

Aus dem Pathologischen Institut,
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Thomas Kirchner

DIE ROLLE VON
CALCITONIN RELATED POLYPEPTIDE β (CALCB)
IM MALIGNEN VERHALTEN VON
EWING-SARKOMEN

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
MARLENE DALLMAYER

aus
Tegernsee, Deutschland

Jahr
2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Thomas G. P. Grünewald, PhD

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Dorit Di Gioia
Prof. Dr. med. Hans Roland Dürr
Prof. Dr. rer. nat. Roland Kappler

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Thomas Kirchner

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 19.11.2020

Eidesstattliche Versicherung

Marlene Dallmayer

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

Die Rolle von Calcitonin related polypeptide β (CALCB)
im malignen Verhalten von Ewing-Sarkomen

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.

Münster, 27.11.2020

.....
Ort, Datum

Marlene Dallmayer

.....
Unterschrift

Vorwort

Zu Beginn dieser Arbeit sei darauf hingewiesen, dass Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit unter dem Titel „Targeting the CALCB/RAMP1 axis inhibits growth of Ewing sarcoma“ von Dallmayer M. *et al.* bereits in der Zeitschrift *Cell Death & Disease* veröffentlicht wurden [16]. Darüber hinaus wurde das Projekt durch ein Promotionsstipendium der „Deutschen Stiftung für junge Erwachsene mit Krebs“ gefördert.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Ewing-Sarkom	1
1.1.1	Auftreten	1
1.1.2	Genetische Charakteristika	1
1.1.3	Diagnostik	3
1.1.4	Therapie	4
1.2	Calcitonin related polypeptide β (CALCB)	4
1.2.1	Calcitonin-/CGRP-Familie	4
1.2.2	Aufbau und Expression	5
1.2.3	Signalwege und Funktion	6
2	Zielsetzung	9
3	Material und Methoden	11
3.1	Material	11
3.1.1	Zellen	11
3.1.2	Reagenzien und Substanzen	12
3.1.3	Systeme und Enzyme	13
3.1.4	Oligonukleotide	14
3.1.5	Verbrauchsmaterialien	16
3.1.6	Xenotransplantationsmodell	17
3.1.7	Antikörper für Immunhistochemie	17
3.1.8	Geräte	17
3.1.9	Programme	18
3.2	Methoden	19
3.2.1	Expressionsanalysen mittels DNA-Microarrays	19
3.2.2	Sequenzierungen	23
3.2.3	Arbeiten mit Zellkulturen	24
3.2.4	DNA-Extraktion mittels NucleoSpin [®] Tissue	31
3.2.5	Analyse der Genexpression durch qRT-PCR	31
3.2.6	Proliferationsversuch	33
3.2.7	Koloniebildungsversuch	34
3.2.8	Dreidimensionale Wachstumskapazität <i>in vitro</i>	35
3.2.9	Resazurin-CGRP-Rezeptorinhibitor-Versuch	35
3.2.10	Luciferase-Versuch	36
3.2.11	Massenspektrometrie	36

3.2.12	Klonierungsarbeiten	37
3.2.13	Arbeit mit Bakterien	43
3.2.14	Xenotransplantationsmodell	44
3.2.15	TMA humaner Ewing-Sarkome	47
3.2.16	Statistische Auswertung	48
4	Ergebnisse	51
4.1	CALCB-Bildung im Ewing-Sarkom	51
4.1.1	Expressionshöhe von <i>CALCB</i>	51
4.1.2	Nachweis der <i>CALCB</i> -Bildung auf Proteinebene	54
4.1.3	<i>CALCB</i> -Sekretion durch Ewing-Sarkomzellen	56
4.1.4	<i>CALCB</i> -Expressionsregulation durch EWSR1-FLI1	56
4.2	<i>CALCB</i> -CGRP-Rezeptor-Signalweg beeinflusst Proliferation von Ewing-Sarkomzellen	60
4.2.1	Korrelation der <i>CALCB</i> -Expression mit proliferationsfördernden Genen	60
4.2.2	Proliferationsversuch unter <i>CALCB</i> -Knockdown	61
4.2.3	CGRP-Rezeptor im Ewing-Sarkom	61
4.2.4	Proliferationshemmung durch Knockdown des <i>CALCB</i> -CGRP-Rezeptor-Signalwegs <i>in vitro</i>	65
4.2.5	Einflussnahme des <i>CALCB</i> -CGRP-Rezeptor-Signalwegs auf xenotransplantierte Ewing-Sarkomzellen	68
4.3	Behandlung von Ewing-Sarkomzellen mit CGRP-Rezeptorinhibitoren	70
4.3.1	Proliferationshemmung durch CGRP-Rezeptorinhibitoren .	71
4.3.2	Spezifität des CGRP-Rezeptorinhibitors MK-3207	71
4.4	Positive Korrelation hoher <i>CALCB</i> -Expression mit Überlebenszeit .	73
5	Diskussion	75
5.1	Gewonnene Erkenntnisse	75
5.2	Ausblick	80
6	Zusammenfassung	83
	Literatur	85
	Danksagung	93
	Abkürzungsverzeichnis	95

1 Einleitung

1.1 Ewing-Sarkom

Beim *Ewing-Sarkom* handelt es sich um einen malignen Tumor des Knochen- und Weichteilgewebes, der nach pathologischen Gesichtspunkten zur Gruppe der *small-blue-round-cell tumors* gerechnet wird [19].

1.1.1 Auftreten

Das Ewing-Sarkom manifestiert sich v. a. im Alter der frühen Adoleszenz mit einem mittleren Erkrankungsalter von 15 Jahren. In Deutschland ist das Ewing-Sarkom bei Kindern unter 15 Jahren mit einer jährlichen Inzidenz von 2 / 1 000 000 der zweithäufigste primär maligne Tumor des Kindesalters [44]. Außerdem ist eine ethnische Häufung zu beobachten: Personen kaukasischer Herkunft erkranken deutlich häufiger als Personen afrikanischer oder asiatischer Herkunft. Allerdings ist die Prognose für Patienten afrikanischer Herkunft in Hinblick auf das Langzeitüberleben signifikant schlechter als für kaukasische Patienten [80]. Eine Ursache wurde dafür bisher nicht gefunden. Diskutiert werden ethnisch begründete Unterschiede im Ansprechen auf die Pharmakotherapie sowie sozioökonomische Faktoren wie der Zeitpunkt der Diagnosestellung [80].

Die Erstbeschreibung des Ewing-Sarkoms erfolgte durch den im Jahr 1921 publizierten Artikel „Diffuse endothelioma of bone“ (Proceedings of the New York Pathological Society, vol. xvii [24]) von dem US-amerikanischen Pathologen James Ewing (1866–1943). Nach diesem wurde das Ewing-Sarkom später auch benannt.

1.1.2 Genetische Charakteristika

Die Entschlüsselung der genetischen Ursache für die Entstehung des Ewing-Sarkoms erfolgte etwa 70 Jahre nach der Erstbeschreibung. Wissenschaftler konnten zeigen, dass es im Ewing-Sarkom durch eine chromosomale Translokation zur Bildung eines Fusionsgens kommt, das als Onkogen des Ewing-Sarkoms fungiert [4, 18]. Es sind mittlerweile mehrere unterschiedliche Fusionstypen für das Ewing-Sarkom beschrieben worden, die sich durch die Fusion des Gens *EWSR1* mit einem Gen aus der Familie der ETS-Transkriptionsfaktoren auszeichnen. In etwa 85 % aller Ewing-Sarkom-Fälle ist die Translokation $t(11;22)(q24;q12)$ und damit das Fusionsgen *EWSR1-FLI1* zu finden. In etwa 10 % der Fälle handelt es sich um die Trans-

lokation $t(21;22)(q22;q12)$, wodurch *EWSR1-ERG* entsteht. Sehr selten kommt es auch u. a. durch die Translokationen $t(7;22)(p22;q12)$, $t(17;22)(q12;q12)$ oder $t(2;22)(q33;q12)$ zur Bildung der Fusionsgene *EWSR1-ETV1*, *EWSR1-E1AF* oder *EWSR1-FEV* [2, 42, 52].

In einer großen prospektiven Studie konnte gezeigt werden, dass der Typ der Translokation jedoch keinen Einfluss auf die Prognose der Patienten nimmt [48]. Abgesehen von den beschriebenen Translokationen, zeichnet sich das Ewing-Sarkom als ein sehr mutationsarmes Malignom aus [14].

Allen Fusionsgenen gemein ist ihre Wirkung als aberrante Transkriptionsfaktoren. Für *EWSR1-FLI1*, dem häufigsten Fusionsgen, wurden die beiden Mechanismen, durch die es in die Regulation der Transkription von Genen in der Tumorzelle eingreift, folgendermaßen beschrieben:

Zum einen kann *EWSR1-FLI1* die Expression von Genen induzieren, indem es im Genom der Tumorzellen an repetitive GGAA-Sequenzen bindet, die als GGAA-Mikrosatelliten bezeichnet werden. Durch seine Bindung erhalten die normalerweise funktionslosen und damit evolutionär nur gering konservierten DNA-Abschnitte Enhancer-artige Eigenschaften. Dies führt dazu, dass das zunächst noch geschlossene Chromatin dieser Stelle geöffnet wird, was sich in einer Zunahme der DNase-Sensitivität der Region widerspiegelt, und zusätzlich der Methylierungs- und Acetylierungszustand der darin gelegenen Histone insofern verändert wird, dass es zu einer Zunahme von H3K4me1 und H3K27ac kommt, was Charakteristika einer Enhancer-Aktivität sind (Abbildung 1.1) [61, 67]. Veränderungen der Histone dieser Art werden typischerweise von großen Proteinkomplexen vermittelt [25]. Stellvertretend für eine Reihe möglicherweise beteiligter Proteine konnten Riggi *et al.* die Rekrutierung der Proteine WDR5 und p300 nach Bindung von *EWSR1-FLI1* an die DNA nachweisen (Abbildung 1.1) [61]. Eine Induktion der Genexpression durch *EWSR1-FLI1* an solchen GGAA-Mikrosatelliten ist in etwa ab einer viermaligen Wiederholung des GGAA-Motivs möglich. Je öfter das GGAA-Motiv wiederholt wird, desto stärker ist auch die Enhancer-Aktivität der Region, da dadurch mehrere Moleküle des Transkriptionsfaktors *EWSR1-FLI1* nebeneinander an dieser Stelle binden können [61]. Dieser Mechanismus verknüpft also das Ereignis der Transformation einer Zelle in eine Tumorzelle durch eine Translokation mit einem interindividuell angeborenen Risikoprofil in Hinblick auf die Architektur der GGAA-Mikrosatelliten [30].

Zum anderen unterdrückt *EWSR1-FLI1* auch die Expression von Genen, indem es an hoch konservierte Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren der ETS-Familie bindet, die häufig über ein singuläres GGAA-Motiv verfügen und damit die physiologische Transkriptionsfaktor Bindung verhindert (Abbildung 1.1). Da ein einzelnes, an die DNA-bindendes *EWSR1-FLI1* der gebundenen DNA keine Enhancer-Aktivität verleihen kann, führt es dazu, dass physiologischerweise aktive Enhancer inaktiv werden. Dadurch werden in den Ewing-Sarkomzellen sowohl Tumorsuppressorgene als auch Gene, die für die mesenchymale Differenzierung zuständig sind, unterdrückt [61].

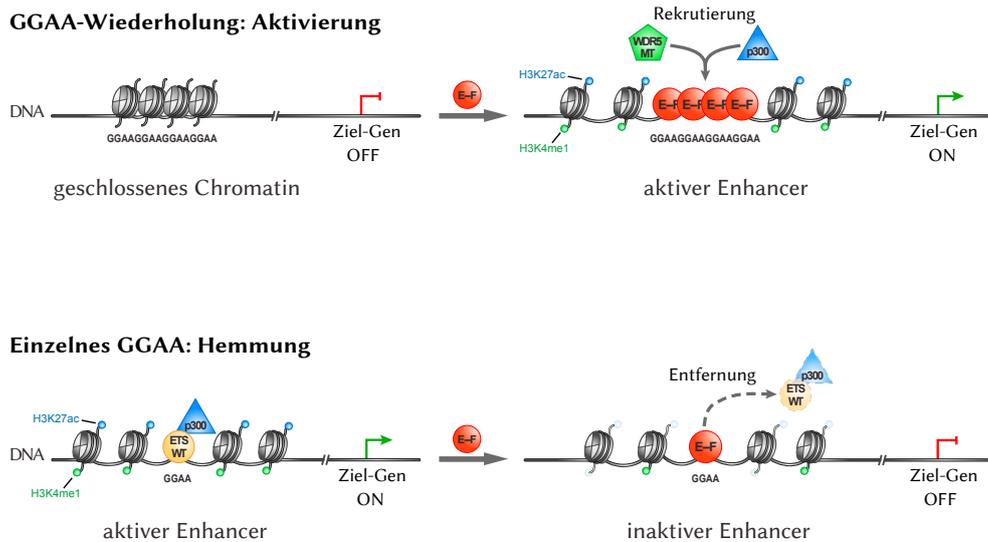


Abbildung 1.1 Schematische Darstellung der Genexpressionsregulation durch EWSR1-FLI1 nach Riggi *et al.* [61].

1.1.3 Diagnostik

Klinisch präsentiert sich das Ewing-Sarkom sehr unspezifisch. Meist handelt es sich bei den führenden Symptomen um lokale Schmerzen, ggf. mit einhergehender Schwellung, und im späteren Verlauf auftretendem Funktionsverlust des entsprechenden muskuloskelettalen Bereichs [20]. In 85 % der Fälle manifestiert sich das Ewing-Sarkom ossär. Der Primärtumor findet sich am häufigsten im Becken und in den Diaphysen langer Röhrenknochen [20, 54].

Als diagnostische Maßnahmen werden initial v. a. bildgebende Verfahren eingesetzt: Im Röntgenbild stellen sich die ossären Läsionen des Ewing-Sarkoms osteolytisch dar. Die Magnetresonanztomographie wird v. a. zur Beurteilung der Ausbreitung des Ewing-Sarkoms intramedullär und im Weichteilgewebe verwendet [54]. Die finale Diagnose Ewing-Sarkom kann nur durch Untersuchung einer Biopsie erfolgen. Dabei ist die Zuhilfenahme immunhistochemischer oder molekulargenetischer Verfahren, zusätzlich zur standardmäßigen pathologischen Beurteilung einer HE (Hämatoxylin-Eosin)-Färbung, unumgänglich, da das Ewing-Sarkom, genauso wie die anderen Tumore der Gruppe der small-blue-round-cell tumors, keinen histologisch einzigartigen Phänotyp aufweist [58]. Der häufigste für die Immunhistochemie verwendete Marker ist CD99, der von den meisten Ewing-Sarkomen stark exprimiert wird. Beweisend für die Diagnose ist ein Nachweis der Translokation, die meistens durch eine FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) nachgewiesen wird [20]. Da die notwendigen molekularpathologischen Methoden zum Nachweis der Translokation jedoch teilweise sehr teuer sind oder in einigen Ländern schlichtweg nicht verfügbar, wurde eine Kombination dreier immunhistochemischer Marker als Diagnosemethode vorgeschlagen. Bei einem CD99-positivem Tumor beträgt die

Spezifität der Markerkombination 99 %, wenn zugleich BCL11B und GLG1 stark positiv sind. Wenn lediglich einer der beiden Marker stark positiv ist, beträgt die Spezifität 96 % [6]. Diese Methode ist eine einfache und kostengünstige Alternative zum Goldstandard der molekularpathologischen Diagnosestellung und beugt v. a. einer Therapie eines fälschlicherweise als Ewing-Sarkom klassifizierten Tumors vor.

Nach gesicherter Diagnose erfolgt das Staging, bei dem v. a. die Skelettszintigraphie und eine Computertomographie des Thorax im Vordergrund stehen, da das Ewing-Sarkom hauptsächlich in die Lunge und die Knochen metastasiert [54, 5].

1.1.4 Therapie

Da sich gezeigt hat, dass eine alleinige Lokalthherapie bei weniger als 10 % der Patienten zu einer dauerhaften Heilung führt, ist das Ewing-Sarkom als eine systemische Erkrankung anzusehen [20, 8]. Man ist daher bei der Therapie des Ewing-Sarkoms auf einen multimodalen Ansatz angewiesen: Dieser besteht aus einer Kombination von systemischer Chemotherapie und, je nach individuellem Befund, lokaler Resektion oder Bestrahlung, auf die das Ewing-Sarkom typischerweise besonders gut anspricht [59]. In metastasierten Stadien kommen auch Hochdosis-Chemotherapien mit anschließender autologer Stammzelltransplantation in Frage [47]. Die Angewiesenheit auf diese sehr intensiven und dabei trotzdem unspezifischen Therapieschemata sind besonders bedauernswert, da es sich bei den Patienten meist um sehr junge Personen handelt, die, sofern sie die Erkrankung überstehen, ihr ganzes weiteres Leben unter den Nebenwirkungen und Spätfolgen der Therapien leiden. Außerdem ist es aufgrund ausgedehnter Lokalbefunde bei den operativen Interventionen häufig notwendig, größere Teile von Muskeln und Skelett mit zu entfernen, um den Primärtumor im gesunden Gewebe zu reseziieren, was unbedingt notwendig ist, um lokale Rezidive und ein beschleunigtes Fortschreiten der Erkrankung zu verhindern [8].

Die Prognose der Patienten mit einer bei Diagnosestellung auf die Manifestation des Primärtumors beschränkten Erkrankungen hat sich mit Hilfe der intensiven Therapien deutlich verbessert: Die 5-Jahres-Überlebenschance liegt bei etwa 70 % [20, 54, 59]. Sind jedoch bereits bei Diagnosestellung diagnostisch Metastasen festzumachen, was bei 20 % bis 25 % der Patienten der Fall ist [5], liegt die 5-Jahres-Überlebenschance, trotz nochmal intensivierter Therapieschemata, im Schnitt lediglich bei 20 % [20, 54].

1.2 Calcitonin related polypeptide β (CALCB)

1.2.1 Calcitonin-/CGRP-Familie

Das Neuropeptid Calcitonin related polypeptide β (CALCB) gehört neben den Peptiden Adrenomedullin, Adrenomedullin 2, Amylin, Calcitonin, Calcitonin related

polypeptide α (CALCA) und Katalcalcin zur Calcitonin-/CGRP-Familie [63]. Häufig werden CALCA und CALCB auch als Calcitonin gene-related peptide 1 (CGRP1) bzw. Calcitonin gene-related peptide 2 (CGRP2) bezeichnet. Während Adrenomedullin, Adrenomedullin 2, Amylin und CALCB jeweils von einem eigenen Gen kodiert werden [63], werden die Peptide Calcitonin, Katalcalcin und CALCA von einem gemeinsamen Gen namens *CALCA* kodiert [81]. Die Expression der drei Peptide wird dabei durch gewebespezifisches alternatives Splicing reguliert [81]. Obwohl das Gen *CALCB* lediglich für ein Peptid kodiert, geht man davon aus, dass es durch eine Duplikation des Gens *CALCA* entstanden ist. Beide Gene befinden sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 [57, 38].

1.2.2 Aufbau und Expression

CALCB kodiert für ein aus 37 Aminosäuren bestehendes sekretorisches Neuropeptid [69]. Der erste Nachweis der Expression von *CALCB* geht auf die Analyse der cDNA eines medullären Schilddrüsenkarzinoms zurück [68]. Während sich die Expression von Calcitonin vorwiegend auf Schilddrüsengewebe beschränkt, werden CALCA und CALCB v. a. im Nervensystem gebildet. Die Expression von CALCA erfolgt dabei durch gewebespezifisches alternatives Spleißen und ist in unterschiedlichsten neuronalen Geweben zu finden [10]. Die Expression von CALCB beschränkt sich auf einen kleinen Teil neuronalen Gewebes. Besonders hohe Expressionen sind u. a. im trigeminalen Ganglion, in der lateralen Medulla, im Hypothalamus und im Mittelhirn, insbesondere in den Motoneuronen von Hirnnerven, zu finden [3]. In einer Veröffentlichung aus dem Jahr 1987 wurde gezeigt, dass CALCB auch im Ewing-Sarkom exprimiert wird [39]. Des Weiteren ist die Expression einiger Mitglieder der Calcitonin-/CGRP-Familie in verschiedenen endokrinen Tumoren bekannt [36].

Strukturell unterscheiden sich die beiden Peptide CALCA und CALCB nur geringfügig: lediglich 3 der 37 Aminosäuren sind verschieden. Beide Peptide werden durch proteolytische Spaltung aus einem Vorläuferprotein abgespalten, das im Fall von CALCB 127 Aminosäuren umfasst, im Fall von CALCA 128 [69]. Die größte Diversität der beiden Proteine ist innerhalb der ersten 79 bzw. 80 Aminosäuren des NH₂-terminalen Endes des Vorläuferproteins zu finden. Hier unterscheiden sie sich in 13 Aminosäuren [69]. Auf diesen Bereich folgen jeweils die eigentlichen Peptide CALCA und CALCB. Die Vorläuferproteine werden durch ein identisches COOH-terminales Tetrapeptid abgeschlossen [69].

Nach proteolytischer Extraktion von CALCB aus dem Vorläuferprotein erfährt es noch zwei posttranslationale Veränderungen: Zum einen erhält es eine Disulfidbrücke zwischen den Aminosäuren der Positionen II und VII, an denen jeweils ein Cystein steht. Zum anderen erhält es C-terminal eine Amidierung der Aminosäure Phenylalanin [79].

1.2.3 Signalwege und Funktion

Es gibt eine Vielzahl verschiedener membranständiger, G-Protein gekoppelter Rezeptoren, welche die Wirkung der Mitglieder der Calcitonin-/CGRP-Familie auf die Zelle vermitteln. Mit Ausnahme des Rezeptors für Calcitonin (CTR), welcher aus einem einzelnen gleichnamigen Protein besteht, handelt es sich bei den Rezeptoren um Heterodimere zweier unterschiedlicher Proteine [34]. Diese bestehen aus verschiedenen Kombinationen des CTR oder des Calcitonin receptor-like receptor (CALCRL) mit je einem der drei receptor activity-modifying proteins (RAMP1, RAMP2 oder RAMP3) [53, 34]. Dabei sind die einzelnen Rezeptoren nicht ausschließlich auf die Bindung eines der Peptide der Calcitonin-/CGRP-Familie festgelegt und es bestehen diverse Überschneidungen bezüglich der Rezeptor-Ligand-Interaktion.

Die Wirkung von CALCA und CALCB wird jedoch vorwiegend durch den sogenannten CGRP-Rezeptor vermittelt, welcher aus den Proteinen CALCRL und RAMP1 besteht [53, 34, 36]. Eine Aktivierung des Rezeptors führt zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration [73]. Daneben ist jedoch auch eine Interaktion von CALCB mit verschiedenen Adrenomedullin (z. B. AM2-Rezeptor bestehend aus CALCRL und RAMP3) oder Amylin-Rezeptoren möglich (z. B. AMY1-Rezeptor bestehend aus CTR und RAMP1) [34, 36]. Eine Ligand-Rezeptor-Interaktion zwischen CALCA oder CALCB und dem CGRP-Rezeptor führt dabei je nach Lokalisation des Rezeptors zu unterschiedlichen physiologischen Reaktionen des Organismus. Befindet sich der Rezeptor auf glatten Muskelzellen von Gefäßen, so wird eine Vasodilatation hervorgerufen [9]. Zusätzlich kann eine Relaxation der Gefäßmuskulatur auch durch eine direkte Einwirkung auf Endothelzellen erfolgen. Dies führt zu einer vermehrten Bildung von Stickstoffmonoxid (NO), welche im Folgenden zu einer Erhöhung der cGMP-Konzentration führt [78]. Tatsächlich gehören CALCA und CALCB zu den stärksten Vasodilatoren, die derzeit bekannt sind [71]. So ist es nicht verwunderlich, dass in Ratten eine erhöhte Konzentration des homologen Peptids nach Gewebeischämie gefunden werden konnte [82].

Außerdem sind die beiden Peptide an der Schmerzentstehung beteiligt: Durch Sekretion von CALCA oder CALCB aus C-Fasern kommt es zu einer Ligand-Rezeptor-Interaktion auf der Oberfläche von A δ -Fasern, wodurch diese Fasern sensibilisiert werden [41]. Für CALCA konnte auch gezeigt werden, dass es wahrscheinlich über einen Signalweg, in welchem Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) beteiligt ist, die Angiogenese fördern kann [72]. Auch in Ratten führte eine Überexpression zu einer verstärkten Angiogenese [82]. Darüber hinaus wurde eine Proliferationsförderung verschiedener Gewebe über den CGRP-Rezeptorsignalweg beschrieben. Kawanami *et al.* konnten zeigen, dass sich die Stimulation des Signalwegs proliferationsfördernd auf alveoläre Epithelzellen auswirkt und dass bei der Übermittlung dieses Effekts die Extracellular-signal Regulated Kinase (ERK) involviert ist [45]. In Versuchen mit Calca-Knockout Mäusen konnte gezeigt werden, dass das Wachstum von Tumoren xenotransplantierte humaner Lungenkarzinomzellen im Vergleich zu Tumoren, welche in genetisch unveränderte Mäuse eingebracht worden waren,

eingeschränkt und eine geringere Angiogenese der Tumoren nachweisbar war [72].

Zusammengefasst handelt es sich bei CALCA und CALCB um zwei Neuropeptide, deren Wirkung über Rezeptorkomplexe an der Zelloberfläche vermittelt wird und welche dadurch Einfluss auf die Weite von Blutgefäßen und die Schmerzvermittlung nehmen. Darüberhinaus gibt es erste Hinweise, dass sie ebenfalls eine Rolle im Wachstum von Tumoren spielen.

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, das Potential der seit Jahren bekannten *CALCB*-Expression als therapeutischen Angriffspunkt im Ewing-Sarkom zu untersuchen. Basierend auf dem Hintergrund der schlechten Prognose von Patienten mit Ewing-Sarkom bei später Diagnosestellung, aber auch der ausgeprägten Morbidität durch die aktuelle Standardtherapie, ist der Anspruch an neue Therapieansätze nicht nur eine gute Wirksamkeit, sondern v. a. eine bessere Verträglichkeit. *CALCB* wurde in diesem Sinne als vielversprechend eingestuft, da es bei hoher Expression im Ewing-Sarkom zugleich nur geringfügig im menschlichen Körper gebildet wird. Zudem wurde die Expression von *CALCB* bisher fast ausschließlich für Gewebe des zentralen Nervensystems beschrieben, was bei einer therapeutischen Intervention unter Umständen durch Abschirmung des Gewebes durch die Blut-Hirn-Schranke eine nebenwirkungsarme, zielgerichtete Therapie versprechen könnte.

Daher wurde im Rahmen dieses Projekts zunächst anhand umfangreicher, öffentlich zugänglicher DNA-Microarray-Datensätzen die Expressionshöhe von *CALCB* im Ewing-Sarkom und einer Vielzahl an Normalgewebearten und Tumorarten verglichen. Durch Etablierung mehrerer Ewing-Sarkomzelllinien mit induzierbarem Knockdown von *CALCB* bzw. eines Teils seines Rezeptors *RAMP1* konnte der Einfluss der *CALCB*-Expression im Ewing-Sarkom auf das Wachstumsverhalten der Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* untersucht werden. Zur Aufdeckung des Regulationsmechanismus, der die starke *CALCB*-Expression im Ewing-Sarkom antreibt, wurde zunächst untersucht, ob es sich bei *CALCB* um ein Zielgen der Onkogens *EWSR1-FLI1* handelt und anschließend durch Klonierung eines GGAA-Mikrosatelliten in einen Reporter-Vektor eine möglicherweise involvierte regulatorische Domäne des Onkogens *EWSR1-FLI1* näher charakterisiert.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zellen

Humane Zelllinien – Wildtyp

Tabelle 3.1

Name	Ursprungsgewebe	bezogen / zur Verfügung gestellt von
A673	Ewing Sarkom	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA
ES7	Ewing Sarkom	O. Delattre, PhD, Institut Curie, Paris, Frankreich
EW1	Ewing Sarkom	O. Delattre, PhD, Institut Curie, Paris, Frankreich
EW3	Ewing Sarkom	O. Delattre, PhD, Institut Curie, Paris, Frankreich
EW7	Ewing Sarkom	O. Delattre, PhD, Institut Curie, Paris, Frankreich
EW16	Ewing Sarkom	O. Delattre, PhD, Institut Curie, Paris, Frankreich
EW18	Ewing Sarkom	O. Delattre, PhD, Institut Curie, Paris, Frankreich
EW22	Ewing Sarkom	O. Delattre, PhD, Institut Curie, Paris, Frankreich
EW24	Ewing Sarkom	O. Delattre, PhD, Institut Curie, Paris, Frankreich
LAP35	Ewing Sarkom	O. Delattre, PhD, Institut Curie, Paris, Frankreich
MHH-ES1	Ewing Sarkom	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, Deutschland
MIC	Ewing Sarkom	O. Delattre, PhD, Institut Curie, Paris, Frankreich
ORS	Ewing Sarkom	O. Delattre, PhD, Institut Curie, Paris, Frankreich
POE	Ewing Sarkom	O. Delattre, PhD, Institut Curie, Paris, Frankreich
RDES	Ewing Sarkom	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
SB-KMS-KS1	Ewing Sarkom	Prof. Dr. S. Burdach, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, MRI, TUM, München, Deutschland
SK-ES1	Ewing Sarkom	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
SK-N-MC	Ewing Sarkom	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
SKNPLI	Ewing Sarkom	O. Delattre, PhD, Institut Curie, Paris, Frankreich
SK-PN-DW	Ewing Sarkom	ATCC, Manassas, VA, USA
STA-ET1	Ewing Sarkom	O. Delattre, PhD, Institut Curie, Paris, Frankreich
TC-71	Ewing Sarkom	Children's Oncology Group, Monrovia, CA, USA
CEM	Leukämie (ALL)	Prof. Dr. I. Jeremias, Dr. von Haunersches Kinderspital der LMU, München, Deutschland
JURKAT	Leukämie (ALL)	Prof. Dr. I. Jeremias, Dr. von Haunersches Kinderspital der LMU, München, Deutschland
NALM6	Leukämie (ALL)	Prof. Dr. I. Jeremias, Dr. von Haunersches Kinderspital der LMU, München, Deutschland
REH	Leukämie (ALL)	Prof. Dr. I. Jeremias, Dr. von Haunersches Kinderspital der LMU, München, Deutschland
SKNAS	Neuroblastom	ATCC, Manassas, VA, USA
TGW	Neuroblastom	O. Delattre, PhD, Institut Curie, Paris, Frankreich
RH30	Rhabdomyosarkom	Prof. Dr. M. Kappler, Dr. von Haunersches Kinderspital der LMU, München, Deutschland
RMS-13	Rhabdomyosarkom	Prof. Dr. M. Kappler, Dr. von Haunersches Kinderspital der LMU, München, Deutschland
Hek-293T	humane embryonale Nierenzellen	ATCC, Manassas, VA, USA

Humane Zelllinien – genetisch verändert

Tabelle 3.2

Name	Expression von	zur Verfügung gestellt von
A673/TR/shEF1	shEWSR1/FLI1	Dr. J. Alonso, Madrid, Spanien (beschrieben in [12])
A673/TR/shCo#3	shCo	generiert im Rahmen dieser Arbeit
A673/TR/shCALCB1#3	shCALCB1	generiert im Rahmen dieser Arbeit
A673/TR/shCALCB4#19	shCALCB4	generiert im Rahmen dieser Arbeit
A673/TR/shRAMP1_3	shRAMP1_3	generiert im Rahmen dieser Arbeit
A673/TR/shRAMP1_4	shRAMP1_4	generiert im Rahmen dieser Arbeit
RDES/TR/shCo#1	shCo	generiert im Rahmen dieser Arbeit
RDES/TR/shCALCB1#7	shCALCB1	generiert im Rahmen dieser Arbeit
RDES/TR/shCALCB4#7	shCALCB4	generiert im Rahmen dieser Arbeit
RDES/TR/shRAMP1_3#2	shRAMP1_3	generiert im Rahmen dieser Arbeit
RDES/TR/shRAMP1_4#1	shRAMP1_4	generiert im Rahmen dieser Arbeit

Bakterien

Tabelle 3.3

Name	Charakteristika	bezogen von
DH5- α (18265017)	Competent Cells	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Stellar (636763)	Competent Cells	Takara Bio USA, CA, USA
SURE-2 (200152)	Supercompetent Cells	Agilent Technologies, Sydney, Australien

3.1.2 Reagenzien und Substanzen

Zellkultur

Tabelle 3.4

Reagenz / Substanz	bezogen / hergestellt von
1×Phosphate Buffered Saline (PBS) ohne Ca^{2+} , Mg^{2+} (L1825)	Biochrom, Berlin, Deutschland
1×Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%) in PBS, ohne Ca^{2+} , Mg^{2+} (L2143)	Biochrom, Berlin, Deutschland
BIBN-4096 (Olcegepant, 4561/10)	Research and Diagnostic systems Inc., Minneapolis, MN, USA
Crystal violet solution (HT90132)	Sigma-Aldrich/Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Dimethyl sulfoxide (DMSO) (D4540)	Sigma-Aldrich/Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Doxycycline hydrochloride powder (J60422.06)	VWR/Merck, Radnor, PA, USA
Fetal Bovine Serum, Tetracyclin-free (S0115/0492C)	Biochrom, Berlin, Deutschland
HiPerfect Transfection Reagent (301707)	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Lipofectamine® LTX Reagent with PLUS™ Reagent (15338-100)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
MK-3207 HCL: CALCRL-Inhibitor (S1542)	Selleck Chemicals, München, Deutschland
Opti-MEM® I Reduced Serum Medium (31985-062)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Penicillin/Streptomycin 10 000 U/ml (A2212)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Plasmocure (ant-pc)	InvivoGen, San Diego, CA, USA
Puromycin solution (ant-pr-1)	InvivoGen, San Diego, CA, USA
RPMI 1640 Flüssigmedium mit stabilem Glutamin mit 2,0 g/l NaHCO_3 (FG1215)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Trypan Blue solution (T8154)	Sigma-Aldrich/Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland

Bakterienkultur

Tabelle 3.5

Reagenz / Substanz	bezogen / hergestellt von
2-Mercaptoethanol, ≥99 % (4227)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin, Ready Made Solution, 100 mg/ml (A5354-10ML)	Sigma-Aldrich/ Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
LB Broth with agar (Lennox) (L2897-250G)	Sigma-Aldrich/ Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
LB Broth (Miller) (L3522-250G)	Sigma-Aldrich/ Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
S.O.C. Medium (15544034)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

Agarose-Gelelektrophorese

Tabelle 3.6

Reagenz / Substanz	bezogen / hergestellt von
1 kbp DNA-Leiter (Y014.2)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose (A9539-500G)	Sigma-Aldrich/ Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Bidestilliertes Wasser	H. Kerndl GmbH, Weißenfeld, Deutschland
Essigsäure 100 % (3738.1)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidium bromide solution 500 µg/ml in H ₂ O (E1385-5ML)	Sigma-Aldrich/ Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), ≥99 % (CN06.3)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, ready-to-use (SM0323)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Roti®-Load DNA (mit Glycerin) (X904.1)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethane, ≥99 %, cryst. (2449.2)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Immunhistochemie

Tabelle 3.7

Reagenz / Substanz	bezogen von
DAB+ (diaminobenzidine), Liquid, 2-component system (K3467)	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Hematoxylin nuclear counterstain (Gill's Formula; H-3401)	Vector laboratories, Burlingame, CA, USA
Streptavidin horseradish peroxidase	Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, UK
Target Retrieval Solution	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Target unmasking fluid	PanPath, Budel, Netherlands

3.1.3 Systeme und Enzyme

Tabelle 3.8

System	bezogen / hergestellt von
Beetle-Juice Luciferase assay Firefly 100 ml (102511)	PJK GmbH, Kleinblittersdorf, Deutschland
GoTaq® G2 Hot Start Polymerase (M7405)	Promega, Madison, WI, USA
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (4368813)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
In-Fusion® HD Cloning Kit	Takara Bio USA, Inc., CA, USA

Fortsetzung...

