nur die Hälfte der Fläche im Vergleich zur Nullkontrolle zugewachsen.

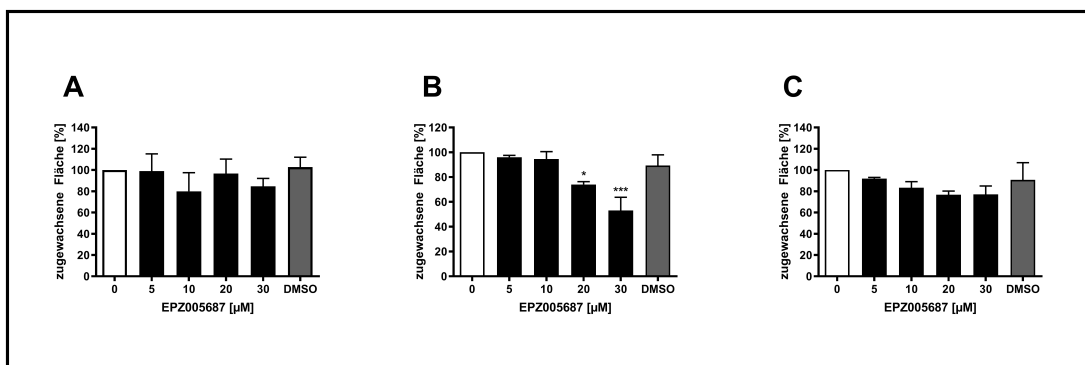


Abb. 25: Migrationsassay „Scratch“ mit ansteigenden EPZ005687 Konzentrationen. Quantitative Datenanalyse des SCRATCH-Assays, genormt auf die Nullkontrolle, der die zugewachsene Fläche unter ansteigenden Konzentrationen mit EPZ005687 für die Zelllinien RD(A), Rh30 (B) und SRH (C) nach 24h zeigt.

Es folgen Abbildungen zur Darstellung des fotografischen Assay-Verlaufs für die RMS-Zelllinien RD (Abb. 26), RH30 (Abb. 27) und SRH (Abb. 28).

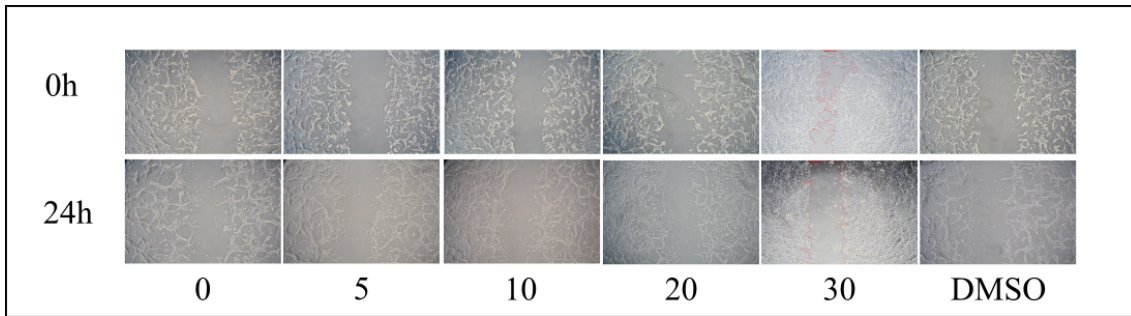


Abb. 26: Repräsentative fotografische Darstellung des Migrations-Assays mit EPZ005687 nach 0h und 24h, durchgeführt mit der Zelllinie RD. Die Zellen wurden in 6 Well Platten ausgesät und bis zur Konfluenz inkubiert, anschließend wurde ein Wound-Healing-Assay durchgeführt. Beispielhafte Darstellung der Auswertung für 30 μM , wobei die rote Linie den zellfreien Bereich demarkiert.

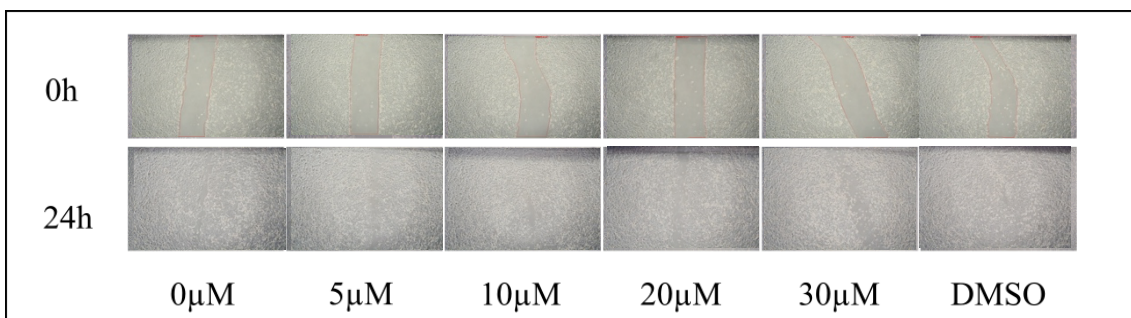


Abb. 27: Fotografische Darstellung des Migrations-Assays mit EPZ005687 nach 0h und 24h, durchgeführt mit der Zelllinie RH30. Rote Markierung entspricht der Messung

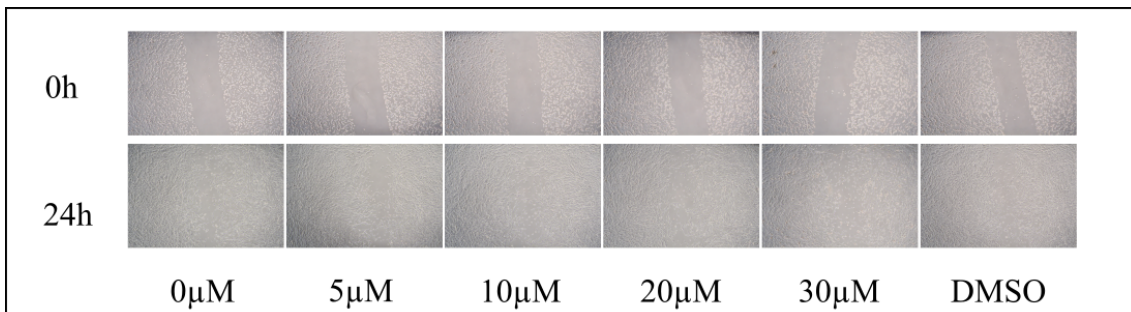


Abb. 28: Fotografische Darstellung des Migrations-Assays mit EPZ005687 nach 0h und 24h, durchgeführt mit der Zelllinie SRH. Die Zellen wurden in 6 Well Platten ausgesät und bis zur Konfluenz inkubiert, anschließend wurde ein Wound-Healing-Assay durchgeführt.

Migrationsassay mit DZNep

Kein signifikanter Effekt kann für die Zelllinie RD nachgewiesen werden (Abb. 29). Auch die Zelllinie RH30 wird in ihrer Migrationsfähigkeit nicht signifikant beeinträchtigt. Lediglich für die Zelllinie SRH zeigt sich ein signifikanter Effekt für Konzentrationen von 25 und 50 μM und eine Abnahme der zugewachsenen Fläche auf 80 %.

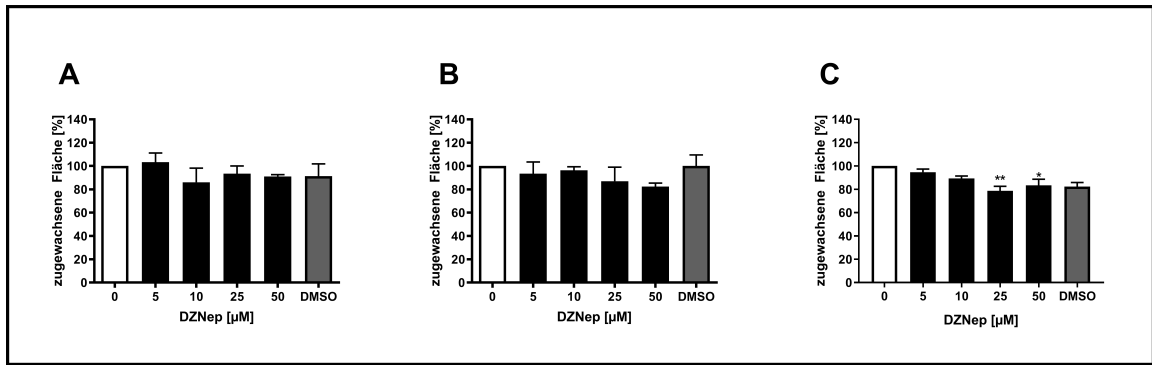


Abb. 29: Migrationsassay Scratch mit ansteigenden DZNep Konzentrationen. SRATCH-Assay, der die zugewachsene Fläche unter ansteigenden Konzentrationen mit DZNep für die Zelllinien RD (A), RH30 (B) und SRH (C) nach 24h zeigt.

Nachfolgend wird die fotografische Dokumentation des Assays für die verwendeten RMS-Zelllinien gezeigt.

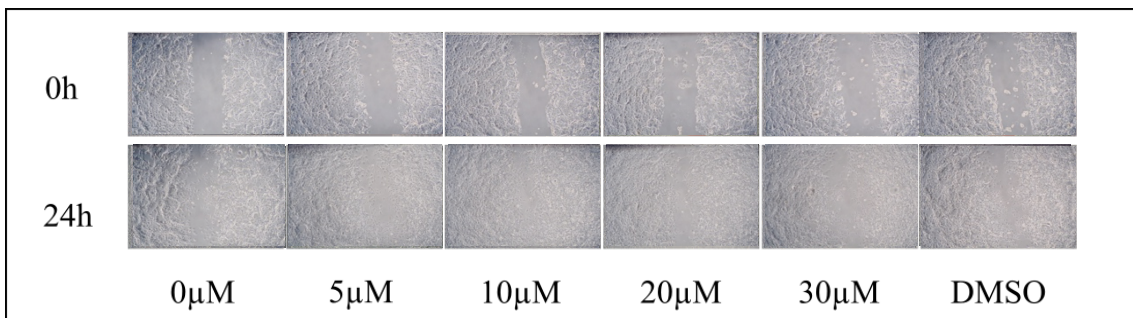


Abb. 30: Fotografische Darstellung des Migrations-Assays mit DZNep nach 0h und 24h, durchgeführt mit der Zelllinie RD.

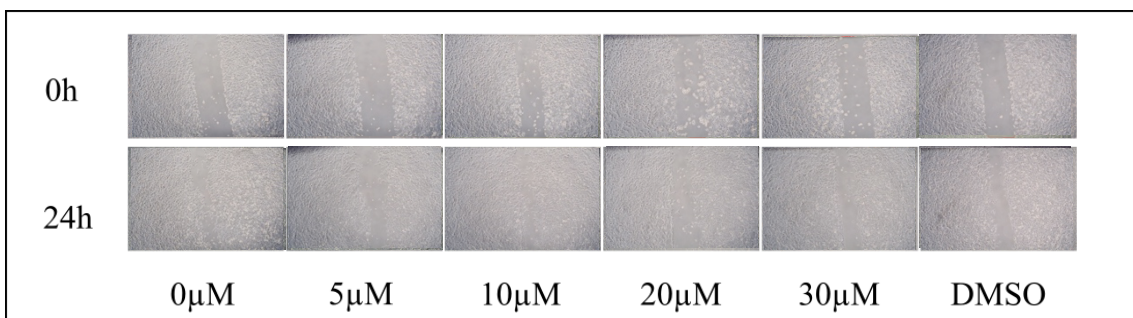


Abb. 31: Fotografische Darstellung des Migrations-Assays mit DZNep nach 0h und 24h, durchgeführt mit der Zelllinie RH30.

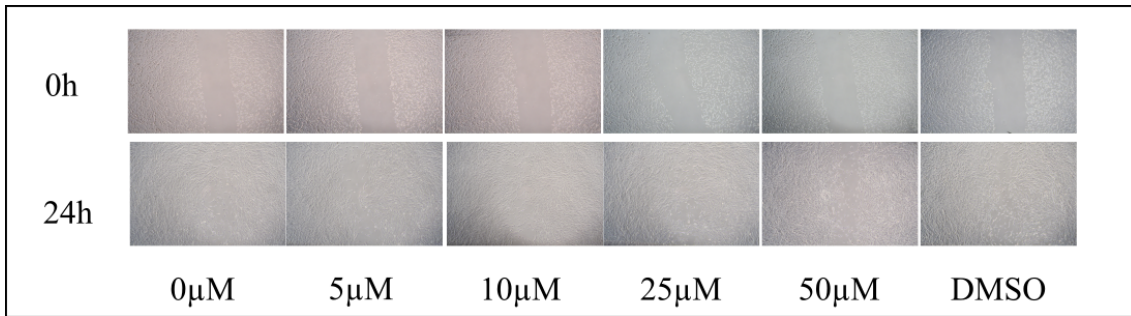


Abb. 32: Fotografische Darstellung des Migrations-Assays mit DZNep nach 0h und 24h, durchgeführt mit der Zelllinie SRH.

Migrationsassay mit AdOx

In Abb. 33 werden die Ergebnisse für den Migrationsassay mit AdOx gezeigt. Es zeigt sich keine signifikante Änderung der zugewachsenen Fläche für die Zelllinie RD durch die Inkubation der Zellen mit AdOx. Mit ansteigenden Konzentrationen ab 10 µM kann für die ARMS-Zelllinie RH30 eine signifikante Reduktion der Migration erzielt werden. Dabei nimmt die prozentual zugewachsene Fläche auf maximal 80 % bei 50 µM ab.

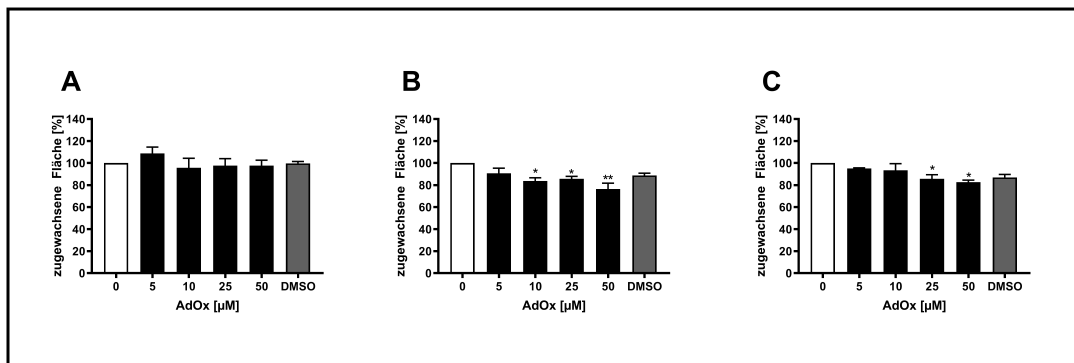


Abb. 33: Migrationsassay SCRATCH mit ansteigenden AdOx Konzentrationen. SCRATCH-Assay, der die zugewachsene Fläche unter ansteigenden Konzentrationen mit DZNep für die Zelllinien RD (A), RH30 (B) und SRH (C) nach 24h zeigt. Zellen nach Zugabe von DMSO fungierten jeweils als Negativ-Kontrolle.