3 Material und Methoden

System	bezogen / hergestellt von
Lysis Buffer (Lysis Juice) 2x (102517)	PJK GmbH, Kleinblittersdorf, Deutschland
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (740609.250)	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NucleoSpin® RNA (740.955.250)	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NucleoSpin® Tissue (740952.250)	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
PureYield™ Plasmid Midiprep System (A2495)	Promega, Madison, WI, USA
Renilla-Juice Luciferase assay 100 ml (102531)	PJK GmbH, Kleinblittersdorf, Deutschland
ReliaPrep miRNA Cell and Tissue Miniprep System	Promega, Madison, WI, USA
SYBR® Select Master Mix (4472919)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

Enzym	bezogen / hergestellt von
AgeI-HF® (R3552S)	New England Biolabs (NEB), Ipswich, MA, USA
EcoRI-HF® (R3101S)	NEB, Ipswich, MA, USA
Eco-RV (R0195S)	NEB, Ipswich, MA, USA
SphI-HF® (R3182S)	NEB, Ipswich, MA, USA
T4 DNA Ligase (5 U/μL) (EL0014)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
XhoI (R0146S)	NEB, Ipswich, MA, USA

zugehörige Chemikalien	bezogen / hergestellt von
CutSmart® Buffer (B7204S)	NEB, Ipswich, MA, USA
Ethanol vergällt >99,8 % (K928.5)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol (2-Propanol), ROTIPURAN® ≥99,8 % (6752.3)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid, ≥99,8 % (9265)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
RNaseZAP™ (R2020)	Sigma-Aldrich/Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Sodium acetate buffer solution, 3M	Sigma-Aldrich/ Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
TRIS Hydrochlorid, PUFFERAN® ≥99 % (9090)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasser, BioScience-Grade, Nuklease-frei, auto-klaviert, DEPC-behandelt (T143.5)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

3.1.4 Oligonukleotide

Small interfering RNAs (siRNAs)

Tabelle 3.11

siRNA	Sequenz (5' – 3')	bezogen von
MISSION® siRNA Universal Negative Control #1 (SIC001-10NMOL)	Sequenz vom Hersteller nicht angegeben	Sigma-Aldrich/ Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Hs_CALCB_1 FlexiTube siRNA (S100337505)	CCUUGGUGAUGCAUUACAA	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Hs_CALCB_4 FlexiTube siRNA (S100337526)	GGAAUGAAACUGAAUGCAA	QIAGEN, Hilden, Deutschland

Small hairpin RNAs (shRNAs)

Alle shRNAs wurden bezogen von Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland.

Tabelle 3.12

shRNA	Sequenz (5' – 3') und genomische Lage
shCALCB_1_BOT	AATTAAAAACACCTTGGTGATGCATTACAACCTCGAGTTGTAATGCATCACCAAGGTG; in translatierter Region
shCALCB_1_TOP	CCGGCACCTTGGTGATGCATTACAACCTCGAGTTGTAATGCATCACCAAGGTGTTTTT; in translatierter Region
shCALCB_4_BOT	AATTAAAAACAGGAATGAACTGAATGCAACTCGAGTTGCATTTCAGTTTCATTCTCTG; in translatierter Region
shCALCB_4_TOP	CCGGCAGGAATGAACTGAATGCAACTCGAGTTGCATTTCAGTTTCATTCTCTGTTTTT; in translatierter Region
shCo_BOT	AATTAAAAACAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGAGTTGGTCTCTTCATCTTGTGTTG; kein Zielgen
shCo_TOP	CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGAGTTGGTCTCTTCATCTTGTGTTTTT; kein Zielgen
shEF1_BOT	AATTCAAAAAGCAGCAGAACCCCTTCTTATGACTCGAGTCATAAGAAGGGTTCTGCTGCG
shEF1_TOP	CCGGGCAGCAGAACCCCTTCTTATGACTCGAGTCATAAGAAGGGTTCTGCTGCTTTTTG
shRAMP1_3_BOT (TRCN0000273815)	AATTCAAAAAGCGCACTGAGGGCATTGTGTAAGTACGAGTACACAATGCCCTCAGTGCGG; in translatierter Region
shRAMP1_3_TOP	CCGGGCAGCACTGAGGGCATTGTGTAAGTACGAGTACACAATGCCCTCAGTGCGGTTTTT; in translatierter Region
shRAMP1_4_BOT (TRCN0000273872)	AATTCAAAAATGCCTGCCAGGAGGCTAACTACTCGAGTAGTTAGCCTCCTGGCAGGCA; in translatierter und 5'-untranslatierter Region
shRAMP1_4_TOP	CCGGTGCCTGCCAGGAGGCTAACTACTCGAGTAGTTAGCCTCCTGGCAGGCATTTTT; in translatierter und 5'-untranslatierter Region

Primer

Alle Primer wurden bezogen von Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland.

Tabelle 3.13

Verwendung	Primernamen	Sequenz (5' – 3')
qRT-PCR	CALCB_F1	GCTCTCAGTATCTTGGTCCTG
	CALCB_R1	CACATAGTCCTGCACCCAGTG
	CALCRL_F1	CCAAAAGATTATGCAAGACCCC
	CALCRL_R1	AAAGTAATCAGGGCAGAGCTG
	EWSR1-FLI1_F	GCCAAGCTCCAAGTCAATATAGC
	EWSR1-FLI1_R	GAGGCCAGAATTCATGTTATTGC
	RAMP1_F1	CCCAGTTCCAGGTAGACATG
	RAMP1_R1	CCAGCTTCTCCGCCATGTG
	RPLP0_F2	GAAACTCTGCATTCTCGCTTC
	RPLP0_R2	GGTGTAATCCGTCTCCACAG
PCR	TET-pLKO_F	GGCAGGGATATTCACCATTAT
	TET-pLKO_R	CTATTCTTCCCCTGCACTG
	CALCB-mSat-For_5	GAGCCCTTAGTATCCCCTTTG
	CALCB-mSat-Rev_5	ACCCTTGACTAACATGCTTCG
Sanger-Sequenzierung	Tet-pLKO-Seq	GGCAGGGATATTCACCATTATCGTTTCAGA
	CALCB-mSat-For_5	GAGCCCTTAGTATCCCCTTTG
	CALCB-mSat-Rev_5	ACCCTTGACTAACATGCTTCG
Infusion-Primer	CALCB-mSat-Infusion-For_5	ctagccgggctcgagGAGCCCTTAGTATCCCCTTTG
	CALCB-mSat-Infusion-Rev_5	gatcgagatctcgagACCCTTGACTAACATGCTTCG

Plasmide

Tabelle 3.14

Plasmid	Charakteristika	bezogen / hergestellt von
Tet-pLKO-puro (Addgene plasmid #21915)	für Doxycyclin induzierbare shRNA Expression; Resistenzen: Puromycin, Ampicillin	Addgene, Cambridge, MA, USA; von Dmitri Wiederschain zur Verfügung gestellt [77] [76]
pGL3-Enhancer Vector (E1771)	für Luciferase Versuche; enthält modifiziertes Luciferase-Gen des Glühwürmchens; Resistenz: Ampicillin	Promega, Madison, WI, USA
pRL Renilla Luciferase Control Reporter Vector	für Luciferase Versuche; enthält modifiziertes Luciferase-Gen der Seefeder; Resistenz: Ampicillin	Promega, Madison, WI, USA
pMD2.G (Addgene Plasmid #12259)	für Herstellung von Lentiviren; enthält VSV-G (Glykoprotein des Vesicular stomatitis Virus); Resistenz: Ampicillin	Addgene, Cambridge, MA, USA; generiert von Didier Trono
pCMV-dR8.91	für Herstellung von Lentiviren; enthält Gag-Pol; Resistenz: Ampicillin	Addgene, Cambridge, MA, USA; [83]

3.1.5 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3.15

Material	bezogen / hergestellt von
96-well solid polystyrene Microplate flat bottom, white polystyrene	Corning Inc., Corning, NY, USA
BrandTech™ BRAND™ Deepwell-Platten, Versiegelungsfolien (10655861)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
BrandTech™ BRAND™ White Real-Time PCR (qPCR) 96-well Microplates (11668439)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Duran™ Enghals-Erlenmeyerkolben, 500 ml (212164404)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Einmal-Skalpelle, CUTFIX, Typ 20 (5409808)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Einmalspritzen Injekt®, mit Luer-Lock-Anschluss, 5 ml (EP96.1)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Erlenmeyer-CAP-Kappen, 37/39 (K396.1)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Gewebekulturschalen, Nunc™ (Durchmesser 10 cm) (GK03)	A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Karl Hecht™ Assistent™ Drigalski-Spatel (41049010)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Kryoröhrchen Typ CryoGen™, steril (KT18)	A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Kulturröhrchen, 13 ml (KU59)	A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Mikro-Homogenisator nach Potter-Elvehjem	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Parafilm M pm996	Pechiney, Paris, Frankreich
Pasteurpipetten aus Glas (PP07)	A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland
PCR SingleCap 8er-SoftStrips 0,2 ml, farblos	Optical Clear Flat Cap, High Profile, Cutable
DNA-, DNase-, RNasefrei	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Petrischalen GBO (PP90)	A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Reaktionsgefäße mit Deckel, Typ „EasyFit“, 1,5 ml (RK1G)	A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Rotilabo®-Spritzenfilter, 0,45 µm (P667.1)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
SafeSeal SurPhop Filter-Tips, 10/20/100/200/1250 µl (VT0200, VT0220, VT0230, VT0240, VT0270)	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Serologische Pipetten GBO 5/10/25 ml (PS05, PS10, PS25-C)	A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Schutzhandschuh, Nitril® NextGen®	Meditrade GmbH, Kiefersfelden, Deutschland
Schutzhandschuhe, purple nitrile	Kimberly-Clark Worldwide, Inc., Dallas, TX, USA
STERICAN Kanülen Luer-Lok 0,45×25 mm Gr.18	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Thermo Scientific™ PCR-Streifen mit 8 Gefäßen (15262179)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
TPP 6-/12-well Platten (92006, 92012)	Faust, Klettgau, Deutschland
TPP 96-well Platten Flat (92096)	Faust, Klettgau, Deutschland
TPP T25/T75/T150 Flasks (90026, 90076, 90151)	Faust, Klettgau, Deutschland
Ultra-low attachment 96-well plates	Corning Inc., Corning, NY, USA

Fortsetzung...

Material	bezogen / hergestellt von
Zählkammer C-Chip (P DHC-N01) Zentrifugenröhrchen 15/50 ml, Greiner GBO (ZR97, ZR82) Schutzkittel, SplashCoat pro+	Biochrom, Berlin, Deutschland A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland DACH Schutzbekleidung GmbH & Co. KG, Rastatt, Deutschland

3.1.6 Xenotransplantationsmodell

Tabelle 3.16

Versuchstiere / Reagenz / Substanz	bezogen / hergestellt von
Beladox [®] , Wirkstoff: Doxycyclin, 500 mg/g Einmalkanüle Sterican [®] Insulin G 30 × 1/2" / ø 0,30 × 12 mm, gelb	bela-pharm, Vechta, Deutschland B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
NOD scid gamma Mouse, NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ (Stock No: 005557) Sucrose (D+)-Saccharose, ≥99.5% (GC) (S9378)	Charles River Laboratories, Inc., Wilmington, MA, USA Sigma-Aldrich/Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Tuberkulinspritzen 1 ml Dispomed [®] (STBO)	A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland

3.1.7 Antikörper für Immunhistochemie

Tabelle 3.17

Reagenz / Substanz	bezogen / hergestellt von
Anti-mouse-CD31-antibody, rat, monoclonal (DIA-310, Clone SZ31) Anti-rat-IgG-antibody, biotinylated and mouse-absorbed (BA 4001) Anti-human-CALCB-antibody, rabbit, polyclonal (bs-0791R) Anti-rabbit-IgG-antibody, Vectastain ABC-Kit Elite Universal	Dianova, Hamburg, Deutschland Vector laboratories, Burlingame, CA, USA Bioss Antibodies Inc., MA, USA Vector laboratories, Burlingame, CA, USA

3.1.8 Geräte

Tabelle 3.18

Gerät	Hersteller
Aspirator FTA-1 with trap flask Axiocam 105 color Axiovert 200 Mikroskop Axiovert 25 Mikroskop mit Phasenkontrast Bakterienbrutschrank B 6030, Heraeus	Biosan SIA, Riga, Lettland Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Deutschland
BL150 Top-loading Balances	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland
CERTOMAT [®] IS, Incubation-Shaker	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland
CFX Connect Real time PCR Gerät FluorChem FC2 Imaging System Forma [™] -86°C ultra-low temperature upright Freezer (8695) Forma [™] Wassermantel-CO2-Inkubator der Serie 3 Kryoeinfriergerät „Quick-Freeze“ (QF18)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA Alpha Innotech Corp., San Leandro, CA, USA Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland

Fortsetzung...

3 Material und Methoden

Gerät	Hersteller
Laborabzug (2 – 453 – GFHD)	Köttermann GmbH & Co. KG, Uetze/Hänigsen, Deutschland
Mastercycler™ PRO, PCR Cycler	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Megafuge 8R, Heraeus, Zellkultur (75007214)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Miele M 8201–1 Kombi-Mikrowelle, Edelstahl	Miele & Cie. KG, Gütersloh, Deutschland
Mikrozentrifuge, Centrifuge 5417R, gekühlt	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mini Centrifuge Spectrafuge™ C1301–230V–UK	Labnet International, Inc., Edison, NJ, USA
Minizentrifuge	Qualitron, Karachi, Pakistan
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Orion II Microplate Luminometer	Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland
Pipetboy acu 2, Pipettierhilfe	Integra Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Pipetman classic 2, 10, 20, 100, 200, 1000 µl	Gilson Incorporated, Middleton, WI, USA
PowerPac™ Basic Power Supply für Elektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Reinraumwerkbank, HeraSave HS12	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Rotina 420R, Tischzentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Schieblehre (S14)	A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Sigma 4K15 refrigerated high-speed benchtop centrifuge	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland
Spectrafuge™ mini-centrifuge for PCR stripes	Labnet International, Inc., Edison, NJ, USA
Sub-Cell® GT Cell Horizontal Electrophoresis System, (1704402)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Tank für flüssigen Stickstoff, Arpege 70	AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Transilluminator, 365 nm, FT – 20 E / 365 (FB 16013)	Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch, Deutschland
UNIVERSAL 320 Tischzentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Vac-Man® Laboratory Vacuum Manifold	Promega, Madison, WI, USA
Vakuumpumpe, WOB-L Press/Vac dry pump 2 (2522Z–02)	Welch Vacuum – Gardner Denver, Monroe, LA, USA
Vakuumpumpensystem BVC 21	Vakuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Varioklav® Laborautoklav, vertikal	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Deutschland
Varioskan Flash Multimode Reader	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA

3.1.9 Programme

Tabelle 3.19

Programm	Hersteller
AlphaEaseFC™ 4.0	Alpha Innotech Corp., San Leandro, CA, USA
CFX Manager™ Software	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Citavi 5	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz
GraphPad PRISM 5	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
ImageJ	Freie Software, Entwickler Wayne Rasband
Inkscape	Freie Software
Microsoft Office 2016	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
MikTex	Freie Software

3.2 Methoden

3.2.1 Expressionsanalysen mittels DNA-Microarrays

DNA-Microarrays erlauben eine simultane Analyse der Expressionshöhe mehrerer tausend Gene eines Gewebes. Dazu werden zunächst definierte DNA-Sequenzen, beispielsweise Teile eines bekannten Gens, auf die Testfelder des Microarrays aufgebracht. Die zu analysierende Probe, bestehend aus gesamt-RNA oder mRNA (messenger RNA), wird durch eine reverse Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgewandelt und durch einen Farbstoff markiert. Dann wird der Microarray mit der markierten cDNA inkubiert und durch Messung der Fluoreszenz und Normalisierung anhand bekannter Proben die Expressionshöhe der Gene bestimmt [65].

Bei den in dieser Arbeit verwendeten DNA-Microarray-Datensätze handelt es sich um öffentlich zugängliche, im Rahmen anderer Projekte generierte Messungen. Davon ausgenommen sind die Datensätze, welche aus eigens in Auftrag gegebenen DNA-Microarrays aus einem Xenotransplantationsversuch und einem *in vitro* Versuch stammen. Verwendet wurden die Daten zum einen um die Expression bestimmter Gene, allen voran *CALCB*, in verschiedenen Gewebearten zu vergleichen. Zum anderen wurde anhand der Datensätze aus primären Ewing-Sarkomen eine *gene set enrichment analysis* (GSEA) durchgeführt. Mit Hilfe einer GSEA ist es möglich, eine Korrelation der Genexpression eines Gens mit der Genexpression einer Gruppe von Genen herzustellen [70]. Dadurch kann eine funktionelle Bedeutung des Gens innerhalb der Zelle, welche sich beispielsweise durch Expressionsänderungen in Signalwegen äußert, aufgedeckt werden. Diese Methode dient v. a. der Hypothesengenerierung bezüglich einer funktionellen Bedeutung eines Gens, welche dann gezielt experimentell weiterverfolgt werden kann.

Beziehen und Aufbereiten der DNA-Mikroarray Daten

Die öffentlich zugänglichen DNA-Microarrays wurden auf dem Affymetrix HG-U133Plus2.0 Chip generiert. Bezogen wurden sie vom Gene Expression Omnibus (GEO), der Array Express database des European Bioinformatics Institute (EBI). Die Zugangsnummern zu den einzelnen Datensätzen sind in den entsprechenden Kapiteln unter Accession code angegeben. Um die unterschiedlichen Datensätze gemeinsam analysieren zu können, bedurfte es erst der Aufbereitung der Datensätze für die Analyse. Dies erfolgte nach Baldauf & Gerke *et al.* [7]. Im Folgenden eine Zusammenfassung der einzelnen Verfahren: Als Qualitätsprüfungen erfolgte zunächst die Berechnung der Relative Log Expression (RLE) [11] und des Normalized Unscaled Standard Error (NUSE) [15]. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass die verwendeten Datensätze keine zu große Streuung aufweisen. Eine Normalisierung wurde durch Berechnung der Expressionsintensität mit Hilfe des Robust Multi-array Average (RMA) Algorithmus durchgeführt [40]. Für die Zusammenfas-

sung der Daten wurden custom brainarray Chip Description Files (CDF; ENTREZG, v21) verwendet [15]. Dadurch erhielt man ein Datenset mit genau einem Messwert pro Gen.

Analyse *CALCB*-Expression in Normalgeweben und Tumoren

Die Accession codes der verwendeten Datensätze sind in Tabellen 3.20 und 3.21 zu finden. Insgesamt wurden für die Expressionsanalyse 2 678 Proben verwendet, die aus 50 verschiedenen Tumorarten und 71 Normalgewebearten stammen. Die Datensätze wurden wie am Anfang des Kapitels beschrieben für die Analyse vorbereitet [7]. Der resultierende Probensatz wurde verwendet, um die Expressionshöhe von *CALCB* in Normal- oder Tumorgewebearten mit der Expressionshöhe des Gens im Ewing-Sarkom zu vergleichen. Der Probensatz des Ewing-Sarkoms wurde des Weiteren zur Analyse der Expressionshöhe der Gene *ADM*, *CALCA*, *CALCR*, *CALCRL*, *IAPP* und *RAMP1* verwendet.

Tabelle 3.20 Accession codes Normalgewebe.

Normalgewebe (71 Gewebearten)	Accession code	n
Normale Nebenniere	GSE10927, GSE19750, GSE43346, GSE7307	19
Normale B-Zellen	GSE31048	15
Normale Blase	E-MTAB-1940, GSE30522, GSE43346, GSE61352	10
Normales Knochenmark	GSE11504	25
Normaler Ncl. accumbens	GSE7307	14
Normale Amygdala	GSE7307	8
Normaler Ncl. caudatus	GSE7307	4
Normales Corpus callosum	GSE7307	9
Normaler Kortex	GSE7307	35
Normaler Hippocampus	GSE7307	8
Normaler Hypothalamus	GSE7307	8
Normales Mittelhirn	GSE7307	7
Normaler Ncl. nodosus	GSE7307	8
Normaler Globus pallidus	GSE7307	6
Normale Hypophyse	GSE7307	6
Normale Pons	GSE7307	1
Normales Putamen	GSE7307	13
Normale Substantia nigra	GSE7307	16
Normaler Ncl. subthalamicus	GSE7307	9
Normaler Thalamus	GSE7307	9
Normales Ganglion trigeminale	GSE7307	8
Normale area tegmentalis anterior	GSE7307	7
Normaler Ncl. vestibularis superior	GSE7307	7
Normale Brustdrüse	GSE26457	25
Normaler Bronchus	GSE14461, GSE7307	6
Normales Kleinhirn	GSE7307	11
Normale Cervix	GSE27678, GSE7307	7
Normale Kolonmukosa	GSE8671	25
Normaler Ösophagus	GSE43346, GSE63626, GSE63941, GSE7307	14
Normales Fett	GSE41168	25
Normale Gallenblase	GSE43346, GSE63626	4
Normale Gingiva	GSE16134	25
Normale Haarfollikel Stammzellen	GSE44765	18
Normales Herz	GSE18676, GSE43346, GSE7307	10
Normale hämatopoetische Stammzellen	GSE19429	9
Normale Niere	GSE11151, GSE18676, GSE43346, GSE7307	14
Normale Leber	GSE40231	22

Fortsetzung...

3.2.1 Expressionsanalysen mittels DNA-Microarrays

Normalgewebe (71 Gewebearten)	Accession code	n
Normale Lunge	GSE40791	25
Normaler Lymphknoten	GSE43346, GSE7307	5
Normale Makrophagen	GSE2125, GSE43346	30
Normale Monozyten	GSE7158	25
Normaler Nävus	GSE53223	12
Normales okuläres Endothel	GSE20986	8
Normale Mundschleimhaut	GSE30784	25
Normales Ovar	GSE18520, GSE43346, GSE7307	13
Normales Pankreas	GSE18676, GSE22780, GSE43346, GSE7307	4
Normaler Penis	GSE7307	6
Normale Rachenschleimhaut	GSE7307	4
Normale Prostata	GSE43346, GSE7307	14
Normale Retina	GSE12621, GSE28133	20
Normale Speicheldrüse	GSE18676, GSE40611, GSE7307	11
Normaler Skelettmuskel	GSE40231	14
Normale Haut	GSE13355	25
Normaler Dünndarm	GSE18676, GSE43346, GSE63626, GSE7307	20
Normales Rückenmark	GSE7307	9
Normale Milz	GSE18676, GSE25550, GSE43346, GSE7307	13
Normaler Bauch	GSE18676, GSE43346, GSE7307	14
Normale Synovialmembran	GSE7307	6
Normale T-Zellen	GSE14926, GSE6338	25
Normaler Hoden	GSE25518, GSE43346, GSE7307	10
Normaler Thymus	GSE18676, GSE43346, GSE46170, GSE7307	10
Normale Schilddrüse	GSE33630	25
Normale Zunge	GSE7307	10
Normale Tonsille	GSE43346, GSE7307	4
Normale Trachea	GSE18676, GSE43346, GSE7307	6
Normale Urethra	GSE7307	5
Normales Uterusendometrium	GSE7307	23
Normales Uterusmyometrium	GSE7307	22
Normale Vagina	GSE7307	4
Normale Arterie	GSE43346, GSE7307	8
Normale Vene	GSE43346, GSE7307	7

$\Sigma = 929$

Tabelle 3.21 Accession codes Tumorgewebe.

Tumorgewebe (50 Gewebearten)	Accession code	n
Adamantinomatöses Kraniopharyngeom	GSE68015	15
Alveoläres Weichteilsarkom	GSE13433, GSE32569	13
Astrozytom Grad 3	GSE4290	26
ATRT	GSE19404, GSE35493	16
Choroidalplexuspapillom	GSE68015	4
CLL	GSE39671	49
CML	GSE13159	47
Desmoid-Tumor	GSE58697	50
Diffuses intrinsisches Ponsgliom	GSE26576	27
DLBCL	GSE53786	49
Ependymom	GSE21687, GSE26576	50
Ewing-Sarkom	GSE34620	50
Ewing-like BCOR-CCNB3	GSE34800	10
Ewing-like CIC-DUX4	GSE60740	14
Ewing-like EWSR1-NFATc2	GSE60740	7
Folikuläres Lymphom	GSE53820	50
Germinom	GSE19348	6
GIST	GSE17743, GSE8167	61
Glioblastom	GSE53733	50
Hodgkin Lymphom	GSE17920	47

Fortsetzung...

Tumorgewebe (50 Gewebearten)	Accession code	n
Uterines Leiomyom	GSE13319	50
Leiomyosarkom	GSE21050	50
Liposarkom	GSE21050	50
MALT Lymphom	GSE13314, GSE25550	48
Mantelzelllymphom	GSE36000	38
MDS	GSE29326, GSE30195	35
Medulloblastom G3	GSE37418	16
Medulloblastom G4	GSE37418	39
Medulloblastom SHH	GSE37418	10
Medulloblastom WNT	GSE37418	8
Meningiom	GSE4780	51
Pleurales Mesotheliom	E-MTAB-1719	38
MPNST	GSE68015	6
Multiples Myelom	GSE19784	46
Nephroblastom	GSE53224	50
Neuroblastom	GSE16476	49
Oligodendrogliom	GSE4290	51
Osteosarkom	E-MEXP-3628, GSE14827	40
Pädiatrische ALL-BCP	GSE47051	33
Pädiatrische AML	GSE17855	46
Pädiatrisches Glioblastom	GSE19578	33
Pädiatrische T-ALL	GSE39816, GSE47051	54
Pilozytäres Astrozytom	GSE50161	12
PNET	GSE19404, GSE35493	20
Rhabdomyosarkom alveoläres, Fusions-negative	E-TABM-1202	20
Rhabdomyosarkom alveoläres, Fusions-positive	E-TABM-1202	45
Rhabdomyosarkom, embryonal	E-TABM-1202	36
Retinoblastom	GSE29683	50
Synovialsarkom	GSE20196	34
Undifferenziertes Sarkom	GSE21050	50

Σ = 1749

Analyse *CALCB*-Expression nach Induktion von *EWSR1-FLI1*

Im Rahmen eines Forschungsprojekts, das sich mit der Ursprungszelle des Ewing-Sarkoms beschäftigte, wurde ein Doxycyclin-induzierbares *EWSR1-FLI1*-Expressionssystem in embryonale Stammzellen eingebracht [29]. Um den Einfluss der künstlichen *EWSR1-FLI1*-Expression weiter zu untersuchen wurde ein DNA-Microarray angefertigt. Diese Daten können über den Accession code GSE64686 bezogen werden [29]. Die Datensätze wurden wie am Anfang des Kapitels beschrieben normalisiert und zusammengefasst. Verglichen wurden die Expressionsunterschiede von *EWSR1-FLI1* und *CALCB* ohne und mit Induktion der *EWSR1-FLI1*-Expression in den embryonalen Stammzellen.

Analyse der *EWSR1-FLI1*-abhängigen *CALCB*-Expression *in vivo*

Um den Effekt eines *EWSR1-FLI1*-Knockdowns auf die Expression von *CALCB* in Xenotransplantaten von Ewing-Sarkomzellen in NSG (NOD scid gamma)-Mäusen zu untersuchen, wurden die Versuchstiere wie unter Abschnitt 3.2.14 beschrieben behandelt. Nach Beendigung des Versuchs wurde das Transkriptom von sechs Tumoren – drei ohne Knockdown und drei mit Knockdown von *EWSR1-FLI1* – auf einem Affymetrix Clariom D Microarray mit Hilfe des Affymetrix WT PLUS

Labeling Kit analysiert. Die Analyse wurde von IMG M Laboratories[®] (Martinsried, Deutschland) durchgeführt. Die Rohdaten wurden mit der Affymetrix Expression Console Software (v1.4) unter Verwendung des Signal Space Transformation Robust Multi-Chip Average (SST-RMA) Algorithmus und Affymetrix CDF normalisiert und annotiert [51]. Als Surrogat für die Änderung der *EWSR1-FLI1*-Expression wurde die Expression von *FLI1* verwendet. Die Signifikanz der Expressionsänderung von *FLI1* (stellvertretend für *EWSR1-FLI1*) und *CALCB* wurde mit einem unabhängigen, zweiseitigen t-Test nachgewiesen.

Gene set enrichment analysis (GSEA)

Anhand eines 166 primäre Ewing-Sarkome umfassenden, normalisierten Genexpressionsdatensatzes [6] wurde eine gene set enrichment analysis (GSEA) durchgeführt. Dazu wurde eine Liste von Genen, sortiert nach deren Korrelationskoeffizient mit der *CALCB*-Expression, verwendet, um Genexpressionsmuster, die mit der Expression von *CALCB* vergesellschaftet sind, aufzudecken. Als Grundlage für die Gruppierung der Gene diente der Datensatz „c2.cpg.v6.2“, welcher über die molecular signatures database (MSigDB) erhältlich ist. Für die Permutationen wurde die Standardeinstellung 1 000 verwendet [70].

Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit der *CALCB*-Expression

Für die Analyse des Gesamtüberlebens von Patienten mit Ewing-Sarkom in lokalisiertem Stadium, je nach Expressionshöhe von *CALCB* in ihren Tumoren, wurden zwei unabhängige Analysen öffentlich zugänglicher DNA-Microarray-Datensätze mit klinischer Annotation durchgeführt. Ein Datensatz bestehend aus 188 Patienten ist unter den Accession codes GSE34620 [56], GSE12102 [66] und GSE17618 [64] erhältlich, der andere Datensatz umfasst 85 Patienten und ist unter dem Accession code GSE63157 [74] erhältlich. Nach bereits beschriebener Aufbereitung der DNA-Microarray-Daten, wurden die Fälle der beiden Datensätze jeweils nach der 34. Perzentile der *CALCB*-Expression in zwei Gruppen aufgeteilt und anhand einer Kaplan-Meier-Kurve das Gesamtüberleben analysiert.

3.2.2 Sequenzierungen

Sanger-Sequenzierung

Die Sanger-Sequenzierung wurde in diesem Projekt genutzt, um die Identität von Plasmiden, welche zuvor in Bakterienkulturen vervielfältigt wurden, zu verifizieren und um die Richtigkeit bzw. die Sequenzen der aus Klonierungsarbeiten neu generierten Plasmide zu überprüfen. Durchgeführt wurden die Sanger-Sequenzierungen von der Firma GATC Biotech (Konstanz, Deutschland). Es wurde jeweils das Paket „SupremeRun“ verwendet. Die an GATC übergebene Plasmid-DNA lag

in einer Konzentration von 30 ng/μl bis 100 ng/μl vor, die Primer in einer Konzentration von 10 pmol/μl. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 3.13 aufgeführt.

ChIP-Seq-Analyse

Bei einer Chromatin-immunoprecipitation followed by sequencing (ChIP-Seq)-Analyse handelt es sich um eine Methode, mit der man die Interaktion zwischen Proteinen und DNA-Fragmenten untersuchen kann. Im Rahmen dieses Projekts wurden öffentlich zugängliche ChIP-Seq-Datensätze der beiden Ewing-Sarkomzelllinien A673 und SK-N-MC verwendet, um *FLI1*-DNA-Interaktion (als Surrogat für *EWSR1-FLI1*-DNA-Interaktion) in der Umgebung des *CALCB*-Genlokus mit und ohne Knockdown von *EWSR1-FLI1* zu untersuchen. Damit wurden Datensätze kombiniert, welche DNase-sensitive Regionen und epigenetische Veränderungen wie Acetylierungen (H3K27ac) und Methylierungen (H3K4me1) von Histonen beschreiben. Typischerweise ist ein aktiver Enhancer durch die Anwesenheit der beiden Marker H3K27ac und H3K4me1 in einer DNase-sensitiven Region des Genoms charakterisiert [67]. So konnten Überlappungen der *FLI1*-DNA-Bindung und Charakteristika von Enhancer-Aktivität festgestellt werden.

Die in Tabelle 3.22 angegebenen Datensätze sind eine Auswahl von Datensätzen des Gene Expression Omnibus (GEO; Auswahl aus GSE61944) [61] und des ENCODE Project [22]. Die von Grünewald *et al.* und Riggi *et al.* [30, 61] präprozessierten Datensätze wurden im UCSC genome browser visualisiert und von dort exportiert.

Tabelle 3.22 Accession codes ChIP-Seq.

ChIP-Seq	Accession code
ENCODE_SKNMC_hg19_DNaseHS_rep2	GSM736570
SKNMC.shGFP96.FLI1	GSM1517546
SKNMC.shFLI196.FLI1	GSM1517555
SK-N-MC_shGFP_96h_H3K4me1	GSM1517548
SK-N-MC_shFLI1_96h_H3K4me1	GSM1517557
SKNMC.shGFP96.H3K27ac	GSM1517547
SKNMC.shFLI196.H3K27ac	GSM1517556
A673.shGFP48.FLI1	GSM1517569
A673.shFLI148.FLI1	GSM1517572
A673.shGFP96.H3.k27ac	GSM1517571
A673.shFLI196.H3K27ac	GSM1517574

3.2.3 Arbeiten mit Zellkulturen

Grundsätzlich wurden alle Arbeiten mit Zellkulturen unter keimarmen Bedingungen durchgeführt. Die Arbeit mit den Zellen erfolgte ausschließlich in einer Reinraumwerkbank. Diese wurde vor Beginn einer Tätigkeit gründlich mit 70 % Ethanol

ausgewischt. Auch alle Verbrauchsmaterialien und Geräte von außerhalb wurden vor Einbringen in die Reinraumwerkbank mit 70 % Ethanol gesäubert. Am Ende jedes Arbeitstages wurde die Reinraumwerkbank außerdem mit UV-Licht dekontaminiert. Es wurden zu jeder Zeit Schutzkittel und Handschuhe getragen. Letztere wurden während der Arbeit regelmäßig gewechselt. Bei Arbeiten mit Viren, die unter S2-Bedingungen erfolgten, wurde die Reinraumwerkbank zusätzlich nach Beendigung der Arbeit für 30 min mit UV-Licht dekontaminiert. Alle Reagenzien und Verbrauchsmaterialien, die nicht bereits vom Hersteller keimfrei geliefert wurden, wurden vor Verwendung durch Autoklavieren (121 °C für 20 min) sterilisiert. Kulturmedien, Transfektionsreagenzien und andere verwendete Substanzen wurden gemäß Hersteller bei 4 °C bis 8 °C gelagert, Plasmide, siRNAs, fetal bovine serum (FBS; sofern noch nicht in RPMI gelöst), Penicillin/Streptomycin (sofern noch nicht in RPMI gelöst) und Trypsin (sofern noch nicht in Verwendung) bei –20 °C. Um zu gewährleisten, dass im Laufe der Arbeit mit verschiedenen Zelllinien keine Verwechslungen oder Vermischungen verschiedener Zelllinien stattgefunden hatten, wurde die Identität der Zelllinien regelmäßig durch Analyse der Short Tandem Repeats sichergestellt. Es fanden ebenfalls routinemäßige Kontrollen der Zellüberstände auf Mykoplasmen-Kontaminationen mittels PCR statt.

Kultivierungsbedingungen

Alle adhärenenten Zelllinien humanen Ursprungs wurden in einer Dichte von $3,0 \cdot 10^4$ bis $1,1 \cdot 10^5$ Zellen pro cm^2 Fläche der Zellkulturflasche in 0,2 ml bis 0,4 ml Kulturmedium, bestehend aus RPMI 1640, versetzt mit 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin (entsprechend einer Dosis von 100 U/ml), in einem Inkubator mit 5 % CO_2 -versetzter Umgebungsluft bei 37 °C in flach liegender Position kultiviert. Zelllinien, die in Suspension wachsen, wurden stehend im Inkubator gelagert, um das Kulturmedium auf einer kleineren Fläche zu sammeln.

Auftauen, Einfrieren und Splitten der Zellen

Zur Aufbewahrung wurden die Zellen zu etwa $2,5 \cdot 10^6$ Zellen pro Kryoröhrchen in 1 ml Einfrierlösung, bestehend aus 0,45 ml Kulturmedium (wie oben beschrieben), 0,45 ml FBS und 0,1 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) bei –80 °C gelagert. Um die Zellen in Kultur zu nehmen, wurden sie rasch durch leichtes Erwärmen in der Handfläche von der Wand des Kryoröhrchens gelöst und als noch gefrorener Block in 5 ml vorgelegtes Kulturmedium in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nachdem die Zellen komplett aufgetaut waren, wurden sie bei 1 200 rpm in einer Megafuge 8R Zentrifuge für 4 min zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin vom klar abgrenzbaren Zellpellet mit Hilfe eines Vakuumpumpsystems abgenommen, die Zellen in 1 ml Kulturmedium resuspendiert und zur weiteren Kultivierung in 5 ml bzw. 10 ml (entsprechend T25- bzw. T75-Flasche) vorgelegtes Kulturmedium in eine Zellkulturflasche überführt.

Zum Splitten adhärenter Zellen wurde das Kulturmedium von den Zellen abgenommen, die Zellen mit 3 ml bzw. 5 ml (entsprechend T25- bzw. T75-Flasche) PBS vorsichtig gewaschen und mit 1,5 ml bzw. 3 ml (entsprechend T25- bzw. T75-Flasche) Trypsin in 5 min Inkubationszeit von der Plastikoberfläche der Kulturflasche abgelöst. Das Trypsin wurde sogleich durch Zugabe von 1,5 ml bzw. 3 ml (entsprechend T25- bzw. T75-Flasche) Kulturmedium abgestoppt und die Zellsuspension in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden daraufhin wie oben beschrieben in einer Megafuge 8R Zentrifuge zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet entweder in 1 ml Kulturmedium resuspendiert, um einen Anteil davon weiter zu kultivieren oder in 3 ml Einfrierlösung (Zusammensetzung siehe oben) gelöst und auf 3 Kryoröhrchen zu je 1 ml verteilt, um mit Hilfe eines Kryoeinfriergerätes, das die Zellen in Schritten von 1 °C/min auf –80 °C abkühlt, bei –80 °C einzufrieren.

Knockdown-Induktion durch siRNAs oder shRNAs

Um die Expression eines Gens transient herunter zu regulieren, einen sogenannten Knockdown eines Gens zu erzielen, wurden Zellen mit small interfering RNAs (siRNAs) transfiziert. Bei dieser Methode werden kurze, etwa 20 bis 25 Basenpaar lange, doppelsträngige RNA-Moleküle, deren Sequenz komplementär zur Sequenz der messenger RNA (mRNA) des Zielgens ist, in die Zelle eingebracht. Damit die RNA-Moleküle die Zellmembran passieren können, werden sie durch Zugabe eines Transfektionsreagens, in dieser Arbeit wurde HiPerfect verwendet, in eine Lipidhülle verpackt, die sich an die Zellmembran anlagert und die Endozytose der verpackten siRNA ermöglicht. Innerhalb der Zelle fungiert die eingeschleuste siRNA als Marker für die mRNA des Zielgens und führt zu deren enzymatischem Abbau. Dadurch wird die Translation des Gens in ein Peptid oder Protein verhindert und somit die Funktion des Gens vermindert bzw. komplett ausgeschaltet. Die Induktion eines Knockdowns durch small hairpin RNAs (shRNA) läuft nach einem ähnlichen Prinzip ab. Ein Unterschied besteht darin, dass im Fall eines Knockdowns durch shRNAs, die in der Zelle als Marker für den Abbau der Ziel-mRNA dienen, diese selbst von der Zelle gebildet werden. Diese Variante hat den Vorteil, dass ein permanenter Knockdown eines Gens in einer Zelle erzielt werden bzw. ein Knockdown in einer Zelle induziert werden kann, ohne die Notwendigkeit eine Transfektion mit siRNAs durchführen zu müssen. Damit die Zelle in der Lage ist die shRNA eigenständig zu bilden, ist es notwendig die Sequenz der Marker-RNA, in diesem Fall eine shRNA, als DNA-Sequenz in das Genom der Zelle zu integrieren. Ein einfacher Weg dieses Ziel zu erreichen, ist eine Einschleusung der DNA-Sequenz in Form eines Vektors mittels eines Virus, eine sogenannte Transduktion. Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch lentivirale Transduktion Zellen in folgender Weise verändert: Es wurden shRNAs gegen die Gene *CALCB* und *RAMP1* oder eine Kontroll-shRNA, welche gegen kein Gen gerichtet ist, in Form des Vektors Tet-pLKO-puro in die Ewing-Sarkomzellen A673 und RDES eingebracht. Dadurch wurden Zellen gene-

riert, die erst durch Zugabe von Doxycyclin zum Kulturmedium zur Expression der jeweiligen shRNA angeregt werden. Dieses System eröffnete einen flexiblen und kaum toxischen Weg, verschiedene Versuche unter Knockdown eines der beiden Gene durchzuführen.

Transfektion der Zellen mit siRNAs

Die Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten siRNAs sind in Tabelle 3.11 aufgeführt. Für die Transfektion der kultivierten Zellen mit siRNAs wurden die Zellen zu $1 \cdot 10^5$ bis $2 \cdot 10^5$ Zellen pro Vertiefung einer 6-well-Platte in 1,5 ml Kulturmedium bzw. zu $1 \cdot 10^3$ bis $3 \cdot 10^3$ Zellen pro Vertiefung einer 12-well-Platte in 0,6 ml Kulturmedium ausgesät. Danach wurden für eine Transfektion mit einer finalen Konzentration von 25 nM siRNA pro Vertiefung 3,62 μ l bzw. 1,47 μ l des 20 μ M siRNA-Grundstocks in 345 μ l bzw. 140 μ l serum- und antibiotikafreies RPMI Medium gegeben und gemeinsam mit 7,25 μ l bzw. 2,93 μ l HiPerfect für 12 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubation wurde das Gemisch mehrmals invertiert, um eine optimale Durchmischung der verschiedenen Bestandteile zu gewährleisten. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 320 μ l bzw. 130 μ l des Transfektionsgemisches durch kreisförmiges Tropfen auf die ausplattierten Zellen gegeben. Spätestens 4 Stunden nach Zugabe des Transfektionsgemisches zu den Zellen wurde, sofern diese schon adhärent waren, ein Medienwechsel durchgeführt oder, sofern noch nicht adhärent, das Kulturmedium auf den Zellen auf das Maximalvolumen mit Kulturmedium aufgefüllt und einen Tag später ein Medienwechsel durchgeführt, um dem zytotoxischen Effekt von HiPerfect entgegen zu wirken. Je nachdem, für welchen Zeitraum die Genexpression des Zielgens vermindert werden sollte, wurden die Zellen in einem minimalen Abstand von 48 Stunden mehrere Male in Folge mit der gleichen siRNA transfiziert. Bei jedem Versuch, bei dem eine Transfektion durchgeführt wurde, wurde auch eine negativ Kontrolle unter Verwendung der Kontroll-siRNA, welche gegen kein bestimmtes Gen gerichtet ist, eingeschlossen.

Herstellung von Lentiviren und Transduktion der Zielzellen

Auf die Klonierung der shRNAs in das induzierbare Vektor-System (Tet-pLKO-puro) wird unter Abschnitt 3.2.12 genauer eingegangen. Die Sequenzen der in den folgenden Versuchen verwendeten shRNAs sind in Tabelle 3.12 aufgeführt. Die im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte zur Herstellung der Lentiviren wurden unter erhöhten Sicherheitsvorkehrungen gemäß den Vorgaben zur Arbeit der Sicherheitsstufe 2 für den Laborbereich durchgeführt.

Für die Produktion von Viren wurde die Zelllinie Hek-293T verwendet. Diese Zelllinie, die von humanen embryonalen Nierenzellen abstammt, eignet sich hervorragend zur Transfektion, da sie sehr problemlos Fremd-DNA und -RNA aufnimmt und äußerst resistent gegenüber toxischem Stress ist. Eine Transfektion ist bei der Erstellung von Viren notwendig, da man die Information für den Aufbau des Virus

und für den Inhalt in eine Zelle einbringen muss, damit diese schließlich die für das Virus benötigten Proteine bilden kann und die Information, die sich im Virus befinden soll, verpacken kann. Die Hek-293T Zellen wurden zu diesem Zweck zu $2 \cdot 10^6$ Zellen pro T75-Flasche in 10 ml Kulturmedium ausgesät und am Folgetag, bei einer Konfluenz von ca. 30 %, mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine[®] LTX Reagent with PLUS[™] Reagent transfiziert. Für die Transfektion wurden 3 µg des für die Virushülle benötigten Plasmids pMD2.G, das für das Glykoprotein des Vesicular stomatitis Virus (VSV-G) kodiert, 10 µg des Plasmids pCMV-dR8.91, das für die Verpackung des Virus notwendig ist, und 10 µg des Plasmids, das die Information, die durch das Virus übertragen werden soll, in diesem Fall den Tet-pLKO-puro Vektor inklusive shRNA, enthält, in 4600 µl Opti-MEM gelöst. Nach der Zugabe von 46 µl Plus Reagent wurde das Gemisch durch Invertieren vermischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 60 µl Lipofectamine[®] LTX hinzugefügt und nach erneuter Durchmischung mittels Invertieren für weitere 25 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit und erneutem Invertieren wurde das komplette Transfektionsgemisch auf die Zellen gegeben. Ein Medienwechsel wurde nach 4 Stunden mit 10 ml Kulturmedium durchgeführt. Am Folgetag, etwa 12 Stunden nach der Transfektion, wurde ein erneuter Medienwechsel vorgenommen, diesmal unter Zugabe von 5 ml Kulturmedium mit einem erhöhten FBS-Gehalt von 30 %, welches die Zellen zur Proliferation anregt und dadurch eine effizientere Virusproduktion zur Folge hat. Wiederum etwa 36 Stunden später konnten die Viren, die von den Zellen produziert wurden und in das Kulturmedium abgegeben wurden, geerntet werden, indem der komplette Medienüberstand von den Zellen abgenommen wurde. Der Überstand wurde im nächsten Schritt durch einen 0,45 µm Rotilabo[®]-Spritzenfilter filtriert, damit bei der Zugabe der Viren zu den Zelllinien, in die die shRNA integriert werden sollte, kein Transfer von Zellen der Zelllinie Hek-293T stattfand. Das Virusfiltrat wurde daraufhin entweder direkt weiterverwendet, für wenige Tage bei 4 °C gelagert oder für eine Lagerung für mehrere Wochen bis Monate bei -80 °C eingefroren.

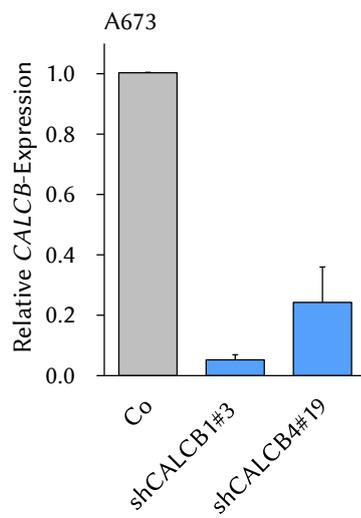
Die Transduktion der Zielzellen, welche schlussendlich die Sequenz für eine bestimmte shRNA in ihr Genom integrieren sollte, erfolgte folgendermaßen: Die Zellen wurden zu $5 \cdot 10^5$ Zellen in T25-Kulturflasche in 1,5 ml Kulturmedium ausgesät. Etwa 24 Stunden nach dem Aussäen wurden 500 µl des Virusfiltrats auf die Zellen gegeben und diese für 48 bis 72 Stunden damit inkubiert. Dann wurde ein Medienwechsel durchgeführt, bei dem zweimalig mit PBS gewaschen wurde, um die Zellen von allen Viren zu befreien. Da der Tet-pLKO-puro-Vektor den Zellen eine Resistenz gegenüber dem Protein-Biosynthese-Hemmer Puromycin verleiht, wurden die Zellen, welche den Vektor aufgenommen hatten, durch Zugabe von 1,5 µg/ml Puromycin zu den frischen 4 ml Kulturmedium selektiert. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz weitergezüchtet. Sobald sie konfluent waren, wurden sie in eine größere Kulturflasche überführt und dann weiter kultiviert, bis genügend Zellen gewachsen waren, um einen Grundstock einzufrieren.

Selektion Tet-pLKO-puro-transduzierter Zellen

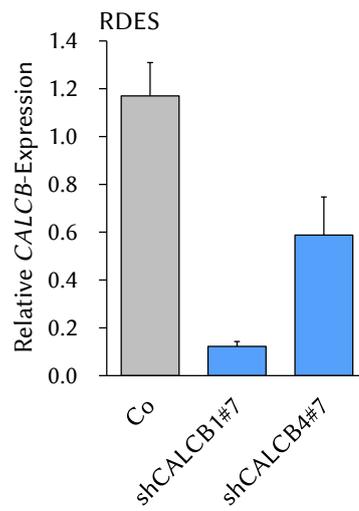
Bei der Transduktion der Zellen mit Viren, die eine gewünschte shRNA in Form des Tet-pLKO-puro-Vektors in die Zelle einbringen, kann es zu Unterschieden in der Menge des aufgenommenen Virus in einzelne Zellen kommen und dadurch einerseits die Stärke des induzierten Knockdowns beeinflusst werden, andererseits das Wachstumsverhalten der Zellen verändert werden. Daher wurde zunächst durch Induktion eines Knockdowns in einer Probe von Zellen des Grundstocks durch Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin das Level des Knockdowns aus dem Grundstock mittels qRT-PCR überprüft. Dazu wurden einige Tage Abstand zur vorherigen Selektion mit Puromycin eingehalten, um eine Verfälschung der Genexpression zu vermeiden. Außerdem wurde das Wachstumsverhalten der Zellen beobachtet und mit Wildtyp-Zellen verglichen.

Bei den Zelllinien A673/TR/shRAMP1_3 und A673/TR/shRAMP1_4, welche jeweils eine induzierbare shRNA gegen *RAMP1* enthalten, war bereits im Test des Grundstocks ein ausreichend guter Knockdown vorhanden und das Zellwachstum nicht verändert, sodass diese direkt für Versuche verwendet werden konnten. Alle anderen im Rahmen dieser Arbeit generierten Zelllinien mit induzierbarer shRNA wurden in Form von Einzelkolonien selektiert. Dazu wurden die Zellen in einer sehr geringen Dichte von $1 \cdot 10^3$ Zellen pro 10 cm Gewebekulturschale ausgesät und weiter mit 1,5 µg/ml Puromycin behandelt. Sobald am Boden der Gewebekulturschale mit bloßem Auge einzelne Kolonien sichtbar wurden, wurden jeweils 24 verschiedene Kolonien durch Trypsinieren mit 2 µl Trypsin in Vertiefungen von 12-well-Platten überführt und dort bis zur Konfluenz in 1 ml Kulturmedium weitergezüchtet. Anschließend wurden diejenigen Zellklone, welche phänotypisch ein unauffälliges Wachstum aufwiesen, in 6-well-Platten überführt. Sobald die Zellen in diesen Platten bereit zum Splitten waren, wurde ein Teil der Zellen in je zwei Vertiefungen einer 6-well-Platte überführt, wo durch Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin zum Kulturmedium von einer Vertiefung für 48 Stunden ein Knockdown induziert wurde, welcher anschließend mittels qRT-PCR quantifiziert wurde. Die restlichen Zellen wurden in T25-Kulturflaschen weitergezüchtet.

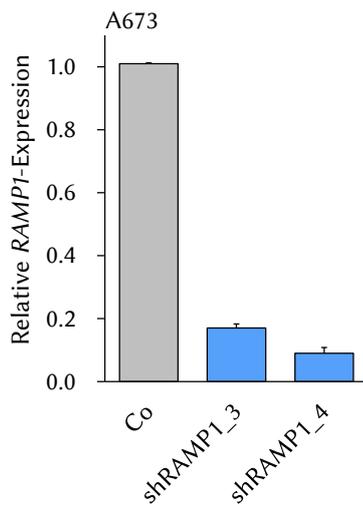
Mit diesem Verfahren wurden Zellklone selektiert, welche den besten Knockdown aufwiesen und zugleich ein unauffälliges Wachstumsverhalten an den Tag legten. Der in den Zellen durch Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin für mindestens 48 Stunden erzielte Knockdown ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Bei den Zellen, in welche eine Kontroll-shRNA eingeschleust worden war, wurde die Expression der Gene *CALCB*, *EWSR1-FLI1* und *RAMP1* getestet und diejenigen Zellen weiterverwendet, welche nach Zugabe von Doxycyclin keine ausschlaggebenden Veränderungen der Expression dieser Gene bzw. des Wachstumsverhaltens aufwiesen. Im Intervall wurden alle generierten Zelllinien gelegentlich nochmals mit 1,5 µg/ml Puromycin selektiert, um die Stärke des Knockdowns zu konservieren.



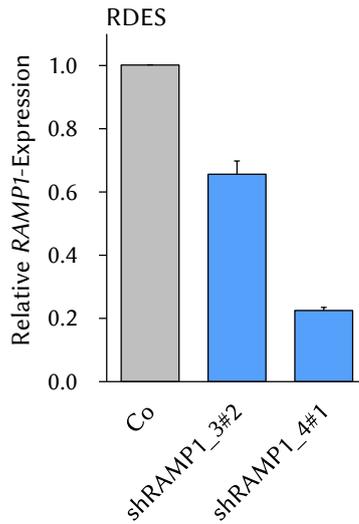
(a) $n = 7$ bzw. 5



(b) $n = 2$ bzw. 4



(c) $n = 5$



(d) $n = 3$

Abbildung 3.1 Knockdown-Level der im Rahmen dieses Projekts erstellten Zelllinien mit Doxycyclin-induzierbarer shRNA gegen *CALCB* oder *RAMP1* nach Behandlung mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin für 48 Stunden, gemessen mittels qRT-PCR.

Behandlung mit Plasmocure

Zellen, welche für länger andauernde oder aufwändige Versuche verwendet werden sollten, wurden im Intervall zwischen verschiedenen Experimenten gelegentlich prophylaktische mit niedrigdosiertem Plasmocure behandelt, um eine Infektion mit Mykoplasmen zu Beginn des Versuchs sicher ausschließen zu können. Die Behandlung wurde jeweils mindestens 48 Stunden vor Beginn eines Experiments mit diesen Zellen beendet, um eine Beeinflussung des Versuchs durch die Prophylaxe auszuschließen. Falls eine Infektion vorlag, wurden die Zellen entweder verworfen und nicht für Versuche verwendet oder für ca. 7 Tage mit Plasmocure behandelt, bis keine Infektion mehr nachgewiesen werden konnte.

3.2.4 DNA-Extraktion mittels NucleoSpin® Tissue

Zur Gewinnung von DNA aus kultivierten Zellen wurden diese bis zu einer Konfluenz von etwa 80 % in T75-Kulturflaschen in Standard Kulturmedium kultiviert. Adhärent wachsende Zellen wurden wie beim Splitten der Zellen unter Verwendung von PBS und Trypsin vom Kultivierungsbehältnis abgelöst und bei 1 200 rpm in einer Megafuge 8R Zentrifuge für 4 min zentrifugiert, um die Zellen in Form eines Pellets zu sammeln. Nicht adhärente Zellen wurden direkt in ein Zentrifugationsbehältnis überführt und wie beschrieben zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurde das Zellpellet gemäß Herstellerangaben in 200 µl T1 Puffer resuspendiert und entweder umgehend zur DNA-Extraktion weiterverwendet oder bei späterer Weiterverwendung bis zur Durchführung der DNA-Extraktion für wenige Tage bei –20 °C eingefroren.

Die DNA-Extraktion erfolgte gemäß Herstellerangaben des NucleoSpin® Tissue Systems. Die Konzentration und Qualität der extrahierten DNA wurde mittels NanoDrop bestimmt. Die Lagerung der DNA erfolgte bei –20 °C.

3.2.5 Analyse der Genexpression durch qRT-PCR

RNA-Extraktion mittels NucleoSpin® RNA

Das NucleoSpin® RNA System wurde zur Gewinnung von RNA aus kultivierten Zellen und aus Tumoren der Xenotransplantationsversuche verwendet, um die Expression bestimmter Gene im jeweiligen Gewebe mittels qRT-PCR zu bestimmen oder die RNA für eine RNA-Sequenzierung zu verwenden.

Bei Verwendung kultivierter Zellen wurden diese entweder bis zu einer Konfluenz von etwa 80 % in T75-Kulturflaschen kultiviert und dann zur Weiterverwendung gewonnen oder direkt nach Beendigung eines Versuches gesammelt. Adhärent wachsende Zellen wurden dazu wie beim Splitten der Zellen unter Verwendung von PBS und Trypsin vom Kultivierungsbehältnis abgelöst und bei 1 200 rpm in einer Megafuge 8R Zentrifuge für 4 min zentrifugiert, um die Zellen in Form eines

Pellets zu sammeln. Nicht adhärente Zellen wurden direkt in ein Zentrifugationsbehältnis überführt und wie beschrieben zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurde das Zellpellet gemäß Herstellerangaben in 350 µl RA1-Puffer des NucleoSpin® RNA Systems resuspendiert, wobei die Zellsuspension mehrmals kräftig in die Pipettenspitze ein- und ausgesogen wurde, um die Zellen zu lysieren.

Bei Verwendung von Gewebe aus den Xenotransplantationsversuchen wurde dieses, wie im entsprechenden Kapitel beschrieben, aufbereitet. Bei der RNA-Extraktion selbst wurde zusätzlich ein Homogenisierungsschritt des Gewebes mitaufgenommen, um das Gewebe zu zerkleinern und damit ein Verstopfen der Filter bzw. eine eingeschränkte RNA-Ausbeute zu verhindern. Dafür wurde ein Mikro-Homogenisator nach Potter-Elvehjem verwendet.

Zur umgehenden RNA-Extraktion wurden die Zelllysate auf Eis gelagert oder bei späterer Weiterverwendung bis zur Durchführung der RNA-Extraktion für wenige Tage bei -20°C eingefroren. Die Extraktion der RNA erfolgte gemäß Herstellerangaben des NucleoSpin® RNA-Extraktionskits. Dabei wurde besonders darauf geachtet sowohl die Zelllysate als auch die am Ende gewonnene RNA möglichst kontinuierlich auf Eis zu lagern und die zur Extraktion verwendete Mikrozentrifuge auf 4°C gekühlt, um einem Verlust von RNA durch RNase-Abbau vorzubeugen. Nach Durchführung der Extraktionsschritte wurde die RNA in RNase-freiem Wasser eluiert, wobei bei Verwendung einer geringen Anzahl von Zellen ein geringeres Wasservolumen gewählt wurde, um vergleichbare RNA-Konzentrationen zu gewährleisten. Die RNA-Konzentration und Qualität wurde mittels NanoDrop bestimmt. Die gewonnene RNA wurde bei -80°C gelagert.

Komplementäre-DNA (cDNA)-Synthese aus RNA

Um die Genexpression mittels qRT-PCR bestimmen zu können, ist es notwendig die gewonnene RNA aus Zelllysaten in DNA zu transkribieren. Dies erfolgte als reverse Transkription unter Verwendung des High Capacity cDNA Reverse Transcription Systems, gemäß Herstellerangaben. Für die Reaktion wurde nach Möglichkeit jeweils 1 µg RNA eingesetzt. Wurde bei der RNA-Extraktion lediglich ein Eluat mit sehr geringer RNA-Konzentration erzielt, konnte aufgrund des feststehenden maximalen Reaktionsvolumens von 20 µl nicht immer der Einsatz von 1 µg RNA in der Reaktion gewährleistet werden, sodass in diesem Fall die maximal mögliche RNA Menge unter Einhaltung des maximalen Reaktionsvolumens eingesetzt wurde. Die reverse Transkription erfolgte in einem Mastercycler™ PRO PCR Cycler nach folgendem Protokoll: 25°C für 10 min, gefolgt von 37°C für 120 min und 85°C für 5 min. Danach wurde die fertige cDNA auf 4°C gekühlt. Die Lagerung der gewonnenen cDNA erfolgte bei -20°C .

Real time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Die Analyse der Genexpression aus Zelllysaten wurde nach RNA-Extraktion und cDNA-Synthese mittels real time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) durchgeführt. Diese erfolgte unter Verwendung des SYBR® Select Master Mix auf einem CFX Connect Real time PCR Gerät. Eingesetzt wurde ein Ansatz mit einem Volumen von 15 µl, unter Verwendung von PCR-Primern für das entsprechende Gen in einer Konzentration von 0,5 µM. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 3.13 aufgeführt. Alle Primer wurden vor ihrer Verwendung für die folgenden Analysen auf ihre Güte getestet: Zum Ausschluss von unspezifischen Amplifikationen wurde zum einen am Ende der PCR-Reaktion eine Schmelzkurve durchgeführt, welche durch eine DNA-Dissoziation bei einer bestimmten Temperatur anzeigt, dass es sich bei der Länge und der Basenzusammensetzung des Amplikons um ein einheitliches DNA-Fragment handelt. Zum anderen wurde das PCR-Produkt in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgespalten und dadurch sichergestellt, dass in der PCR-Reaktion ein einzelnes Amplikon entstanden ist, dessen Länge dem zu erwartenden Amplikon entspricht. RPLP0 wurde bei den Analysen als sogenanntes *housekeeping gene* verwendet, welches aufgrund seiner stabilen Expression zur Normalisierung der Daten dient. Die verwendete cDNA wurde in einem Verhältnis von 1:9 (cDNA:Wasser) verdünnt. Die PCR-Reaktion erfolgte nach dem in Tabelle 3.23 aufgeführten Protokoll.

Tabelle 3.23 Temperaturprotokoll der qRT-PCR-Reaktion.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Wdh.
1: Enzymaktivierung	95 °C	2 min	
2: DNA-Denaturierung	95 °C	10 s	×49
3: Primer-Bindung und DNA-Synthese	60 °C	20 s	
Messung der Lumineszenz von SYBR, dann zurück zu Schritt 2			
4: Schmelzkurve (0,5 °C Schritte)	55 °C bis 95 °C	jeweils 10 s	

Die Expressionshöhe der untersuchten Gene wurde anschließend mit der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Methode [50] berechnet.

3.2.6 Proliferationsversuch

Für die Durchführung von Proliferationsversuchen wurden $1 \cdot 10^5$ bis $5 \cdot 10^5$ A673 oder RDES Zellen pro Vertiefung einer 6-well-Platte in 1,5 ml Kulturmedium ausgesät. Je nach Versuch wurde die Expression von *CALCB* entweder in Wildtypzellen durch eine wiederholte Transfektion der Zellen mit siRNAs gegen *CALCB* alle 48 Stunden herunterreguliert. Dabei diente die Transfektion mit einer unspezifischen siRNA als Kontrolle. Alternativ wurde die Expression von *CALCB* unter

Verwendung von genetisch veränderten Zelllinien, welche eine Doxycyclin-induzierbare shRNA gegen *CALCB* enthalten, durch Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin herunterreguliert. Dabei dienten Zellen ohne Doxycyclin Behandlung als Kontrolle. Die Zugabe von Doxycyclin erfolgte alle 48 bis 72 Stunden. Die Auswertung des Versuches erfolgte im Kurzzeitversuch 72 Stunden nach dem Aussäen der Zellen, im Langzeitversuch 6 bis 9 Tage nach dem Aussäen. Dazu wurde das Kulturmedium, in welchem die Zellen zuletzt gewachsen waren, aufgefangen, die Zellen nach Ablösen von der Kulturplatte mit Hilfe von Trypsin hinzugefügt und aus der Zellsuspension nach Verdünnung mit Trypan Blue solution im Verhältnis 9:1 (Trypan Blue solution: Zellsuspension) die Zahl der lebenden und toten Zellen in einer Zählkammer (C-Chip) ermittelt. Dies erfolgte in Triplikaten. Bei der Auswertung wurde insbesondere darauf geachtet, dass die Zellsuspensionen ein identisches Volumen enthielten und beim Ablösen der Zellen möglichst in jeder Schale die Zellen mit den gleichen Bewegungen und der gleichen Sorgfalt abgelöst wurden, um etwaige Fehlerquellen der Analyse zu vermeiden. Der Mittelwert der in Triplikaten erhobenen Gesamtzellzahl, bestehend jeweils aus lebenden und toten Zellen einer Kondition, wurde in Relation zur Gesamtzellzahl der Kontrolle gesetzt. Der Prozentsatz an lebenden und toten Zellen einer Kondition wurde entsprechend auf die relative Gesamtzellzahl bezogen. Nach Analyse der Zellzahl wurden die Zellen für die RNA-Extraktion vorbereitet und durch eine qRT-PCR der angestrebte *CALCB*-Knockdown nachgewiesen.

3.2.7 Koloniebildungsversuch

Zur Untersuchung der Zellverband unabhängigen Wachstumskapazität wurden Zellen in einer Konzentration von $1 \cdot 10^2$ bis $1 \cdot 10^3$ Zellen pro Vertiefung einer 12-well-Platte in 1 ml Medium in Triplikaten ausgesät und für 12 bis 14 Tage kultiviert. Dabei wurden entweder Zellen verwendet, die eine Doxycyclin-induzierbare shRNA gegen *CALCB* oder *RAMP1* enthalten, und durch Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin eines der Gene herunterreguliert oder es wurden Wildtyp RDES Zellen verwendet, die wiederholt mit einer Kontroll-siRNA oder einer siRNA gegen *CALCB* transfiziert wurden. Zusätzlich wurde der Versuch mit beiden Zelllinien auch unter CGRP-Rezeptorinhibitor-Behandlung durchgeführt. Dabei diene eine Behandlung mit DMSO als Kontrolle. Das Kulturmedium wurde jeden zweiten Tag durch Zugabe von neuem Kulturmedium je nach Kulturbedingung mit oder ohne Doxycyclin-Zusatz aufgefrischt und bei einem Medienwechsel darauf geachtet, möglichst vorsichtig zu arbeiten, um ein Ablösen der Zellen vom Boden der Platte zu vermeiden.

Unter Inhibitor-Konditionen wurde 48 Stunden nach dem Aussäen der Zellen entweder BIBN-4096 (Olcegepant) in einer finalen Konzentration von 100 µM oder MK-3207 in einer finalen Konzentration von 20 µM hinzugefügt, welche in DMSO gelöst sind. Als Kontrolle wurden die entsprechenden Konzentrationen von DMSO alleine verwendet. Nach 12 bis 14 Tagen wurde das Kulturmedium abgenommen, die Platten zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen und die Kolonien schließlich mit

500 µl Kristallviolett gefärbt. Dazu wurden sie für 1 Stunde mit der Lösung inkubiert und anschließend durch 3 bis 4-maliges, vorsichtiges Waschen mit bidestilliertem Wasser von Kristallviolett-Lösungsüberschüssen befreit. Danach wurden die Platten luftgetrocknet und eingescannt. Die Quantifizierung der Kolonien erfolgte mit dem Programm ImageJ. Die mittlere Koloniezahl der Triplikate der einzelnen Konditionen wurde auf die mittlere Koloniezahl der jeweiligen Kontrolle bezogen.

3.2.8 Dreidimensionale Wachstumskapazität *in vitro*

Um Unterschiede im dreidimensionalen Wachstum von A673 und RDES Ewing-Sarkomzellen mit oder ohne Knockdown der Gene *CALCB* oder *RAMP1* bzw. den Einfluss von CGRP-Rezeptorinhibitoren auf das Oberflächen-unabhängige Wachstum der Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen in einer Konzentration von $1 \cdot 10^3$ Zellen in 80 µl Kulturmedium pro Vertiefung einer 96-well-Platte ausgesät, bei der die Zellen nicht an den Untergrund binden können (sogenannte *ultra-low attachment 96-well plate*). Es wurden dabei Zellen mit induzierbarer shRNA gegen eines der beiden Gene benutzt und ein Knockdown durch Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin induziert. Dieses wurde durch Zugabe von 10 µl frischem Medium mit oder ohne Doxycyclin alle 48 Stunden erneuert.

Bei Versuchen mit CGRP-Rezeptorinhibitoren wurde 24 Stunden nach der Aussaat der Zellen 20 µl Kulturmedium, welches einen der beiden CGRP-Rezeptorinhibitoren enthielt, hinzugefügt, wodurch eine Inhibitorkonzentration von 100 µM BIBN-4096 oder von 20 µM MK-3207 erreicht wurde. Da beide Inhibitoren in DMSO gelöst waren, diente jeweils die entsprechende DMSO-Konzentration ohne Inhibitor als Kontrolle.

Der Versuch wurde nach 14 Tagen durch Anfertigung von Bildern der gewachsenen, in Suspension befindlichen Zellkonglomerate mit Hilfe eines Axiovert 25 Mikroskops mit Phasenkontrast und zugehöriger Kamera beendet und durch Ausmessen des größten Durchmessers der jeweiligen Zellkonglomerate ausgewertet. Hierzu wurde das Programm ImageJ verwendet. Der Durchmesser aller unter einer Kondition gewachsenen Zellkonglomerate wurde addiert und auf den Gesamtdurchmesser der jeweiligen Kontrolle bezogen.

3.2.9 Resazurin-CGRP-Rezeptorinhibitor-Versuch

Ein Resazurin-Versuch untersucht die Stoffwechselaktivität der Zellen. Dazu wurden entweder A673 Wildtyp Ewing-Sarkomzellen oder A673 Zellen mit einer induzierbaren *RAMP1*-shRNA verwendet und in einer Konzentration von $1,5 \cdot 10^3$ Zellen in 50 µl Kulturmedium pro Vertiefung einer Standard-96-well-Platte in Triplikaten ausgesät. Die Zellen mit der induzierbaren shRNA erhielten entweder 1 µg/ml Doxycyclin oder kein Doxycyclin. Nach 24 Stunden wurden weitere 50 µl Kulturmedium, angereichert mit dem in DMSO gelösten CGRP-Rezeptorinhibitor MK-3207 in verschiedenen Konzentrationen oder als Kontrolle die entsprechende

DMSO-Konzentration ohne Inhibitor, hinzugegeben. Nach Zugabe von 20 µl Resazurin (vorverdünnt im Verhältnis 1:9) 72 Stunden nach dem Aussäen der Zellen, wurden die Zellen für weitere 7 Stunden inkubiert und schließlich die Fluoreszenz der Zellen, die einen Rückschluss auf die Zell-Viabilität gibt, mit einem Multimode Reader bestimmt. Die mittlere Fluoreszenz der Triplikate wurde auf die der jeweiligen Kontrolle bezogen.