Für die Zelllinie SRH lässt sich ebenfalls ein signifikanter Effekt in höheren Konzentrationen nachweisen (Abb. 33 C). AdOx 25 bzw. 50 µM reduziert die zugewachsene Fläche auf 90 %.

Die Abb. 34 bis Abb. 36 zeigen die fotografische Dokumentation des Migrations-Assays nach 0h und 24h für den Inhibitor AdOx bei den drei verwendeten RMS-Zelllinien.

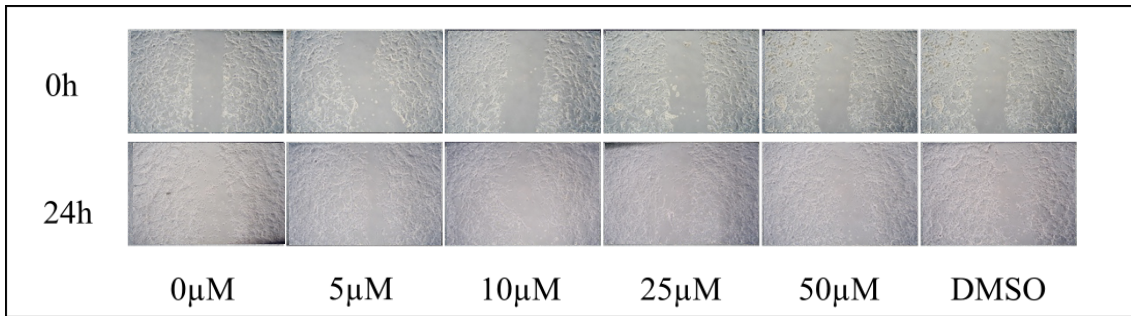


Abb. 34: Fotografische Darstellung des Migrations-Assays mit AdOx nach 0h und 24h, durchgeführt mit der Zelllinie RD.

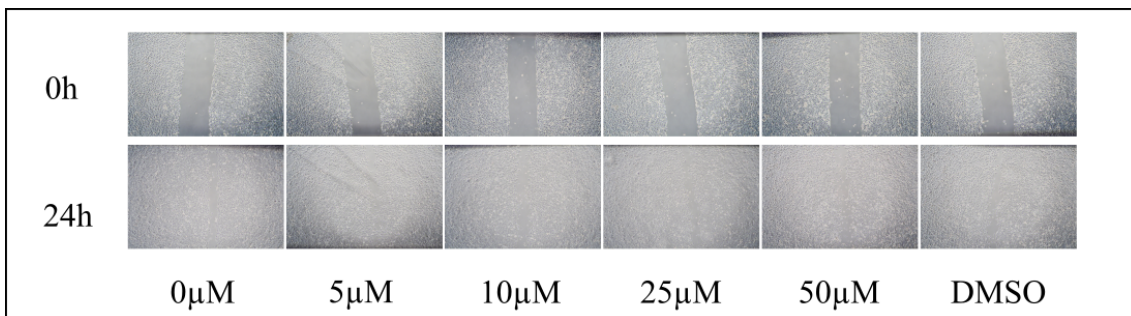


Abb. 35: Fotografische Darstellung des Migrations-Assays mit AdOx nach 0h und 24h, durchgeführt mit der Zelllinie RH30.

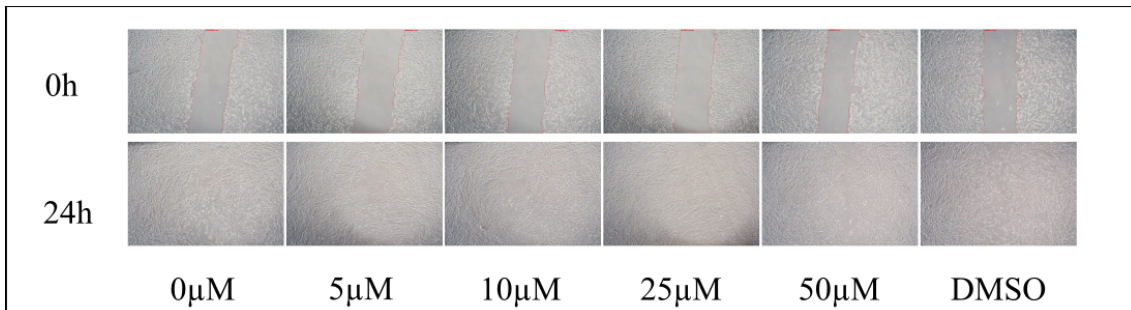


Abb. 36: Fotografische Darstellung des Migrations-Assays mit AdOx nach 0h und 24h, durchgeführt mit der Zelllinie SRH.

3.5 Reduktion des Metastasierungspotenzials durch epigenetische Inhibitoren *in vitro*

Wie unter 2.2.6 beschrieben zeigt dieser Assay das Leistungsvermögen von Tumorzellen unabhängig und einzeln zu wachsen sowie Kolonien zu bilden, eines der Kennzeichen maligner Entartung. Dazu wurden eine spezifische Anzahl an Tumorzellen für 72h mit den Inhibitoren EPZ005687, DZNep und AdOx behandelt und anschließend die Ausbildung von Kolonien dokumentiert.

CFA-EPZ005687

Die Balkendiagramme in Abb. 37 zeigen die Ergebnisse des CFA-Assay unter Behandlung mit ansteigenden Konzentrationen von EPZ005687. Es zeigt sich für beide verwendete RMS-Zelllinien RD und RH30, dass mit zunehmender Konzentration von EPZ005687 die so genannte *Planting efficacy* (PE) sinkt. Dabei entspricht die PE der Anzahl an entstandenen Kolonien in %.

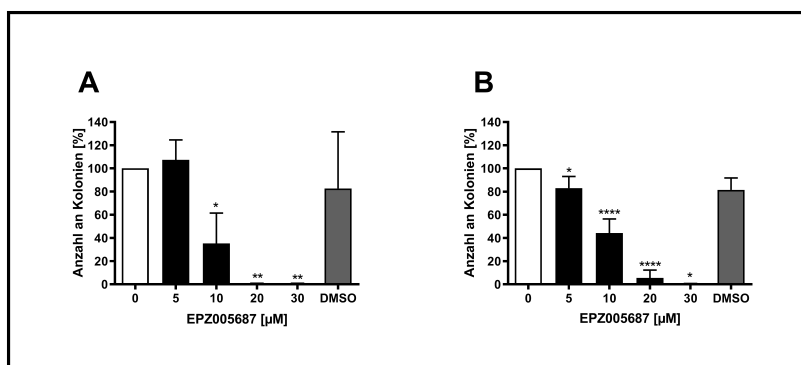


Abb. 37: Colony forming assay (CFA) mit EPZ005687 behandelte Zellen. CFA-Assay, der die Ausbildung von Kolonien unter ansteigender Konzentration von EPZ005687 für die RMS-Zelllinien (A) RD und (B) RH30 zeigt.

Bei der RD-Zelllinie sinkt die PE signifikant unter 40%, wenn die Zellen mit 10 µM EPZ inkubiert wurden. Höhere Konzentrationen bewirken eine fast vollständige Unterdrückung der Kolonienbildung. Ähnlich verhält sich auch die Zelllinie RH30 mit signifikanter Abnahme ab Konzentrationen von 5 µM um 20 % und auf unter 60 % bei 10 µM. Bei 20 µM und mehr unterdrückt die Substanz die Kolonarisierungsfähigkeit fast vollständig (Abb. 37, B).

CFA-DZNep

Die Abb. 38 zeigt die Ergebnisse des CFA-Assays unter Behandlung mit ansteigenden Konzentrationen von DZNep. Für jede verwendete Konzentration von 5 bis 25 µM zeigt sich eine konstante und signifikante Abnahme der PE auf circa 20% für die Zelllinie RD.

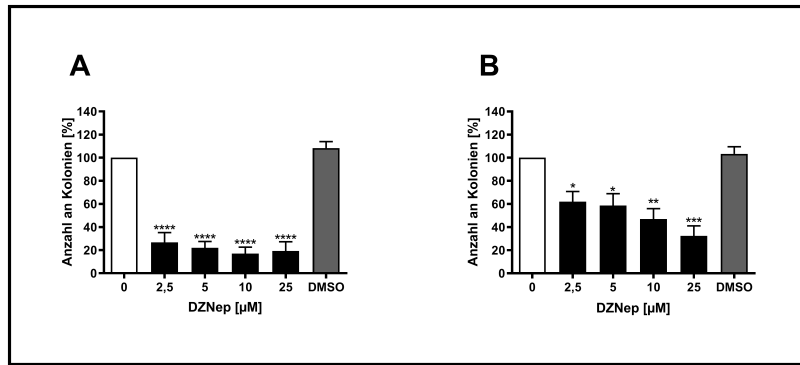


Abb. 38: Colony forming assay (CFA) mit DZNep behandelte Zellen. CFA-Assay, der die Ausbildung von Kolonien unter ansteigender Konzentration von DZNep für die Zelllinien (A) RD und (B) RH30 zeigt.

Für die Zelllinie RH30 zeigt sich für jede verwendete Konzentration eine signifikante und mit ansteigender Konzentration zunehmende Wirkung und damit Abnahme der PE auf maximal 30 % bei 25 μM.

CFA-AdOx

Die Balkendiagramme in Abb. 39 zeigen die Ergebnisse des CFA für die Behandlung der beiden RMS-Zelllinien RD und RH30 mit ansteigenden Konzentrationen von AdOx.

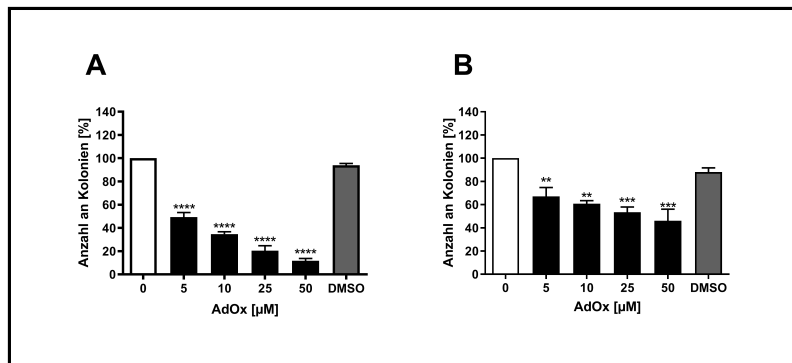


Abb. 39: Colony forming assay (CFA) mit AdOx behandelte Zellen. CFA-Assay, der die Ausbildung von Kolonien unter ansteigender Konzentration von AdOx für die Zelllinien RD (A) und RH30 (B) zeigt.

In Abb. 39 gezeigt, führt eine ansteigende Behandlungskonzentrationen für beide Zelllinien zu einer vermehrten Abnahme der PE. Eine Dosis von 50 μM reduziert signifikant die Anzahl der Kolonien bei der Zelllinie RD auf unter 20% (Abb. 39, A) und bei der Zelllinie RH30 auf circa 50% (Abb. 39, B). Jedoch zeigen sich bereits auch in geringeren Dosen signifikante Abnahmen der PE für RD und RH30.

3.6 EPZ005687 und DZNep mit komplexen Auswirkungen auf Mikrometastasen

In vitro Mikrometastasen indizieren ein erhöhtes Fernmetastasenrisiko und damit eine schlechtere Prognose *in vivo*. Daher wurde mittels Sphäroid-Assay die Wirksamkeit der Inhibitoren an einem *in vitro* Modell für Mikrometastasen untersucht. Die Versuchsreihe wurde wie in 2.2.7 erläutert nur mit RMS-Zelllinien durchgeführt und liefert zweierlei Datensätze zur Evaluation. So wurde einerseits die Viabilität der RMS-Zellen unter Inkubation untersucht und zum anderen die Sphäroid-Größe im Verlauf der Therapie gemessen.

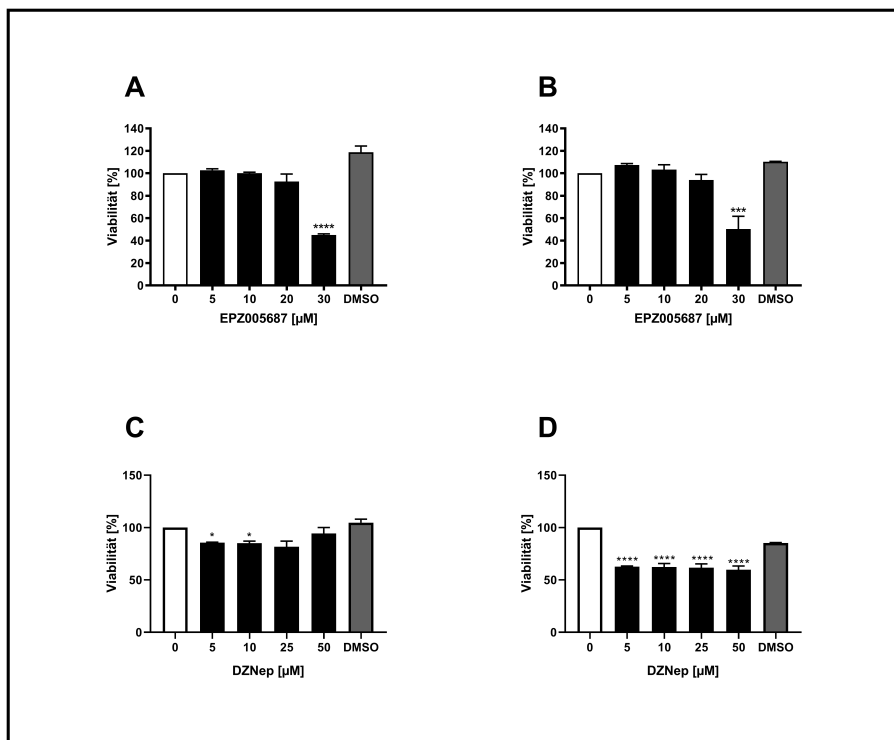


Abb. 40: Untersuchung der Viabilität bei Sphäroid Kulturen. Sphäroid-Assay mit der Substanz EPZ005687 und den RMS-Zelllinien RD (A) und RH30 (B), sowie mit der Substanz DZNep und den RMS-Zelllinien RD (C) und RH30 (D).

Bei beiden RMS-Zelllinien RD und RH30 kann bei einer Konzentration von 30 μM EPZ005687 eine signifikante Abnahme der Viabilität erreicht werden. Für niedrigere Konzentrationen lassen sich keine Signifikanzen nachweisen.

Bei der Behandlung mit DZNep tritt schon bei einer Konzentration von 5 μM ein signifikanter Effekt bei beiden RMS Zelllinien auf. Die Viabilität nimmt jedoch bei der alveolären RMS-Zelllinie RH30 auch bei höheren Konzentrationen nicht weiter ab (Abb. 40, D).

Die Ergebnisse für die Substanz AdOx werden nicht dargestellt, da sich kein Effekt auf die Viabilität im Sphäroid-Assay zeigte.

Die folgenden Balkendiagramme in Abb. 41 zeigen eine weitere Auswertung des Sphäroid-Assays. Hierbei wurde die Veränderung des Kugelumfangs unter fortgeführter Behandlung gemessen.

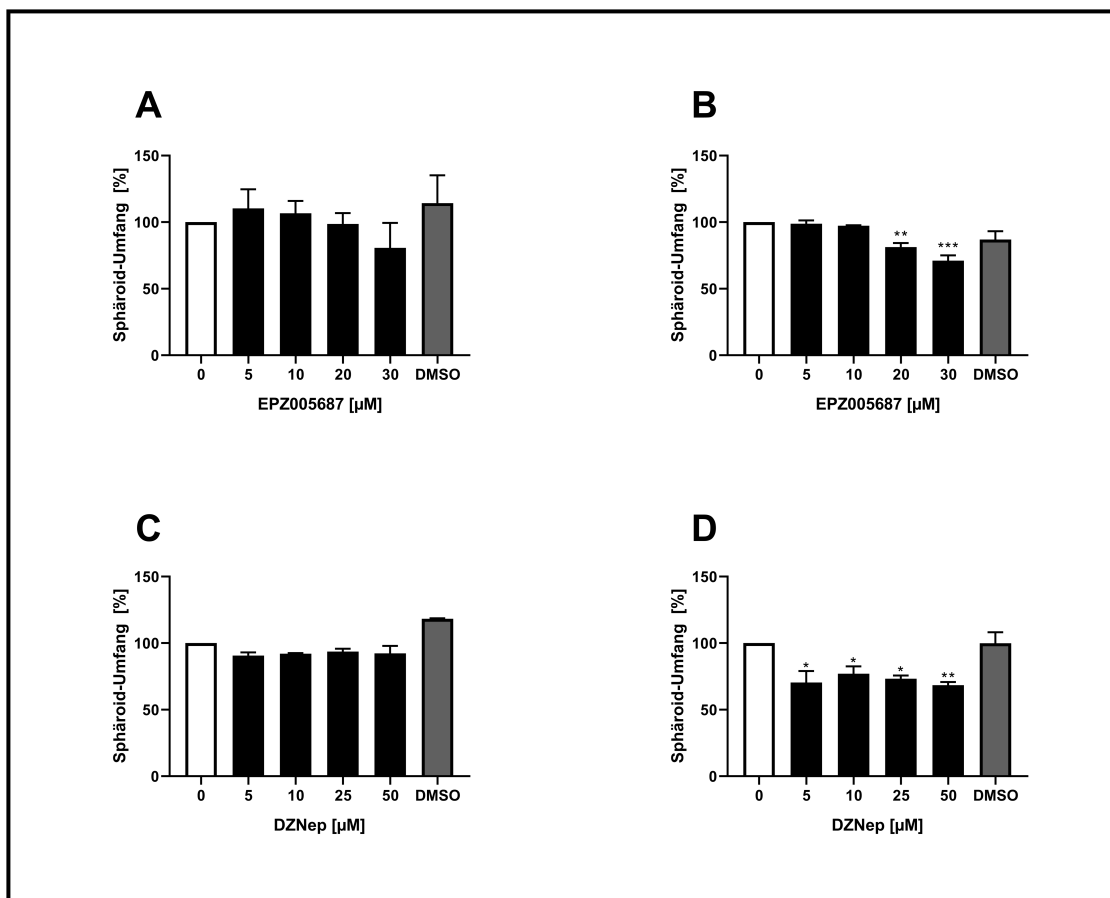


Abb. 41: Untersuchung des Sphäroid-Umfangs unter 72h Behandlung. Die untersuchten Sphäroide der RMS-Zelllinien RD (A & C) und RH30 (B & D) wurden mittels AxioVision ausgemessen und die Größenzunahme bzw. -abnahme gegen die unbehandelte Nullkontrolle verglichen.

Der Sphäroid-Umfang für die ERMS-Zelllinie RD wird weder durch EPZ005687 (A) noch durch DZNep (C) signifikant verändert. Für die ARMS-Zelllinie RH30 zeigt sich für EPZ005687 (B) eine signifikante Abnahme des Sphäroid-Umfangs für 20 μM und 30 μM. Auch der Inhibitor DZNep hat einen signifikanten Einfluss auf das Wachstumsverhalten der ARMS-Zelllinie RH30 (D). Hierbei zeigt sich für alle verwendeten Kon-

zentrationen eine signifikante Abnahme des Sphäroid-Umfangs auf ca. 80 % (Abb. 41, D).

Nachfolgend ist die Fotodokumentation der Sphäroid-Assays dargestellt.

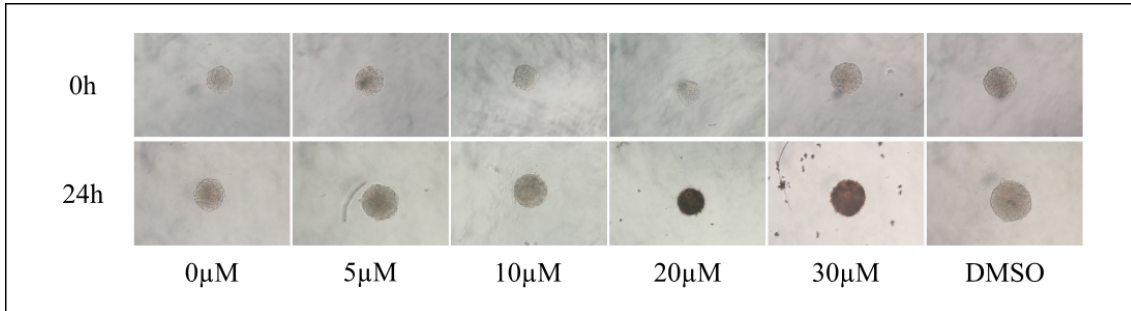


Abb. 42: Photographische Darstellung des Sphäroid-Assays mit EPZ005687 nach 0h und 72h, durchgeführt mit der Zelllinie RD.

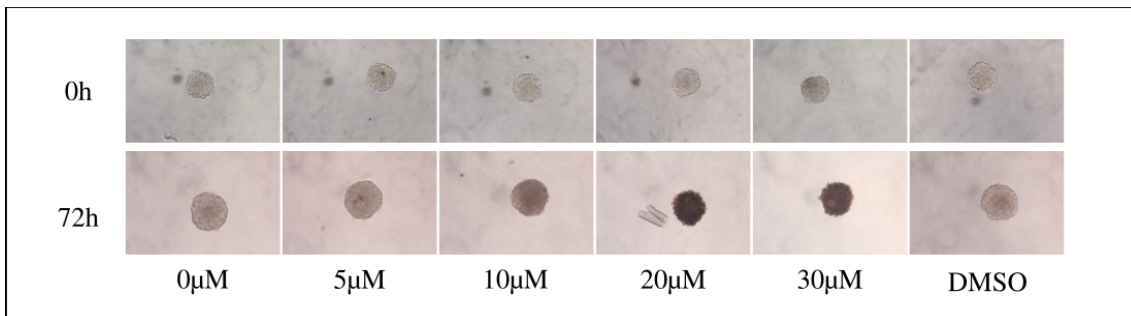


Abb. 43: Photographische Darstellung des Sphäroid-Assays mit EPZ005687 nach 0h und 72h, durchgeführt mit der Zelllinie RH30.

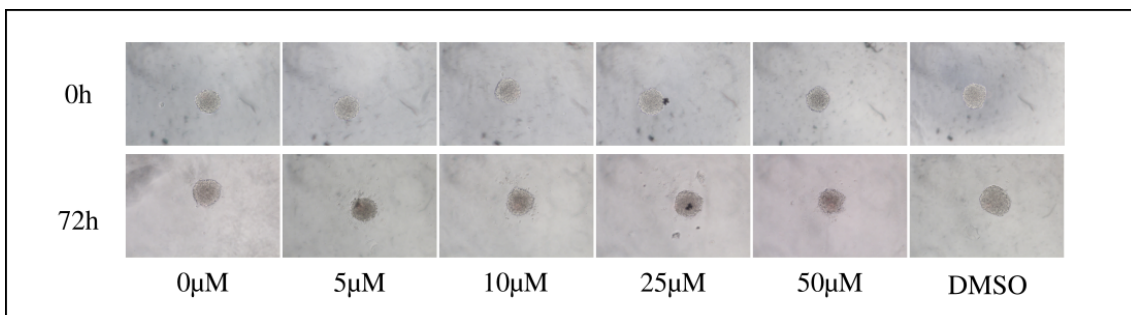


Abb. 44: Photographische Darstellung des Sphäroid-Assays mit DZNep nach 0h und 72h, durchgeführt mit der Zelllinie RD.

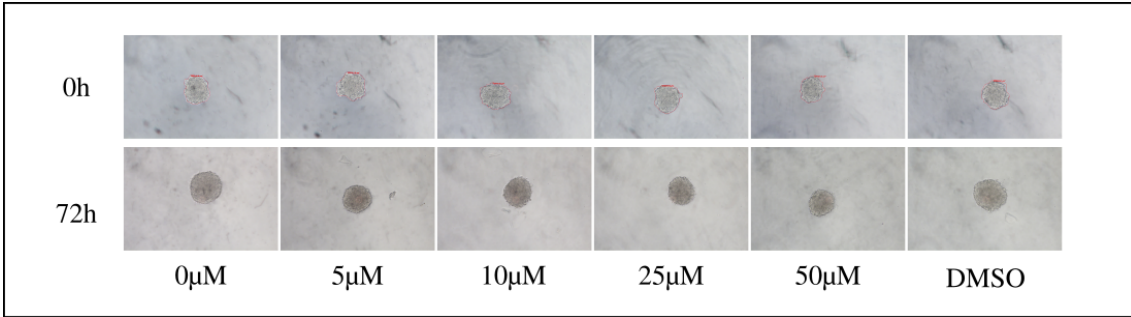


Abb. 45: Fotografische Darstellung des Sphäroid-Assays mit DZNep nach 0h und 72h, durchgeführt mit der Zelllinie RH30.

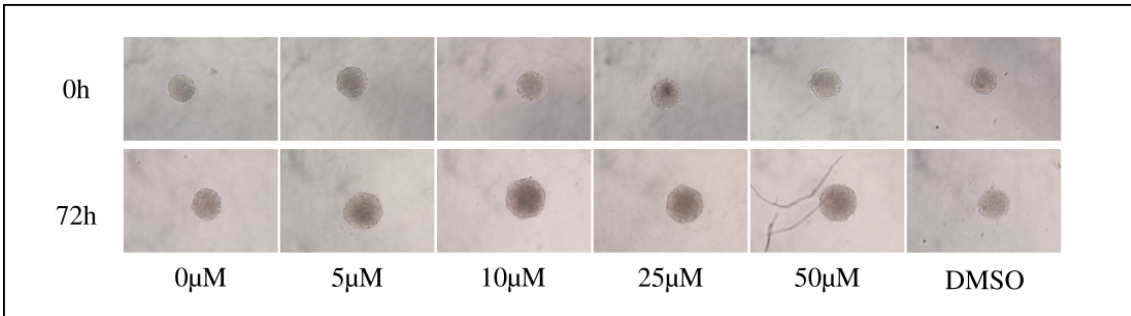


Abb. 46: Fotografische Darstellung des Sphäroid-Assays mit AdOx nach 0h und 72h, durchgeführt mit der Zelllinie RD.

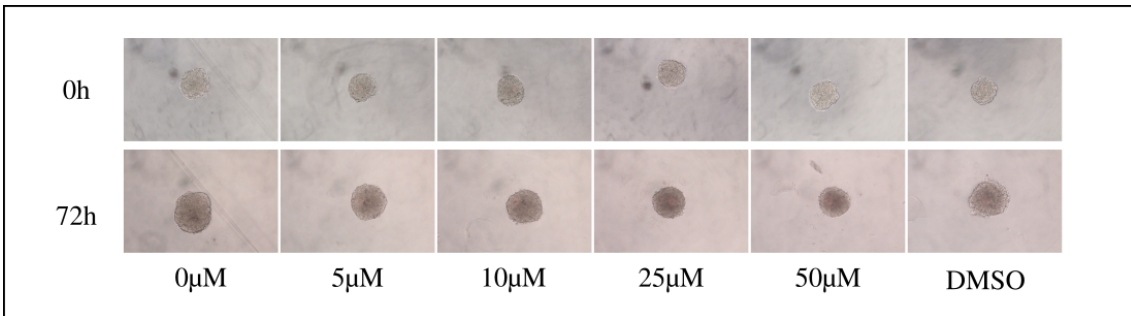


Abb. 47: Fotografische Darstellung des Sphäroid-Assays mit AdOx nach 0h und 72h, durchgeführt mit der Zelllinie RH30.

4. Diskussion

Die Epigenetik rückte in den letzten Jahren in den Fokus der Tumorforschung. So gibt es zunehmend Evidenz dafür, dass epigenetische Fehlregulationen zu schlechteren Prognosen in zahlreichen Tumorarten führen. Bereits 2002 wurde für das Prostatakarzinom gezeigt, dass die Dysregulation von EZH2 ein entscheidender Faktor in Entstehung und Progress ist (Gan et al., 2018; Varambally et al., 2002). Aufgrund der Relevanz für Prognose und Überleben wird derzeit intensiv nach zugrunde liegenden Mechanismen, sowie auch an der klinischen Nutzbarkeit dieser Erkenntnisse geforscht (Yamagishi and Uchimar, 2017). Auch beim RMS wird EZH2 vermehrt exprimiert. In einigen Studien zeigt sich diese Überexpression mit einer Penetranz von bis zu 100% (19 von 19 RMS-Tumoren) (Ciarapica et al., 2009). Aus der Literatur sind bereits einige molekulare Substanzen bekannt, die möglicherweise in epigenetische Regulationsmechanismen eingreifen und daher potenzielle Therapieansätze darstellen. Neben den hier getesteten Inhibitoren sind Beispiele für epigenetische Therapieansätze der Histon-Deacetylase-Inhibitor Valproat, der gute Ergebnisse bei der CLL *in vitro* zeigt (Bokelmann, 2008) oder die Lysin spezifische Histon-Demethylase (LSD1) für kleinzellige Lungenkarzinome und die akute myeloische Leukämie (Kikuchi et al., 2012).