3.2.10 Luciferase-Versuch

Für diesen Versuch wurde ein 359 Basenpaar großes DNA-Fragment, welches den *CALCB*-assoziierten GGAA-Mikrosatelliten enthält, in den pGL3-Enhancer-Vektor kloniert, welcher dazu dient, die Enhancer-Aktivität eines DNA-Fragmentes zu testen. Die einzelnen Schritte der Klonierung sind unter Abschnitt 3.2.12 beschrieben. Im hier folgenden Abschnitt wird genauer auf die Versuchsbedingungen mit dem klonierten Vektor eingegangen.

Zunächst wurden $2 \cdot 10^5$ A673 Ewing-Sarkomzellen mit Doxycyclin-induzierbarer shRNA gegen das Fusionsonkogen *EWSR1-FLI1* in 1,8 ml Kulturmedium pro Vertiefung einer 6-well-Platte ausgesät. Danach wurden die Zellen mittels Lipofectamine® LTX Reagent with PLUS™ Reagent mit dem den Mikrosatelliten enthaltenden pGL3-Enhancer-Vektor und einem pRL Renilla Luciferase Control Reporter-Vektor in einem Verhältnis von 99:1 gemäß Herstellerangaben transfiziert. Nach 4 Stunden wurde das Transfektionsmedium entfernt, um einer zu starken Toxizität der Reagenzien auf die Zellen entgegenzuwirken. Zugleich wurde durch Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin zum Kulturmedium eines Teiles der Zellen ein *EWSR1-FLI1*-Knockdown eingeleitet. Das Kulturmedium wurde 72 Stunden nach dem Aussäen von den Zellen entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und durch Zugabe von Lysis Buffer lysiert. Danach wurde mittels des Orion II Microplate Luminometers und der Reagenzien Beetle-Juice (Firefly) und Renilla-Juice die Enhancer-Aktivität des GGAA-Mikrosatelliten in undurchsichtigen, weißen 96-well-Platten analysiert. Durch das verwendete Luminometer wurde dabei in zwei aufeinanderfolgenden Schritten das Firefly-Luciferase-Substrat und das Renilla-Luciferase-Substrat zu den Zellen hinzugefügt und jeweils die Luciferase-Aktivität gemessen. Dadurch war es möglich die Firefly-Luciferase Aktivität auf die Renilla-Luciferase-Aktivität zu normalisieren, was eine Vergleichbarkeit der Versuche gewährleistet.

3.2.11 Massenspektrometrie

Eine Massenspektrometrie des Kulturmediums, in dem Ewing-Sarkomzellen gewachsen waren, wurde durchgeführt, um zu untersuchen, ob Ewing-Sarkomzellen das gebildete Protein *CALCB* sezernieren. Dazu wurden $4 \cdot 10^6$ A673 Zellen in 20 ml Standardkulturmedium in T150-Kulturflaschen ausgesät und nach 48 Stunden das Kulturmedium entfernt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und daraufhin in 20 ml reinem Opti-MEM kultiviert. Dieser Schritt war notwendig, um

auszuschließen, dass der Versuch durch im Standardkulturmedium enthaltene bovine Proteine verfälscht wird. Nach weiteren 24 Stunden wurde das Opti-MEM von den Zellen entfernt und bei -80°C eingefroren. Die Massenspektrometrie wurde freundlicherweise von Herrn Horacio Bach, PhD an der *Division of Infectious Diseases, and IIRC Antibody Engineering and Proteomics facility* des *Department of Medicine, University of British Columbia* (Vancouver, BC, Kanada) durchgeführt. Daher wurden die Proben auf Trockeneis nach Kanada geschickt. Dort wurden grob folgende Schritte durchgeführt: Die Proben wurden gefriergetrocknet und in Ammoniumbikarbonat gelöst. Nach Reduktion, Alkylierung, Trypsin-Verdau und Auftrennung der Peptide mittels Nano-HPLC wurden die Peptide auf eine 384-well-Platte aufgetragen und mit α -Cyano-4-hydroxymethylsäure versetzt. Ein MALDI-TOF/TOF 4800 (Sciex) System wurde zur Analyse im Positiv-Modus verwendet. Als Standard wurde ein künstlich synthetisiertes CALCB-Peptid (Peptides & Elephants, Henningsdorf, Deutschland) verwendet, welches dazu diente das Peptidprofil von CALCB zu erkennen und durch welches der Peptidteil der Aminosäuren 106 bis 116 von CALCB, mit der Aminosäuresequenz SNFVPTNVGSK (m/z 1149.5898, monoisotopic), als Erkennungsmarker für CALCB identifiziert wurde. Analysiert wurden die Daten mit Hilfe der *Trans-Proteomic Pipeline* (Seattle Proteome Center, WA, USA).

3.2.12 Klonierungsarbeiten

Bevor im Folgenden eine Beschreibung der durchgeführten Plasmid-Klonierungen erfolgt, wird auf die Vorgehensweise bei der Agarose-Gelelektrophorese als eine der zentralen Methoden der Klonierungsarbeiten eingegangen. Des Weiteren soll an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass während der einzelnen Klonierungsschritte konsequent jeweils Negativ- und Positivkontrollen eingeschlossen worden sind, um nach jedem Schritt überprüfen zu können, ob die entsprechende Reaktion korrekt stattgefunden hat. Auf die Kontrollen wird im Folgenden nicht separat eingegangen.

Agarose-Gelelektrophorese

Mit einer Agarose-Gelelektrophorese ist es u. a. möglich ein Gemisch unterschiedlich langer DNA- oder RNA-Fragmente der Länge nach aufzuspalten. Diese Methode wurde im Rahmen des Projekts v. a. bei Klonierungsarbeiten eingesetzt. Sofern nicht anders angegeben, wurde mit 1 % Agarose-Gelen und dem Farbstoff Ethidiumbromid gearbeitet. Zur Herstellung eines 10-fach TAE-Elektrophoresepuffers wurden 48,4 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 11,4 ml Essigsäure und 3,7 g EDTA in 1 l bidestilliertem Wasser gelöst. Diese Lösung wurde zur Vorbereitung des Elektrophoresegels und der Elektrophoresekammern im Verhältnis 1:9 (TAE-Puffer: Wasser) mit bidestilliertem Wasser verdünnt. Für ein 1 % Agarose-Gel wurde 1 g Agarose in 100 ml 1-fach TAE-Puffer gegeben und die Suspension in einer Mikrowelle solange erhitzt, bis sich die Agarose vollständig im Puffer aufgelöst hatte.

Danach wurde die Agaroselösung wieder soweit abgekühlt, bis sie gerade noch flüssig war, 10 µl Ethidiumbromid hinzugefügt und die Agaroselösung langsam, um eine Blasenbildung innerhalb des Gels zu vermeiden, in eine mit Kämmen bestückte Gelkammer gegossen. Nach Verfestigung des Gels wurde die Gelkammer in die Elektrophoresekammer eingesetzt, die Taschen mit den Proben und einem Leiter bestückt und die Elektrophorese anhand der PowerPac-Stromquelle gestartet. Die Auftrennung der Fragmente wurde mit einem FluorChem Imaging System dargestellt und bei gewünschter Weiterverwendung einzelner DNA-Teile die entsprechenden Banden aus dem Gel auf einem Transilluminator ausgeschnitten. Das ausgeschnittene Gelfragment wurde danach entweder bei -20°C eingefroren oder die enthaltene DNA direkt mit dem NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up System gemäß Herstellerangaben extrahiert.

Tet-pLKO-puro-Vektor für induzierbare shRNA Expression

Zur Generierung von Zelllinien, in denen durch äußere Stimulation mittels Doxycyclin die Bildung einer shRNA im Inneren der Zelle angeregt werden kann, war es notwendig die gewünschte shRNA in den Tet-pLKO-puro-Vektor [77, 76] zu integrieren, was durch verschiedene Klonierungsschritte erreicht werden konnte. Neben verschiedenen Antibiotikaresistenzen (im Fall des Tet-pLKO-puro-Vektors gegen Puromycin und Ampicillin) enthält das verwendete Plasmid einen Promoter in Verbindung mit einem Tet-Element, welches auf Doxycyclin anspricht und zur Induktion der Expression der shRNA führt.

Verdau des Tet-pLKO-puro-Vektors In einem ersten Schritt wurde der sogenannte *Stuffer*, ein funktionsloses Stück DNA (1800 Basenpaare lang), an dessen Stelle die shRNA integriert werden sollte, aus dem Tet-pLKO-puro-Vektor herausgeschnitten, was auch als Verdau des Vektors bezeichnet wird. Dafür wurden die Restriktionsenzyme EcoRI und AgeI verwendet, welche den Vektor an den beiden flankierenden Regionen des Stuffers schneiden. Genauer wurden 4 µg DNA des Vektors mit 2 µl des Restriktionsenzym EcoRI HF (20 U), 1 µl des Restriktionsenzym AgeI HF (20 U) und 2 µl 10-fach Smart Cut Buffer in einem durch Nuklease-freies Wasser adjustierten Gesamtvolumen von 20 µl bei 37°C für 15 min inkubiert und darauffolgend die Reaktion durch 20-minütiges Erhitzen auf 65°C abgestoppt. Um die DNA des verdauten Vektors aus dieser Lösung zurückzugewinnen, wurde diese präzipitiert. Dazu wurden zum ersten Ansatz 20 µl einer 3 M Natriumacetat-Lösung (CH_3COONa) hinzugefügt und mit Nuklease-freiem Wasser auf 200 µl aufgefüllt. Zusätzlich wurden 440 µl 100 % Ethanol dazugegeben und das Gemisch für 45 min bei -80°C inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 30 min bei 4°C und 13000 rpm, der Überstand wurde verworfen und zum Präzipitat wurde zum Ausspülen von Reagenzienbestandteilen 70 % Ethanol hinzugegeben. Nach einem weiteren wie oben beschriebenen Zentrifugationsschritt, diesmal jedoch nur für 15 min, wurde der Überstand erneut verworfen und das sichtbare DNA-Pellet für 1 min bis

2 min bei 37 °C getrocknet. Danach wurde die präzipitierte DNA in 10 µl Nuklease-freiem Wasser gelöst und eine Gelelektrophorese mit einem 0,8 % Agarosegel zur Verifizierung des erfolgreichen Verdau des Vektors durchgeführt. Es war von einem erfolgreichen Verdau auszugehen, wenn sich in der Gelelektrophorese zwei Banden zeigten: eine bei 8834 Basenpaaren, entsprechend des Tet-pLKO-puro-Vektors ohne DNA des Stuffers, und eine weitere Bande bei 1800 Basenpaaren, entsprechend der Länge der DNA des Stuffers. Der geschnittene Vektor wurde entweder sofort weiterverwendet oder bei 20 °C für spätere Klonierungen gelagert.

Festlegung der shRNA-Sequenz Die 57 Nukleotide umfassenden DNA-Sequenzen der einzubringenden shRNAs wurden folgendermaßen festgelegt: Die Sequenzen für die shRNAs gegen *RAMP1* wurden anhand von Plasmiden, welche eine dauerhafte Expression von shRNAs gegen *RAMP1* verursachen, ausgewählt und bedurften keiner weiteren Veränderungen. Als Grundlage zur Generierung der shRNAs, die zum Knockdown des Gens *CALCB* verwendet wurden, dienten die Sequenzen der siRNAs, die in vorhergehenden Versuchen den besten Knockdown von *CALCB* hervorgerufen hatten. Die Sequenzen der siRNAs wurden folgendermaßen verändert: Die erste Base der 21 Nukleotide langen sogenannte *target-Sequenz* der siRNAs, die in Form von DNA angegeben wird, wurde je nach Art der Base mit der sie am 5'-Ende beginnt, verändert. Beginnt die Sequenz mit dem Nukleotid Cytosin (C) oder Guanin (G) wurde dieses mit Adenin (A) ersetzt, beginnt sie mit Adenin (A) oder Thymin (T) wurde diese durch Cytosin (C) ersetzt. Im nächsten Schritt wurde ein Überhang vor das erste Nukleotid am 5'-Ende mit der Sequenz 5'-CCGG-3' angefügt. An das 3'-Ende der target-Sequenz folgte die Nukleotid-Abfolge 5'-CTCGAG-3', die später für die Bildung einer Schleife (engl.: *hairpin turn*) benötigt wird. Als nächstes wurde die komplementäre und reverse Form der target-Sequenz gebildet und an die Abfolge für die Schleife angehängt. Den Abschluss des ersten shRNA Strangs, des sogenannten Top-Strands, bildete der Anhang 5'-TTTTT-3'. Die Nukleotidabfolge des zweiten shRNA-Strangs, des sogenannten Bottom-Strands, entspricht zum größten Teil der reversen und komplementären Form des Top-Strands. Einzige Ausnahmen hiervon sind, dass dem Bottom-Strand noch ein Überhang am 5'-Ende mit der Sequenz 5'-AATT-3' angehängt wurde und der Bottom-Strand mit der komplementären Base zum ersten Nukleotid der target-Sequenz des Top-Strands endet und somit der Überhang des Top-Strands nicht im Bottom-Strand enthalten ist. Eine schematische Darstellung des Aufbaus der shRNA ist beispielhaft in Abbildung 3.2 anhand der Sequenz von shCALCB4 dargestellt. Die vollständigen Sequenzen der shRNAs sind in Tabelle 3.12 angegeben und die Synthetisierung der shRNAs erfolgte durch die Firma Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland.

Einbringen der shRNA in den Tet-pLKO-puro-Vektor Die synthetisierten shRNA-Stränge wurden jeweils in einer Konzentration von 100 µM in Nuklease-freiem Wasser gelöst und 11,25 µl der Lösung des jeweiligen shRNA-Top-Strands

5'-Überhang	Target-Sequenz	Schleife	Target-Sequenz (revers und komplementär)	3'-Anhang
5'	-CCGGCAGGAATGAACTGAATGCAA	CTCGAG	TTGCATTTCAGTTTCATTCTG	TTTTT-3'
5'	-AATTAAAA	CAGGAATGAACTGAATGCAA	CTCGAG	TTGCATTTCAGTTTCATTCTG-3'

Abbildung 3.2 Schematische Darstellung der Sequenz einer shRNA: Die Zeilen 2 und 3 zeigen die Sequenz der shRNA shCALCB4 (Zeile 2: Top-Strand, Zeile 3: Bottom-Strand). Wichtige Bereiche der Sequenz sind farbig hervorgehoben. Die korrespondierende Beschriftung ist in der entsprechenden Farbe in der 1. Zeile dargestellt.

mit 11,25 µl der Lösung des jeweiligen shRNA-Bottom-Strands mit 2,5 µl eines 10-fach Annealing Puffers gemischt. Der 10-fach Annealing Puffer besteht aus 1 Molar Natriumchlorid-Lösung mit 100 mM Tris-HCl und ist auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Diese Gemisch wurde in einem PCR-Gerät zunächst für 1 min auf 95 °C erhitzt und anschließend in 1 °C Schritten auf 14 °C abgekühlt, woraufhin 1 µl der shRNA-Mischung mit 399 µl eines 0,5-fach Annealing Puffers verdünnt wurde. Anschließend fand die Ligation des linearisierten Vektors und der vorbereiteten shRNA über Nacht durch eine Inkubation bei 16 °C von ca. 20 ng des Vektors mit 1 µl der shRNA, 1 µl einer DNA-Ligase inklusive 1,5 µl eines dazugehörigen 10-fach Ligase-Puffers und so viel Nuklease-freiem Wasser, dass das Gesamtvolumen 15 µl betrug. Im Anschluss an die Ligation wurden SURE-2 Zellen mit 3 µl der Ligations-Lösung wie unter Abschnitt 3.2.13 beschrieben transformiert und über Nacht auf Ampicillin-Selektions-Agarplatten angezüchtet, auf welchen nur Bakterien überleben konnten, die einen vollständigen Tet-pLKO-puro-Vektor enthielten. Um zu kontrollieren, ob die Klonierung der shRNA in den Tet-pLKO-puro-Vektor erfolgreich war, wurde eine sogenannte *touchdown colony PCR* durchgeführt. Dafür wurden einzelne Klone der Agarplatten geerntet und in 100 µl Minikulturen für 1 Stunde angezüchtet. Unter Einsatz von 2 µl der einzelnen Minikulturen wurde mit dem Go Taq Hot Start Polymerase System und den beiden Primern TET-pLKO_F und TET-pLKO_R eine PCR durchgeführt. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 3.13 aufgeführt. Das Temperaturprotokoll ist in Tabelle 3.24 angegeben.

Das PCR-Produkt wurde anschließend mit einer 1,5 % Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Eine Bande bei 420 Basenpaaren zeigte dabei eine erfolgreiche Klonierung der shRNA an, eine Bande bei 2 230 Basenpaaren einen Verbleib des Stuffers im Vektor.

Korrekte Kandidaten wurden in einer größeren Bakterienkultur weitergezüchtet und wie unter Abschnitt 3.2.13 beschrieben mittels eines Plasmid Midiprep Systems das Plasmid aus den Zellen extrahiert. Die Korrektheit der shRNA-Sequenz im klonierten Plasmid wurde durch eine Sanger-Sequenzierung mit dem in Tabelle 3.13 angegebenen Sequenzierungsprimer bestätigt. Auf die lentivirale Transduktion des Plasmids in die Ewing-Sarkomzellen wird unter Abschnitt 3.2.3 genauer eingegan-

Tabelle 3.24 Temperaturprotokoll der touchdown colony PCR.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Wdh.
1: Enzymaktivierung	95 °C	10 min	
2: DNA-Denaturierung	98 °C	10 s	
3: Bindung der Primer an DNA	59 °C bis 49 °C (0,5 °C Abnahme pro Wdh.)	30 s	×19
4: DNA-Synthese	72 °C	1 min	
5: DNA-Denaturierung	98 °C	10 s	
6: Bindung der Primer an DNA	56 °C	30 s	×19
7: DNA-Synthese	72 °C	1 min	
Ende	72 °C	10 min	

gen.

pGL3-Enhancer-Vektor für Mikrosatelliten Untersuchung

Um die Aktivität des CALCB-assoziierten GGAA-Mikrosatelliten zu untersuchen, wurde ein 359 Basenpaare großes, den GGAA-Mikrosatelliten enthaltendes DNA-Fragment aus den Zelllinien TC-71 und MHH-ES1 in den pGL3-Enhancer-Vektor kloniert. Dazu wurde die DNA der Zellen wie unter Abschnitt 3.2.4 beschrieben mittels NucleoSpin® Tissue extrahiert und anschließend mit den beiden Restriktionsenzymen Eco-RV und SphI in Teilstücke zerschnitten. Im Vorfeld wurde sichergestellt, dass die beiden Restriktionsenzyme keine Schnittstelle innerhalb des gesuchten DNA-Fragments besitzen und ermittelt, wie groß das zu erwartende Teilstück sein würde, in dem sich das gesuchte DNA-Fragment befindet. Die zerschnittene DNA wurde daraufhin durch eine Agarose-Gelelektrophorese der Länge nach aufgetrennt. Die Bande, die sich bei 8 200 Basenpaaren gebildet hatte, wurde aus dem Gel ausgeschnitten und die enthaltene DNA mit Hilfe des NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Systems aufgereinigt. Danach wurde unter Einsatz von 100 ng der aufgereinigten DNA eine sogenannte *touchdown PCR* durchgeführt. Hierzu wurden sogenannte *Infusion-Primer* verwendet, welche neben der Sequenz für die Amplifikation des DNA-Fragments jeweils am 5'-Ende einen Überhang enthalten, bei welchem es sich um eine komplementäre Sequenz der Schnittstellen des pGL3-Enhancer-Vektors handelt. Diese Überhänge sind notwendig, um das DNA-Fragment in den linearisierten Vektor zu integrieren. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 3.13 unter Infusion-Primer aufgeführt. Die Konzentration der Primer betrug 0,5 µM. Zur Durchführung der PCR wurden das Go Taq Hot Start Polymerase System und das in Tabelle 3.25 angegebene Temperaturprotokoll verwendet.

Tabelle 3.25 Temperaturprotokoll der touchdown PCR.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Wdh.
1: Enzymaktivierung	95 °C	2 min	
2: DNA-Denaturierung	98 °C	10 s	
3: Bindung der Primer an DNA	59 °C bis 49 °C (0,5 °C Abnahme pro Wdh.)	30 s	×19
4: DNA-Synthese	72 °C	1 min	
Ende	72 °C	5 min	

Das dadurch generierte PCR-Produkt wurde wiederum durch eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und das gesuchte 359 Basenpaare umfassende DNA-Fragment mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up System aufgereinigt. Um das DNA-Fragment, welches den GGAA-Mikrosatelliten enthielt, schließlich in den pGL3-Enhancer-Vektor zu integrieren, wurde dieser zunächst entsprechend der Herstellerinformation mit Hilfe des Restriktionsenzym XhoI linearisiert und aufgereinigt. Unter Verwendung von 10 ng des linearisierten Vektors und 20 ng des DNA-Fragments wurden diese mit Hilfe des In-Fusion HD Cloning Systems bei 50 °C für 15 min inkubiert und dadurch zu einem Plasmid vereint. Die Reaktion wurde durch eine Lagerung auf Eis für 5 min beendet und das erhaltene Plasmid wie unter Abschnitt 3.2.13 beschrieben in Stellar™ Competent Cells transformiert. Die Bakterien wurden über Nacht auf Agarplatten, angereichert mit Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml, bei 37 °C angezchtet. Am Folgetag wurden einzelne Kolonien von der Agarplatte gepickt und für mehrere Stunden in flüssigem Kulturmedium inkubiert. Welche gepickten Klone das gewünschte DNA-Fragment, in dem in sie transformiertem Plasmid enthielten, und damit als positive Klone bezeichnet werden konnten, wurde durch eine sogenannte *touchdown colony PCR* festgestellt. Hierzu wurde unter Verwendung von 4 µl der Bakterienkultur, den Komponenten des Go Taq Hot Start Polymerase Systems und den CALCB-mSat-PCR-Primern (entsprechend Tabelle 3.13) eine PCR mit dem in Tabelle 3.25 genannten Temperaturprotokoll durchgeführt. Das erhaltene PCR-Produkt wurde wiederum durch eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und eine Bakterienkolonie als positiv gewertet, wenn sich eine Bande der Länge des gesuchten DNA-Fragments abzeichnete (359 Basenpaare). Positive Kolonien wurden in flüssigen Midiprep-Kulturen mit 100 µg/ml Ampicillin über Nacht bei 37 °C inkubiert und das Plasmid mit dem PureYield Plasmid Midiprep System 2 aufgereinigt. Als letzter Schritt wurde mittels Sanger-Sequenzierung die Korrektheit des in den pGL3-Enhancer Vektor integrierten DNA-Fragments sichergestellt.

Die Versuchsbedingungen der mit dem klonierten Plasmid durchgeführten Luciferase-Versuche sind unter Abschnitt 3.2.10 beschrieben.

3.2.13 Arbeit mit Bakterien

Die Arbeiten mit Bakterien erfolgten konsequent in der Umgebung eines laufenden Bunsenbrenners, um Kontaminationen der Bakterienkulturen zu vermeiden. Die Bakterien wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Das Auftauen erfolgte langsam auf Eis und es wurde darauf geachtet, Bakterien nicht öfter als zweimal aufzutauen. Wenn nicht anders angegeben, diente Ampicillin in einer Konzentration von $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ als Selektionsantibiotikum.

Kultivierungsbedingungen – solide Bakterienkultivierung

Die Herstellung der Agarplatten für die Bakterienkultivierung erfolgte mit LB Broth with agar (Lennox). Dazu wurde das Puder gemäß Herstellerangaben gelöst, für 15 min bei $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ autoklaviert, nach Abkühlung in noch flüssigem Zustand das gewünschte Selektionsantibiotikum hinzugefügt und unter der Reinraumwerkbank in Petrischalen gefüllt. Die erhärteten Agarplatten wurden bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für maximal 30 Tage gelagert.

Bakterienkulturen wurden mit Hilfe eines abgeflammtten Drigalskispatels gleichmäßig auf der Platte verteilt. Die Kultivierung erfolgte in einem Bakterienbrutschrank bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht.

Kultivierungsbedingungen – flüssige Bakterienkultivierung

Zur Herstellung flüssiger Nährmedien zur Bakterienkultivierung wurde LB Broth (Miller) verwendet. Gemäß Herstellerangaben wurden 25 g der vorbereiteten Mischung aus Trypton, Hefeextrakt und Natriumchlorid in 1 l Wasser gelöst. Diese Mischung wurde bei $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 15 min autoklaviert. Nach Abkühlen wurde die Mischung zur Anzucht von Bakterien für maximal 30 Tage verwendet, solange keine Zeichen einer Kontamination bestanden. Die Anzucht erfolgte über Nacht in Erlenmeyerkolben mit luftdurchlässigem Deckel, meist mit einem Kulturmediumvolumen von 200 ml. Verwendet wurde dafür ein CERTOMAT[®] IS Incubation-Shaker, der die Kulturen bei 140 rpm in Bewegung hielt und eine Umgebungstemperatur von $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ gewährleistete.

Transformation von Plasmiden in kompetente Zellen

Zur Transformation eines Plasmids in kompetente Zellen, wie Dh5 α oder Stellar[™] Competent Cells wurden $100\text{ }\mu\text{l}$ dieser Zellen in $1,5\text{ ml}$ Reaktionsgefäßen auf Eis aufgetaut, das Plasmid hinzugefügt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte für 30 s ein Hitzeschock bei $42\text{ }^{\circ}\text{C}$. Im Anschluss wurden die Bakterien für weitere 2 min auf Eis gelagert, mit $900\text{ }\mu\text{l}$ vorgewärmtem S.O.C. Medium aufgefüllt und für 3 Stunde bei 250 rpm bis 300 rpm bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Danach wurde ein Teil der Zellen auf Agarplatten oder in flüssiges Kulturmedium mit Selektionsantibiotikum überführt und über Nacht weiter inkubiert. Bei den kompetenten SURE-

2-Zellen wurde im Prinzip ebenfalls wie für Dh5 α oder StellarTM Competent Cells beschrieben vorgegangen. Einzig wurden sie vor Zugabe des Plasmids für 10 min mit 2 μ l 1,22 M β -Mercaptoethanol auf Eis inkubiert.

DNA-Extraktion aus Bakterien mit PureYieldTM Plasmid Midiprep System

Um das in die Bakterien transformierte Plasmid, welches durch diese während der Kultivierung in flüssigem Nährmedium vervielfältigt wurde, aus den Zellen zu gewinnen, wurde eine DNA-Extraktion mit dem PureYieldTM Plasmid Midiprep System durchgeführt. Dazu wurden die Bakterien zunächst in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 5 000 xg in einer 4K15 high-speed Zentrifuge für 10 min zentrifugiert. Der Überstand, über den am Boden des Zentrifugenröhrchens als Pellet gesammelten Bakterien, wurde abgenommen und die Extraktion der DNA nach Angaben des PureYieldTM Plasmid Midiprep Systems unter Verwendung eines Vac-Man[®] angeschlossen an eine WOB-L Press/Vac dry pump 2 durchgeführt. Die Konzentration der extrahierten DNA wurde mit einem NanoDrop 1000 Spectrophotometer bestimmt. Gelagert wurde die DNA bei $-20^{\circ}C$.

3.2.14 Xenotransplantationsmodell

Die im Folgenden beschriebenen Tierversuche an Mäusen wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt. Die Durchführung erfolgte gemäß der ARRIVE Leitlinien und der Empfehlungen der *European Community (86/609/EEC)* und *UKCC-CR (guidelines for the welfare and use of animals in cancer research)*. Alle Personen, die mit der Betreuung der Tierversuche betraut waren, hatten im Vorfeld mindestens das *Modul Versuchstierkunde des TransMIT-Projektbereiches für Versuchstierkunde* abgelegt oder ein umfangreicheres Zertifikat erworben.

Als Versuchstiere wurden ausschließlich männliche NOD scid gamma Mäuse (NSG, NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ) verwendet, welche eine starke Einschränkung des Immunsystems aufweisen und in denen daher das Wachstum artfremder Zellen, wie der hier verwendeten menschlichen Ewing-Sarkomzellen möglich ist. Aufgrund der starken Immunkompromittierung der Mäuse war es aber auch notwendig, die Tiere in einer keimarmen Umgebung zu halten. Dies wurde durch den Einsatz spezieller Luftfilteranlagen und durch die Nutzung einer Reinraumwerkbank bei Herausnahme der Versuchstiere aus dem Käfig gewährleistet.

Subkutane Injektion der Tumorzellen

Für die Xenotransplantationsversuche wurden ausschließlich A673 Ewing-Sarkomzellen verwendet, welche über eine Doxycyclin-induzierbare shRNA verfügen. Als Kontrolle wurden Zellen mit einer ungerichteten shRNA verwendet. Untersucht wurde zum einen der Effekt eines shRNA-vermittelten Knockdowns von *EWSR1-FLI1* auf die Expressionshöhe von *CALCB*, zum anderen ein Knockdown von *CALCB* oder

RAMP1 auf das Wachstum der Tumoren. Die Zellen wurden 2 bis 3 Wochen vor Injektion in die Versuchstiere in T150-Zellkulturflaschen ausgesät, zu Beginn für wenige Tage prophylaktisch mit einer Erhaltungsdosis Plasmocure behandelt, unter Standardbedingungen kultiviert und am Tag der Injektion von den Zellkulturflaschen abgelöst und in PBS resuspendiert. Den Versuchstieren wurden $5 \cdot 10^6$ A673 Zellen mit induzierbarer shRNA gegen *EWSR1-FLI1* oder $2,5 \cdot 10^6$ Zellen mit induzierbarer shRNA gegen *CALCB* oder *RAMP1* jeweils gelöst in 200 μ l PBS subkutan in die Flanke injiziert.

Versuchsbedingungen – Effekt eines *EWSR1-FLI1*-Knockdowns auf die *CALCB*-Expression

Die Behandlung der Versuchstiere wurde eingeleitet, sobald die Tumoren ein mittleres Volumen von 180 mm³, bestimmt mit einer Schieblehre, erreicht hatten. Sie wurden daraufhin in zwei Gruppen randomisiert. Um einen Knockdown von *EWSR1-FLI1* in den Tumoren zu induzieren, erhielt eine Gruppe 2 mg/ml Doxycyclin im Trinkwasser, versetzt mit 5 % Saccharose (Dox +). Die Kontrollgruppe erhielt lediglich 5 % Saccharose über das Trinkwasser (Dox –). Der Versuch endete 96 Stunden nach Behandlungsbeginn.

Versuchsbedingungen – Wachstumsverhalten unter *CALCB*- oder *RAMP1*-Knockdown

Nach 10 bis 14 Tagen waren die Tumoren bei den Mäusen erstmals tastbar. Die Mäuse wurden daraufhin in zwei Gruppen randomisiert, wobei darauf geachtet wurde, dass die Gruppen bezüglich der Tumorgöße bei Randomisierung möglichst ausgeglichen waren. Die einzelnen Mäuse wurden durch Ohrmarkierungen gekennzeichnet. Die Behandlungsgruppe (Dox +) erhielt ab Tag der Randomisierung Trinkwasser, angereichert mit 2 mg/ml Doxycyclin und 5 % Saccharose. Die Kontrollgruppe (Dox –) erhielt Trinkwasser, lediglich angereichert mit 5 % Saccharose.

Vor Versuchsbeginn wurde als Endpunkt ein Überschreiten eines mittleren Tumordurchmessers von 15 mm definiert. Die Tumorgöße wurde jeden zweiten Tag mit Hilfe einer Schieblehre in 2 Ebenen bestimmt. Außerdem wurde auf Hinweise einer nichttragbaren Einschränkung des Wohlbefindens der Versuchstiere geachtet und bei Auftreten einer solchen das Tier frühzeitig erlöst, was bei 5 von 48 Versuchstieren notwendig war. Auf die statistische Auswertung des Versuchs wird unter Abschnitt 3.2.16 eingegangen.

Präparation und Aufbereitung des Tumorgewebes

Die Tötung der Versuchstiere erfolgte bei Erreichen des vorher definierten Endpunktes oder nichttolerabler Einschränkung des Wohlbefindens durch zervikale Dislokation. Nach Feststellung des Todes wurde der Tumor präpariert und zur

weiteren Untersuchung konserviert. Auch das Gewicht der Maus wurde dokumentiert, um eine Einflussnahme unterschiedlicher Proportionen der Versuchstiere auf das Tumorwachstum auszuschließen. Ein kleiner Teil des Tumors, der später zur RNA-Extraktion verwendet werden sollte, wurde umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverwendung bei -80°C gelagert, der restliche Tumor wurde in Formalin eingelegt und zur Anfertigung von Feinschnittuntersuchungen weiterverwendet. Dazu wurde der Tumor im Verlauf in Paraffin eingebettet.

Feinschnitte aller Versuche wurden nach Standardmethoden auf Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt und der Tumoraufbau und die Reinheit der Tumorschnitte begutachtet. Bei den Tumoren aus den *CALCB*- und *RAMP1*-Knockdown-Versuchen wurde zusätzlich die Anzahl an Mitosen und der Anteil nekrotischer Fläche evaluiert sowie bei Tumoren mit *CALCB*-Knockdown eine Evaluation der Mikrogefäßdichte anhand einer Färbung auf CD31 vorgenommen, worauf im folgenden Abschnitt näher eingegangen wird. Die Tumoren aus den *CALCB*-Knockdown-Versuchen wurden zusätzlich auf *CALCB* gefärbt, was unter Abschnitt 3.2.15 beschrieben wird.

Die gesamt-RNA der Tumoren aus dem *EWSR1-FLI1*-Knockdown-Versuch wurde mit dem ReliaPrep miRNA Cell and Tissue Miniprep System gemäß Herstellerangaben extrahiert. Wie unter Abschnitt 3.2.1 beschrieben wurde die gewonnene RNA zur Analyse der Genexpression auf einem Affymetrix Clariom D Microarray weiterverwendet. Außerdem wurde der Knockdown von *EWSR1-FLI1* mittels qRT-PCR überprüft, wobei ein *EWSR1-FLI1*-Knockdown auf 15 % in der Doxycyclin-Behandlungsgruppe (Dox +) gemessen wurde. Die RNA der Tumoren aus den *CALCB*- und *RAMP1*-Knockdown-Versuchen wurde mit dem NucleoSpin[®] RNA System extrahiert. Die gewonnene RNA dieser Tumoren wurde lediglich zum Nachweis des Knockdowns über eine qRT-PCR verwendet (Abbildung 4.20).

Färbungen der Tumorschnitte auf CD31

Aus den in Paraffin eingebetteten Tumoren der *CALCB*-Knockdown-Xenotransplantationsversuche wurden $4\ \mu\text{m}$ dünne Feinschnitte angefertigt. Diese wurden zunächst mit der Target Retrieval Solution hitzebehandelt. Zur Färbung auf das Oberflächenantigen CD31, welches typischerweise auf Endothelzellen zu finden ist, wurde als Primärantikörper der monoklonale Ratten anti-CD31-Antikörper verwendet, der gegen CD31 der Maus gerichtet ist. Dieser wurde in einem Verdünnungsverhältnis von 1 : 150 eingesetzt und die Schnitte damit für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Sekundärantikörper diente ein biotinylierter anti-rat-IgG-Antikörper, welcher zusätzlich *mouse-absorbed* ist, was eine Kreuzreaktion mit Mäuse-Antigenen verhindert. Des Weiteren wurden die Schnitte mit Streptavidin horseradish peroxidase behandelt und schließlich DAB+ zur Detektion verwendet. Gegengefärbt wurden die Schnitte mit Hämatoxylin nach Gill.