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir die drei epigenetischen Inhibitoren EPZ005687, DZNep und AdOx in ihrer Wirkung auf alveoläre (ARMS) und embryonale Rhabdomyosarkom- (ERMS) Zelllinien. Dabei bewegen wir uns im Spannungsfeld neuer epigenetischer Therapieansätze zwischen EZH2-Degradation und direkter bzw. indirekter pharmakologischer Inhibierung von EZH2, um mögliche wirkungsvolle und nebenwirkungsarme Therapiestrategien für ein verbessertes Überleben Erkrankter zu etablieren (Ma et al., 2020).

EZH2 methyliert nicht nur H3K27. Es wurden weitere nicht-kanonische Aktivitäten von EZH2 identifiziert, darunter Methylierung von Nicht-Histon Substraten wie z.B. die Automethylierung von EZH2 zur Wirkungspotenzierung, Interaktion mit RNA und Proteinen wie z.B. β -Catenin und Untereinheiten des SWI/SNF-Komplexes, methylierungsgesteuerte Genaktivierung statt Repression (beispielhaft sei hier auf das Promyelozyten Leukämie Zinkfinger Protein verwiesen) und PRC-unabhängige

Transkriptionsfaktor-Regulierung (Wang and Wang, 2020). Die Effekte, die durch die Inhibierung der Methylierungsaktivität von EZH2 verursacht werden, können sich daher von den Effekten, die durch das Ausschalten von EZH2 entstehen, unterscheiden (Kim et al., 2015; Lawrence and Baldwin, 2016; Ma et al., 2020; Wee, 2014). Angewendet auf die vorliegende Arbeit kann dies die Ergebnisunterschiede zwischen unspezifischen Inhibitoren, wie DZNep, die u.a. eine Degradation von EZH2 induzieren, und direkten Inhibitoren wie EPZ005687, die den EZH2 Spiegel nicht beeinflussen, erklären (Wang and Wang, 2020).

Die Methyltransferase-Inhibitoren DZNep und AdOx werden als unspezifische Inhibitoren bezeichnet, da sie über die Akkumulation von SAH ein negatives Feedback nicht nur auf die Lysin-Methylierung an H3K27 ausüben, sondern auch Lysin-, Arginin- und DNA-Methylierungen an anderer Stelle beeinflussen. DZNep werden zudem antiproliferative Eigenschaften zugeschrieben, indem es durch eine Dexoxyazacytidin vermittelte Hochregulation der Antigenexpression in Lungenkrebszellen diese für das Immunsystem erkennbar macht (Kikuchi et al., 2012; Miranda et al., 2009).

In dieser unspezifischen Wirkweise steckt die Problematik, gegebenenfalls weitere Stoffwechsel- und Signalwege zu verändern, die für eine normale Zellhomöostase benötigt werden. Denn der Methionin-Zyklus spielt nicht nur für DNA-Methylierungen eine wichtige Rolle, sondern ist in seiner Funktion auch für die korrekte Funktion der Leber, der Synthese von Neurotransmittern wie Adrenalin, Verwertung wichtiger Nähr- und Vitalstoffe und vielen weiteren Funktionen essentiell (Arndt, 2004; Biesalski, 2002). In einem gesamtphysiologisch pharmakokinetischen Mausmodell wurde bereits eine Dosis-abhängige Nephrotoxizität von DZNep gezeigt (Sun et al., 2015). In einem weiteren Mausmodell untersuchten Lhuissier et al. mögliche durch DZNep induzierte kognitive und organtoxische Nebenwirkungen. Es zeigte sich eine transiente Wachstumsreduktion, eine reversible Splenomegalie, sowie eine persistierende Reduktion des Hodenvolumens und der Erythropoese. Abgesehen von diesen Effekten ist die Applikation von DZNep, laut Autoren, jedoch grundsätzlich als sicher im Tiermodell anzusehen; insbesondere da sich keinerlei Auswirkungen auf das Verhalten oder die kognitiven Funktionen zeigten (Lhuissier et al., 2018). Auch die bereits diskutierten EZH2 unabhängigen Veränderungen ma-

chen es schwer, potenzielle Nebenwirkungen von DZNep valide vorherzusagen und würden ein enges klinisches Monitoring im Studiendesign bedingen. Gegen eine hohe Toxizität spricht, dass die als gesundes Vergleichsgewebe verwendete Zelllinie SkMc nicht durch DZNep in ihrer Viabilität eingeschränkt wurde. Hier wird es weiterer Studien und *in vivo* Modelle benötigen, um eine valide Aussage zur potenziellen Toxizität indirekter epigenetischer Inhibitoren wie DZNep zu treffen.

Für DZNep wurde ein antimetastatischer Effekt in einem Glioblastom-Xenograft-Modell demonstriert (Kim et al., 2013). Vergleichbar damit sind die Ergebnisse des CFA-Assays für RD und RH30. Im 3D-Mikrometastasen-Modell waren jedoch nur Auswirkungen auf die ARMS-Zelllinie RH30 zu beobachten. Die unterschiedlichen Expressionsmuster zwischen FPRMS und FNRMS sind eine mögliche Erklärung und werden im Verlauf der Diskussion ausführlicher behandelt.

Betrachtet man die Wirkung von DZNep auf die Apoptose bei den verwendeten RMS-Zelllinien, so zeigte sich für RD kein, jedoch für RH30 ein signifikanter Effekt. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Ciarapica et al. (Ciarapica et al., 2014b). Bei einer weiteren Tumorentität, dem embryonalen Chondrosarkom, zeigten Aury-Landes et al., dass nicht die indirekte EZH2 Inhibition, sondern vermutlich die EGFR- (*epidermal growth factor receptor*) Expression ursächlich für den proapoptischen Effekt *in vitro* und *in vivo* sein könnte (Aury-Landas et al., 2019). Denn EGFR, ein Zellwachstumsstimulus und Inhibitor der Apoptose, ist wie in vielen weiteren Tumoren, auch im alveolären und embryonalen RMS überexprimiert (Ganti et al., 2006). Weitere Autoren sehen darin einen weiteren potenziell wirksamen Therapieansatz (Niesen et al., 2015). Gegenstand weiterer Untersuchung bleibt somit, wieso DZNep nur im ARMS bzw. der Zelllinie RH30 Apoptose induziert und ob die EGFR-Expression dafür relevant ist.

Adenosine dialdehyde (AdOx) wirkt als indirekter epigenetischer Inhibitor über die Akkumulierung von SAH und wird auch zur Gruppe der AdoHcy Hydrolase Inhibitoren gezählt (Bartel and Borchardt, 1984). In Studien mit Brust- und Blasenkrebszelllinien wurden ähnliche Auswirkungen wie durch DZNep beschrieben, nämlich eine Abnahme der EZH2 Protein-Levels und eine globale Abnahme von H3K27me3. Das klinische Potenzial von AdOx wird jedoch als niedrig und im direkten Vergleich mit

DZNep als geringer eingestuft. Als mögliche biochemische Erklärung formulierte Miranda et al. die These, dass AdOx wegen der beiden labilen Aldehydgruppen metabolisch in der Zelle nicht überleben könnte (Miranda et al., 2009). Auch in der vorliegenden Arbeit ist AdOx insbesondere im Vergleich mit DZNep und EPZ005687 schwächer wirksam hinsichtlich Reduktion der Zellviabilität, Reduktion der Koloniebildung, Induktion von Apoptose und zeigt keine Wirkung in Zellzyklus-Analysen, beim 3D Migrationsmodell Sphäroid, sowie Wound-Healing Assay der ERMS Zelllinie RD. Darüber hinaus sind andere AdoHcy Hydrolase Inhibitoren wie Neplanocin A toxisch (Kondo et al., 2008). Eine durchwachsene unspezifische Wirksamkeit, potenziell instabile pharmakologische Eigenschaften und bessere vergleichbare Therapieoptionen sprechen gegen weitere Versuche oder *in vivo* Studien für AdOx als potenzielles Therapeutikum bei RMS.

DZNep und AdOx greifen auf komplexe Weise in die epigenetische Regulation ein; sie beeinflussen Methylierung global und sprechen auch non-kanonische Aktivitäten von EZH2 an (Ma et al., 2020). In den beiden Zelllinien RD und RH30 wurden die getesteten zellulären Merkmale in der vorliegenden Arbeit am meisten durch EPZ005687 beeinflusst, wobei Migration und Sphäroid-Zirkumferenz der RD-Zelllinie durch keinen verwendeten Inhibitor gestört wurden. Die negative und indirekte Feedback-Hemmung ist offensichtlich weniger wirksam als die direkte Inhibierung. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass DZNep und AdOx durch die Methylierung anderer Gen- und Chromatinabschnitte den Effekt einer H3K27-Inhibierung konterkarieren.

EPZ005687 ist aus einem Hochdurchsatzscreening/-verfahren mit über 175.000 Verbindungen hervorgegangen und gilt als der Erste direkte und selektive Inhibitor von EZH2. EPZ005687 wirkt über kompetitive Hemmung von SAM und nicht-kompetitiv über das Peptid-Substrat EZH2-SAH; dabei war es 50x selektiver für den PRC2/EZH2 Komplex als 15 vergleichbare Methyltransferasen (Fioravanti et al., 2018; Knutson et al., 2012). EPZ005687 zeigte in der vorliegenden Arbeit eine vergleichbare Wirksamkeit gegen RD und RH30 bei der Reduktion der Zellviabilität und der Koloniebildung, der Zellzyklusinhibition und der Apoptose-Induktion, konnte

jedoch nur für die ARMS Zelllinie RH30 Migration und Sphäroid-Zirkumferenz inhibieren.

Maligne rhabdoide Tumoren weisen typischerweise keine genetischen Alterationen auf, zeichnen sich aber mit fast vollständiger Penetranz durch einen Verlust von *SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily B member 1* (SMARCB1), einer der Hauptkomponenten des SWI/SNF-Chromatin-Remodeling-Komplexes, aus (Lee et al., 2012). Auch für das RMS ist eine Mutation im SMARCB1-Gen beschrieben (DeCristofaro et al., 1999). In einer weiteren Studie ist beschrieben, dass PRC2 und SWI/SNF antagonistisch Genexpression und Signalwege wie RB, MYC und Cyclin D1 regulieren (Roberts and Biegel, 2009). Dass mehr mit EPZ005687 behandelte Zellen in der G1 Phase verbleiben, stützt die These, dass EPZ005687 an diesem Antagonismus ansetzt. EPZ005687 scheint durch eine Inhibierung von PRC2 das gestörte Gleichgewicht zwischen SWI/SNF und PRC2 günstig zu beeinflussen (Knutson et al., 2012).

Dem stehen die Ergebnisse von Knutson et al. entgegen, die keinen Effekt von EPZ6438 auf die Zellzyklusinhibition oder Zellmorphologie der RD Zelllinie zeigten. EPZ6438 (Tazemetostat) ist eine Weiterentwicklung von EPZ005687. Es besitzt anders als Tazemetostat suboptimale pharmakokinetische Eigenschaften, die eine klinische Anwendung, wie z.B. eine orale Verabreichung, einschränken (Knutson et al., 2013). Ciarapica et al. konnten für MC1945, einen weiteren epigenetischen Inhibitor, eine Wirkung auf die Zelllinie RD zeigen, indem das Wirksubstrat alle 24h ausgetauscht und somit höhere Wirkdosen erzielt wurden. Dieser Ansatz wurde auch in der vorliegenden Arbeit verfolgt. Trotz Verwendung eines anderen direkten Inhibitors und gewisser Limitationen wie z.B. unterschiedlichen Hemmkonstanten, eine um 24h längere Inkubationszeit in den berichteten Apoptose-Experimenten und höheren Konzentrationen der Substanzen kann man die Resultate dieser Arbeit mit den bisherigen publizierten Ergebnissen von Ciarapica et al. vergleichen. Bei geringen Konzentrationen (5 μ M) zeigt sich kein Effekt auf die Zelllinie RD, wohl aber bei höheren Dosierungen und in RH30 Zellen für Migration und Apoptose (Ciarapica et al., 2014a; Ciarapica et al., 2014b; Schmidt et al., 2021).

Die vorliegende Arbeit zeigt eine unterschiedliche Wirksamkeit, auch Dosis-abhängig, der verwendeten epigenetischen Inhibitoren je nach verwendeter Zelllinie. Im Folgenden werden mögliche Erklärungen für die Unterschiede diskutiert.

In der Literatur gibt es viele Beispiele für die heterogene Regulation der Migration im alveolären und embryonalen RMS sowie die Einteilung in FPRMS und FNRMS anhand von Translokationen, micro-RNA- und Genexpression (Lae et al., 2007; Missiaglia et al., 2017; Williamson et al., 2010). Das PAX3-FOXO1 Fusionsprotein beeinflusst verschiedene nachgeschaltete Zielgene, die wiederum an Zellmotilität und Invasivität beteiligt sind (Loupe et al., 2016). So sind in der ARMS-Zelllinie RH30 verglichen mit der ERMS-Zelllinie RD Gene der Zellmotilität wie *Forkhead Box F1* (FOXF1) und *LIM Domain only 4 (LMO4)* (Transkriptionsfaktoren), *Engulfment- und Zellmotilitätsprotein 1* (ELMO1 – ein Protein aktiv in Zellstrukturveränderungen) und *NEL-1-like-Gen* (NELL1; EGF-ähnliche *Repeats*) überexprimiert (Armeanu-Ebinger et al., 2011; Rapa et al., 2012). Ein *Knockout* mittels EZH2-Inhibitoren hatte eine signifikantere Wirkung auf die Migration im Scratch sowie im 3D-Mikrometastasen-Modell der ARMS Zelllinie RH30. Bereits 2014 zeigten Ciarapica et al., dass die EZH2 Depletion in FPRMS proapoptotisch wirkte und die depletierten Zellen unfähig zur weiteren Proliferation waren (Ciarapica et al., 2014b). Daraus lässt sich folgern, dass epigenetische Inhibitoren wie EPZ005687 besonders wirksam bei den prognostisch schlechteren FPRMS sind. Eine wirksamere Inhibition ließe sich über die stärkere Suppression von FOXF1 erklären. So ist FOXF1 antiapoptotisch und unterdrückt die Autophagie von Zellen; dabei ist es mit einer direkten PRC2-Interaktion assoziiert (Zhao et al., 2021). LMO4 wird direkt durch MYCN reguliert und eine erhöhte MYCN Expression geht mit einer schlechten Prognose bei Neuroblastomen einher (Duffy et al., 2017). MYCN wiederum wird direkt über das Fusionsprotein PAX3-FOXO1 vermehrt exprimiert und interagiert mit PRC2. Es amplifiziert epigenetische Modifizierer wie PRC2 und stimuliert alle Komponenten wie zum Beispiel EED, Suz12 und EZH2 (He et al., 2013; Neri et al., 2012).

Der Transkriptionsfaktor SNAIL ist in RH30 Zellen verglichen mit RD Zellen überexprimiert (Skrzypek et al., 2018). SNAIL reguliert unter anderem die Migration durch Interaktion mit dem Signalweg PI3K/AKT und micro-RNA, sowie die epithelial-mesenchymale Transition durch die Regulation von E-Cadherin. SNAIL kann

darüberhinaus die Differenzierung einer myogenen Zelle durch das Verdrängen von MyoD negativ beeinflussen (Skrzypek et al., 2020; Skrzypek et al., 2018). Die signifikantere Wirkung von EPZ005687 und den anderen epigenetischen Inhibitoren auf das Migrationsverhalten der ARMS Zelllinie RH30 weisen auf eine potenzielle Verbindung von EZH2 und SNAIL hin. Beide sind in aggressiveren Tumoren erhöht exprimiert und stehen für eine Progression von RMS hin zu Metastasierung und schlechterem klinischen *Outcome*. Für die epithelial-mesenchymale Transition ist ein Zusammenwirken von SNAIL und EZH2, als katalytische Einheit des PRC2, beschrieben (Battistelli et al., 2017). Dies stützt die These, dass EZH2 und SNAIL ein integriertes Signalnetzwerk bilden, dass die Tumorzellen zu Bildung von Metastasen und zum Fortschreiten des RMS anregt. So beeinflusste EPZ005687 nur die RH30 Zelllinie bei der Messung von Apoptose am FACS sowie dem SCRATCH Assay signifikant, nicht jedoch die ERMS Zelllinie RD. Die oben angeführte unterschiedliche Genexpression der Zelllinien und damit einhergehender Sensibilität auf epigenetische Veränderungen ist hierfür eine naheliegende Erklärung. Eine andere Erklärung für die signifikante Hemmung der Migration für die Zelllinie RH30 wäre durch die Überexpression von NELL1; Tombolan et al. zeigten, dass die NELL1 Expression von der DNA Methylierung abhängt und ein *Silencing* deutlichen Einfluss auf Migration und Bewegungsfähigkeit der Zelle hat (Tombolan et al., 2017). Eine direkte Verbindung zwischen NELL1 und PRC2 ist in der Literatur jedoch nicht beschrieben.

Die von Schleicher et al. eingeführte Zelllinie SRH weist ebenfalls eine Überexpression von PRC2 im Vergleich zu SkMc auf, sodass auf eine potenzielle Wirksamkeit der verwendeten Inhibitoren geschlossen werden kann. Die Ergebnisse des Viabilitätsassays zeigen jedoch nur für EPZ005687 einen signifikanten Effekt, der sich für den direkten Inhibitor im Migrationsassay nicht wiederholen lässt. Eine potenzielle Erklärung für die schwache Wirksamkeit der verwendeten Inhibitoren kann die hohe Expression von MYOD1 in SRH sein. Erst die Downregulation von EZH2 ermöglicht eine partielle Redifferenzierung via MYOD. Bei bereits hoher MYOD Expression in der SRH-Zelllinie ließe sich hier kein Benefit beobachten (Juan et al., 2009; Mousavi et al., 2012; Schleicher et al., 2020). Zudem sind für die Zelllinie komplexe genetische Abberationen wie der Verlust von 10q22, der Zuwachs von Chromosom 11 und der Verlust von

Chromosom 22 oder zusätzliche Chromosomen 16, 18 und 21 beschrieben, die eine epigenetisch-therapeutisches Eingreifen verkomplizieren. Ebenso fehlt der Zelllinie SRH das Fusionsprotein PAX-FOXO1, das eine gute Wirksamkeit der Inhibitoren beim ARMS-Subtyp erklären kann (Schleicher et al., 2020). Ein weiterer Hinweis auf eine insuffiziente Wirkung zeigt sich darin, dass die Lösungsmittelkontrolle mittels DMSO eine ähnliche Wirkung auf die Zelllinie SRH aufweist. So kann hier ein scheinbarer Effekt durch das Lösungsmittel verursacht sein.

Zusammenfassend scheint die Zelllinie SRH ungeeignet für epigenetische Inhibitoren, die am PR-Komplex interagieren. Andere Substanzen wie z.B. Arsen Trioxid zeigten für die Zelllinie SRH bereits eine gute Wirksamkeit *in vitro* und könnten ein therapeutischer Ansatz in dieser komplex-aberranten Zelllinie sein (Boehme et al., 2016).

5. Zusammenfassung

Die Prognose des kindlichen Rhabdomyosarkoms (RMS) bleibt insbesondere in fortgeschrittenen Tumorstadien oder bei Auftreten eines Rezidivs limitiert. Da die Behandlungskonzepte weiterhin begrenzt sind, besteht die Notwendigkeit neue Therapiestrategien zu entwickeln und zu etablieren.

Seit der Entschlüsselung des menschlichen Genoms im Jahr 2006 rücken epigenetische Regulationsmechanismen zunehmend in den Fokus von Diagnostik und Therapie.

Dabei stellt der Polycomb Repression Complex 2 (PRC2) eine wesentliche epigenetische Schlüsselstelle zwischen Differenzierung und Proliferation in der Zellzyklusregulation dar. Die gesteigerte Expression von PRC2 ist in einigen Tumorentitäten, so auch im RMS, mit einer erhöhten Malignität und schlechteren Prognose assoziiert. In den beiden häufigsten Subtypen, dem alveolären und embryonalen RMS, ist PRC2 überexprimiert. Durch epigenetische Inhibitoren können regulatorische Proteinkomplexe wie PRC2 beeinflusst werden.

Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss von drei epigenetischen Inhibitoren, einem direkten Inhibitor, EPZ005687, sowie zwei indirekten Inhibitoren, DZNep und AdOx (Abb. 7) auf die Rhabdomyosarkomzelllinien des embryonalen (RD), alveolären (RH30) und spindelzelligen (SRH) Subtyps. Zudem werden RMS in Fusionspositive (FPRMS) und Fusionsnegative Rhabdomyosarkom (FNRMS) eingeteilt.

Der Einfluss der Inhibitoren auf Zellviabilität wurde mittels MTT-Assay, das Migrationsverhalten in 2D und 3D, das Metastasierungspotenzial mittels Colony-forming-Assay, sowie die Apoptose und der Zellzyklusarrest der Tumorzellen am FACS untersucht.

Dabei konnte gezeigt werden, dass der direkte Inhibitor EPZ005687 im Hinblick auf die Reduktion der Zellviabilität, die Induktion von Apoptose, und vermehrtem Zellzyklusarrest die Tumorzellen stärker hemmt als die untersuchten indirekten Inhibitoren. Über die indirekte und undifferenzierte Wirkung der Inhibitoren DZNep und AdOx kann zudem eine Konterkarierung ihrer eigenen Wirksamkeit nicht sicher ausgeschlossen werden. Auffällig war zudem die unterschiedliche Wirksamkeit der Inhibitoren auf die verschiedenen Tumorzelllinien. Insbesondere beim prognostisch ungünstigeren FPRMS zeigte sich eine höhere Suppression von Migration und eine proapoptotische Wirkung von EPZ005687 *in vitro*.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit unter Verwendung verschiedener methodischer Ansätze auf, dass epigenetische Inhibitoren auf Zellebene eine regulatorische Funktion auf verschiedene Rhabdomyosarkomsubtypen besitzen. Desweiteren unterscheidet sich die Wirksamkeit der direkten und indirekten Inhibitoren untereinander, sowie ihre Wirkung auf die jeweiligen Subtypen.

Diese Arbeit gibt hiermit einen weiteren Einblick in die komplexen epigenetischen Regulationsmechanismen, es bedarf jedoch für ein tieferes Verständnis weiterer, umfangreicher interdisziplinärer Studien. Erst nach genauer genetischer und epigenetischer Analyse der zu behandelnden Tumore ist eine Verwendung epigenetisch wirksamer Substanzen zielgenau im Sinne einer individualisierten Medizin möglich. So gibt es bereits einen oral einnehmbaren Arzneistoff, Tazemetostat (EPZ6438), der aus dem epigenetischen Inhibitor EPZ005687 entwickelt wurde, und für die Behandlung von Epitheloidsarkomen sowie follikulären Lymphomen seine klinische Zulassung erhalten hat.

6. Danksagung

Meine größte Dankbarkeit möchte ich PD Dr. rer. nat. Evi Schmid und Dr. med. Andreas Schmidt für Ihre enge Betreuung und Geduld aussprechen.

Meinen Eltern und Geschwistern Danke für Ihr ständiges Begleiten und Motivieren.

Ein großer Dank gebührt auch Herrn Professor Warmann für die Überlassung des Themas und die fachliche Beratung und Betreuung.

Danke an das Laborteam – Bettina, Julia und Melanie – für die freundliche Aufnahme, Erklärungen und eure Geduld.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Ich, Lucas Benjamin Behrendt, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Epigenetische Regulation von EZH2 in soliden Tumoren des Kindesalters am Beispiel des Rhabdomyosarkoms

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Abkürzungsverzeichnis

AdOx	Adenosin periodate oxidized
AEBP2	Adipozyten Enhancer Bindungsprotein 2
ARF	Adenosyl-Ribosylierungs-Faktor
ARMS	Alveoläres Rhabdomyosarkom
bHLH	Basic Helix-Loop-Helix
BMI1	B-Lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog
BSA	Bovines Serumalbumin
CBX	Chromatin-Domäne enthaltend
CFA	Colony Forming Assay
COG	Childrens Oncology Group
CpG	5'-C-Phosphat-G-3'
CWS	Cooperativen Weichteilsarkom Studiengruppe
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNMT	DNA Methyltransferasen
DZNep	3-Deazaneplanocin A
EED	Embryonic Ectoderm Development
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELMO1	Engulfment- und Zellmotilitätsprotein 1
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERMS	Embryonales Rhabdomyosarkom
EZH1/2	Enhancer of Zeste 1/2
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorting
FBOX32	F-box Protein 32
FCS	Fetal Calf Serum
FCS	Foward Scattered
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR4	Fibroblast growth factor receptor 4
FN RMS	Fusionsnegatives Rhabdomyosarkom
FOXF1	Forkhead Box F1
FPRMS	Fusionspositives Rhabdomyosarkom

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HAT	Acetyltransferasen
HDAC	Histon Deacetylasen
H3K4/9/27	Histon 3 Lysin 4/9/27
H4K20	Histon 4 Lysin 20
IGF2	Insulin Growth Factor 2
JARID2	Gene Targeting Jumonji
KDM2B	K-spezifische Lysin Demethylase 2B
kPRC1	Kanonischer Polycomb Repressive Complex 1
LMO4	LIM Domain only 4
mCK	Muscle Creatin Kinase
MHC	Myosin Heavy Chain
miRNA	Micro-RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
MyoD	Myogener Faktor 3
Myf5	Myogener Faktor 5
MyoG	Myogenin G
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NELL1	NEL-1 like Gen
NGS	Next-Generation Sequencing
nkPRC1	Nicht kanonischer Polycomb Repressive Complex 1
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
PcG	Polycomb Group
PCGF4	Polycomb Group RING Finger Protein 4
PET/CT	Positronen Emissions-Tomographie/Computertomographie
PHC	Polyhomeotic Complexes
PI	Propidium Iodid
PRC	Polycomb Repressive Complex
PS	Phosphatidylserin
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog

PTM	Post-translationale Modifizierungen
RMS	Rhabdomyosarkom
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SAH	S-Adenosylhomocystein
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SEM	Standardfehler
SET	Su(var)3-9, Enhancer of Zeste and Trithorax
SMARCB1	SWI/SNF-verwandter matrix-assoziiertes aktinabhängiger Regulator der Chromatin-Unterfamilie B, Mitglied 1
SPRY1	Sprouty RTK Signaling Antagonist 1
SSC	Side Scattered
SUZ12	Suppressor of Zeste 12
TEMED	Tetramethylenendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
YY1	Ying Yang 1
ZdK1/2	Zyclin-abhängige Kinase 1/2

Literaturverzeichnis

- <http://www.kinderkrebsregister.de/>.
- http://www.kinderkrebsregister.de/typo3temp/secure_downloads/22297/0/2df4719687ba2596d4216218a4f4632763b64847/jb2018_oor_s.pdf.
- <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/weichgewebssarkome-maligne-weichgewebstumoren-des-erwachsenen/@/@view/html/index.html>.
- <https://www.promocell.com/product/human-skeletal-muscle-cells-skmc/>.
- <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c12530?lang=de®ion=DE>.
- (2016). The Surgery of Childhood Tumors. Third Edition. *Anticancer Res* 36, 4369.
- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., and Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol* 37, 163-176.
- Agamanolis, D.P., Dasu, S., and Krill, C.E., Jr. (1986). Tumors of skeletal muscle. *Hum Pathol* 17, 778-795.
- Aguirre-Arteta, A.M., Grunewald, I., Cardoso, M.C., and Leonhardt, H. (2000). Expression of an alternative Dnmt1 isoform during muscle differentiation. *Cell Growth Differ* 11, 551-559.
- Andrassy, R.J. (2002). Advances in the surgical management of sarcomas in children. *Am J Surg* 184, 484-491.
- Armeanu-Ebinger, S., Bonin, M., Habig, K., Poremba, C., Koscielniak, E., Godzinski, J., Warmann, S.W., Fuchs, J., and Seitz, G. (2011). Differential expression of invasion promoting genes in childhood rhabdomyosarcoma. *Int J Oncol* 38, 993-1000.
- Arndt, K.A., T. (2004). *Handbuch Protein und Aminosäuren*. Novagenics Verlag 2. Auflage, 63-72, 128, 189-199, 248.
- Arnold, M.A., and Barr, F.G. (2017). Molecular diagnostics in the management of rhabdomyosarcoma. *Expert Rev Mol Diagn* 17, 189-194.
- Asangani, I.A., Ateeq, B., Cao, Q., Dodson, L., Pandhi, M., Kunju, L.P., Mehra, R., Lonigro, R.J., Siddiqui, J., Palanisamy, N., *et al.* (2013). Characterization of the EZH2-MMSET histone methyltransferase regulatory axis in cancer. *Mol Cell* 49, 80-93.
- Aury-Landas, J., Girard, N., Lhuissier, E., Adouane, D., Delepee, R., Boumediene, K., and Bauge, C. (2019). The Antitumoral Effect of the S-Adenosylhomocysteine Hydrolase Inhibitor, 3-Deazaneplanocin A, is Independent of EZH2 but is Correlated with EGFR Downregulation in Chondrosarcomas. *Cell Physiol Biochem* 53, 731-745.
- Bartel, R.L., and Borchardt, R.T. (1984). Effects of adenosine dialdehyde on S-adenosylhomocysteine hydrolase and S-adenosylmethionine-dependent transmethylation in mouse L929 cells. *Mol Pharmacol* 25, 418-424.
- Battistelli, C., Cicchini, C., Santangelo, L., Tramontano, A., Grassi, L., Gonzalez, F.J., de Nonno, V., Grassi, G., Amicone, L., and Tripodi, M. (2017). The Snail repressor recruits EZH2 to specific genomic sites through the enrollment of the lncRNA HOTAIR in epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncogene* 36, 942-955.
- Berger, S.L. (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 447, 407-412.
- Biesalski, H.K., J.; Schümann, K. (2002). *Vitamine, Spurenelemente und Mineralstoffe*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart/New York, 83, 450-451.
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16, 6-21.
- Bird, A. (2007). Perceptions of epigenetics. *Nature* 447, 396-398.
- Bishop, T.C., and Schulten, K. (1996). Molecular dynamics study of glucocorticoid receptor-DNA binding. *Proteins* 24, 115-133.
- Bodor, C., Grossmann, V., Popov, N., Okosun, J., O'Riain, C., Tan, K., Marzec, J., Araf, S., Wang, J., Lee, A.M., *et al.* (2013). EZH2 mutations are frequent and represent an early event in follicular lymphoma. *Blood* 122, 3165-3168.