Evaluation der Mikrogefäßdichte, Nekrosefläche und Mitosezahl

Die Quantifizierung der Mikrogefäßdichte innerhalb der aus den *CALCB*-Knockdown-Mausversuchen stammenden Tumoren anhand der CD31 gefärbten Gewebeschnitte erfolgte über die sogenannte Chalkley-Methode [13, 33]. Bei dieser Methode wird ein Gitter mit zufällig verteilten Punkten auf den Gewebeschnitt gelegt, das Gitter solange gedreht, bis möglichst häufig eine Überlappung der Punkte mit CD31 positiven Zellen besteht, und gezählt, wie häufig solche Überlappungen innerhalb eines Tumorteils entstehen (Abbildung 4.21b). Dies erfolgte in vier unabhängigen Teilen des Tumors durch einen verblindeten Auswerter. Verglichen wurde die mittlere Mikrogefäßdichte in Tumoren mit oder ohne induziertem *CALCB*-Knockdown, erhoben anhand der mittleren Anzahl an Überlappungen zwischen einer CD31-gefärbten Endothelzelle und einem Punkt des Chalkley-Gitters.

Anhand von 22, nach Standardmethoden HE-gefärbten, repräsentativen Tumorschnitten mit und ohne *CALCB*- oder *RAMP1*-Knockdown wurde der Anteil der mittleren Nekrosefläche an der gesamten Tumorfläche innerhalb eines Tumors und die mittlere Anzahl an Mitosefiguren pro 40-fach vergrößertem Tumorauschnitt bestimmt. Hierzu wurden die Mitosen in 10 unabhängigen Bereichen des Tumors von einem verblindeten Auswerter bestimmt.

3.2.15 TMA humaner Ewing-Sarkome

Immunhistochemische Färbung auf CALCB

Zur immunhistochemischen Färbung von Gewebefeinschnitten auf *CALCB* wurde ein polyklonaler anti-*CALCB*-Antikörper (bs-0791R) aus dem Kaninchen stammend verwendet. Dazu wurden 4 µm dünne Gewebeschnitte angefertigt. Zunächst wurden die Schnitte unter Einsatz der target unmasking fluid hitzebehandelt, um die Antigene zu demaskieren. Nach 60 min Inkubation mit dem anti-*CALCB*-Antikörper (Verdünnung 1 : 120) bei Raumtemperatur wurden die Schnitte mit einem anti-rabbit-IgG-Antikörper inkubiert und schließlich die Darstellung der Antigen-Antikörper-Reaktion durch Behandlung der Gewebeschnitte mit DAB+ erreicht. Nach Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Gill wurden die Schnitte analysiert. Gefärbt wurde nach dieser Methode zum einen ein Tissue-Microarray (TMA), freundlicherweise von Prof. Dr. med. Ivo Leuschner und Dr. med. Christian Vokuhl (Kiel, Deutschland) zur Verfügung gestellt, der 89 primäre Ewing-Sarkom Tumoren umfasst. Zum anderen wurden Gewebeschnitte der Xenotransplantationsversuche mit induzierbarem *CALCB*-Knockdown in dieser Weise auf *CALCB* gefärbt.

Analyse der Färbung und statistische Auswertung

Die Auswertung des TMAs primärer Ewing-Sarkome erfolgte nach Genehmigung durch das Ethikkomitee der LMU München. Der TMA umfasst 89 Tumoren, die jeweils mit zwei 1 mm großen Stanzen auf dem TMA abgebildet sind. Zusätzlich

enthält der TMA interne Kontrollen. Die Analyse der Immunreaktivität erfolgte durch zwei unabhängige Auswerter auf einer Skala von 0 bis 2. Dabei wurde die Färbeintensität, welche der Großteil der Zellen aufwies, bewertet. Ein höherer Wert sprach für eine stärkere Immunreaktion. Nach Bildung der Mittelwerte aus den Einschätzungen der beiden Begutachter und der beiden Stanzten eines Tumors, wurden Gruppen gebildet: eine mittlere Färbung von 0 bis 0,5 wurde als *schwach* eingestuft, eine mittlere Färbung von 0,75 bis 1,25 als *moderat* und eine mittlere Färbung von 1,5 bis 2 als *stark*. Zur Überprüfung der Spezifität des anti-CALCB-Antikörpers wurden zusätzlich Gewebeschnitte der CALCB-Knockdown-Xenotransplantationsversuche, bei welchen ein CALCB-Knockdown bereits mittels qRT-PCR bestätigt worden war, durchgeführt. Die Analyse der Immunreaktivität erfolgte gemäß des immunreaktiven Score (IRS) nach Remmele und Stegner [60], welcher für die immunhistochemische Quantifizierung von Hormonrezeptorpositivität entwickelt wurde. Danach wurde pro Schnitt in 6 bis 11 repräsentativen Tumorarealen ausgewertet, wie viel Prozent der Zellen eine Immunreaktion zeigen und wie stark die am häufigsten zutreffende Färbeintensität bei den gefärbten Zellen auf einer Skala von 1 bis 3 (wenig bis stark gefärbt) ausfällt. Danach wurde der gefärbten Fläche ein Zahlenwert zwischen 0 bis 4 zugeordnet: 0 = 0 % der Zellen gefärbt, 1 = 1 % bis 9 % der Zellen gefärbt, 2 = 10 % bis 50 % der Zellen gefärbt, 3 = 51 % bis 80 % der Zellen gefärbt und 4 = 81 % bis 100 % der Zellen gefärbt. Die beiden Zahlenwerte der Färbeintensität und der gefärbten Fläche wurden miteinander multipliziert, wodurch ein Score auf einer Skala von 0 bis 12 ermittelt wurde. Aus den verschiedenen Werten pro Tumorschnitt wurde der Median ermittelt.

3.2.16 Statistische Auswertung

Signifikanztestung

Sofern nicht gesondert anders angegeben wurde zur Testung auf signifikante Unterschiede der Mittelwerte zweier Stichproben ein zweiseitiger, Zweistichproben-*t*-Test durchgeführt. Dieser wurde unter der Annahme einer Normalverteilung der erhobenen Daten verwendet, auch wenn die Stichprobengröße meist nicht ausreichte, um einen entsprechenden Test zum Nachweis der Normalverteilung durchzuführen. Die Signifikanztestung erfolgte mit den Programmen Microsoft Excel 2016 und GraphPad PRISM 5. Die Signifikanzniveaus der Daten sind entsprechend in Form von Sternchen in den einzelnen Abbildungen angegeben (nicht signifikant (n.s.) = p -Wert > 0,05; * = p -Wert ≤ 0,05; ** = p -Wert ≤ 0,01; *** = p -Wert ≤ 0,001). Die Anzahl der biologischen Replikate (n) ist bei den einzelnen Versuchen angegeben. Generell besteht beim größten Teil der Versuche jedes biologische Replikat aus mindestens zwei technischen Replikaten.

Überlebenszeitanalyse

Bei den Xenotransplantationsversuchen mit *CALCB*- oder *RAMP1*-Knockdown wurde wie unter Abschnitt 3.2.14 beschrieben das Erreichen einer bestimmten Tumorgroße als Endpunkt des Versuchs für das einzelne Tier definiert. Zur Auswertung der Daten wurde daher eine Überlebenszeitanalyse durchgeführt. Die Daten wurden dazu in einer Kaplan-Meier-Kurve aufgetragen. Zum Vergleich der Überlebenszeit der beiden Gruppen, jeweils mit oder ohne Knockdown des entsprechenden Gens, wurde ein Logrank-Test durchgeführt. Dieser wurde auch für die Analyse der Überlebenszeit von Patienten anhand von DNA-Microarray-Datensätzen mit klinischer Annotation verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 CALCB-Bildung im Ewing-Sarkom

4.1.1 Expressionshöhe von *CALCB*

Um die bereits seit 1987 bekannte Expression von *CALCB* im Ewing-Sarkom [39] quantitativ zu untersuchen, wurde die Expressionshöhe von *CALCB* in 71 unterschiedlichen Normalgeweben und 49 unterschiedlichen Tumorgeweben mit der Expressionshöhe von *CALCB* im Ewing-Sarkom verglichen. Die dafür verwendeten DNA-Microarray-Datensätzen stammen aus verschiedenen Forschungsprojekten und sind unter den in Tabellen 3.20 und 3.21 angegebenen Accession codes öffentlich zugänglich. In der durchgeführten Analyse zeigte sich, dass *CALCB* im Ewing-Sarkom im Vergleich zu allen untersuchten Normalgewebearten, ausgenommen von Zellen des trigeminalen Ganglions, des Rückenmarks und der Schilddrüse, deutlich überexprimiert ist (Abbildung 4.1). Auch im Vergleich zu verschiedenen anderen Tumorgeweben zeigten die Gewebeproben des Ewing-Sarkoms eine erhöhte *CALCB*-Expression (Abbildung 4.2). Bei der Auswahl der mit dem Ewing-Sarkom verglichenen Malignome wurde das Augenmerk v. a. auf differentialdiagnostisch für das Ewing-Sarkom relevante Tumorarten, Sarkome und pädiatrische Malignome gelegt [16].

Durch qRT-PCRs wurden die Unterschiede in der *CALCB*-Expression von Ewing-Sarkomen und drei weiteren Malignomen (Leukämie, Rhabdomyosarkom und Neuroblastom) anhand der *CALCB*-Expression in 30 verschiedenen Zelllinien bestätigt (Abbildung 4.3).

Bei den Analysen der Expressionshöhe von *CALCB* im Ewing-Sarkom fiel auf, dass, wenngleich grundsätzlich eine hohe Expression nachgewiesen werden konnte, innerhalb der verschiedenen Ewing-Sarkom-Fälle eine deutliche Streuung der Expressionsstärke zu sehen war. Auf Grundlage der Expression von *CALCB* in den getesteten Ewing-Sarkomzelllinien (Abbildung 4.3) wurden zwei Zelllinien ausgewählt, die für die späteren funktionellen Versuche verwendet wurden. Bei diesen handelt es sich mit RDES und A673 um Zelllinien mit hoher und mittlerer *CALCB*-Expression. Weitere Gründe für die Verwendung dieser Zelllinien sind ihre gute Handhabbarkeit *in vitro* und ihre gute Eignung für den Einsatz in Xenotransplantationsmodellen.



Abbildung 4.1 DNA-Microarray-Daten der $CALCB$ -Expression in 71 Normalgewebear-
 ten verglichen mit der Expression im Ewing-Sarkom. Die Daten sind \log_2 -transformiert.
 Jeder Punkt steht für einen Fall der Stichprobe. Die Ewing-Sarkom-Fälle sind blau mar-
 kiert. Die Anzahl der Fälle ist jeweils in Klammern angegeben. Dargestellt sind der
 Median (mittlerer roter Balken) und der Interquartilsabstand (Fehlerindikatoren).

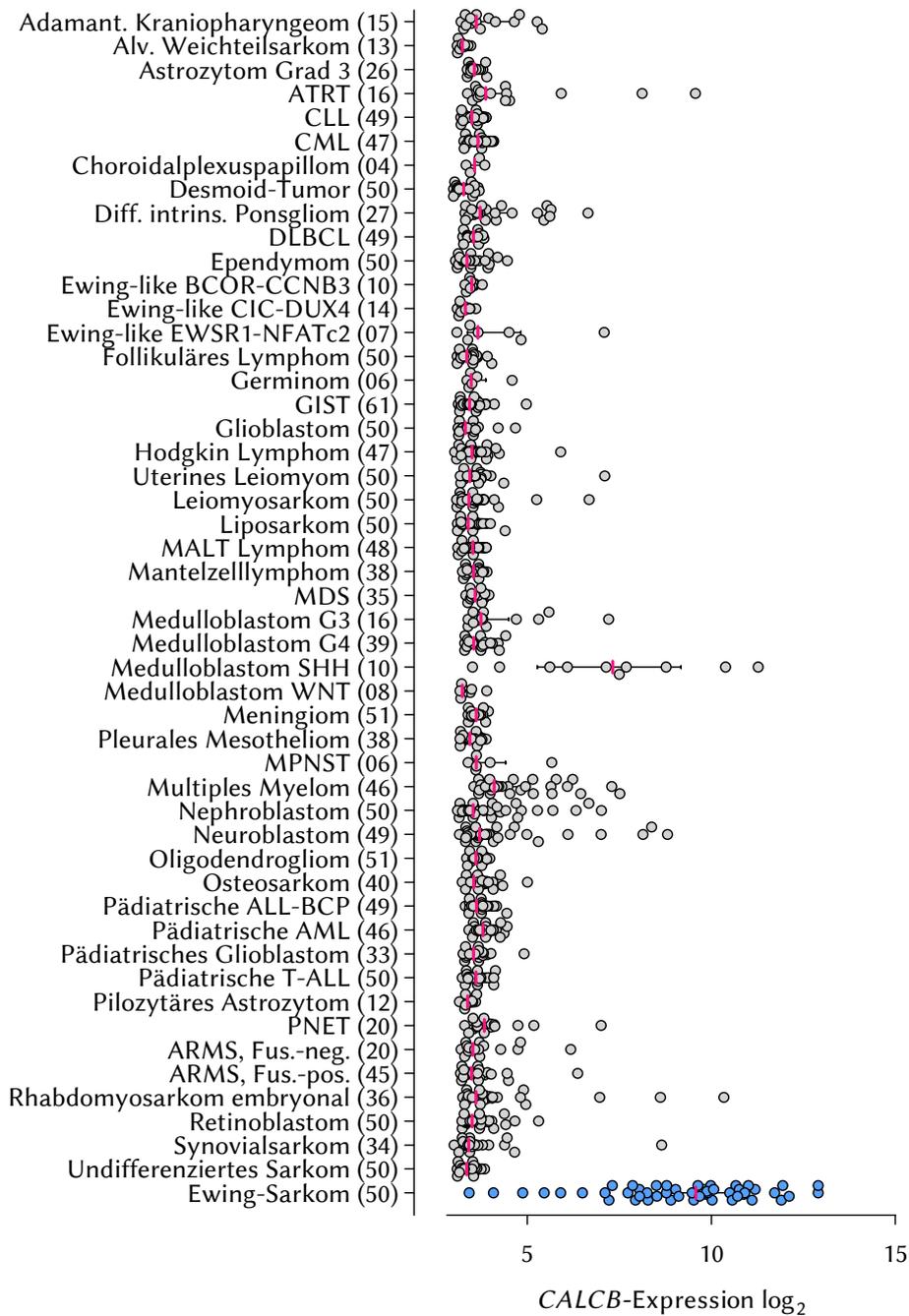


Abbildung 4.2 DNA-Microarray-Daten der *CALCB*-Expression in 49 Tumorarten verglichen mit der Expression im Ewing-Sarkom. Die Daten sind \log_2 -transformiert. Jeder Punkt steht für einen Fall der Stichprobe. Die Ewing-Sarkom-Fälle sind blau markiert. Die Anzahl der Fälle ist jeweils in Klammern angegeben. Dargestellt sind der Median (mittlerer roter Balken) und der Interquartilsabstand (Fehlerindikatoren).

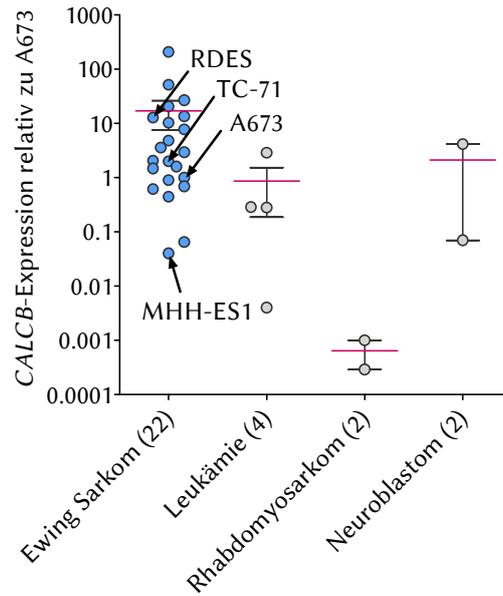
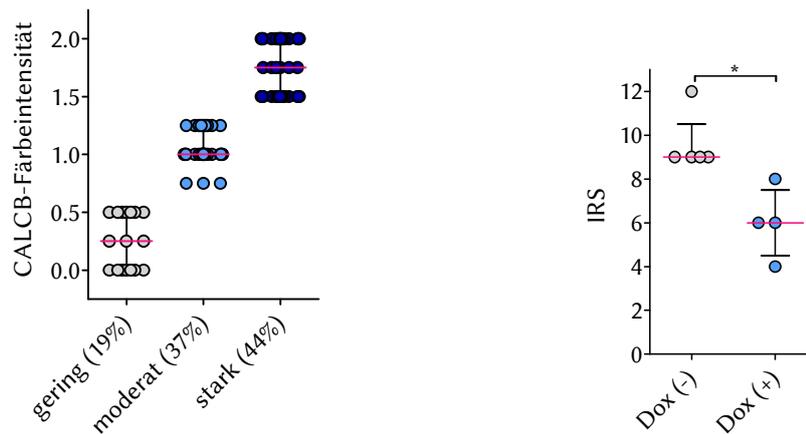


Abbildung 4.3 Abgebildet ist die mittels qRT-PCR erhobene *CALCB*-Expression kultivierter Zelllinien vier verschiedener Entitäten. Jeder Punkt symbolisiert die mittlere *CALCB*-Expression aus zwei biologischen Replikaten jeweils bezogen auf die *CALCB*-Expression in der Ewing-Sarkomzelllinie A673. Die horizontalen roten Balken symbolisieren den Mittelwert der *CALCB*-Expression einer Entität. Die Anzahl der untersuchten Zelllinien pro Entität steht jeweils in Klammern dahinter. Die Fehlerindikatoren symbolisieren den SEM. Die Punkte, welche Ewing-Sarkomzelllinien darstellen, sind blau markiert und solche Zelllinien, die im Rahmen des Projekts weiter für funktionelle Untersuchungen verwendet wurden, sind zusätzlich beschriftet.

4.1.2 Nachweis der *CALCB*-Bildung auf Proteinebene

Ein 89 primäre Ewing-Sarkome umfassender Tissue-Microarray (TMA) wurde durch immunhistochemische Färbung auf *CALCB* auf dessen Expression in diesen Tumoren auf Proteinebene untersucht. Dabei wurde die Färbeintensität entsprechend einer Skala von 0 = keine Färbung bis 2 = starke Färbung durch zwei unabhängige Auswerter bewertet. Anhand der mittleren erhobenen Färbeintensität wurden die Tumoren in Gruppen mit geringer (19 % der Fälle, 17/89), moderater (37 % der Fälle, 33/89) oder starker (44 % der Fälle, 39/89) Anfärbung eingeteilt (Abbildung 4.4a). Dies bestätigte die bereits auf RNA-Ebene gezeigte Expression von *CALCB* auf Proteinebene und zudem die dabei beobachteten Unterschiede der *CALCB*-Expressionshöhe verschiedener Ewing-Sarkom-Tumoren. Repräsentative Bilder einzelner Fälle des TMAs, welche die Färbeintensität der drei Gruppen widerspiegeln, sind in Abbildung 4.5 dargestellt [16].

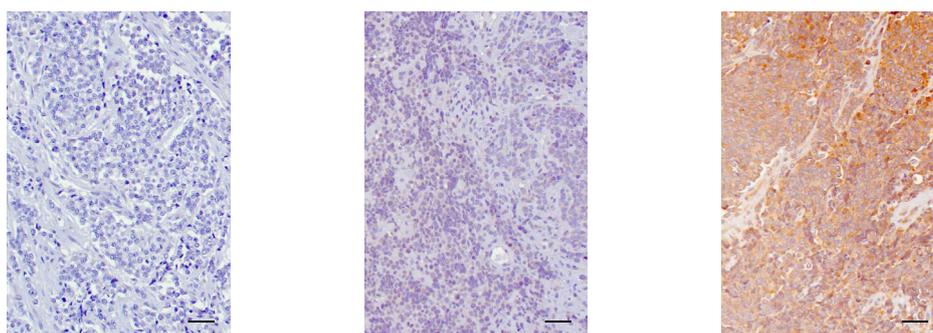
Um die Spezifität des verwendeten *CALCB*-Antikörpers zu überprüfen, wurden darüber hinaus Tumoren eines Xenotransplantationsmodells mit Doxycyclin-indu-



(a) Immunhistochemische Färbung eines TMAs primärer Ewing-Sarkome auf CALCB: Jeder Punkt des Diagramms repräsentiert die mittlere Färbeintensität eines Falles, erhoben durch zwei unabhängige Auswerter anhand von jeweils zwei Gewebestücken pro Tumor, wobei ein Wert von 0 keine, ein Wert von 1 eine moderate und ein Wert von 2 eine starke Färbeintensität bedeutet. Die einzelnen Fälle wurden in Gruppen je nach Färbeintensität zusammengefasst. In Klammern ist der Anteil der jeweiligen Gruppe an der Gesamtzahl der evaluierten Fälle angegeben. Die horizontalen roten Striche symbolisieren den Median und die Fehlerindikatoren den Interquartilsabstand.

(b) Dargestellt ist der Median des Immunreaktivitäts Scores (IRS) nach Remmele und Stegner [60] erhoben anhand von Ewing-Sarkom-Xenotransplantaten mit induzierbarer shRNA gegen *CALCB* mit (Dox +) und ohne (Dox -) Behandlung mit Doxycyclin in unabhängigen Regionen des Tumorschnitts. Ein IRS von 0 entspricht keiner Anfärbung des Tumors, ein IRS von 12 entspricht einer starken Anfärbung des Tumors in mindestens 81 % der Tumorfläche. Der rote horizontale Balken symbolisiert den Median, die Fehlerindikatoren den Interquartilsabstand. Zur Signifikanztestung wurde ein zweiseitiger Mann-Whitney-Test verwendet.

Abbildung 4.4 Auswertung immunhistochemischer Färbung eines TMAs primärer Ewing-Sarkome (a) und Tumoren aus Xenotransplantationsmodellen (b) auf CALCB.



(a) schwach

(b) moderat

(c) stark

Abbildung 4.5 Dargestellt sind repräsentative Bilder der CALCB-Färbung des Ewing-Sarkom-TMAs. Der Messbalken hat eine Länge von 50 μ m.

zierbarem Knockdown von *CALCB* auf die Anfärbarkeit von *CALCB* hin untersucht (Abbildung 4.4b). Hierzu wurde die Evaluation der Anfärbung der Tumoren nach dem immunreaktivem Score (IRS) nach Remmele und Stegner [60] vorgenommen. Nachdem in diesen Tumoren bereits mittels qRT-PCR ein Knockdown von *CALCB* bestätigt werden konnte (Abbildung 4.20), zeigte sich auch bei der Färbung auf *CALCB* ein statistisch signifikanter Unterschied der Färbeintensität der Tumoren mit und ohne *CALCB*-Knockdown (Dox + und Dox –) [16].

4.1.3 *CALCB*-Sekretion durch Ewing-Sarkomzellen

Da es sich bei *CALCB* um ein Neuropeptid handelt, welches physiologischerweise von den produzierenden Zellen sezerniert wird, wurde mit Hilfe von Massenspektrometrie das Medium, in welchem Ewing-Sarkomzellen kultiviert worden waren, auf den Gehalt des Peptids *CALCB* getestet. Als Medium wurde dabei Opti-MEM verwendet, in welchem die Zellen für 24 Stunden gewachsen waren, um Verfälschungen durch bovine, im Standardkulturmedium vorhandene Proteine zu vermeiden. In nicht kultiviertem Opti-MEM konnte kein *CALCB* nachgewiesen werden. Zum massenspektrometrischen Nachweis von *CALCB* wurde eine *CALCB*-spezifische Aminosäuresequenz gewählt, die durch ein Signal bei 1 149,589 8 Mw charakterisiert ist. Mit dieser Methode konnte gezeigt werden, dass *CALCB* von Ewing-Sarkomzellen in das Kulturmedium sezerniert wird. Im Gegensatz dazu konnte das in Ewing-Sarkomzellen deutlich geringer exprimierte Peptid *CALCA* nicht nachgewiesen werden [16].

4.1.4 *CALCB*-Expressionsregulation durch *EWSR1-FLI1*

Aufgrund der hohen Expression von *CALCB* im Ewing-Sarkom, welche in dieser Weise in keinem anderen Gewebe nachgewiesen werden konnte, wurde der zugrunde liegende Regulationsmechanismus, welcher die *CALCB*-Expression im Ewing-Sarkom fördert, weiter untersucht. Da das Ewing-Sarkom wie eingangs beschrieben ausgenommen von der krankheitserzeugenden Translokation, welche die Bildung von *EWSR1-FLI1* zur Folge hat, kaum über weitere Mutationen verfügt, wurde die Hypothese einer möglichen Regulation der *CALCB*-Expression durch *EWSR1-FLI1* aufgestellt. Diese Hypothese wurde durch die folgenden Ergebnisse bestärkt.

***EWSR1-FLI1*-abhängige *CALCB*-Expression**

Um zu untersuchen, ob die *CALCB*-Expression im Ewing-Sarkom durch Knockdown von *EWSR1-FLI1* verändert wird, wurde in der Zelllinie A673/TR/shEF1 durch eine mit Doxycyclin induzierbare shRNA ein Knockdown von *EWSR1-FLI1* erzeugt und 0 bis 96 Stunden nach der ersten Doxycyclin-Gabe die *EWSR1-FLI1*- und *CALCB*-Expression gemessen. Hierbei zeigte sich die *CALCB*-Expression konkordant mit der *EWSR1-FLI1*-Expression vermindert (Abbildung 4.6) [16].

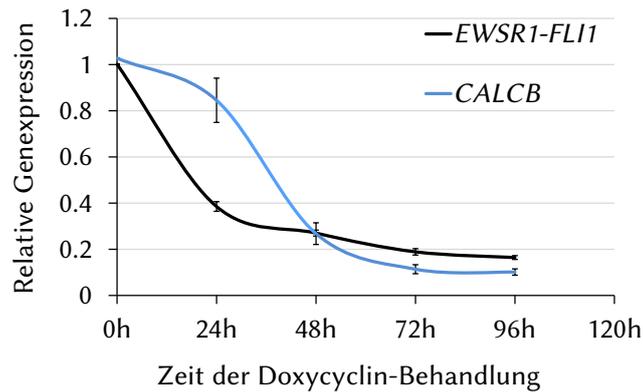


Abbildung 4.6 Ein Knockdown von *EWSR1-FLI1* wurde durch Doxycyclin-Behandlung der Ewing-Sarkomzellen A673/TR/shEF1, welche über einen Doxycyclin-induzierbare shRNA gegen *EWSR1-FLI1* verfügen, induziert und die Expression von *CALCB* zu verschiedenen Zeitpunkten nach Start der Doxycyclin-Behandlung bestimmt. Die beiden Linien zeigen die mittlere Expression von *EWSR1-FLI1* (schwarz) und *CALCB* (blau) bestimmt mittels qRT-PCR ($n = 7$) relativ zur Expression in Zellen, welche nicht mit Doxycyclin behandelt wurden. Die Fehlerindikatoren zeigen den SEM.

Zusätzlich wurde mit Hilfe derselben Ewing-Sarkomzelllinie dieser Versuch auch im Mausmodell durchgeführt. Dazu wurden A673/TR/shEF1 Zellen in die Flanken der Mäuse injiziert, die Mäuse randomisiert und eine Gruppe mit Doxycyclin behandelt, die andere nicht. Der Versuch wurde 96 Stunden nach Einleitung der Doxycyclin-Behandlung beendet. Eine Analyse der gewonnenen DNA-Microarray-Daten ergab ebenfalls eine zur *EWSR1-FLI1*-Expression konkordant verminderte *CALCB*-Expression (Abbildung 4.7). Da auf einem DNA-Microarray nur physiologische Gene des menschlichen Organismus abgebildet werden, wurde *FLI1* als Surrogatparameter für die Expression von *EWSR1-FLI1* verwendet [16].

Die künstliche Induktion einer *EWSR1-FLI1*-Expression in embryonalen Stammzellen führte hingegen auch zur Expression von *CALCB* in diesen Zellen (Abbildung 4.8). Dies konnte anhand von öffentlich zugänglichen DNA-Microarray-Daten gezeigt werden [16]. Zusammengefasst legen die aufgeführten Ergebnisse somit nahe, dass *EWSR1-FLI1* regulatorischen Einfluss auf die Expressionshöhe von *CALCB* nimmt.

***CALCB*-Expressionsregulation über einen GGAA-Mikrosatelliten**

Um den Mechanismus der *EWSR1-FLI1*-Einflussnahme auf die Expression von *CALCB* aufzudecken, wurden zunächst die dem *CALCB*-Lokus auf Chromosom 11 benachbarten DNA-Sequenzen auf das Auftreten von GGAA-Mikrosatelliten hin untersucht. Wie in Kapitel 1 erläutert ist *EWSR1-FLI1* in der Lage durch Bindung an repetitive GGAA-Wiederholungen, sogenannte GGAA-Mikrosatelliten, normalerweise funktionslosen DNA-Abschnitten Enhancer-Aktivität zu verleihen [61]. Diese DNA-

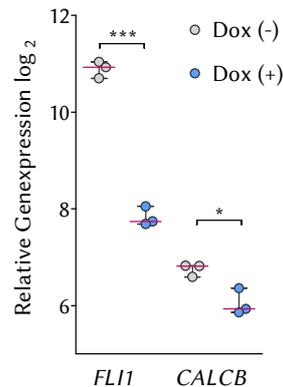


Abbildung 4.7 Dargestellt ist die Expression von *FLI1* (Surrogat für *EWSR1-FLI1*) und *CALCB* in xenotransplantierten Tumoren der Ewing-Sarkomzelllinie A673/TR/shEF1, welche über eine Doxycyclin-induzierbare shRNA gegen *EWSR1-FLI1* verfügt mit (blau) und ohne (grau) Doxycyclin-Behandlung der Versuchstiere. Die Daten stellen die relative, \log_2 -transformierte Expressionsstärke der beiden Gene dar, gemessen in einem Microarray aus Tumor-RNA. Jeder Punkt repräsentiert einen Tumor. Die horizontale rote Linie repräsentiert den Median, die Fehlerindikatoren den Interquartilsabstand.

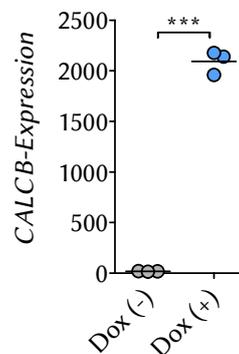


Abbildung 4.8 Gezeigt ist die *CALCB*-Expression in embryonalen Stammzellen mit und ohne ektope, Doxycyclin-induzierte Expression von *EWSR1-FLI1* erhoben in öffentlich zugänglichen DNA-Microarray-Datensätzen. Der horizontale Strich zeigt den Mittelwert an.

Abschnitte sind dadurch in der Lage die Expression von Genen in einer Entfernung von mehreren 100 000 Basenpaaren zu induzieren [32]. Anhand von *FLI1*-ChIP-Seq Daten der Ewing-Sarkomzelllinien A673 und SK-N-MC wurde ein GGAA-Mikrosatellit entdeckt, welcher sich in Intron 5 der längsten *CALCB*-Isoform (Isoform 3) befindet. Dieser Mikrosatellit zeichnet sich durch eine starke *EWSR1-FLI1*-Bindung aus, die mit einer epigenetischen Signatur eines aktiven Enhancers einhergeht, welche dadurch gekennzeichnet ist, dass es sich um eine DNase-sensitive Region (DNase 1 HS) handelt, die eine Methylierung des Lysin-4 (H3K4me1) und eine Acetylierung des Lysin-27 im Histon 3 (H3K27ac) aufweist (Abbildung 4.9). Nach shRNA-vermitteltem Knockdown von *EWSR1-FLI1* verringerte sich erwartungsgemäß die *EWSR1-FLI1*-Bindung deutlich und die H3K4me1 und H3K27ac nahmen ab, was für eine eingeschränkte Enhancer-Aktivität spricht [67]. Im Referenzgenom hg38 von 2013 umfasst dieser Mikrosatellit 16 Wiederholungen des GGAA-Motivs [16].

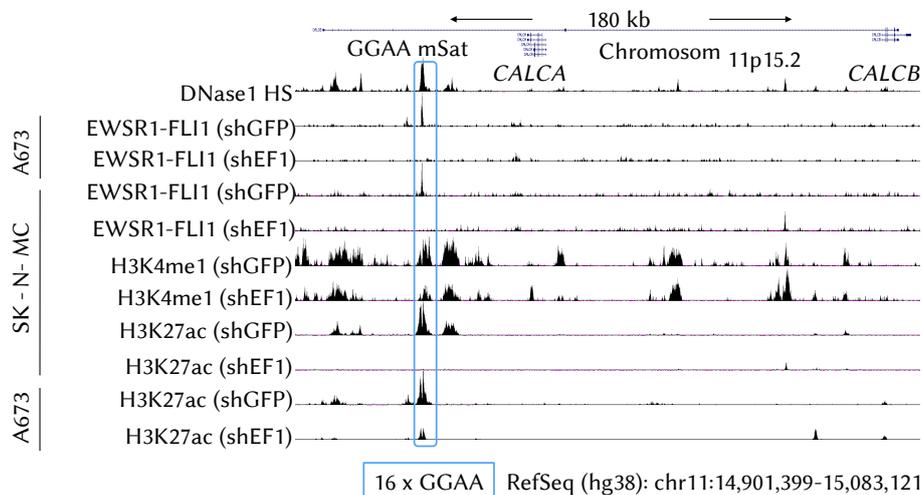


Abbildung 4.9 Öffentlich zugängliche DNase-Seq- und ChIP-Seq-Daten der Ewing-Sarkomzelllinien A673 und SK-N-MC mit (shEF1) und ohne (shGFP) stabilem *EWSR1-FLI1*-Knockdown im Bereich des *CALCB*-assoziierten GGAA-Mikrosatelliten auf Chromosom 11p15.2. Der blaue Rahmen verdeutlicht die Position des Mikrosatelliten.

Nach Klonierung dieses, den GGAA-Mikrosatelliten enthaltenden, DNA-Fragments aus den Ewing-Sarkomzelllinien TC-71 und MHH-ES1 in den pGL3-Enhancer-Vektor konnte die Enhancer-Aktivität des GGAA-Mikrosatelliten in einem Luciferase-Versuch mit A673/TR/shEF1 Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 4.10). Die starke Enhancer-Aktivität war nur unter Anwesenheit von *EWSR1-FLI1* zu beobachten, was eine direkte Interaktion zwischen dem GGAA-Mikrosatellit und *EWSR1-FLI1* nahelegt [16].

Während der Mikrosatellit der Zelllinie TC-71 insgesamt 12 Wiederholungen des GGAA-Motivs aufweist, enthält der Mikrosatellit von MHH-ES1 insgesamt 9 Wiederholungen des GGAA-Motivs. Entsprechend der bekannten höheren Aktivität von

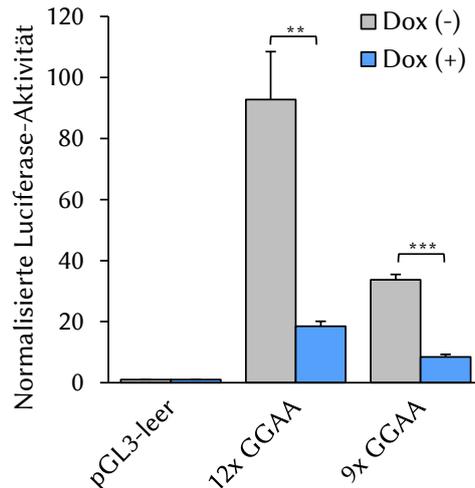


Abbildung 4.10 Die Luciferase-Aktivität eines 359 Basenpaare umfassenden, den *CALCB*-assoziierten GGAA-Mikrosatelliten enthaltenden DNA-Fragments aus den Ewing-Sarkomzelllinien TC-71 (12 Wiederholungen des GGAA-Motivs) und MHH-ES1 (9 Wiederholungen des GGAA-Motivs), kloniert in einen pGL3-Enhancer Vektor, wurde mittels eines Luciferase-Versuchs im Vergleich zum Vektor ohne DNA-Fragment in A673/TR/shEF1 Ewing-Sarkomzellen mit Doxycyclin-induzierbarer shRNA gegen *EWSR1-FLI1* erhoben. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit SEM ($n = 3-5$).