Boehme, K.A., Zaborski, J.J., Riester, R., Schweiss, S.K., Hopp, U., Traub, F., Kluba, T., Handgretinger, R., and Schleicher, S.B. (2016). Targeting hedgehog signalling by arsenic trioxide reduces cell growth and induces apoptosis in rhabdomyosarcoma. *Int J Oncol* 48, 801-812.

Bokelmann, I. (2008). Epigenetic therapy options by the example of Chronic Lymphocytic Leukemia and Myelodysplastic Syndrome.

Bracken, A.P., Pasini, D., Capra, M., Prosperini, E., Colli, E., and Helin, K. (2003). EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J* 22, 5323-5335.

Buckingham, M., Bajard, L., Chang, T., Daubas, P., Hadchouel, J., Meilhac, S., Montarras, D., Rocancourt, D., and Relaix, F. (2003). The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J Anat* 202, 59-68.

Buckingham, M., and Relaix, F. (2015). PAX3 and PAX7 as upstream regulators of myogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 44, 115-125.

Cao, R., Tsukada, Y., and Zhang, Y. (2005). Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing. *Mol Cell* 20, 845-854.

Cao, R., and Zhang, Y. (2004). SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex. *Mol Cell* 15, 57-67.

Caretti, G., Di Padova, M., Micales, B., Lyons, G.E., and Sartorelli, V. (2004). The Polycomb Ezh2 methyltransferase regulates muscle gene expression and skeletal muscle differentiation. *Genes Dev* 18, 2627-2638.

Caretti, G., Palacios, D., Sartorelli, V., and Puri, P.L. (2011). Phosphoryl-EZH-ion. *Cell Stem Cell* 8, 262-265.

Chen, D.H., Wu, K.T., Hung, C.J., Hsieh, M., and Li, C. (2004). Effects of adenosine dialdehyde treatment on in vitro and in vivo stable protein methylation in HeLa cells. *J Biochem* 136, 371-376.

Chen, H., Tu, S.W., and Hsieh, J.T. (2005a). Down-regulation of human DAB2IP gene expression mediated by polycomb Ezh2 complex and histone deacetylase in prostate cancer. *J Biol Chem* 280, 22437-22444.

Chen, X., Hiller, M., Sancak, Y., and Fuller, M.T. (2005b). Tissue-specific TAFs counteract Polycomb to turn on terminal differentiation. *Science* 310, 869-872.

Ciarapica, R., Carcarino, E., Adesso, L., De Salvo, M., Bracaglia, G., Leoncini, P.P., Dall'agnese, A., Verginelli, F., Milano, G.M., Boldrini, R., *et al.* (2014a). Pharmacological inhibition of EZH2 as a promising differentiation therapy in embryonal RMS. *BMC Cancer* 14, 139.

Ciarapica, R., De Salvo, M., Carcarino, E., Bracaglia, G., Adesso, L., Leoncini, P.P., Dall'Agnese, A., Walters, Z.S., Verginelli, F., De Sio, L., *et al.* (2014b). The Polycomb group (PcG) protein EZH2 supports the survival of PAX3-FOXO1 alveolar rhabdomyosarcoma by repressing FBXO32 (Atrogin1/MAFbx). *Oncogene* 33, 4173-4184.

Ciarapica, R., Russo, G., Verginelli, F., Raimondi, L., Donfrancesco, A., Rota, R., and Giordano, A. (2009). Deregulated expression of miR-26a and Ezh2 in rhabdomyosarcoma. *Cell Cycle* 8, 172-175.

Conway, E.M., Bracken, A.P. (2017). Polycomb Group Proteins. Academic Press, 57-80.

Copeland, R.A., Solomon, M.E., and Richon, V.M. (2009). Protein methyltransferases as a target class for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 8, 724-732.

Crist, W., Gehan, E.A., Ragab, A.H., Dickman, P.S., Donaldson, S.S., Fryer, C., Hammond, D., Hays, D.M., Herrmann, J., Heyn, R., *et al.* (1995). The Third Intergroup Rhabdomyosarcoma Study. *J Clin Oncol* 13, 610-630.

Crist, W.M., Anderson, J.R., Meza, J.L., Fryer, C., Raney, R.B., Ruymann, F.B., Breneman, J., Qualman, S.J., Wiener, E., Wharam, M., *et al.* (2001). Intergroup rhabdomyosarcoma study-IV: results for patients with nonmetastatic disease. *J Clin Oncol* *19*, 3091-3102.

Cubas, P., Vincent, C., and Coen, E. (1999). An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry. *Nature* *401*, 157-161.

Czermin, B., Melfi, R., McCabe, D., Seitz, V., Imhof, A., and Pirrotta, V. (2002). Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell* *111*, 185-196.

Dasgupta, R., Fuchs, J., and Rodeberg, D. (2016). Rhabdomyosarcoma. *Semin Pediatr Surg* *25*, 276-283.

Davicioni, E., , Anderson, J.R., Buckley, J.D., Meyer, W.H., Triche, T.J. (2010). Gene expression profiling for survival prediction in pediatric rhabdomyosarcomas: a report from the children's oncology group. *Journal of Clinical Oncology*.

Davis, R.J., and Barr, F.G. (1997). Fusion genes resulting from alternative chromosomal translocations are overexpressed by gene-specific mechanisms in alveolar rhabdomyosarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 8047-8051.

Day, D.W. (1984). The adenoma-carcinoma sequence. *Scand J Gastroenterol Suppl* *104*, 99-107.

DeCristofaro, M.F., Betz, B.L., Wang, W., and Weissman, B.E. (1999). Alteration of hSNF5/INI1/BAF47 detected in rhabdoid cell lines and primary rhabdomyosarcomas but not Wilms' tumors. *Oncogene* *18*, 7559-7565.

Di Croce, L., and Helin, K. (2013). Transcriptional regulation by Polycomb group proteins. *Nat Struct Mol Biol* *20*, 1147-1155.

Douglas, D., Hsu, J.H., Hung, L., Cooper, A., Abdueva, D., van Doorninck, J., Peng, G., Shimada, H., Triche, T.J., and Lawlor, E.R. (2008). BMI-1 promotes ewing sarcoma tumorigenicity independent of CDKN2A repression. *Cancer Res* *68*, 6507-6515.

Douglass, E.C., Rowe, S.T., Valentine, M., Parham, D.M., Berkow, R., Bowman, W.P., and Maurer, H.M. (1991). Variant translocations of chromosome 13 in alveolar rhabdomyosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* *3*, 480-482.

Duffy, D.J., Krstic, A., Halasz, M., Schwarzl, T., Konietzny, A., Iljin, K., Higgins, D.G., and Kolch, W. (2017). Retinoic acid and TGF-beta signalling cooperate to overcome MYCN-induced retinoid resistance. *Genome Med* *9*, 15.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* *35*, 495-516.

Enterline, H.T., and Horn, R.C., Jr. (1958). Alveolar rhabdomyosarcoma; a distinctive tumor type. *Am J Clin Pathol* *29*, 356-366.

Erdmann F, K.P., Grabow D, Spix C. German Childhood Cancer Registry - Annual Report 2019 (1980-2018). Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz, 2020 (2020). German Childhood Cancer Registry - Annual Report 2019 (1980-2018).

Ernst, T., Chase, A.J., Score, J., Hidalgo-Curtis, C.E., Bryant, C., Jones, A.V., Waghorn, K., Zoi, K., Ross, F.M., Reiter, A., *et al.* (2010). Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet* *42*, 722-726.

Eskeland, R., Leeb, M., Grimes, G.R., Kress, C., Boyle, S., Sproul, D., Gilbert, N., Fan, Y., Skoultchi, A.I., Wutz, A., *et al.* (2010). Ring1B compacts chromatin structure and represses gene expression independent of histone ubiquitination. *Mol Cell* *38*, 452-464.

Esteller, M. (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* *8*, 286-298.

Esteller, M., Fraga, M.F., Guo, M., Garcia-Foncillas, J., Hedenfalk, I., Godwin, A.K., Trojan, J., Vaurs-Barriere, C., Bignon, Y.J., Ramus, S., *et al.* (2001). DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Hum Mol Genet* *10*, 3001-3007.

Fan, T., Jiang, S., Chung, N., Alikhan, A., Ni, C., Lee, C.C., and Hornyak, T.J. (2011). EZH2-dependent suppression of a cellular senescence phenotype in melanoma cells by inhibition of p21/CDKN1A expression. *Mol Cancer Res* *9*, 418-429.

Felix, C.A., Kappel, C.C., Mitsudomi, T., Nau, M.M., Tsokos, M., Crouch, G.D., Nisen, P.D., Winick, N.J., and Helman, L.J. (1992). Frequency and diversity of p53 mutations in childhood rhabdomyosarcoma. *Cancer Res* *52*, 2243-2247.

Fioravanti, R., Stazi, G., Zwergel, C., Valente, S., and Mai, A. (2018). Six Years (2012-2018) of Researches on Catalytic EZH2 Inhibitors: The Boom of the 2-Pyridone Compounds. *Chem Rec* *18*, 1818-1832.

Fiorentino, F.P., Marchesi, I., and Giordano, A. (2013). On the role of retinoblastoma family proteins in the establishment and maintenance of the epigenetic landscape. *J Cell Physiol* *228*, 276-284.

Fiskus, W., Wang, Y., Sreekumar, A., Buckley, K.M., Shi, H., Jillella, A., Ustun, C., Rao, R., Fernandez, P., Chen, J., *et al.* (2009). Combined epigenetic therapy with the histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A and the histone deacetylase inhibitor panobinostat against human AML cells. *Blood* *114*, 2733-2743.

Franken, N.A., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J., and van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* *1*, 2315-2319.

Fuchs, J., Paulsen, F., Bleif, M., Lamprecht, U., Weidner, N., Zips, D., Neunhoeffer, F., and Seitz, G. (2016). Conservative surgery with combined high dose rate brachytherapy for patients suffering from genitourinary and perianal rhabdomyosarcoma. *Radiother Oncol* *121*, 262-267.

Gan, L., Yang, Y., Li, Q., Feng, Y., Liu, T., and Guo, W. (2018). Epigenetic regulation of cancer progression by EZH2: from biological insights to therapeutic potential. *Biomark Res* *6*, 10.

Ganti, R., Skapek, S.X., Zhang, J., Fuller, C.E., Wu, J., Billups, C.A., Breitfeld, P.P., Dalton, J.D., Meyer, W.H., and Khoury, J.D. (2006). Expression and genomic status of EGFR and ErbB-2 in alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma. *Mod Pathol* *19*, 1213-1220.

Georgiou, C.D., Grintzalis, K., Zervoudakis, G., and Papapostolou, I. (2008). Mechanism of Coomassie brilliant blue G-250 binding to proteins: a hydrophobic assay for nanogram quantities of proteins. *Anal Bioanal Chem* *391*, 391-403.

Gerlier, D., and Thomasset, N. (1986). Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods* *94*, 57-63.

Gil, J., and Peters, G. (2006). Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol* *7*, 667-677.

Gilbert, S.F. (2000). *Developmental Biology*. Sunderland *6th edition*.

Grufferman, S., Delzell, E., and DeLong, E.R. (1984). An approach to conducting epidemiologic research within cooperative clinical trials groups. *J Clin Oncol* *2*, 670-675.

Grufferman, S., Ruymann, F., Ognjanovic, S., Erhardt, E.B., and Maurer, H.M. (2009). Prenatal X-ray exposure and rhabdomyosarcoma in children: a report from the children's oncology group. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* *18*, 1271-1276.

Grufferman, S., Schwartz, A.G., Ruymann, F.B., and Maurer, H.M. (1993). Parents' use of cocaine and marijuana and increased risk of rhabdomyosarcoma in their children. *Cancer Causes Control* *4*, 217-224.

Guglielmelli, P., Biamonte, F., Score, J., Hidalgo-Curtis, C., Cervantes, F., Maffioli, M., Fanelli, T., Ernst, T., Winkelman, N., Jones, A.V., *et al.* (2011). EZH2 mutational status predicts poor survival in myelofibrosis. *Blood* *118*, 5227-5234.

Haie-Meder, C., Mazon, R., Martelli, H., and Oberlin, O. (2013). [Brachytherapy role in pediatric rhabdomyosarcomas]. *Cancer Radiother* *17*, 155-158.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57-70.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646-674.

Hawkins, D.S., Spunt, S.L., Skapek, S.X., and Committee, C.O.G.S.T.S. (2013). Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: Soft tissue sarcomas. *Pediatr Blood Cancer* *60*, 1001-1008.

He, S., Liu, Z., Oh, D.Y., and Thiele, C.J. (2013). MYCN and the epigenome. *Front Oncol* *3*, 1.

Hinson, A.R., Jones, R., Crose, L.E., Belyea, B.C., Barr, F.G., and Linardic, C.M. (2013). Human rhabdomyosarcoma cell lines for rhabdomyosarcoma research: utility and pitfalls. *Front Oncol* *3*, 183.