Mikrosatelliten mit mehr Wiederholungen [27], konnte eine stärkere Aktivität des GGAA-Mikrosatelliten der Zelllinie TC-71 festgestellt werden (Abbildung 4.10). Zudem wiesen TC-71 Zellen eine höhere *CALCB*-Expression auf mRNA-Level auf als MHH-ES1 Zellen (Abbildung 4.3), was die Hypothese der Regulation der *CALCB*-Expression über den untersuchten GGAA-Mikrosatelliten unterstützt [16].

4.2 *CALCB*-CGRP-Rezeptor-Signalweg beeinflusst Proliferation von Ewing-Sarkomzellen

4.2.1 Korrelation der *CALCB*-Expression mit proliferationsfördernden Genen

Ein 166 primäre Ewing-Sarkome umfassendes Datenset [6] wurde verwendet, um anhand dessen eine gene set enrichment analysis (GSEA) durchzuführen. Diese diente als eine Art Screening-Methode, um Hinweise auf eine funktionelle Einflussnahme von *CALCB* innerhalb der Ewing-Sarkomzellen aufzudecken. Dabei konnte eine Korrelation zwischen der *CALCB*-Expression und genetischer Signaturen, welche proliferationsfördernd auf Zellen einwirken und ihnen Stammzell-ähnliche Eigenschaften verleihen, festgestellt werden. Insbesondere konnte eine Korrela-

tion mit der Expression einer Gruppe von EWSR1-FLI1-Zielgenen nachgewiesen werden, welche unter dem Namen *ZHANG_TARGETS_OF_EWSR1-FLI1_FUSION* zusammengefasst werden [49] (Abbildung 4.11) [16].

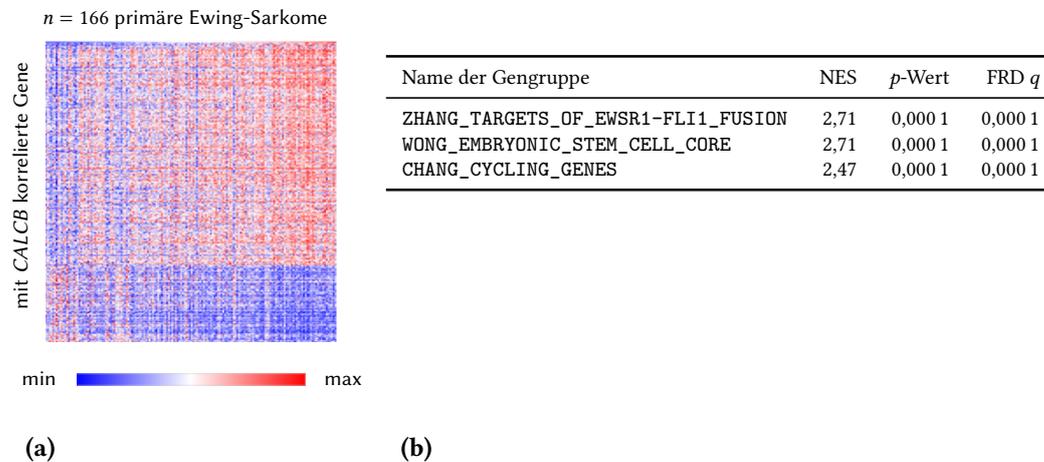


Abbildung 4.11 In einem DNA-Microarray-Datensatz 166 primärer Ewing-Sarkome wurde untersucht, bei welchen Genen die Expression mit der von *CALCB* negativ oder positiv korreliert. In (a) sind einzelne Gene dargestellt, deren Expression mit der Expression von *CALCB* korreliert. Der Korrelationskoeffizient beträgt $|r_{\text{Pearson}}| \geq 0,3$. In (b) sind Gruppen von Genen, deren Expression mit der von *CALCB* korreliert dargestellt, welche durch eine GSEA ermittelt wurden.

4.2.2 Proliferationsversuch unter *CALCB*-Knockdown

Zur Untersuchung der Einflussnahme von *CALCB* auf die Proliferation der Ewing-Sarkomzellen wurden Proliferationsversuche durchgeführt. Dabei konnte in Versuchen, die über einen kurzen Zeitraum von 2 bis 3 Tagen angelegt waren, kein Einfluss eines *CALCB*-Knockdowns auf das Wachstum oder das Überleben von A673 oder RDES Ewing-Sarkomzellen festgestellt werden (Abbildung 4.12). In länger angelegten Versuchen über 6 bis 9 Tage zeigte sich jedoch eine deutliche Verringerung der Zellzahl bei den Zellen, in welchen ein *CALCB*-Knockdown induziert worden war (Abbildung 4.13). Jedoch konnte durch Zellzählung unter Verwendung von Trypan Blue solution kein Unterschied im Anteil der toten Zellen an der Gesamtzahl der Zellen ausgemacht werden. Dieser Umstand legt nahe, dass der beobachtete Effekt nicht durch Apoptose oder Nekrose, sondern durch eine Inhibition der Proliferation der Zellen zu erklären ist [16].

4.2.3 CGRP-Rezeptor im Ewing-Sarkom

In der Vergangenheit konnte für die Ewing-Sarkomzelllinien WE-68 und SK-N-MC gezeigt werden, dass beide einen funktionsfähigen CGRP-Rezeptor auf der Zellober-

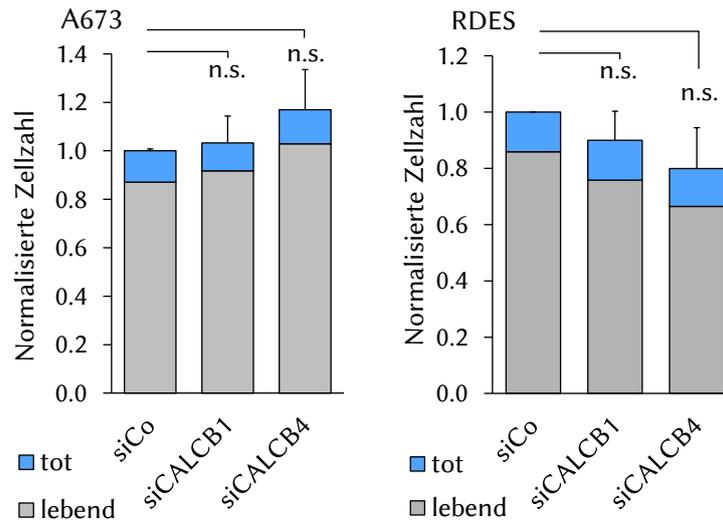
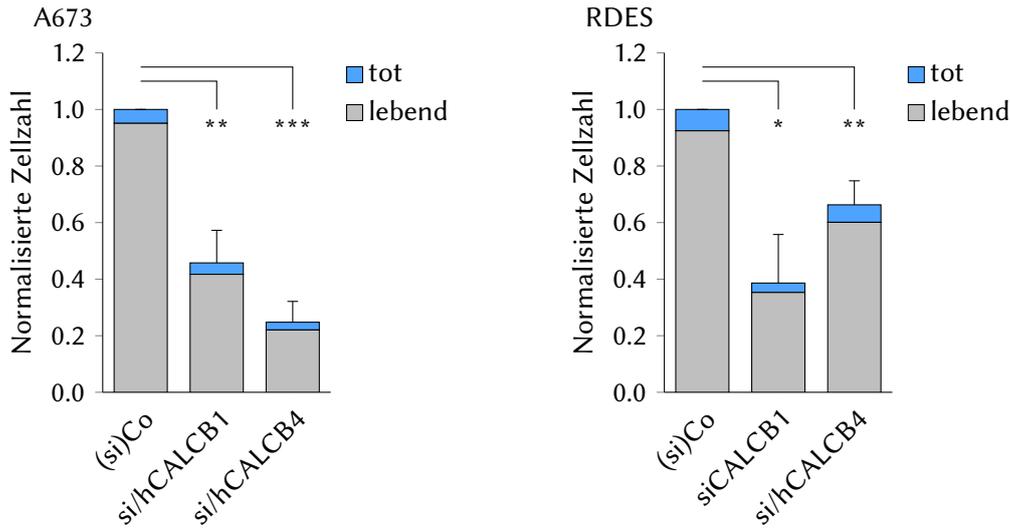
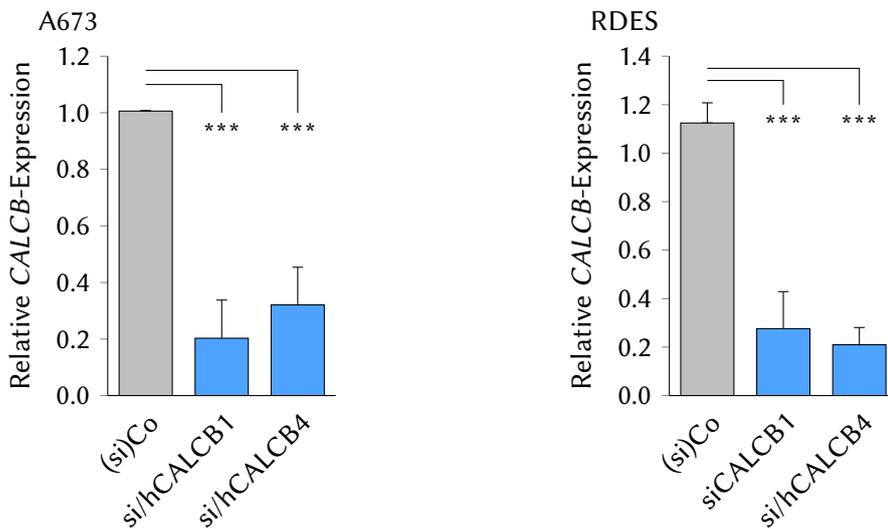


Abbildung 4.12 Dargestellt sind die Ergebnisse eines Kurzzeit-Proliferationsversuchs in den Ewing-Sarkomzellen A673 (links) und RDES (rechts) unter siRNA-vermitteltem Knockdown von *CALCB* durch die beiden siRNAs siCALCB1 und siCALCB4 im Vergleich zu einer Kontroll-siRNA. Der Versuch wurde für 2 bis 3 Tage durchgeführt. Die Zellzahl der lebenden und toten Zellen wurde durch Zellzählung unter Verwendung von Trypan blue solution ermittelt. Dargestellt ist die auf die Gesamtzellzahl der Kontrolle normalisierte Zellzahl mit SEM ($n_{A673} = 2$ bzw. 4; $n_{RDES} = 3$). Der Anteil der toten Zellen ist blau hervorgehoben, der Anteil der lebenden Zellen in grau.

fläche ausbilden, welcher nach Stimulation zu einer erhöhten intrazellulären cAMP-Konzentration führt [73, 53]. Tatsächlich wurde die zunächst als Neuroblastom-Zelllinie klassifizierte Zelllinie SK-N-MC als Standard-Zelllinien zur Untersuchung des CGRP-Rezeptors genutzt [53]. Nachdem der Nachweis einer EWSR1-FLI1-Translokation in den Zellen gelang, gilt mittlerweile der Konsens, dass es sich bei dieser Zelllinie um eine Ewing-Sarkomzelllinie handelt [21]. Um zu untersuchen, ob Ewing-Sarkomzellen im Allgemeinen die Bestandteile des CGRP-Rezeptors exprimieren und damit potentiell ebenfalls einen funktionsfähigen Rezeptor ausbilden, wurde zunächst die Expression von *CALCRL* und *RAMP1* anhand von DNA-Microarray-Datensätzen ermittelt. Hier konnte gezeigt werden, dass beide Bestandteile von Ewing-Sarkomzellen exprimiert werden (Abbildung 4.14) [16]. Eine autokrine bzw. parakrine Stimulation der Ewing-Sarkomzellen durch *CALCB* scheint daher prinzipiell möglich zu sein. Da der CGRP-Rezeptor jedoch nicht ausschließlich durch die Bindung von *CALCB* aktiviert wird, sondern auch durch Bindung anderer Mitglieder der Calcitonin-Gen-Peptid Familie wie *CALCA*, Adrenomedullin oder Amylin (kodiert vom Gen *IAPP*), wurde zusätzlich die Expressionshöhe dieser Gene untersucht. Diese wiesen im Mittel eine geringere Expression als *CALCB* auf (Abbildung 4.14) [16]. Zusätzlich verfügen sie eine deutlich geringere Affinität für



(a) Dargestellt sind die Ergebnisse eines Langzeitproliferationsversuchs in den Ewing-Sarkomzellen A673 (links) und RDES (rechts) unter siRNA- oder shRNA-vermitteltem Knockdown von *CALCB* im Vergleich zu einer Kontroll-siRNA oder Zellen ohne Doxycyclin-Behandlung bei Verwendung von Zellen mit Doxycyclin-induzierbarer shRNA gegen *CALCB*. Der Versuch wurde für 6 bis 9 Tage durchgeführt. Die Zellzahl der lebenden und toten Zellen wurde durch Zellzählung unter Verwendung von Trypan blue solution ermittelt. Dargestellt ist die auf die Gesamtzellzahl der Kontrolle normalisierte Zellzahl mit SEM ($n_{A673} = 4$; $n_{RDES} = 3$ bzw. 5).



(b) Der in den Zellen während des Langzeitproliferationsversuchs erzielte Knockdown von *CALCB* ist links für die Zelllinie A673 und rechts für die Zelllinie RDES dargestellt. Ermittelt wurde die relative *CALCB*-Expression in Bezug zur Kontrolle mittels qRT-PCR. Dargestellt wird die mittlere *CALCB*-Expression der in Abbildung 4.13a verwendeten Replikate und der SEM. Die Kontrolle ist grau dargestellt. Zellen, in denen ein Knockdown von *CALCB* induziert wurde, sind in blau dargestellt.

Abbildung 4.13 Langzeitproliferationsversuch unter *CALCB*-Knockdown.

den CGRP-Rezeptor als *CALCB* [1, 34]. Daher ist eine Beeinflussung der folgenden Versuche durch Stimulation des CGRP-Rezeptors durch diese anderen Peptide zwar nicht ausgeschlossen, aber eher als unwahrscheinlich einzustufen. Des Weiteren wurde anhand der DNA-Microarray-Daten die Expression des Gens *CALCR* untersucht. Es kodiert für den Calcitonin-Rezeptor und könnte als Bestandteil der verschiedenen Amylin-Rezeptoren, welche in Kombination mit RAMP1, -2 und -3 gebildet werden [36], Einfluss auf die folgenden Versuche nehmen. *CALCR* wird jedoch kaum von Ewing-Sarkomzellen exprimiert (Abbildung 4.14). Eine Einflussnahme ist daher nicht anzunehmen.

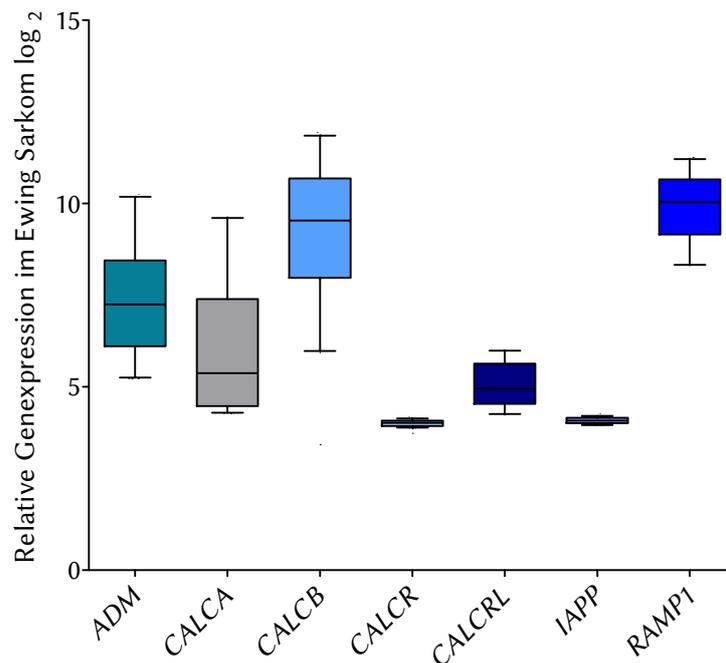


Abbildung 4.14 Die Expression der Bestandteile des CGRP-Rezeptors (*CALCRL* und *RAMP1*), des Calcitonin-Rezeptors (*CALCR*) und verschiedener Mitglieder der Calcitonin-Gen-Peptid Familie (*ADM*, *CALCA* und *IAPP*, welches für Amylin kodiert) wurde neben der Expression von *CALCB* in einem DNA-Microarray-Datensatz 50 primärer Ewing-Sarkome ermittelt. Dargestellt ist die Expressionshöhe der Gene in einer \log_2 -transformierten Skala. Der mittlere horizontale Strich der Box repräsentiert den Median, die Boxen den Interquartilsabstand und die Fehlerindikatoren die 10 bis 90 Perzentile.

Zusätzlich wurde untersucht, ob *EWSR1-FLI1* an der Regulation der CGRP-Rezeptorexpression beteiligt ist. So wurde in A673/TR/shEF1 Ewing-Sarkomzellen, welche eine induzierbare shRNA gegen *EWSR1-FLI1* besitzen nach Knockdown von *EWSR1-FLI1* eine nicht signifikante Expressionszunahme von *CALCRL* beobachtet (Abbildung 4.15). Falls dieser Effekt wider Erwarten wirklich vorliegen sollte, wurde,

um auszuschließen, dass es sich bei diesem Mechanismus um eine Gegenregulation der Zellen als Antwort auf die durch *EWSR1-FLI1*-Knockdown verminderte Expression von *CALCB* handelt, zusätzlich der Einfluss eines siRNA-vermittelten *CALCB*-Knockdowns in Ewing-Sarkomzellen auf die Expression von *CALCRL* untersucht. Dabei wurde als Reaktion auf einen *CALCB*-Knockdown eher ein Rückgang der Rezeptorexpression nachgewiesen (Abbildung 4.16). Sollte sich eine Expressionssteigerung von *CALCRL* als Antwort auf einen *EWSR1-FLI1*-Knockdown doch bestätigen, so liegt dabei keine Gegenregulation auf die verminderte *CALCB*-Expression vor, sondern wahrscheinlicher eine Unterdrückung der Expression von *CALCRL* durch *EWSR1-FLI1*. Die Expression von *RAMP1* wird sowohl durch einen *EWSR1-FLI1*-Knockdown als auch durch einen *CALCB*-Knockdown geringfügig vermindert (Abbildungen 4.15 und 4.16).

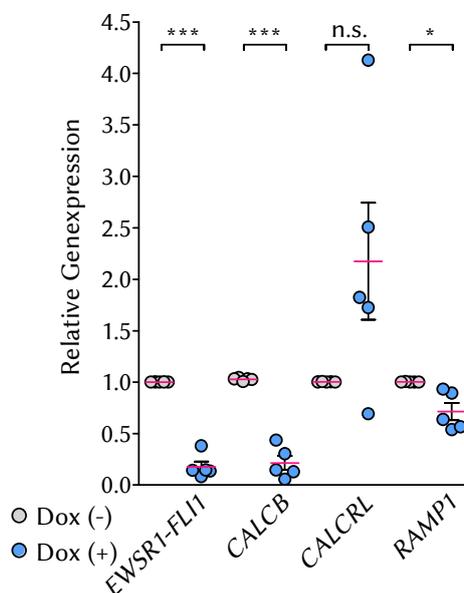


Abbildung 4.15 Dargestellt ist die relative Genexpression der Bestandteile des CGRP-Rezeptors (*CALCRL* und *RAMP1*), sowie von *CALCB* und *EWSR1-FLI1* bestimmt mittels qRT-PCR in A673/TR/shEF1 mit induzierbarer shRNA gegen *EWSR1-FLI1* mit und ohne Doxycyclin-induziertem Knockdown von *EWSR1-FLI1* für 72 Stunden. Jeder Punkt repräsentiert ein Replikat der jeweiligen Messung ($n = 5$). Die horizontale rote Linie zeigt den Mittelwert an, die Fehlerindikatoren den SEM.

4.2.4 Proliferationshemmung durch Knockdown des *CALCB*-CGRP-Rezeptor-Signalwegs *in vitro*

Um dem beobachteten Effekt eines *CALCB*-Knockdowns auf die Proliferation der Ewing-Sarkomzellen nachzugehen, wurden weitere Versuche zur Koloniebildungs-

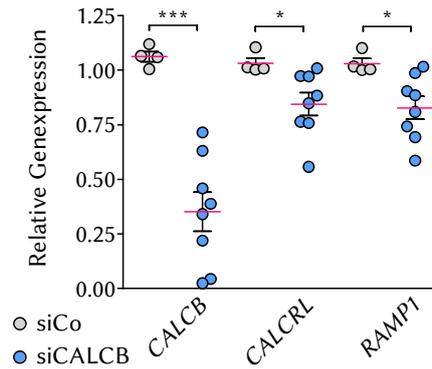


Abbildung 4.16 Dargestellt ist die relative Genexpression der Bestandteile des CGRP-Rezeptors (*CALRL* und *RAMP1*) sowie von *CALCB* bestimmt mittels qRT-PCR in A673 Ewing-Sarkomzellen mit siRNA-vermitteltem Knockdown von *CALCB* durch siCALCB1 oder siCALCB4 bezogen auf eine Kontroll-siRNA. Jeder Punkt repräsentiert ein Replikat der jeweiligen Messung ($n = 4$ bis 8). Die horizontale rote Linie zeigt den Mittelwert an, die Fehlerindikatoren den SEM.

kapazität der Zellen und zum dreidimensionalen Wachstum der Zellen jeweils mit und ohne *CALCB*-Knockdown durchgeführt. In beiden Versuche konnte, ausgenommen von einer *CALCB*-Knockdown-Kondition in Koloniebildungsversuchen mit RDES Zellen, ein signifikant eingeschränktes Wachstum der Zellen, in welchen ein *CALCB*-Knockdown eingeleitet wurde, beobachtet werden (Abbildungen 4.17 und 4.18) [16].

Der Hypothese folgend, dass der Einfluss von *CALCB* auf die Zellen durch den CGRP-Rezeptor-Signalweg vermittelt wird, wurden diese Versuche ebenfalls unter *RAMP1*-Knockdown durchgeführt. Dabei wurde ebenfalls in beiden Versuchen ein signifikant eingeschränktes Wachstum der Ewing-Sarkomzellen unter Knockdown von *RAMP1* beobachtet (Abbildungen 4.17 und 4.18). Der Einfluss eines *RAMP1*-Knockdowns auf das Wachstum der Zellen fiel in der Tendenz sogar stärker aus als der eines *CALCB*-Knockdowns [16]. Anzumerken ist bei diesem Versuch, dass A673 Zellen mit Doxycyclin-induzierbarer Kontroll-shRNA ebenfalls eine signifikante Reduktion des Zellwachstums nach Doxycyclin-Behandlung im Vergleich zu einer Kontrolle ohne Doxycyclin-Behandlung aufwiesen (Abbildung 4.17). Der Effekt fiel jedoch vielfach geringer aus als bei den shRNAs gegen *CALCB* und *RAMP1*. Ein dezenter Off-target-Effekt durch die Induktion der shRNA über Doxycyclin ist jedoch nicht auszuschließen. Bei der Zelllinie RDES konnte dieses Phänomen nicht beobachtet werden.

4.2.4 Proliferationshemmung unter Knockdown *CALCB*-*CGRP*-Rezeptor-Signalweg

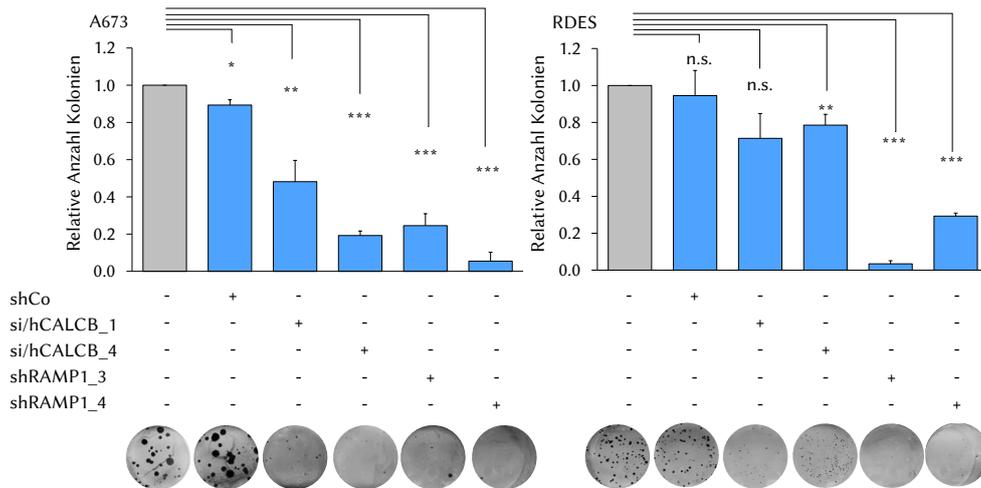


Abbildung 4.17 Koloniebildungsversuche mit und ohne siRNA- oder shRNA-vermittelterm Knockdown von *CALCB* oder *RAMP1* oder Doxycyclin-Induktion einer Kontroll-shRNA wurden mit den Ewing-Sarkomzelllinien A673 und RDES mit und ohne Doxycyclin-induzierbarer shRNA durchgeführt. Gezeigt ist die mittlere Koloniezahl im Bezug zur Kontrolle, welche entweder eine Kontroll-siRNA erhielt oder kein Doxycyclin, bei Verwendung von Zelllinien mit Doxycyclin-induzierbarer shRNA ($n = 3$ bis 6). Die Fehlerindikatoren zeigen den SEM an. Darunter abgebildet sind repräsentative Bilder der jeweiligen Konditionen.

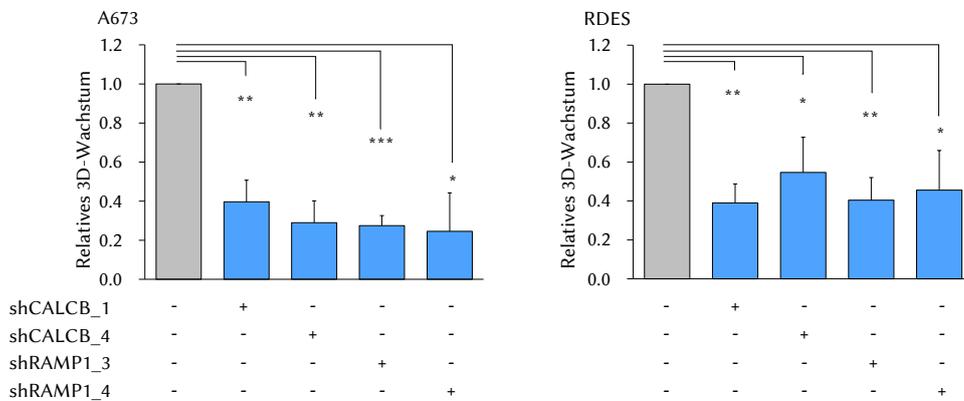


Abbildung 4.18 Die dreidimensionale Wachstumskapazität der Zellen A673 und RDES mit und ohne Doxycyclin-induzierter shRNA gegen *CALCB* oder *RAMP1* wurde anhand des relativen Gesamtdurchmessers aller Zellklomglomerate einer Kondition bezogen auf den Gesamtdurchmesser aller Zellklomglomerate der Kontrolle ohne Doxycyclin-Behandlung ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert des relativen Gesamtdurchmessers und der SEM ($n = 3$ bis 6).

4.2.5 Einflussnahme des CALCB-CGRP-Rezeptor-Signalwegs auf xenotransplantierte Ewing-Sarkomzellen

Proliferationshemmung durch Knockdown des CALCB-CGRP-Rezeptor-Signalwegs *in vivo*

Um eine Übertragbarkeit der anhand von Zellkulturmodellen gemachten Beobachtungen auf das Wachstumsverhalten eines Tumors in der Umgebung eines vollständigen Organismus zu untersuchen, wurden Xenotransplantationsversuche an NSG-Mäusen durchgeführt. Diese Versuche boten zusätzlich die Möglichkeit auch die Einflussnahme von CALCB auf die Gefäßversorgung des Tumors zu evaluieren. In die Flanken der Mäuse wurden subkutan A673 Zellen, welche über eine Doxycyclin-induzierbare shRNA gegen *CALCB* oder *RAMP1* verfügen injiziert und durch Zugabe von Doxycyclin zum Trinkwasser bei einer Hälfte der Mäuse ein Knockdown des jeweiligen Gens induziert. Die Randomisierung und Behandlung der Tiere mit Doxycyclin erfolgten, sobald die Tumoren tastbar waren. Als Endpunkt wurde ein mittlerer Tumordurchmesser von 15 mm definiert. Eine Überlebenszeitanalyse zeigte, dass die Tiere bei deren Tumoren ein Knockdown von *CALCB* oder *RAMP1* induziert worden war, signifikant länger lebten als Tiere ohne Knockdown, was durch ein langsames Tumorstadium zu erklären ist (Abbildung 4.19). Der in den Versuchen erzielte Knockdown der beiden Gene wurde nach Ende des Versuchs durch qRT-PCR aus Tumor-RNA bestätigt (Abbildung 4.20) [16].

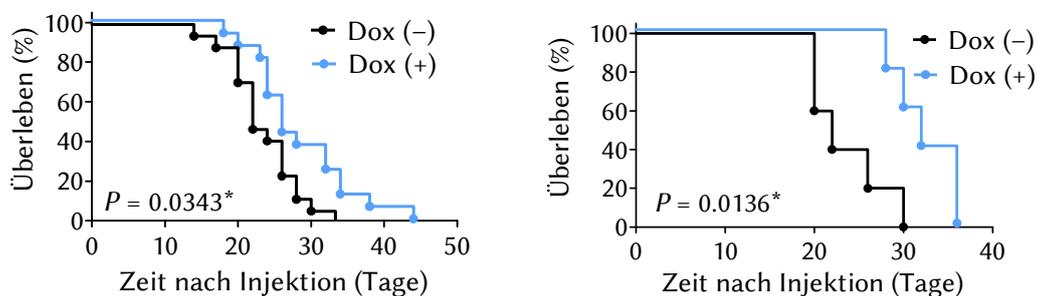


Abbildung 4.19 Die beiden Kaplan-Meier-Graphen zeigen Überlebenszeitanalysen der NSG-Mäuse mit xenotransplantierten A673 Ewing-Sarkomzellen mit induzierbarer shRNA gegen *CALCB* (links; $n = 33$) oder gegen *RAMP1* (rechts; $n = 10$). Dargestellt ist die Überlebenszeit der Tiere vom Beginn der Doxycyclin-Behandlung bis zum Erreichen des als Endpunkt definierten „events“, eines mittleren Tumordurchmessers von 15 mm. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Logrank-Test.

Mikrogefäßdichte in Tumoren der Xenotransplantationsmodelle

CALCB ist bekanntermaßen ein Peptid mit starkem vasodilatatorischem Potential [9, 71]. Neben der Hypothese, dass der proliferationsfördernde Effekt von CALCB

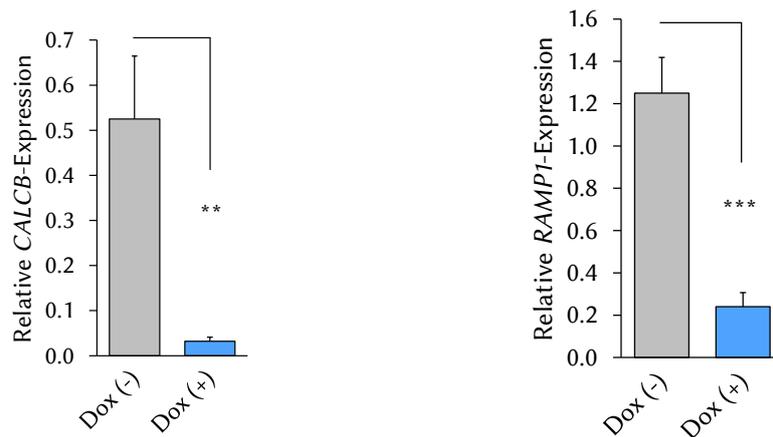
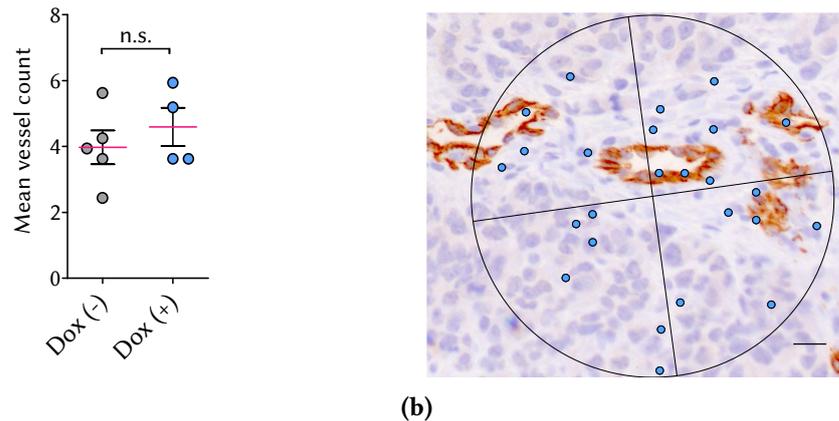


Abbildung 4.20 Der in den Tumoren der Xenotransplantationsmodelle erzielte Knockdown von *CALCB* oder *RAMP1* wurde *ex vivo* mittels qRT-PCR überprüft. Die beiden Graphen zeigen jeweils den Mittelwert der auf die Kontrolle (Dox –) normalisierten Genexpression und den SEM. Links ist der Knockdown von *CALCB* in Tumoren mit Doxycyclin-induzierbarer shRNA gegen *CALCB* abgebildet, rechts der Knockdown von *RAMP1* in Tumoren mit Doxycyclin-induzierbarer shRNA gegen *RAMP1*.

auf Ewing-Sarkomzellen durch eine para- oder autokrine Stimulation gesteuert sein könnte, kam bei dem *in vivo* beobachtetem wachstumsfördernden Effekt von *CALCB* auf die Tumoren auch ein möglicher Unterschied in der Nährstoffversorgung durch bessere Gefäßversorgung der Tumoren in Betracht. Daher wurden die konservierten Tumoren der Xenotransplantationsversuche mit und ohne induziertem *CALCB*-Knockdown histologisch auf ihre Mikrogefäßdichte hin untersucht. Dazu wurden Gewebefeinschnitte angefertigt, welche auf CD31, einem Marker für Endothelzellen, gefärbt wurden und durch die Chalkley-Methode [13, 33] die Mikrogefäßdichte in Tumoren mit oder ohne *CALCB*-Knockdown untersucht (Abbildung 4.21). Dabei konnte kein Unterschied der Mikrogefäßarchitektur zwischen den Gruppen mit und ohne Knockdown festgestellt werden [16]. Dieses Ergebnis ist jedoch mit der Einschränkung zu betrachten, dass damit eine vorübergehende Beeinflussung der Blutversorgung des Tumors durch *CALCB*-vermittelte Vasodilatation nicht abgebildet werden kann.

Mitosedichte und Nekrose in Tumoren der Xenotransplantationsmodelle

Anhand von HE-Färbungen von Feinschnitten der Tumoren der Xenotransplantationsmodelle wurde die mittlere Anzahl an Mitosen pro 40-fach vergrößertem Sichtfeld in Tumoren mit und ohne Knockdown von *CALCB* oder *RAMP1* untersucht. Dabei zeigten die Tumoren ohne Knockdown eines der beiden Gene eine signifikant höhere Anzahl an Mitosen als Tumoren mit Knockdown (Abbildung 4.22a). Bei der Analyse des flächenhaften Anteils von nekrotischen Arealen an der Fläche



(a)

(b)

Abbildung 4.21 Die Mikrogefäßdichte der Tumoren aus dem Xenotransplantationsmodell mit induzierbarer shRNA gegen *CALCB* wurde anhand von CD31-gefärbten Tumorschnitten gegen murines CD31 mit Hilfe der Chalkley-Methode [13, 33] evaluiert. Die linke Abbildung zeigt die mittlere Gefäßzahl in Tumoren mit und ohne Knockdown von *CALCB*. Jeder Punkt repräsentiert dabei den Mittelwert der Gefäßdichte eines Tumors, evaluiert in vier unabhängigen Regionen des Tumors. Der horizontale, rote Balken zeigt den Mittelwert an, die Fehlerindikatoren den SEM. Rechts ist ein repräsentatives Bild eines Tumorschnitts mit Chalkley-Gitter dargestellt [13]. Die Länge des Eichstrichs beträgt 25 μm.

des gesamten Tumorschnitts, anhand von HE-gefärbten Feinschnitten der Tumoren der Xenotransplantationsmodelle, wurde kein Unterschied der Nekrosefläche bei Tumoren mit oder ohne Knockdown von *CALCB* oder *RAMP1* festgestellt (Abbildung 4.22b) [16].

4.3 Behandlung von Ewing-Sarkomzellen mit CGRP-Rezeptorinhibitoren

In der Vergangenheit wurde eine Reihe unterschiedlicher CGRP-Rezeptorinhibitoren entwickelt. Dies erfolgte mit dem Hintergrund, dass diese neuen Therapeutika in der Therapie der Migräne Verwendung finden sollten. In der Pathogenese der Migräne spielt *CALCB* sowohl als *Neurosensitizer* als auch durch eine meningeale Vasodilatation in Kombination mit einer Induktion einer Entzündungsreaktion eine Rolle [41]. Verfügbar sind neben *small molecule* CGRP-Rezeptorantagonisten (sogenannte „-gepants“) mittlerweile auch monoklonale Antikörper [17]. Um einem möglichen neuen therapeutischen Ansatz für das Ewing-Sarkom auf Grundlage der erhobenen Ergebnisse dieser Arbeit nachzugehen, wurde in verschiedenen Versuchen die Wirkung der CGRP-Rezeptorinhibitoren MK-3207 und BIBN4096 (Olcegepant) auf Ewing-Sarkomzellen untersucht.

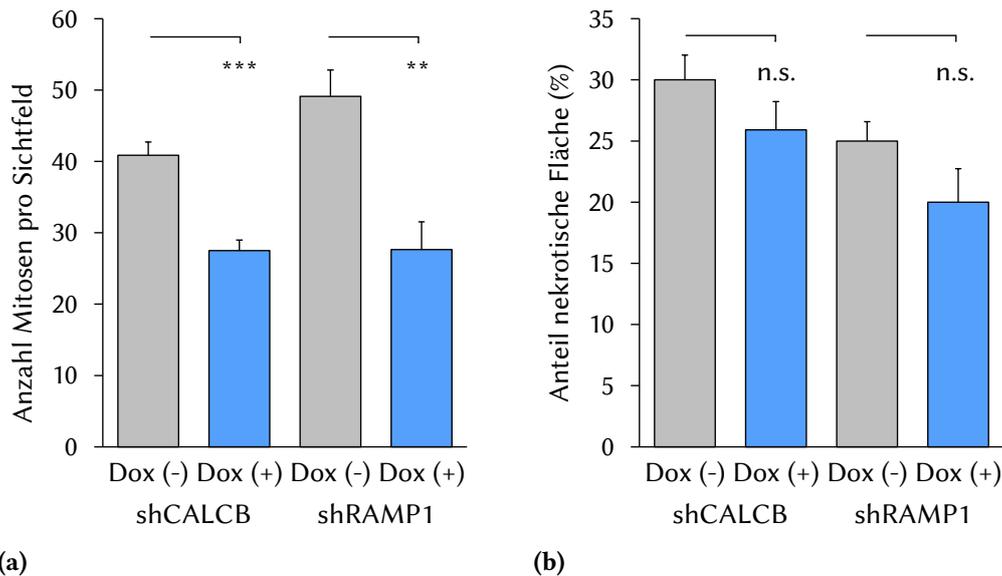


Abbildung 4.22 Die beiden Abbildungen zeigen eine Analyse von HE-gefärbten Gewebeschnitten der Xenotransplantationsmodelle mit und ohne Doxycyclin-induzierter shRNA gegen *CALCB* oder *RAMP1*. Ausgewertet wurden jeweils mehrere Areale von 22 repräsentativen Gewebeschnitten des Versuchs mit Doxycyclin-induzierbarer shRNA gegen *CALCB* und 10 repräsentativen Gewebeschnitten des Versuchs mit Doxycyclin-induzierbarer shRNA gegen *RAMP1*. Auf der linken Seite ist die mittlere Anzahl der Mitosen pro Sichtfeld dargestellt. Die rechte Abbildung zeigt den mittleren Flächenanteil an nekrotischen Arealen bezogen auf die Gesamtfläche des Tumorschnitts. Die Fehlerindikatoren geben jeweils den SEM an.

4.3.1 Proliferationshemmung durch CGRP-Rezeptorinhibitoren

Zur Untersuchung der Wirkung von MK-3207 und BIBN4096 (Olcegepant) bezüglich der Proliferation der Ewing-Sarkomzellen wurden Koloniebildungsversuche und dreidimensionale Wachstumsversuche unter Inhibitor Behandlung durchgeführt. MK-3207 wurde dabei in einer Konzentration von 20 μM und BIBN4096 (Olcegepant) in einer Konzentration von 100 μM eingesetzt. Als Kontrolle wurden die jeweiligen Konzentrationen von DMSO, in welchem die beiden Inhibitoren gelöst sind, verwendet. Wie bereits in den Knockdown-Versuchen konnte eine signifikante Reduktion der Proliferation der Ewing-Sarkomzellen unter Behandlung mit den Inhibitoren nachgewiesen werden (Abbildungen 4.23 und 4.24) [16].

4.3.2 Spezifität des CGRP-Rezeptorinhibitors MK-3207

Da in den Inhibitor-Versuchen relativ hohe Dosen der Inhibitoren verwendet werden mussten, um einen deutlichen Effekt der Inhibitoren auf das Wachstum der

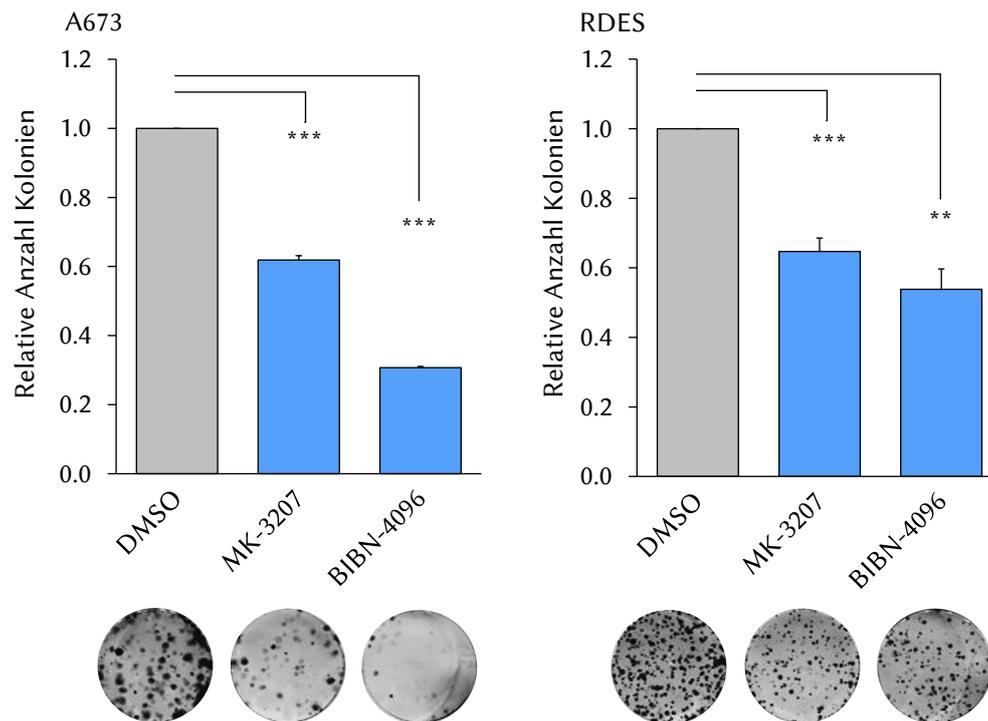


Abbildung 4.23 Dargestellt sind Koloniebildungsversuche der Ewing-Sarkomzelllinien A673 (links) und RDES (rechts) unter Behandlung mit den CGRP-Rezeptorinhibitoren MK-3207 in einer Konzentration von 20 μM oder BIBN-4096 in einer Konzentration von 100 μM im Vergleich zu entsprechenden Konzentrationen des Lösungsmittels DMSO. Gezeigt ist die mittlere Koloniezahl im Bezug zur Kontrolle (DMSO; $n = 3$ bis 6). Die Fehlerindikatoren zeigen den SEM an. Darunter abgebildet sind repräsentative Bilder der jeweiligen Konditionen.

Zellen beobachten zu können, wurde mit dem Inhibitor MK-3207 zusätzlich ein Resazurin-Versuch unter Verwendung von A673 Zellen mit induzierbarer shRNA gegen *RAMP1* durchgeführt. Dabei wurde, wie bereits in Koloniebildungsversuchen und Versuchen zum dreidimensionalen Wachstum der Zellen, eine Reduktion des Zellumsatzes bei Zellen, die mit dem Inhibitor behandelt wurden, beobachtet (Abbildung 4.25a). Diese stellte sich dosisabhängig dar. Um zu überprüfen, ob der Effekt tatsächlich eine spezifische Wirkung des Inhibitors ist, wurde durch Zugabe von Doxycyclin zu den Zellen unter Inhibitor-Behandlung zusätzlich ein *RAMP1*-Knockdown induziert. Dadurch konnte der durch Inhibitor-Behandlung alleine beobachtete Effekt auf den Zellumsatz zum Teil aufgehoben werden (Abbildung 4.25b), was darauf schließen lässt, dass trotz der notwendigen hohen Dosen des Inhibitors in den verschiedenen Versuchen der Effekt spezifisch für die Blockade des CGRP-Rezeptor zu sein scheint [16].

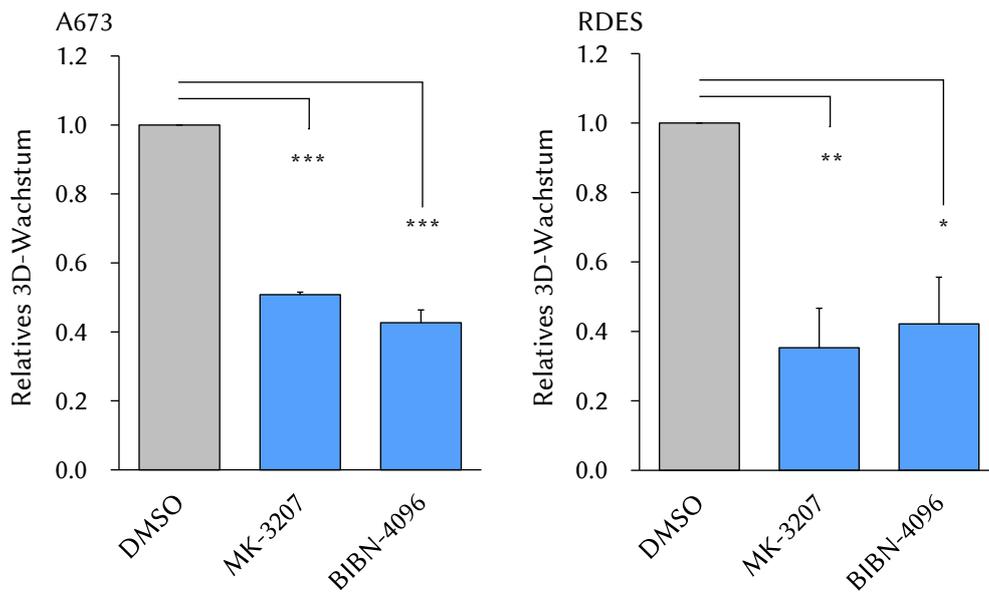
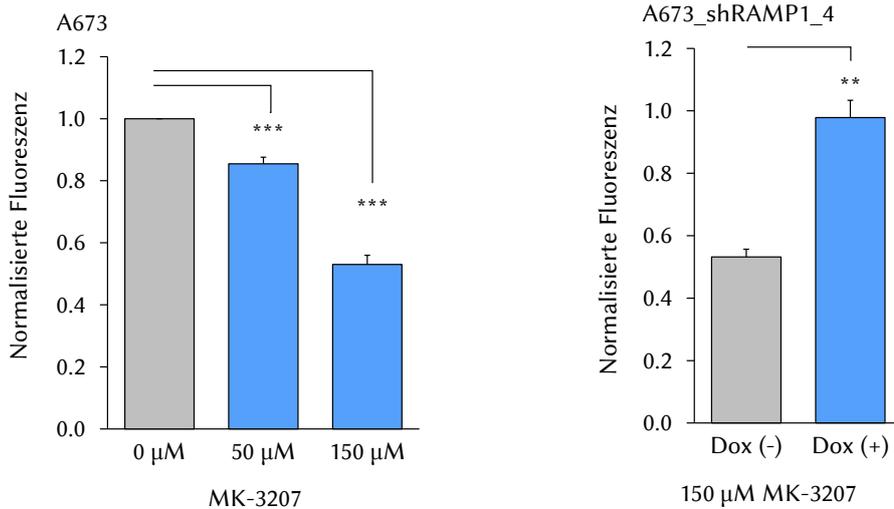


Abbildung 4.24 Die dreidimensionale Wachstumskapazität der Ewing-Sarkomzellen A673 (links) und RDES (rechts) unter Behandlung mit den CGRP-Rezeptorinhibitoren MK-3207 in einer Konzentration von 20 μM oder BIBN-4096 in einer Konzentration von 100 μM wurde im Vergleich zur entsprechenden Konzentrationen des Lösungsmittels DMSO anhand des relativen Gesamtdurchmessers aller Zellkonglomerate einer Kondition bezogen auf den Gesamtdurchmesser aller Zellkonglomerate der Kontrolle (DMSO) ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert des relativen Gesamtdurchmessers und der SEM ($n = 3$).

4.4 Positive Korrelation hoher *CALCB*-Expression mit Überlebenszeit

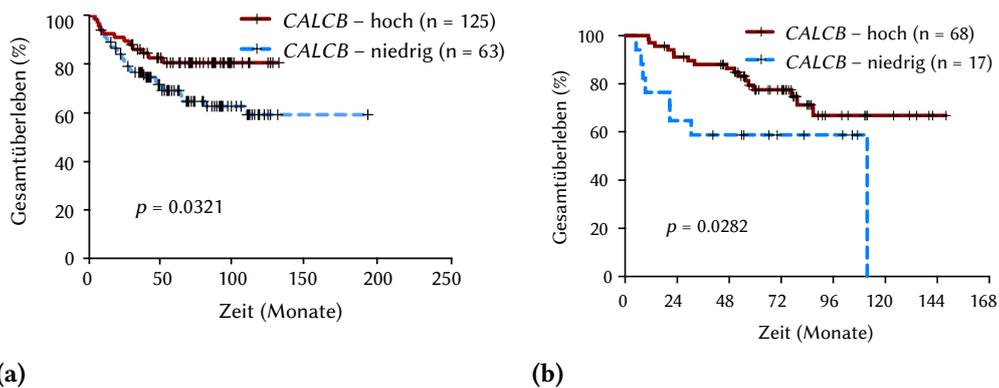
Unerwarteterweise ergab die Analyse eines Datensets von DNA-Microarrays primärer Ewing-Sarkome mit klinischer Annotation schließlich, dass Patienten, welche eine hohe *CALCB*-Expression (über der 34. Perzentile) in ihrem Tumorgewebe aufwiesen, im Vergleich zu Patienten mit niedriger *CALCB*-Expression (unter der 34. Perzentile) im Tumorgewebe ein längeres Gesamtüberleben zeigten (Abbildung 4.26a). Diese Beobachtung konnte durch Analyse eines zweiten, unabhängigen Datensatzes repliziert werden (Abbildung 4.26b).



(a) A673 Ewing-Sarkomzellen wurden in einem Resazurin-Versuch für 72 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen des CGRP-Rezeptorinhibitors MK-3207 oder entsprechenden Konzentrationen des Lösungsmittels DMSO behandelt. Im Anschluss wurde der Zellumsatz in einem Resazurin-Versuch ausgewertet. Dargestellt ist der Mittelwert der auf die Kontrolle (DMSO) normalisierten Fluoreszenz ($n = 12$) und der SEM.

(b) A673 Ewing-Sarkomzellen mit induzierbarer shRNA gegen *RAMP1* wurden in einem Resazurin-Versuch mit dem CGRP-Rezeptorinhibitor MK-3207 in einer Konzentration von 150 μM behandelt und entweder durch zusätzliche Zugabe von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Doxycyclin ein Knockdown von *RAMP1* induziert oder nicht. Im Anschluss wurde der Zellumsatz in einem Resazurin-Versuch ausgewertet. Dargestellt ist der Mittelwert der auf eine Kontrolle (DMSO mit und ohne Doxycyclin) normalisierten Fluoreszenz ($n = 3$) und der SEM.

Abbildung 4.25 Resazurin-Versuch unter CGRP-Rezeptorinhibitor-Behandlung.



(a)

(b)

Abbildung 4.26 Dargestellt sind Überlebenszeitanalyse von Patienten mit lokalisiertem Ewing-Sarkom stratifiziert nach der Höhe der *CALCB*-Expression innerhalb der Tumoren ermittelt aus DNA-Microarray-Daten anhand von zwei unabhängigen Datensätzen. Als hoch wurde eine Expression von *CALCB* über der 34. Perzentile eingestuft.

5 Diskussion

5.1 Gewonnene Erkenntnisse

Das Ewing-Sarkom ist ein Malignom, welches sich dadurch auszeichnet, dass es ausgenommen von der krankheitserzeugenden Translokation, welche zur Bildung eines unphysiologisch-aktiven Transkriptionsfaktors führt, kaum über weitere – insbesondere kaum über rekurrende – Mutationen verfügt [14]. Dass es trotzdem zu einer interindividuellen Diversität der Genexpression der Tumoren kommt, liegt an dem besonderen Regulationsmechanismus, durch welchen die verschiedenen Transkriptionsfaktoren, allen voran EWSR1-FLI1 (der häufigste Translokationstyp [14]), die Genexpression beeinflussen. Durch Bindung an evolutionär gering konservierte, eigentlich funktionslose DNA-Fragmente, welche sich durch unterschiedlich häufige Wiederholungen des Basenmotivs GGAA auszeichnen und daher als GGAA-Mikrosatelliten bezeichnet werden, kann EWSR1-FLI1 diesen Abschnitten Enhancer-Aktivität verleihen und dadurch die Expression verschiedener Gene induzieren [61]. Wie stark nun diese induzierte Enhancer-Aktivität ausfällt ist davon abhängig, wie viele GGAA-Wiederholungen in einem GGAA-Mikrosatelliten vorkommen, was interindividuell unterschiedlich ist [61]. Diese Art der Genexpressionsförderung führt dazu, dass es zu einer Interaktion eines Onkogens mit individuellen Keimbahnveränderungen kommt, was unterschiedliche Expressionsmuster in Ewing-Sarkom-Tumoren verschiedener Individuen verursacht und damit einhergehend ein individuelles Risikoprofil erzeugt [30].

Expressionsanalysen Die Variabilität der Genexpression verschiedener Ewing-Sarkom-Tumoren unterschiedlicher Individuen ist auch bei dem in dieser Arbeit untersuchten Neuropeptid *CALCB* deutlich zu erkennen. Dies konnte sowohl auf mRNA-Niveau wie auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte im Rahmen dieses Projekts anhand von DNA-Microarray-Daten gezeigt werden, dass Ewing-Sarkome im Mittel verglichen mit 71 verschiedenen Normalgewebearten und 49 Tumorarten eine erhöhte *CALCB*-Expression aufweisen, welche in etwa auf dem Niveau der Expressionshöhe von *CALCB* im trigeminalen Ganglion lag. Dass das trigeminale Ganglion eine sehr hohe *CALCB*-Expression aufweist, konnte bereits in der Vergangenheit gezeigt werden [3]. Die hohe Expression von *CALCB* im Ewing-Sarkom legte die Hypothese nahe, dass es zu einer Genexpressionsinduktion von *CALCB* im Ewing-Sarkom kommt, welche interindividuell unterschiedlich stark ausfällt. Betrachtet man die in den DNA-Microarray-Datensätzen

analysierten Normalgewebearten, ist anzumerken, dass es sich bei den einzelnen Normalgewebearten häufig um eine Mischung verschiedener Gewebearten handelt bzw. eine unzureichend genaue Annotation, welches Gewebe exakt zur Analyse verwendet wurde, erfolgt ist. Daher ist trotz der großen Anzahl analysierter Normalgewebearten beispielsweise eine Aussage darüber, in welchem Normalgewebe die höchste Expression von *CALCB* vorzufinden ist, nur eingeschränkt möglich.

Untersuchungen zur Expressionsregulation Die beobachteten Unterschiede in der Höhe der *CALCB*-Expression innerhalb verschiedener Ewing-Sarkom-Fälle in Kombination mit der *in vitro* und *in vivo* festgestellten Korrelation der *CALCB*-Expression mit der Expression von *EWSR1-FLI1* legte eine Genexpressionsregulation über eine *EWSR1-FLI1*-Bindung an einen *GGAA*-Mikrosatelliten nahe. Der daraufhin untersuchte Mikrosatellit, welcher in einer *ChIP-Seq*-Analyse Charakteristika eines durch *EWSR1-FLI1*-regulierten *GGAA*-Mikrosatelliten zeigte, wies gemäß seiner relativ hohe Anzahl an *GGAA*-Wiederholung, wie aus der Literatur bekannt [27], auch eine deutliche Enhancer-Aktivität in Luciferase-Versuchen in Anwesenheit von *EWSR1-FLI1* auf. Dabei wurde ein aus den beiden Ewing-Sarkomzelllinien TC-71 und MHH-ES1 klonierter *CALCB*-assoziiertes *GGAA*-Mikrosatellit verwendet. Um der Hypothese der Expressionsregulation über diesen Mikrosatelliten weiter nachzugehen, wäre es wünschenswert gewesen, auch die Aktivität des *CALCB*-assoziierten Mikrosatelliten anderer Ewing-Sarkomzelllinien zu untersuchen. Insbesondere wäre die Aktivität der Mikrosatelliten der Zelllinien A673 und RDES interessant gewesen, da diese Zelllinien für alle funktionellen Versuche verwendet wurden. Bei der Klonierung repetitiver Sequenzen handelt es sich jedoch um ein Verfahren, bei welchem es häufig zu Amplifikationsfehlern der DNA-Polymerasen kommt. So kommt es neben dem Einbau von Mutationen während der Amplifikation in Form von Deletionen oder Inversionen auch schlichtweg zu Amplifikationsabbrüchen [37]. Daher gelang es im Rahmen der Klonierungsarbeiten leider nicht, den *CALCB*-assoziierten Mikrosatelliten aus anderen Ewing-Sarkomzelllinien zu gewinnen. Ein möglicher Grund für die Klonierungsprobleme bei den RDES-Zellen könnte auch darin liegen, dass der Mikrosatellit in Anbetracht der höheren *CALCB*-Expression wahrscheinlich eine höhere Anzahl an *GGAA*-Motiven aufweist und daher schwieriger zu amplifizieren ist. Dies ist jedoch nur Spekulation. Schlussendlich kann auf Grundlage der erhobenen Daten nicht abschließend geklärt werden, ob die Expressionsregulation von *CALCB* tatsächlich über den untersuchten *GGAA*-Mikrosatelliten stattfindet oder nicht. Eine Möglichkeit diese Frage final zu beantworten, wäre beispielsweise die Durchführung eines Knockouts des *CALCB*-assoziierten Mikrosatelliten in verschiedenen Ewing-Sarkomzelllinien und die Analyse der daraufhin eventuell veränderten *CALCB*-Expressionshöhe. Fest steht jedoch, dass die beobachtete Abhängigkeit der *CALCB*-Expression von der Expression von *EWSR1-FLI1* einen regulatorischen Einfluss sehr wahrscheinlich macht, dass der untersuchte *GGAA*-Mikrosatellit von *EWSR1-FLI1* gebunden wird und Enhancer-Aktivität besitzt,

dass das *CALCB*-Gen in Reichweite des untersuchten GGAA-Mikrosatelliten liegt und dass interindividuelle Wiederholungsunterschiede des GGAA-Motivs die Expressionsvariabilität von *CALCB* in Ewing-Sarkom-Tumoren verschiedener Individuen erklären könnte.

Untersuchungen zur Proliferationsstimulation Bei einer Reihe funktioneller Versuche unter Knockdown von *CALCB* oder *RAMP1* wurde nachgewiesen, dass der *CALCB/RAMP1*-Signalweg eine proliferationsfördernde Wirkung auf die Ewing-Sarkomzellen zu haben scheint. In der Literatur konnte für ein anderes Mitglied der Calcitonin-/CGRP-Familie, Adrenomedullin, bereits gezeigt werden, dass es eine Rolle in der Pathophysiologie endokriner Malignome spielt. So ist es in der Lage, neben der Stimulation der Blut- und Lymphgefäßbildung auch durch autokrine oder parakrine Einwirkung auf die Tumorzellen deren Proliferation zu stimulieren und ihre Überlebenszeit zu verlängern [36]. Da auch in dieser Arbeit sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine Proliferationsförderung der Zellen durch Bildung von *CALCB* gezeigt werden konnte, lag die Hypothese nahe, dass *CALCB* ebenso, zusätzlich zu einem auto- oder parakrinen Mechanismus, eventuell die Blutgefäßbildung stimulieren könnte. Bei der Untersuchung der CD31-gefärbten Gewebeschnitte auf die Blutgefäßdichte von Tumoren ohne *CALCB*-Knockdown und Tumoren mit *CALCB*-Knockdown konnte jedoch kein Unterschied in der Blutgefäßdichte nachgewiesen werden. Dies ist wahrscheinlich durch die endogene Produktion von *Calca* und *Calcb* durch die Versuchstiere zu erklären. Toda *et al.* konnten zeigen, dass die Einschränkung der Proliferation xenotransplantierte Tumoren in *Calca*-Knockout Mäusen durch Denervierung xenotransplantierte Tumoren in Wildtyp-Mäusen reproduziert werden kann [72]. Diese Beobachtung legt nahe, dass Tumoren, welche selbst keine hohe endogene Produktion von *CALCA* aufweisen durch eine neuronale *CALCA*-Ausschüttung aus Nervenendigungen trotzdem vom Angiogenesefördernden Effekt von *CALCA* profitieren [72]. Hierbei sei darauf hingewiesen, dass dieser Effekt v. a. *CALCA* zugeschrieben wird, da eine Analyse der Höhe der *Calca*- und *Calcb*-Bildung in Spinalganglien der Mäuse ergab, dass etwa 6-fach höhere Konzentrationen von *Calca* im Vergleich zu *Calcb* vorlagen [26].

Der in der vorliegenden Arbeit beobachtete schwächere Effekt des *CALCB*-Knockdowns im Vergleich zu einem *RAMP1*-Knockdown auf die Proliferation der xenotransplantierten Tumoren *in vivo* könnte ebenso darin begründet sein, dass möglicherweise eine Signaltransduktion durch murines *Calca* und/oder *Calcb* innerhalb der Tumoren die Ewing-Sarkomzellen zur Proliferation angeregt hat. Retrospektiv wäre es daher wünschenswert gewesen, den auf mRNA-Ebene und mit Immunhistochemie bestätigten Knockdown von *CALCB* durch eine Messung des Gesamtgehalts von humanem und murinem *CALCA* und *CALCB* auf Proteinebene zu ergänzen. Da jedoch, obwohl kein Unterschied in der Mikrogefäßdichte der Tumoren vorlag, trotzdem ein deutlicher Phänotyp des *CALCB*-Knockdowns im Sinne einer verlangsamten Proliferation der Zellen vorlag, ist es auch möglich,

dass der auto- oder parakrine Effekt von CALCB auf die Zellen im Ewing-Sarkom der im Vordergrund stehende Pathomechanismus ist und die Angiogenese durch CALCB eventuell geringfügiger beeinflusst wird als für CALCA beschrieben [36]. Ein Überwiegen einer auto- oder parakrinen Proliferationsstimulation im Gegensatz zu einer verbesserten Tumor-Umgebung würde auch den starken Effekt des *RAMP1*-Knockdowns *in vivo* erklären. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass durch einen Knockdown von *RAMP1*, nicht nur die Bildung des CGRP-Rezeptors unterdrückt wird, sondern zugleich auch die des AMY_1 -Rezeptors, welcher aus dem CTR und *RAMP1* gebildet wird [34]. Es ist denkbar, dass dadurch auch eine Signaltransduktion von Amylin auf die Ewing-Sarkomzellen verhindert wurde. Gegen die Hypothese, dass die erhobenen Ergebnisse unter *RAMP1*-Knockdown dadurch verfälscht wurden spricht jedoch, dass, wie in dieser Arbeit dargestellt, CTR (kodiert von *CALCR*) und Amylin (kodiert von *IAPP*) kaum von Ewing-Sarkomzellen exprimiert werden. Daher ist zumindest *in vitro* eine Beeinflussung durch diesen Signalweg unwahrscheinlich. Jedoch wäre es denkbar, dass *in vivo* eine Beeinflussung der Ergebnisse durch murines Amylin stattgefunden hat. Zusätzlich ist bekannt, dass auch CALCA und CALCB an den AMY_1 -Rezeptor binden können. Die Relevanz und Funktion ist allerdings noch nicht abschließend geklärt [35].

Verwendung des pLKO-Tet-On-Vektor-Systems Um die in diesem Projekt gezeigten funktionellen Untersuchungen durchzuführen, wurden Zelllinien generiert, in welche ein pLKO-Tet-On-Vektor mit entsprechenden shRNAs gegen *CALCB* oder *RAMP1* durch lentivirale Transduktion eingebracht worden war [76, 77]. Diese Methode hat den Vorteil, dass durch Doxycyclin-Zugabe oder Doxycyclin-Wegnahme flexibel die Transkription der in das Genom eingeschleusten shRNA gesteuert werden kann. Ein Nachteil dieser Methode besteht jedoch darin, dass dadurch zwangsläufig das Genom der Zellen verändert wird. Obwohl darauf geachtet wurde, dass die Zellen phänotypisch und in der Expression der hier untersuchten Gene den Wildtyp-Zelllinien möglichst ähnlich geblieben sind, ist eine Veränderung der Eigenschaften der Versuchszellen und evtl. sogar eine grundlegende Veränderung der genetischen Architektur der Zellen nicht auszuschließen. Dies ist insbesondere der Fall, da es sich bei einem Großteil der generierten Zelllinien um Einzelzellklone handelt. Eine Untersuchung ergab, dass shRNAs, welche durch lentivirale Transduktion in Zellen eingebracht wurden, tatsächlich häufig innerhalb von Genen integriert werden [28]. Dabei wurde eine direkte Korrelation der Höhe der shRNA-Expression mit der Höhe der Expressionsaktivität der jeweiligen Region, in welche sie integriert worden war, beobachtet [28]. Insofern birgt die verwendete Methode die Gefahr gerade diese Zellklone zu selektieren, welche die shRNA in stark exprimierte Gene integriert haben. Da die Methode jedoch über die flexible Induktion eines Knockdowns hinaus eine Reihe von Vorteilen bringt, wurde sie trotzdem als die beste Möglichkeit der Umsetzung dieses Projekts eingeschätzt. So sind die Zellen dadurch, dass keine Transfektionen durch siRNAs mehr notwendig

sind, weniger toxischem Stress ausgesetzt, bestimmte Versuchsbedingungen, unter denen beispielsweise ein Medienwechsel nicht durchführbar ist, werden ermöglicht und auch *in vivo* ist es möglich tierschonend einen Knockdown zu induzieren. Das Risiko, dass die beobachteten Änderungen des Zellwachstums nicht durch die gezielte Wirkung der shRNA innerhalb der Zelle, sondern durch einen sogenannten Off-target-Effekt verursacht wurden, wurde durch die Verwendung zweier verschiedener shRNAs in zwei verschiedenen Zelllinien minimiert. Zusätzlich wurde der CALCB-CGRP-Rezeptor-Signalweg sowohl auf Ebene des Liganden als auch auf Ebene des Rezeptors gehemmt, sodass ein reiner Off-target-Effekt als Ursache für die beobachteten Proliferationsveränderungen der Zellen unwahrscheinlich erscheint.

Verwendete CGRP-Rezeptorinhibitoren Mit den *in vitro* durchgeführten Versuchen mit CGRP-Rezeptorinhibitoren konnte der Effekt eines CALCB- oder RAMP1-Knockdowns auf die Proliferation der Ewing-Sarkomzellen reproduziert werden. Die verschiedenen Vertreter der Stoffgruppe der sogenannten „Gepants“, zu welchen auch die verwendeten Inhibitoren MK-3207 und BIBN-4096 gehören, wurden ursprünglich für die Therapie der Migräne entwickelt. In klinischen Studien führten einige Vertreter dieser Substanzgruppe, darunter auch MK-3207 zu einer transienten Schädigung der Leber der Probanden, welche als Anstieg der Transaminasen im Serum der Probanden auffiel [17]. Bei BIBN-4096 konnten bei manchen Patienten als Nebenwirkungen Parästhesien, Übelkeit, Kopfschmerzen und Sehstörungen festgestellt werden [17]. Aufgrund verschiedener Nebenwirkungsprofile der Vertreter dieser Stoffgruppe wird bisher noch keine Substanz in der Routinetherapie angewendet. Ob ein Einsatz der in diesem Projekt verwendeten Medikamente daher jemals in der Therapie einer Erkrankung möglich sein wird, ist noch unklar. Vielmehr wird mit Nachdruck an der Entwicklung neuer Antikörper gearbeitet, welche den CGRP-Rezeptor-Signalweg hemmen sollen. Diese zeigten in der Therapie der Migräne eine gute Wirksamkeit bei einer besseren Verträglichkeit. Daher sind die Antikörper Galcanezumab, Fremanezumab und Erenumab mittlerweile für die Prävention der Migräne in den USA zugelassen [41]. Bezogen auf dieses Projekt wäre es zum einen wünschenswert, die *in vitro* gemachten Beobachtungen bezüglich der Wirksamkeit der CGRP-Rezeptorinhibitoren auf die Proliferation der Ewing-Sarkomzellen *in vivo* zu bestätigen. In Anbetracht der beschriebenen besseren Verträglichkeit der neu entwickelten CGRP-Rezeptor-Antikörper wäre jedoch der Einsatz dieser Substanzen in nachfolgenden Studien zu präferieren.