Hnasko, T.S., and Hnasko, R.M. (2015). The Western Blot. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* *1318*, 87-96.

Hong, S., Cho, Y.W., Yu, L.R., Yu, H., Veenstra, T.D., and Ge, K. (2007). Identification of JmjC domain-containing UTX and JMJD3 as histone H3 lysine 27 demethylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 18439-18444.

Ingham, P.W. (1983). Differential expression of bithorax complex genes in the absence of the extra sex combs and trithorax genes. *Nature* *306*, 591-593.

Institute, N.H.G.R. (2023). Histone. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/histone>

Jacobs, J.J., Kieboom, K., Marino, S., DePinho, R.A., and van Lohuizen, M. (1999). The oncogene and Polycomb-group gene *bmi-1* regulates cell proliferation and senescence through the *ink4a* locus. *Nature* *397*, 164-168.

Jeggo, P.A., and Holliday, R. (1986). Azacytidine-induced reactivation of a DNA repair gene in Chinese hamster ovary cells. *Mol Cell Biol* *6*, 2944-2949.

Jiang, T., Wang, Y., Zhou, F., Gao, G., Ren, S., and Zhou, C. (2016). Prognostic value of high EZH2 expression in patients with different types of cancer: a systematic review with meta-analysis. *Oncotarget* *7*, 4584-4597.

Jiwlawat, N., Lynch, E., Jeffrey, J., Van Dyke, J.M., and Suzuki, M. (2018). Current Progress and Challenges for Skeletal Muscle Differentiation from Human Pluripotent Stem Cells Using Transgene-Free Approaches. *Stem Cells Int* *2018*, 6241681.

Juan, A.H., Kumar, R.M., Marx, J.G., Young, R.A., and Sartorelli, V. (2009). Mir-214-dependent regulation of the polycomb protein *Ezh2* in skeletal muscle and embryonic stem cells. *Mol Cell* *36*, 61-74.

Kaneko, S., Li, G., Son, J., Xu, C.F., Margueron, R., Neubert, T.A., and Reinberg, D. (2010). Phosphorylation of the PRC2 component *Ezh2* is cell cycle-regulated and up-regulates its binding to ncRNA. *Genes Dev* *24*, 2615-2620.

Karimian, A., Ahmadi, Y., and Yousefi, B. (2016). Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair (Amst)* *42*, 63-71.

Karmodiya, K., Krebs, A.R., Oulad-Abdelghani, M., Kimura, H., and Tora, L. (2012). H3K9 and H3K14 acetylation co-occur at many gene regulatory elements, while H3K14ac marks a subset of inactive inducible promoters in mouse embryonic stem cells. *BMC Genomics* *13*, 424.

Kikuchi, J., Takashina, T., Kinoshita, I., Kikuchi, E., Shimizu, Y., Sakakibara-Konishi, J., Oizumi, S., Marquez, V.E., Nishimura, M., and Dosaka-Akita, H. (2012). Epigenetic

therapy with 3-deazaneplanocin A, an inhibitor of the histone methyltransferase EZH2, inhibits growth of non-small cell lung cancer cells. *Lung Cancer* 78, 138-143.

Kim, E., Kim, M., Woo, D.H., Shin, Y., Shin, J., Chang, N., Oh, Y.T., Kim, H., Rhee, J., Nakano, I., *et al.* (2013). Phosphorylation of EZH2 activates STAT3 signaling via STAT3 methylation and promotes tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells. *Cancer Cell* 23, 839-852.

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., *et al.* (2015). SWI/SNF-mutant cancers depend on catalytic and non-catalytic activity of EZH2. *Nat Med* 21, 1491-1496.

Kirmizis, A., Bartley, S.M., Kuzmichev, A., Margueron, R., Reinberg, D., Green, R., and Farnham, P.J. (2004). Silencing of human polycomb target genes is associated with methylation of histone H3 Lys 27. *Genes Dev* 18, 1592-1605.

Kleer, C.G., Cao, Q., Varambally, S., Shen, R., Ota, I., Tomlins, S.A., Ghosh, D., Sewalt, R.G., Otte, A.P., Hayes, D.F., *et al.* (2003). EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 11606-11611.

Knudsen, K.A. (1985). The calcium-dependent myoblast adhesion that precedes cell fusion is mediated by glycoproteins. *J Cell Biol* 101, 891-897.

Knudsen, K.A., McElwee, S.A., and Myers, L. (1990). A role for the neural cell adhesion molecule, NCAM, in myoblast interaction during myogenesis. *Dev Biol* 138, 159-168.

Knudson, A.G., Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 820-823.

Knutson, S.K., Warholic, N.M., Wigle, T.J., Klaus, C.R., Allain, C.J., Raimondi, A., Porter Scott, M., Chesworth, R., Moyer, M.P., Copeland, R.A., *et al.* (2013). Durable tumor regression in genetically altered malignant rhabdoid tumors by inhibition of methyltransferase EZH2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 7922-7927.

Knutson, S.K., Wigle, T.J., Warholic, N.M., Sneeringer, C.J., Allain, C.J., Klaus, C.R., Sacks, J.D., Raimondi, A., Majer, C.R., Song, J., *et al.* (2012). A selective inhibitor of EZH2 blocks H3K27 methylation and kills mutant lymphoma cells. *Nat Chem Biol* 8, 890-896.

Koh, C.M., Iwata, T., Zheng, Q., Bethel, C., Yegnasubramanian, S., and De Marzo, A.M. (2011). Myc enforces overexpression of EZH2 in early prostatic neoplasia via transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Oncotarget* 2, 669-683.

Kondo, Y., Shen, L., Ahmed, S., Bumber, Y., Sekido, Y., Haddad, B.R., and Issa, J.P. (2008). Downregulation of histone H3 lysine 9 methyltransferase G9a induces centrosome disruption and chromosome instability in cancer cells. *PLoS One* 3, e2037.

Koscielniak, E., Blank, B., Vokuhl, C., Kazanowska, B., Ladenstein, R., Niggli, F., Ljungman, G., Handgretinger, R., Seitz, G., Fuchs, J., *et al.* (2022). Long-Term Clinical Outcome and Prognostic Factors of Children and Adolescents with Localized Rhabdomyosarcoma Treated on the CWS-2002P Protocol. *Cancers (Basel)* 14.

Koscielniak, E., Klingebiel, T. (2017). http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/025-0071_S1_Weichteilsarkome_2017-03.pdf

Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693-705.

Kuzmichev, A., Nishioka, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D. (2002). Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes Dev* 16, 2893-2905.

Lae, M., Ahn, E.H., Mercado, G.E., Chuai, S., Edgar, M., Pawel, B.R., Olshen, A., Barr, F.G., and Ladanyi, M. (2007). Global gene expression profiling of PAX-FKHR

fusion-positive alveolar and PAX-FKHR fusion-negative embryonal rhabdomyosarcomas. *J Pathol* 212, 143-151.

Laugesen, A., and Helin, K. (2014). Chromatin repressive complexes in stem cells, development, and cancer. *Cell Stem Cell* 14, 735-751.

Laugesen, A., Hojfeldt, J.W., and Helin, K. (2016). Role of the Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) in Transcriptional Regulation and Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6.

Lawrence, C.L., and Baldwin, A.S. (2016). Non-Canonical EZH2 Transcriptionally Activates RelB in Triple Negative Breast Cancer. *PLoS One* 11, e0165005.

Lee, R.S., Stewart, C., Carter, S.L., Ambrogio, L., Cibulskis, K., Sougnez, C., Lawrence, M.S., Auclair, D., Mora, J., Golub, T.R., *et al.* (2012). A remarkably simple genome underlies highly malignant pediatric rhabdoid cancers. *J Clin Invest* 122, 2983-2988.

Leeb, M., Pasini, D., Novatchkova, M., Jaritz, M., Helin, K., and Wutz, A. (2010). Polycomb complexes act redundantly to repress genomic repeats and genes. *Genes Dev* 24, 265-276.

Lewis, P.H. (1947). New mutants report. *Drosoph inf Serv* 21 : 69.

Lhuissier, E., Aury-Landas, J., Bouet, V., Bazille, C., Repesse, Y., Freret, T., Boumediene, K., and Bauge, C. (2018). Evaluation of the impact of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase inhibitor, 3-deazaneplanocin A, on tissue injury and cognitive function in mice. *Oncotarget* 9, 20698-20708.

Li, B., Carey, M., and Workman, J.L. (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell* 128, 707-719.

Liang, C.C., Park, A.Y., and Guan, J.L. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* 2, 329-333.

Liu, S., Dontu, G., Mantle, I.D., Patel, S., Ahn, N.S., Jackson, K.W., Suri, P., and Wicha, M.S. (2006). Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Res* 66, 6063-6071.

Loupe, J.M., Miller, P.J., Bonner, B.P., Maggi, E.C., Vijayaraghavan, J., Crabtree, J.S., Taylor, C.M., Zabaleta, J., and Hollenbach, A.D. (2016). Comparative transcriptomic analysis reveals the oncogenic fusion protein PAX3-FOXO1 globally alters mRNA and miRNA to enhance myoblast invasion. *Oncogenesis* 5, e246.

Ma, A., Stratikopoulos, E., Park, K.S., Wei, J., Martin, T.C., Yang, X., Schwarz, M., Leshchenko, V., Rialdi, A., Dale, B., *et al.* (2020). Discovery of a first-in-class EZH2 selective degrader. *Nat Chem Biol* 16, 214-222.

Mahmood, T., and Yang, P.C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci* 4, 429-434.

Malempati, S., and Hawkins, D.S. (2012). Rhabdomyosarcoma: review of the Children's Oncology Group (COG) Soft-Tissue Sarcoma Committee experience and rationale for current COG studies. *Pediatr Blood Cancer* 59, 5-10.

Marchesi I, B.L. (2013). Role of Enhancer of Zeste Homolog 2 Polycomb Protein and Its Significance in Tumor Progression and Cell Differentiation. *Radioch D.*

Marchesi, I., Fiorentino, F.P., Rizzolio, F., Giordano, A., and Bagella, L. (2012). The ablation of EZH2 uncovers its crucial role in rhabdomyosarcoma formation. *Cell Cycle* 11, 3828-3836.

Marchesi, I., Giordano, A., and Bagella, L. (2014). Roles of enhancer of zeste homolog 2: from skeletal muscle differentiation to rhabdomyosarcoma carcinogenesis. *Cell Cycle* 13, 516-527.

Margueron, R., Li, G., Sarma, K., Blais, A., Zavadil, J., Woodcock, C.L., Dynlacht, B.D., and Reinberg, D. (2008). Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms. *Mol Cell* 32, 503-518.

Margueron, R., and Reinberg, D. (2011). The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* 469, 343-349.

Maurer, H.M., Beltangady, M., Gehan, E.A., Crist, W., Hammond, D., Hays, D.M., Heyn, R., Lawrence, W., Newton, W., Ortega, J., *et al.* (1988). The Intergroup Rhabdomyosarcoma Study-I. A final report. *Cancer* 61, 209-220.

Menko, A.S., and Boettiger, D. (1987). Occupation of the extracellular matrix receptor, integrin, is a control point for myogenic differentiation. *Cell* 51, 51-57.

Miller, R.W., Yong, J.L., Novakovic, B. (1995). Childhood cancer. *Cancer* 75, 395-406.

Miranda, T.B., Cortez, C.C., Yoo, C.B., Liang, G., Abe, M., Kelly, T.K., Marquez, V.E., and Jones, P.A. (2009). DZNep is a global histone methylation inhibitor that reactivates developmental genes not silenced by DNA methylation. *Mol Cancer Ther* 8, 1579-1588.

Missiaglia, E., Shepherd, C.J., Aladowicz, E., Olmos, D., Selfe, J., Pierron, G., Delattre, O., Walters, Z., and Shipley, J. (2017). MicroRNA and gene co-expression networks characterize biological and clinical behavior of rhabdomyosarcomas. *Cancer Lett* 385, 251-260.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63.

Mousavi, K., Zare, H., Wang, A.H., and Sartorelli, V. (2012). Polycomb protein Ezh1 promotes RNA polymerase II elongation. *Mol Cell* 45, 255-262.

Mueller-Klieser, W. (1987). Multicellular spheroids. A review on cellular aggregates in cancer research. *J Cancer Res Clin Oncol* 113, 101-122.

Muller, H., Bracken, A.P., Vernell, R., Moroni, M.C., Christians, F., Grassilli, E., Prosperini, E., Vigo, E., Oliner, J.D., and Helin, K. (2001). E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev* 15, 267-285.

Myohanen, S.K., Baylin, S.B., and Herman, J.G. (1998). Hypermethylation can selectively silence individual p16ink4A alleles in neoplasia. *Cancer Res* 58, 591-593.

Nakagawa, S., Sakamoto, Y., Okabe, H., Hayashi, H., Hashimoto, D., Yokoyama, N., Tokunaga, R., Sakamoto, K., Kuroki, H., Mima, K., *et al.* (2014). Epigenetic therapy with the histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A inhibits the growth of cholangiocarcinoma cells. *Oncol Rep* 31, 983-988.

Neri, F., Zippo, A., Krepelova, A., Cherubini, A., Rocchigiani, M., and Oliviero, S. (2012). Myc regulates the transcription of the PRC2 gene to control the expression of developmental genes in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 32, 840-851.

Niemeyer, C., Eggert, Angelika (2018). Pädiatrische Hämatologie und Onkologie.

Niesen, J., Brehm, H., Stein, C., Berges, N., Pardo, A., Fischer, R., Ten Haaf, A., Gattenlohner, S., Tur, M.K., and Barth, S. (2015). In vitro effects and ex vivo binding of an EGFR-specific immunotoxin on rhabdomyosarcoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 141, 1049-1061.

Ognjanovic, S., Linabery, A.M., Charbonneau, B., and Ross, J.A. (2009). Trends in childhood rhabdomyosarcoma incidence and survival in the United States, 1975-2005. *Cancer* 115, 4218-4226.

Owens, J., Moreira, K., and Bain, G. (2013). Characterization of primary human skeletal muscle cells from multiple commercial sources. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 49, 695-705.

Palacios, D., and Puri, P.L. (2006). The epigenetic network regulating muscle development and regeneration. *J Cell Physiol* 207, 1-11.

Panda, S.P., Chinnaswamy, G., Vora, T., Prasad, M., Bansal, D., Kapoor, G., Radhakrishnan, V., Agarwala, S., Laskar, S., Arora, B., *et al.* (2017). Diagnosis and

Management of Rhabdomyosarcoma in Children and Adolescents: ICMR Consensus Document. *Indian J Pediatr* 84, 393-402.

Pappo, A.S., Anderson, J.R., Crist, W.M., Wharam, M.D., Breitfeld, P.P., Hawkins, D., Raney, R.B., Womer, R.B., Parham, D.M., Qualman, S.J., *et al.* (1999). Survival after relapse in children and adolescents with rhabdomyosarcoma: A report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group. *J Clin Oncol* 17, 3487-3493.

Pappo, A.S., Shapiro, D.N., Crist, W.M., and Maurer, H.M. (1995). Biology and therapy of pediatric rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol* 13, 2123-2139.

Parham, D.M., and Barr, F.G. (2013). Classification of rhabdomyosarcoma and its molecular basis. *Adv Anat Pathol* 20, 387-397.

Parham, D.M., and Jenkins, J.J., 3rd (1994). Pathology of selected pediatric embryonal neoplasms. *Mod Pathol* 7, 501-519.

Patton, R.B., and Horn, R.C., Jr. (1962). Rhabdomyosarcoma: clinical and pathological features and comparison with human fetal and embryonal skeletal muscle. *Surgery* 52, 572-584.

Peng, L., Jiang, H., and Bradley, C. (2001). [Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on lymphoma cells undergoing apoptosis]. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao* 32, 602-604, 620.

Pengelly, A.R., Copur, O., Jackle, H., Herzig, A., and Muller, J. (2013). A histone mutant reproduces the phenotype caused by loss of histone-modifying factor Polycomb. *Science* 339, 698-699.

Plon, S.E., Malkin, D. (2010). Principles and Practice of Pediatric Oncology.

Pozarowski, P., and Darzynkiewicz, Z. (2004). Analysis of cell cycle by flow cytometry. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) 281, 301-311.

Ramaglia, M., D'Angelo, V., Iannotta, A., Di Pinto, D., Pota, E., Affinita, M.C., Donofrio, V., Errico, M.E., Lombardi, A., Indolfi, C., *et al.* (2016). High EZH2 expression is correlated to metastatic disease in pediatric soft tissue sarcomas. *Cancer Cell Int* 16, 59.

Rapa, E., Hill, S.K., Morten, K.J., Potter, M., and Mitchell, C. (2012). The over-expression of cell migratory genes in alveolar rhabdomyosarcoma could contribute to metastatic spread. *Clin Exp Metastasis* 29, 419-429.

Richly, H., Aloia, L., and Di Croce, L. (2011). Roles of the Polycomb group proteins in stem cells and cancer. *Cell Death Dis* 2, e204.

Ries, L.A.G., Smith, M.A., Gurney, J.G., Linet, M., Tamra, T., Young, J.L., Bunin, G.R. (1999). Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States. SEER Program 1975-1995.

Roberts, C.W., and Biegel, J.A. (2009). The role of SMARCB1/INI1 in development of rhabdoid tumor. *Cancer Biol Ther* 8, 412-416.

Robinson D.C.L., D.F.J. (2018). Chapter Eight - Epigenetic Regulation of Adult Myogenesis. 126, 235-284.

Rodriguez-Perales, S., Martinez-Ramirez, A., de Andres, S.A., Valle, L., Urioste, M., Benitez, J., and Cigudosa, J.C. (2004). Molecular cytogenetic characterization of rhabdomyosarcoma cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 148, 35-43.

Saab, R., Spunt, S.L., and Skapek, S.X. (2011). Myogenesis and rhabdomyosarcoma the Jekyll and Hyde of skeletal muscle. *Curr Top Dev Biol* 94, 197-234.

Schleicher, S., Grote, S., Malenke, E., Chan, K.C., Schaller, M., Fehrenbacher, B., Riester, R., Kluba, T., Frauenfeld, L., Boesmueller, H., *et al.* (2020). Establishment and Characterization of a Sclerosing Spindle Cell Rhabdomyosarcoma Cell Line with a Complex Genomic Profile. *Cells* 9.

Schmidt, A., Behrendt, L., Eybe, J., Warmann, S.W., Schleicher, S., Fuchs, J., and Schmid, E. (2021). The Effect of Direct and Indirect EZH2 Inhibition in Rhabdomyosarcoma Cell Lines. *Cancers (Basel)* *14*.

Schuettengruber, B., Bourbon, H.M., Di Croce, L., and Cavalli, G. (2017). Genome Regulation by Polycomb and Trithorax: 70 Years and Counting. *Cell* *171*, 34-57.

Sebire, N.J., and Malone, M. (2003). Myogenin and MyoD1 expression in paediatric rhabdomyosarcomas. *J Clin Pathol* *56*, 412-416.

Seki, M., Nishimura, R., Yoshida, K., Shimamura, T., Shiraishi, Y., Sato, Y., Kato, M., Chiba, K., Tanaka, H., Hoshino, N., *et al.* (2015). Integrated genetic and epigenetic analysis defines novel molecular subgroups in rhabdomyosarcoma. *Nat Commun* *6*, 7557.

Shaw, P.H. (1996). The role of p53 in cell cycle regulation. *Pathol Res Pract* *192*, 669-675.

Shrestha, A., Ritz, B., Ognjanovic, S., Lombardi, C.A., Wilhelm, M., and Heck, J.E. (2013). Early life factors and risk of childhood rhabdomyosarcoma. *Front Public Health* *1*, 17.

Shuman, C., Beckwith, J.B., and Weksberg, R. (1993). Beckwith-Wiedemann Syndrome. In *GeneReviews*((R)), M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J.H. Bean, K. Stephens, and A. Amemiya, eds. (Seattle (WA)).

Silva, J., Garcia, J.M., Pena, C., Garcia, V., Dominguez, G., Suarez, D., Camacho, F.I., Espinosa, R., Provencio, M., Espana, P., *et al.* (2006). Implication of polycomb members Bmi-1, Mel-18, and Hpc-2 in the regulation of p16INK4a, p14ARF, h-TERT, and c-Myc expression in primary breast carcinomas. *Clin Cancer Res* *12*, 6929-6936.

Simon, J.A., and Kingston, R.E. (2009). Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nat Rev Mol Cell Biol* *10*, 697-708.

Skapek, S.X., Ferrari, A., Gupta, A.A., Lupo, P.J., Butler, E., Shipley, J., Barr, F.G., and Hawkins, D.S. (2019). Rhabdomyosarcoma. *Nat Rev Dis Primers* *5*, 1.

Skrzypek, K., Kot, M., Konieczny, P., Nieszporek, A., Kusienicka, A., Lasota, M., Bobela, W., Jankowska, U., Kedracka-Krok, S., and Majka, M. (2020). SNAIL Promotes Metastatic Behavior of Rhabdomyosarcoma by Increasing EZRIN and AKT Expression and Regulating MicroRNA Networks. *Cancers (Basel)* *12*.

Skrzypek, K., Kusienicka, A., Trzyna, E., Szewczyk, B., Ulman, A., Konieczny, P., Adamus, T., Badyra, B., Kortylewski, M., and Majka, M. (2018). SNAIL is a key regulator of alveolar rhabdomyosarcoma tumor growth and differentiation through repression of MYF5 and MYOD function. *Cell Death Dis* *9*, 643.

Smits, A.H., Jansen, P.W., Poser, I., Hyman, A.A., and Vermeulen, M. (2013). Stoichiometry of chromatin-associated protein complexes revealed by label-free quantitative mass spectrometry-based proteomics. *Nucleic Acids Res* *41*, e28.

Sparmann, A., and van Lohuizen, M. (2006). Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat Rev Cancer* *6*, 846-856.

Stockert, J.C., Horobin, R.W., Colombo, L.L., and Blazquez-Castro, A. (2018). Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem* *120*, 159-167.

Stojic, L., Jasencakova, Z., Prezioso, C., Stutzer, A., Bodega, B., Pasini, D., Klingberg, R., Mozzetta, C., Margueron, R., Puri, P.L., *et al.* (2011). Chromatin regulated interchange between polycomb repressive complex 2 (PRC2)-Ezh2 and PRC2-Ezh1 complexes controls myogenin activation in skeletal muscle cells. *Epigenetics Chromatin* *4*, 16.

Strober, W. (2001). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol Appendix 3*, Appendix 3B.

Sun, F., Lee, L., Zhang, Z., Wang, X., Yu, Q., Duan, X., and Chan, E. (2015). Preclinical pharmacokinetic studies of 3-deazaneplanocin A, a potent epigenetic anticancer agent, and its human pharmacokinetic prediction using GastroPlus. *Eur J Pharm Sci* 77, 290-302.

Sutherland, R.M., and Durand, R.E. (1984). Growth and cellular characteristics of multicell spheroids. *Recent Results Cancer Res* 95, 24-49.

Sutherland, R.M., McCredie, J.A., and Inch, W.R. (1971). Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 46, 113-120.

Swatika S., T.R.S. (2016). *Advances in Molecular Toxicology*. 10, 361-389.

Tan, J., Yang, X., Zhuang, L., Jiang, X., Chen, W., Lee, P.L., Karuturi, R.K., Tan, P.B., Liu, E.T., and Yu, Q. (2007). Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. *Genes Dev* 21, 1050-1063.

Tang, S.H., Pei, R.Z., Ma, J.X., Zhang, P.S., Liu, X.H., Du, X.H., Chen, D., Sha, K.Y., Cao, J.J., and Li, S.Y. (2014). [Effects of H3K27 methylation inhibitor EPZ005687 on apoptosis, proliferation and cell cycle of U937 cells and normal CD34 positive cells]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 22, 1561-1566.

Terry L Riss, P., Richard A Moravec, BS, Andrew L Niles, MS, Sarah Duellman, PhD, Hélène A Benink, PhD, Tracy J Worzella, MS, and Lisa Minor (2013). *Cell Viability Assays. Assay guidance manual*.

Tombolan, L., Poli, E., Martini, P., Zin, A., Romualdi, C., Bisogno, G., and Lanfranchi, G. (2017). NELL1, whose high expression correlates with negative outcomes, has different methylation patterns in alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma. *Oncotarget* 8, 33086-33099.

Ueda, K., Yoshimi, A., Kagoya, Y., Nishikawa, S., Marquez, V.E., Nakagawa, M., and Kurokawa, M. (2014). Inhibition of histone methyltransferase EZH2 depletes leukemia stem cell of mixed lineage leukemia fusion leukemia through upregulation of p16. *Cancer Sci* 105, 512-519.

van der Vlag, J., and Otte, A.P. (1999). Transcriptional repression mediated by the human polycomb-group protein EED involves histone deacetylation. *Nat Genet* 23, 474-478.

van Engeland, M., Nieland, L.J., Ramaekers, F.C., Schutte, B., and Reutelingsperger, C.P. (1998). Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 31, 1-9.

van Lohuizen, M., Frasch, Manfred, Wientjens Ellen & Berns, Anton (1991). Sequence similarity between the mammalian bmi-1 proto-oncogene and the Drosophila regulatory genes Psc and Su(z)2. *Nature* 353 (353-355).

van Lohuizen, M., Verbeek, S., Scheijen, B., Wientjens, E., van der Gulden, H., and Berns, A. (1991). Identification of cooperating oncogenes in E mu-myc transgenic mice by provirus tagging. *Cell* 65, 737-752.

Varambally, S., Dhanasekaran, S.M., Zhou, M., Barrette, T.R., Kumar-Sinha, C., Sanda, M.G., Ghosh, D., Pienta, K.J., Sewalt, R.G., Otte, A.P., *et al.* (2002). The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 419, 624-629.

Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., and Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184, 39-51.

Vire, E., Brenner, C., Deplus, R., Blanchon, L., Fraga, M., Didelot, C., Morey, L., Van Eynde, A., Bernard, D., Vanderwinden, J.M., *et al.* (2006). The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* 439, 871-874.

Vizan, P., Beringer, M., Ballare, C., and Di Croce, L. (2015). Role of PRC2-associated factors in stem cells and disease. *FEBS J* 282, 1723-1735.

Walker, N.I., Harmon, B.V., Gobe, G.C., and Kerr, J.F. (1988). Patterns of cell death. *Methods Achiev Exp Pathol* 13, 18-54.

Wang, J., Mager, J., Chen, Y., Schneider, E., Cross, J.C., Nagy, A., and Magnuson, T. (2001). Imprinted X inactivation maintained by a mouse Polycomb group gene. *Nat Genet* 28, 371-375.

Wang, J., and Wang, G.G. (2020). No Easy Way Out for EZH2: Its Pleiotropic, Noncanonical Effects on Gene Regulation and Cellular Function. *Int J Mol Sci* 21.

Wee, Z.N., et al. (2014). EZH2-mediated inactivation of IFN-gamma-JAK-STAT1 signaling is an effective therapeutic target in MYC-driven prostate cancer. *Cell*.

Weintraub, H., Tapscott, S.J., Davis, R.L., Thayer, M.J., Adam, M.A., Lassar, A.B., and Miller, A.D. (1989). Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 5434-5438.

Williamson, D., Missiaglia, E., de Reynies, A., Pierron, G., Thuille, B., Palenzuela, G., Thway, K., Orbach, D., Lae, M., Freneaux, P., et al. (2010). Fusion gene-negative alveolar rhabdomyosarcoma is clinically and molecularly indistinguishable from embryonal rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol* 28, 2151-2158.

Wlodkowic, D., Skommer, J., and Darzynkiewicz, Z. (2009). Flow cytometry-based apoptosis detection. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 559, 19-32.

Xu, J., Shao, Z., Li, D., Xie, H., Kim, W., Huang, J., Taylor, J.E., Pinello, L., Glass, K., Jaffe, J.D., et al. (2015). Developmental control of polycomb subunit composition by GATA factors mediates a switch to non-canonical functions. *Mol Cell* 57, 304-316.

Yamagishi, M., and Uchamaru, K. (2017). Targeting EZH2 in cancer therapy. *Curr Opin Oncol* 29, 375-381.

Yiallourous, M., Kube, Stefanie (2009). https://www.kinderkrebsinfo.de/erkrankungen/weitere_solide_tumoren/weichteilsarkom_tumor/pohpatinfoweichteiltumorkurz20101215/index_ger.html.

You, J.S., and Jones, P.A. (2012). Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? *Cancer Cell* 22, 9-20.

Zee, B.M., Levin, R.S., Xu, B., LeRoy, G., Wingreen, N.S., and Garcia, B.A. (2010). In vivo residue-specific histone methylation dynamics. *J Biol Chem* 285, 3341-3350.

Zhao, S.P., Yu, C., Yang, M.S., Liu, Z.L., Yang, B.C., and Xiao, X.F. (2021). Long Non-coding RNA FENDRR Modulates Autophagy Through Epigenetic Suppression of ATG7 via Binding PRC2 in Acute Pancreatitis. *Inflammation* 44, 999-1013.