Überlebenszeitanalysen Die Überlebenszeitanalysen primärer Ewing-Sarkomfälle, welche zeigten, dass eine höhere Expression von CALCB mit einem längeren Gesamtüberleben korreliert, steht im Kontrast zum beobachteten proliferationsfördernden Effekt von CALCB auf Ewing-Sarkomzellen und ist zunächst kontraintuitiv. Der Grund für das längere Überleben ist durch die in dieser Arbeit erhobenen Ergeb-

nisse nicht zu erklären. In Anbetracht der vorhandenen Literatur gibt es verschiedene Hypothesen, welche dieses Ergebnis unter Umständen erklären könnten: Eine Möglichkeit ist, dass Tumoren, welche eine hohe Konzentration von CALCB produzieren, eventuell stärkere Symptome des Patienten hervorrufen und das Malignom entsprechend früher diagnostiziert wird. So konnte für das medulläre Schilddrüsenkarzinom gezeigt werden, dass durch erhöhte CALCA- und CALCB-Level im Plasma der Patienten eine erhöhte Herzfrequenz hervorgerufen wurde [62]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass tumorassoziierter Schmerz mit erhöhten Spiegeln von CALCA in den Tumoren einhergeht und eine Linderung des Schmerzes durch Injektion von CGRP-Rezeptorinhibitoren erreicht werden konnte [75]. Die Bildung von CALCA erfolgte dabei höchstwahrscheinlich in sensiblen Fasern des Rückenmarks [55]. Obwohl im Fall des Ewing-Sarkoms die CALCB-Bildung direkt im Tumor erfolgt und nicht in Nervenfasern des physiologischen Organismus, wäre es jedoch trotzdem plausibel, dass eine hohe CALCB-Produktion des Tumors ein Schmerzempfinden hervorruft, auch wenn die Tumoren noch klein sind. Zusätzlich ist es denkbar, dass die Proliferationssteigerung durch den hohen CALCB-Gehalt der Tumoren früher zu einer Verdrängung von umliegendem Gewebe führt, was ebenfalls häufig mit Schmerzen, jedoch auch mit funktionellen Einschränkungen der Patienten einhergeht. Zuletzt ist es auch denkbar, dass hohe CALCB-Konzentrationen des Tumors zu einem besseren Therapieansprechen führen: Auch wenn anhand der hier untersuchten Tumoren der Xenotransplantationsmodelle keine erhöhte Angiogenese durch hohe CALCB-Spiegel nachgewiesen werden konnte, ist nicht ausgeschlossen, dass CALCB eventuell über vorübergehende Einwirkung auf die Tumorgefäße die Blutversorgung der Tumoren beeinflusst. Eine bessere Blutversorgung der Tumoren führt zwar zunächst zu einem schnelleren Tumorwachstum, zusätzlich gewährleistet es jedoch auch, dass verabreichte Chemotherapeutika in das Tumorbett gelangen, was wiederum unter Umständen zu einem besseren Therapieansprechen führt. Es wäre interessant den zugrundeliegenden Mechanismus in folgenden Projekten tiefergehend zu untersuchen.

5.2 Ausblick

Nachdem bereits bekannt war, dass Ewing-Sarkome CALCB und den dazugehörigen CGRP-Rezeptor exprimieren [39, 73, 53], wurde in dieser Arbeit nun zum ersten Mal die funktionelle Bedeutung dieses Signalwegs für das Ewing-Sarkom untersucht. Es konnte dabei gezeigt werden, dass es sich bei *CALCB* um ein *EWSR1-FLI1*-Zielgen handelt, welches interindividuell unterschiedlich stark in den Ewing-Sarkom-Tumoren überexprimiert wird. Dies führt zu einer Proliferationsförderung der Ewing-Sarkomzellen, welche durch eine Behandlung der Zellen mit CGRP-Rezeptorinhibitoren geblockt werden kann [16]. Da die Standardtherapie des Ewing-Sarkoms, neben ausgedehnten Operationen und eventuell lokaler Bestrahlung, nach wie vor auf eine Kombination verschiedener nicht-selektiver Zytostatika, mit allen

entsprechenden Nebenwirkungen, angewiesen ist [59], wird mit Nachdruck an Angriffspunkten für eine zielgerichtete Therapie geforscht. Versuche den Transkriptionsfaktor EWSR1-FLI1 direkt zu inhibieren, sind bisher gescheitert [31]. Auch eine Immun-Checkpoint-Inhibition, welche einem Entkommen der Tumorzellen vor dem Angriff durch körpereigene Zellen des Immunsystems entgegenwirkt und sich insbesondere in der Therapie von Malignomen des Erwachsenen bewährt hat, scheint beim Ewing-Sarkom keine vielversprechende Therapieoption zu sein: Zum einen ist in den Tumoren nur eine geringe Invasion von Immunzellen des Körpers zu beobachten, zum anderen werden die Zielstrukturen der Immun-Checkpoint-Inhibitoren PD-1 (Programmed cell death protein 1) und PD-L1 (Programmed cell death 1 ligand 1) nur in einem Teil der Ewing-Sarkom-Tumoren exprimiert [31, 43]. Studien zur Therapie des Ewing-Sarkoms mit CAR (chimeric antigen receptor)-T-Zellen werden aktuell durchgeführt. Diese Therapie beruht auf einer Veränderung des T-Zell-Rezeptors körpereigener T-Zellen der Patienten, sodass dieser Rezeptor bestimmte Tumorantigene erkennt. Die Anpassung des T-Zell-Rezeptors erfolgt *ex vivo* und die Zellen werden nach Expansion den Patienten wieder in den Blutkreislauf zurückgegeben [43]. Knackpunkt bei dieser Therapie ist die Identifikation passender Antigene, gegen welche sich die T-Zellen richten sollen. Daher ist dieses Feld aktuell Gegenstand verschiedener Forschungsprojekte [7]. Ob und wann immuntherapeutische Ansätze in der Therapie des Ewing-Sarkoms schließlich den erhofften Durchbruch erbringen werden, bleibt weiter fraglich.

Das in dieser Arbeit beschriebene Ansprechen der Ewing-Sarkomzellen auf die Behandlung mit CGRP-Rezeptorinhibitoren könnte zumindest für einen Teil der Patienten eine weitere Therapieoption sein. Neben der beobachteten Proliferationshemmung der Ewing-Sarkomzellen könnte eine solche Behandlung sich eventuell zusätzlich positiv auf den tumorassoziierten Schmerz auswirken [75]. Denkbar wäre auch eine Kombinationstherapie aus einem CGRP-Rezeptorinhibitor und zytostatischer Chemotherapie. Eine solche Kombination könnte unter Umständen den Vorteil mit sich bringen, dass durch eine Applikation eines CGRP-Rezeptorinhibitors im Anschluss an die Applikation eines zytostatisch wirkenden Standardchemotherapeutikums durch eine CGRP-Rezeptorinhibitor-induzierte Vasokonstriktion in den Tumoren höhere Konzentrationen des applizierten Zytostatikums im Tumorbett erreicht werden können. Zusätzlich wäre es möglich, dass die Ausschwemmung der Chemotherapeutika durch die Vasokonstriktion verlangsamt wird. Möglicherweise könnte damit die Dosis der Standardchemotherapeutika reduziert werden. Auf Grund der berichteten besseren Verträglichkeit der CGRP-Rezeptor-Antikörper wären diese in der Therapie mit Sicherheit gegenüber den früher entwickelten CGRP-Rezeptorinhibitoren zu präferieren [41]. Jedoch sind vor Einsatz dieser Substanzen an Patienten noch *in vitro*- und *in vivo*-Versuche notwendig, um auch die Wirksamkeit der CGRP-Rezeptor-Antikörper auf die Ewing-Sarkomzellen zu untersuchen.

Darüber hinaus wäre es interessant zu untersuchen, ob auch Adrenomedullin eine funktionelle Rolle im Ewing-Sarkom spielt. Bekannt ist aus endokrinen Tumoren, dass die Adrenomedullin-Ausschüttung besonders durch Hypoxie über den

HIF-1 α (hypoxia inducible factor 1 subunit α) innerhalb des Tumors gesteigert wird [36]. HIF-1 α führt gleichzeitig auch zu einer gesteigerten Expression von *CALCRL*. Eine Rolle von HIF1 α in der Anpassung an Hypoxie ist auch für das Ewing-Sarkom bekannt [46]. Hätte auch Adrenomedullin einen proliferationssteigernden Effekt auf Ewing-Sarkom-Tumoren bzw. würde es die Angiogenese der Tumoren, wie für andere Malignome beschrieben, steigern, so wäre auch der Einsatz von Antagonisten, welche sowohl den CGRP-Rezeptor als auch die Adrenomedullin 1- und 2-Rezeptoren blocken zu überlegen [36].

Zusammenfassend bestätigen die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse die hohe Expression von *CALCB* im Ewing-Sarkom. Sie zeigen auf, dass diese mit der Expression von *EWSR1-FLI1* korreliert und, dass es sich damit bei *CALCB* höchstwahrscheinlich um ein *EWSR1-FLI1*-Zielgen handelt, dessen Expression wahrscheinlich über eine Bindung von *EWSR1-FLI1* an einen GGAA-Mikrosatelliten reguliert wird, welcher eine starke Enhancer-Aktivität in Anwesenheit von *EWSR1-FLI1* zeigt. Darüber hinaus konnte im Hinblick auf die funktionelle Rolle von *CALCB* im Ewing-Sarkom ein deutlich proliferationsfördernder Einfluss auf die Ewing-Sarkomzellen nachgewiesen werden, welcher durch die Inhibierung des *CALCB*-CGRP-Signalwegs auf Rezeptorebene vermindert werden kann. Die beschriebene Proliferationshemmung der Ewing-Sarkomzellen nach Behandlung mit CGRP-Rezeptorinhibitoren zeigt einen potentiellen neuen Therapieansatz für die Therapie des Ewing-Sarkoms auf. Die im Rahmen der Arbeit generierten Zelllinien mit induzierbarer shRNA gegen *CALCB* oder *RAMP1* sind hilfreiche Werkzeuge für weitere Forschungsprojekte zu diesem Thema.

6 Zusammenfassung

Das Ewing-Sarkom ist ein Malignom des Knochen- und Weichteilgewebes, welches durch eine chromosomale Translokation verursacht wird, die zur Bildung eines unphysiologisch-aktiven Transkriptionsfaktors führt, bei dem es sich in den meisten Fällen um EWSR1-FLI1 handelt [14]. Dieser ist im Stande durch Bindung an GGAA-Mikrosatelliten die Expression von Genen zu induzieren, indem es den normalerweise funktionslosen DNA-Abschnitten Enhancer-Eigenschaften verleiht [61]. Ziel dieses Projekts war es, die funktionelle Bedeutung des Neuropeptids CALCB, welches im Ewing-Sarkom exprimiert wird [39], zu charakterisieren und den zugrundeliegenden Mechanismus der CALCB-Expressionsinduktion im Ewing-Sarkom zu untersuchen. CALCB ist ein Neuropeptid, das eine starke Vasodilatation hervorruft und v. a. im zentralen Nervensystem exprimiert wird [71, 3].

Zu diesem Zweck erfolgte zunächst anhand eines großen DNA-Microarray-Datensatzes eine Eingrenzung der Expressionshöhe von CALCB im Ewing-Sarkom im Bezug zu verschiedenen Normal- und Tumorgeweben und es wurde durch Massenspektrometrie des Kulturmediums einer Ewing-Sarkomzelllinie untersucht, ob CALCB von den Zellen sezerniert wird. Um die Abhängigkeit der CALCB-Expression von der von EWSR1-FLI1 zu untersuchen, wurden sowohl EWSR1-FLI1-Knockdown-Versuche *in vitro* und *in vivo* durchgeführt, als auch DNA-Microarray-Daten embryonaler Stammzellen mit ektopter EWSR1-FLI1-Expression analysiert [29]. In Luciferase-Versuchen wurde die Enhancer-Aktivität eines GGAA-Mikrosatelliten aus der Umgebung des CALCB-Gens zweier verschiedener Ewing-Sarkomzelllinien in Abhängigkeit von der Anwesenheit von EWSR1-FLI1 untersucht. Die funktionelle Bedeutung von CALCB für das Ewing-Sarkom wurde durch verschiedene Versuche *in vitro* und durch xenotransplantierte Ewing-Sarkomzellen *in vivo* unter Knockdown von CALCB oder RAMP1, einem Bestandteil des CGRP-Rezeptors, an welchen CALCB bindet und welcher auf der Zelloberfläche Ewing-Sarkomzellen präsent ist, eingegrenzt. Dazu wurden Zelllinien mit Doxycyclin-induzierbarer shRNA gegen CALCB oder RAMP1 generiert. Zusätzlich wurden einige Versuche bezüglich der Proliferation der Ewing-Sarkomzellen unter Verwendung von CGRP-Rezeptorinhibitoren reproduziert.

In dieser Arbeit konnte auf mRNA- und Proteinebene gezeigt werden, dass das Ewing-Sarkom über eine sehr hohe Expression von CALCB verfügt, welche höher ist als in allen 71 untersuchten Normalgewebearten und 49 untersuchten Tumorgewebearten, und dass diese Expression abhängig ist von der Expression von EWSR1-FLI1. Es konnte ein GGAA-Mikrosatellit in der Umgebung des CALCB-Gens ausgemacht werden, welcher in ChIP-Seq-Daten Charakteristika einer durch EWSR1-FLI1-Bin-

derung induzierten Enhancer-Aktivität aufwies, die ebenfalls in Luciferase-Versuchen in Anwesenheit von EWSR1-FLI1 nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Ewing-Sarkomzellen *CALCB* in das Kulturmedium sezernieren. Anhand einer GSEA wurde eine Korrelation der *CALCB*-Expression mit der Expression von Proliferations-Signaturen gefunden und in funktionellen Versuche konnte eine signifikante Proliferationshemmung der Ewing-Sarkomzellen nach *CALCB*-Knockdown aufgedeckt werden, die durch Inhibierung des CGRP-Rezeptors der Ewing-Sarkomzellen entweder durch Knockdown von *RAMP1* oder durch Behandlung der Zellen mit CGRP-Rezeptorinhibitoren reproduziert werden konnte. Die Tumoren xenotransplantierte Ewing-Sarkomzellen mit und ohne Knockdown von *CALCB* zeigten zwar histologisch einen signifikanten Unterschied in der Anzahl der Mitosen, jedoch keinen Unterschied in der Gefäßdichte oder Nekrosefläche. Eine Überlebenszeitanalyse der Patienten mit Ewing-Sarkom in Abhängigkeit von der Expressionshöhe von *CALCB* in den Tumoren zeigte schließlich überraschenderweise eine Korrelation einer hohen *CALCB*-Expression mit einem längeren Überleben.

Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit der mutmaßliche Mechanismus, der der hohen *CALCB*-Expression im Ewing-Sarkom zugrunde liegt gefunden und eine funktionelle Bedeutung von *CALCB* für das maligne Verhalten von Ewing-Sarkomen nachgewiesen werden. Diese bietet durch eine Blockade des *CALCB*-CGRP-Rezeptor-Signalwegs potentiell einen nebenwirkungsarmen Angriffspunkt für die Therapie des Ewing-Sarkoms. Neben dem direkten hemmenden Effekt auf die Proliferation der Ewing-Sarkomzellen, könnte dabei zusätzlich eine Einflussnahme auf die Blutgefäßarchitektur und die vorübergehende Durchblutung der Tumoren erzielt werden, welche sich positiv auf das Therapieansprechen der Patienten auswirken könnte. Bevor der Einsatz einer CGRP-Rezeptor-Blockade jedoch in der Therapie von Patienten denkbar ist, sind insbesondere im Hinblick auf das längere Überleben der Patienten mit hoher *CALCB*-Expression weitere Forschungsbemühungen notwendig.

Literatur

- [1] Nambi Aiyar *et al.* „A cDNA Encoding the Calcitonin Gene-related Peptide Type 1 Receptor“. In: *Journal of Biological Chemistry* 271.19 (1996), S. 11325–11329. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.271.19.11325.
- [2] Enrique de Alava und William L. Gerald. „Molecular Biology of the Ewing’s Sarcoma/Primitive Neuroectodermal Tumor Family“. In: *Journal of Clinical Oncology* 18.1 (2000), S. 204–213. ISSN: 0732-183X. DOI: 10.1200/JCO.2000.18.1.204.
- [3] S. G. Amara *et al.* „Expression in brain of a messenger RNA encoding a novel neuropeptide homologous to calcitonin gene-related peptide“. In: *Science* 229.4718 (1985), S. 1094–1097. ISSN: 0036-8075. DOI: 10.1126/science.2994212.
- [4] Alain Aurias *et al.* „Chromosomal translocations in Ewing’s sarcoma“. In: *The New England Journal of Medicine* 309.8 (1983), S. 496–497. ISSN: 0028-4793. DOI: 10.1056/NEJM198308253090817.
- [5] Naomi J. Balamuth und Richard B. Womer. „Ewing’s sarcoma“. In: *The Lancet Oncology* 11.2 (2010), S. 184–192. ISSN: 1470-2045. DOI: 10.1016/S1470-2045(09)70286-4.
- [6] Michaela C. Baldauf *et al.* „Robust diagnosis of Ewing sarcoma by immunohistochemical detection of super-enhancer-driven EWSR1-ETS targets“. In: *Oncotarget* 9.2 (2018), S. 1587–1601. ISSN: 1949-2553. DOI: 10.18632/oncotarget.20098.
- [7] Michaela C. Baldauf *et al.* „Systematic identification of cancer-specific MHC-binding peptides with RAVEN“. In: *OncoImmunology* 7.9, e1481558 (2018), S. 1–12. ISSN: 2162-4011. DOI: 10.1080/2162402X.2018.1481558.
- [8] T. Bölling *et al.* „Development of Curative Therapies for Ewing Sarcomas by Interdisciplinary Cooperative Groups in Europe“. In: *Klinische Pädiatrie* 227.3 (2015), S. 108–115. DOI: 10.1055/s-0035-1545263.
- [9] S. D. Brain *et al.* „Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator“. In: *Nature* 313.5997 (1985), S. 54–56. ISSN: 0028-0836. DOI: 10.1038/313054a0.
- [10] Lars H. Breimer, Iain MacIntyre und Mone Zaidi. „Peptides from the calcitonin genes: molecular genetics, structure and function“. In: *Biochemical Journal* 255.2 (1988), S. 377–390. ISSN: 0264-6021. DOI: 10.1042/bj2550377.

- [11] Julia Brettschneider *et al.* „Quality Assessment for Short Oligonucleotide Microarray Data“. In: *Technometrics* 50.3 (2008), S. 241–264. ISSN: 0040-1706. DOI: 10.1198/004017008000000334.
- [12] Jaime Carrillo *et al.* „Cholecystokinin Down-Regulation by RNA Interference Impairs Ewing Tumor Growth“. In: *Clinical Cancer Research* 13.8 (2007), S. 2429–2440. ISSN: 1078-0432. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1762.
- [13] H. W. Chalkley. „Method for the Quantitative Morphologic Analysis of Tissues“. In: *Journal of the National Cancer Institute* 4.1 (1943), S. 47–53. ISSN: 0027-8874. DOI: 10.1093/jnci/4.1.47.
- [14] Brian D. Crompton *et al.* „The Genomic Landscape of Pediatric Ewing Sarcoma“. In: *Cancer Discovery* 4.11 (2014), S. 1326–1341. ISSN: 2159-8274. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-13-1037.
- [15] Manhong Dai *et al.* „Evolving gene/transcript definitions significantly alter the interpretation of GeneChip data“. In: *Nucleic Acids Research* 33.20, e175 (2005), S. 1–9. ISSN: 0305-1048. DOI: 10.1093/nar/gni179.
- [16] Marlene Dallmayer *et al.* „Targeting the CALCB/RAMP1 axis inhibits growth of Ewing sarcoma“. In: *Cell Death & Disease* 10.2, 116 (2019), S. 1–13. ISSN: 2041-4889. DOI: 10.1038/s41419-019-1372-0.
- [17] Marie Deen *et al.* „Blocking CGRP in migraine patients – a review of pros and cons“. In: *The Journal of Headache and Pain* 18.96 (2017), S. 1–9. ISSN: 1129-2369. DOI: 10.1186/s10194-017-0807-1.
- [18] Olivier Delattre *et al.* „Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours“. In: *Nature* 359.6391 (1992), S. 162–165. ISSN: 0028-0836. DOI: 10.1038/359162a0.
- [19] Olivier Delattre *et al.* „The Ewing Family of Tumors – A Subgroup of Small-Round-Cell Tumors Defined by Specific Chimeric Transcripts“. In: *The New England Journal of Medicine* 331.5 (1994), S. 294–299. ISSN: 0028-4793. DOI: 10.1056/NEJM199408043310503.
- [20] Uta Dirksen und Heribert Jürgens. *Ewing-Sarkome des Kindes- und Jugendalters*. S1-Leitlinie. Version Juni 2014. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V., 1999. AWMF-Registernummer: 025-006.
- [21] Teresa Dunn *et al.* „ERG gene is translocated in an Ewing’s sarcoma cell line“. In: *Cancer genetics and Cytogenetics* 76.1 (1994), S. 19–22. ISSN: 0165-4608. DOI: 10.1016/0165-4608(94)90063-9.
- [22] The ENCODE Project Consortium. „An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome“. In: *Nature* 489.7414 (2012), S. 57–74. DOI: 10.1038/nature11247.

-
- [23] James Ewing. „Diffuse endothelioma of bone“. In: *Proceedings of the New York Pathological Society* 21.17 (1921).
- [24] James Ewing. „The Classic: Diffuse Endothelioma of Bone“. In: *Clinical Orthopaedics and Related Research* 450 (2006). Reprint of the Proceedings of the New York Pathological Society. (1921), S. 25–27. ISSN: 0009-921X. DOI: 10.1097/01.blo.0000229311.36007.c7.
- [25] Eugene Froimchuk, Younghoon Jang und Kai Ge. „Histone H3 lysine 4 methyltransferase KMT2D“. In: *Gene* 627 (2017), S. 337–342. ISSN: 0378-1119. DOI: 10.1016/j.gene.2017.06.056.
- [26] Pandu R. R. Gangula *et al.* „Increased Blood Pressure in α -Calcitonin Gene-Related Peptide/Calcitonin Gene Knockout Mice“. In: *Hypertension* 35.1 (2000), S. 470–475. ISSN: 0194-911X. DOI: 10.1161/01.hyp.35.1.470.
- [27] Kunal Gangwal *et al.* „Microsatellites as EWS/FLI response elements in Ewing’s sarcoma“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105.29 (2008), S. 10149–10154. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.0801073105.
- [28] Hincó J. Gierman *et al.* „Domain-wide regulation of gene expression in the human genome“. In: *Genome Research* 17.9 (2007), S. 1286–1295. ISSN: 1088-9051. DOI: 10.1101/gr.6276007.
- [29] D. J. Gordon, M. Motwani und D. Pellman. „Modeling the initiation of Ewing sarcoma tumorigenesis in differentiating human embryonic stem cells“. In: *Oncogene* 35.24 (2016), S. 3092–3102. ISSN: 1476-5594. DOI: 10.1038/onc.2015.368.
- [30] Thomas G. P. Grünewald *et al.* „Chimeric EWSR1-FLI1 regulates the Ewing sarcoma susceptibility gene *EGR2* via a GGAA microsatellite“. In: *Nature Genetics* 47.9 (2015), S. 1073–1078. DOI: 10.1038/ng.3363.
- [31] Thomas G. P. Grünewald *et al.* „Ewing sarcoma“. In: *Nature Reviews Disease Primers* 4.5 (2018), S. 1–22. ISSN: 2056-676X. DOI: 10.1038/s41572-018-0003-x.
- [32] Noëlle Guillon *et al.* „The Oncogenic EWS-FLI1 Protein Binds *In Vivo* GGAA Microsatellite Sequences with Potential Transcriptional Activation Function“. In: *PLOS One* 4.3, e4932 (2009), S. 1–8. DOI: 10.1371/journal.pone.0004932.
- [33] Steinbjørn Hansen *et al.* „The Prognostic Value of Angiogenesis by Chalkley Counting in a Confirmatory Study Design on 836 Breast Cancer Patients“. In: *Clinical Cancer Research* 6.1 (2000), S. 139–146. ISSN: 1078-0432.
- [34] Debbie L. Hay. „What makes a CGRP₂ receptor?“ In: *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 34.10 (2007), S. 963–971. ISSN: 0305-1870. DOI: 10.1111/j.1440-1681.2007.04703.x.

- [35] Debbie L. Hay und Christopher S. Walker. „CGRP and its receptors“. In: *Headache* 57.4 (2017), S. 625–636. ISSN: 0017-8748. DOI: 10.1111/head.13064.
- [36] Debbie L. Hay, Christopher S. Walker und David R. Poyner. „Adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide receptors in endocrine-related cancers: opportunities and challenges“. In: *Endocrine-Related Cancer* 18.1 (2011), S. C1–C14. ISSN: 1351-0088. DOI: 10.1677/ERC-10-0244.
- [37] Carl Maximilian Hommelsheim *et al.* „PCR amplification of repetitive DNA: a limitation to genome editing technologies and many other applications“. In: *Scientific Reports* 4, 5052 (2014). ISSN: 2045-2322. DOI: 10.1038/srep05052.
- [38] J. M. N. Hoovers *et al.* „High-Resolution Chromosomal Localization of the Human Calcitonin/CGRP/IAPP Gene Family Members“. In: *Genomics* 15.3 (1993), S. 525–529. ISSN: 0888-7543. DOI: 10.1006/geno.1993.1104.
- [39] J. W. M. Höppener *et al.* „Expression of the Second Calcitonin/Calcitonin Gene-Related Peptide Gene in Ewing Sarcoma Cell Lines“. In: *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 64.4 (1987), S. 809–817. DOI: 10.1210/jcem-64-4-809.
- [40] Rafael A. Irizarry *et al.* „Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data“. In: *Biostatistics* 4.2 (2003), S. 249–264. ISSN: 1465-4644. DOI: 10.1093/biostatistics/4.2.249.
- [41] Smriti Iyengar *et al.* „CGRP and the Trigeminal System in Migraine“. In: *Headache* 59.5 (2019), S. 659–681. ISSN: 0017-8748. DOI: 10.1111/head.13529.
- [42] Shilpa Jain *et al.* „Molecular classification of soft tissue sarcomas and its clinical applications“. In: *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 3.4 (2010), S. 416–429. ISSN: 1936-2625.
- [43] David T. W. Jones *et al.* „Molecular characteristics and therapeutic vulnerabilities across paediatric solid tumours“. In: *Nature Reviews Cancer* (2019). ISSN: 1474-1768. DOI: 10.1038/s41568-019-0169-x.
- [44] Peter Kaatsch und Claudia Spix. *Jahresbericht 2015. (1980-2014)*. Deutsches Kinderkrebsregister, Johannes Gutenberg Universität Mainz, 2015.
- [45] Yukiko Kawanami *et al.* „Calcitonin gene-related peptide stimulates proliferation of alveolar epithelial cells“. In: *Respiratory Research* 10, 8 (2009), S. 1–8. ISSN: 1465-993X. DOI: 10.1186/1465-9921-10-8.
- [46] Max M. L. Knott, Marlene Dallmayer und Thomas G. P. Grünewald. „Next steps in preventing Ewing sarcoma progression“. In: *Future Oncology* 12.1 (2016), S. 1–4. ISSN: 1479-6694. DOI: 10.2217/fon.15.298.
- [47] Ruth Ladenstein *et al.* „Primary Disseminated Multifocal Ewing Sarcoma: Results of the Euro-EWING 99 Trial“. In: *Journal of Clinical Oncology* 28.20 (2010), S. 3284–3291. DOI: 10.1200/JCO.2009.22.9864.

-
- [48] Marie-Cécile Le Deley *et al.* „Impact of EWS-ETS Fusion Type on Disease Progression in Ewing’s Sarcoma/Peripheral Primitive Neuroectodermal Tumor: Prospective Results From the Cooperative Euro-E.W.I.N.G. 99 Trial“. In: *Journal of Clinical Oncology* 28.12 (2010), S. 1982–1988. DOI: 10.1200/JCO.2009.23.3585.
- [49] Siwen Hu-Lieskovan *et al.* „EWS-FLI1 Fusion Protein Up-regulates Critical Genes in Neural Crest Development and Is Responsible for the Observed Phenotype of Ewing’s Family of Tumors“. In: *Cancer Research* 65.11 (2005), S. 4633–4644. ISSN: 0008-5472. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2857.
- [50] Kenneth J. Livak und Thomas D. Schmittgen. „Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method“. In: *Methods* 25.4 (2001), S. 402–408. ISSN: 1046-2023. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
- [51] Mitchell J. Machiela *et al.* „Genome-wide association study identifies multiple new loci associated with Ewing sarcoma susceptibility“. In: *Nature Communications* 9.1, 3184 (2018). DOI: 10.1038/s41467-018-05537-2.
- [52] Carlos Mackintosh *et al.* „The molecular pathogenesis of Ewing sarcoma“. In: *Cancer Biology & Therapy* 9.9 (2010), S. 655–667. DOI: 10.4161/cbt.9.9.11511.
- [53] Linda M. McLatchie *et al.* „RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor“. In: *Nature* 393.6683 (1998), S. 333–339. DOI: 10.1038/30666.
- [54] Hermann L. Müller. „Onkologie“. In: *Klinikleitfaden Pädiatrie*. Hrsg. von Stephan Illing und Martin Claßen. 9. Aufl. München: Elsevier GmbH, 2014. Kap. 18, S. 603–622. ISBN: 978-3-437-22254-2. DOI: 10.1016/B978-3-437-22254-2.00018-8.
- [55] Hee Chul Park *et al.* „Alteration of cancer pain-related signals by radiation: Proteomic analysis in an animal model with cancer bone invasion“. In: *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics* 61.5 (2005), S. 1523–1534. ISSN: 0360-3016. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2004.12.070.
- [56] Sophie Postel-Vinay *et al.* „Common variants near TARDBP and EGR2 are associated with susceptibility to Ewing sarcoma“. In: *Nature Genetics* 44.3 (2012), S. 323–327. DOI: 10.1038/ng.1085.
- [57] Donna Przepiorka *et al.* „The human calcitonin gene is located on the short arm of chromosome 11“. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 120.2 (1984), S. 493–499. DOI: 10.1016/0006-291X(84)91281-6.
- [58] Arvind Rajwanshi, Radhika Srinivas und Gautam Upasana. „Malignant small round cell tumors“. In: *Journal of Cytology* 26.1 (2009), S. 1–10. ISSN: 0970-9371. DOI: 10.4103/0970-9371.54861.

- [59] Peter Reichardt. „Malignome der Weichteile und der Knochen“. In: *Facharztwissen Hämatologie Onkologie*. Hrsg. von Kurt Possinger, Anne Constanze Regierer und Jan Eucker. 4. Aufl. München: Elsevier GmbH, 2017. Kap. 22, S. 881–908. ISBN: 978-3-437-21214-7. DOI: 10.1016/B978-3-437-21214-7.00022-5.
- [60] W. Remmele und H. E. Stegner. „Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe“. In: *Der Pathologe* 8.3 (1987), S. 138–140. ISSN: 0172-8113.
- [61] Nicolò Riggi *et al.* „EWS-FLI1 Utilizes Divergent Chromatin Remodeling Mechanisms to Directly Activate or Repress Enhancer Elements in Ewing Sarcoma“. In: *Cancer Cell* 26.5 (2014), S. 668–681. ISSN: 1878-3686. DOI: 10.1016/j.ccell.2014.10.004.
- [62] C. Rubinstein *et al.* „Elevated plasma calcitonin gene-related peptide and the symptoms associated with medullary thyroid cancer“. In: *The Australian and New Zealand Journal of Surgery* 62.11 (1992), S. 892–896. ISSN: 0004-8682. DOI: 10.1111/j.1445-2197.1992.tb06945.x.
- [63] Fiona A. Russell *et al.* „Calcitonin Gene-Related Peptide: Physiology and Pathophysiology“. In: *Physiological Reviews* 94.4 (2014), S. 1099–1142. DOI: 10.1152/physrev.00034.2013.
- [64] Suvi Savola *et al.* „High Expression of Complement Component 5 (C5) at Tumor Site Associates with Superior Survival in Ewing’s Sarcoma Family of Tumour Patients“. In: *ISRN Oncology* 2011, 168712 (2011), S. 1–10. DOI: 10.5402/2011/168712.
- [65] Mark Schena *et al.* „Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray“. In: *Science* 270.5235 (1995), S. 467–470. ISSN: 0036-8075. DOI: 10.1126/science.270.5235.467.
- [66] Katia Scotlandi *et al.* „Overcoming Resistance to Conventional Drugs in Ewing Sarcoma and Identification of Molecular Predictors of Outcome“. In: *Journal of Clinical Oncology* 27.13 (2009), S. 2209–2216. DOI: 10.1200/JCO.2008.19.2542.
- [67] Daria Shlyueva, Gerald Stampfel und Alexander Stark. „Transcriptional enhancers: from properties to genome-wide predictions“. In: *Nature Reviews Genetics* 15.4 (2014), S. 272–286. DOI: 10.1038/nrg3682.
- [68] P. H. Steenbergh *et al.* „A second human calcitonin/CGRP gene“. In: *FEBS Letters* 183.2 (1985), S. 403–407. ISSN: 0014-5793. DOI: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(85\)80820-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(85)80820-6).
- [69] P. H. Steenbergh *et al.* „Structure and expression of the human calcitonin/CGRP genes“. In: *FEBS Letters* 209.1 (1986), S. 97–103. ISSN: 0014-5793. DOI: 10.1016/0014-5793(86)81091-2.

-
- [70] Aravind Subramanian *et al.* „Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102.43 (2005), S. 15545–15550. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.0506580102.
- [71] J. R. Tippins. „CGRP: A novel neuropeptide from the calcitonin gene is the most potent vasodilator known“. In: *Journal of Hypertension. Supplement* 4.5 (1986), S102–5. ISSN: 0952-1178.
- [72] Masaya Toda *et al.* „Neuronal system-dependent facilitation of tumor angiogenesis and tumor growth by calcitonin gene-related peptide“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105.36 (2008), S. 13550–13555. DOI: 10.1073/pnas.0800767105.
- [73] F. van Valen, E. Keck und Heribert Jürgens. „Functional characteristics of calcitonin gene-related peptide receptors in human Ewing’s sarcoma WE-68 cells“. In: *FEBS Letters* 256.1–2 (1989), S. 170–174. ISSN: 0014-5793. DOI: 10.1016/0014-5793(89)81742-9.
- [74] Samuel L. Volchenboum *et al.* „Gene expression profiling of Ewing sarcoma tumours reveals the prognostic importance of tumour–stromal interactions: a report from the Children’s Oncology Group“. In: *The Journal of Pathology: Clinical Research* 1.2 (2015), S. 83–94. ISSN: 2056-4538. DOI: 10.1002/cjp2.9.
- [75] Paul W. Wacnik *et al.* „Tumor-induced mechanical hyperalgesia involves CGRP receptors and altered innervation and vascularization of DsRed2 fluorescent hindpaw tumors“. In: *Pain* 115.1 (2005), S. 95–106. ISSN: 0304-3959. DOI: 10.1016/j.pain.2005.02.024.
- [76] Susan Wee *et al.* „PTEN-deficient cancers depend on PIK3CB“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105.35 (2008), S. 13057–13062. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.0802655105.
- [77] Dmitri Wiederschain *et al.* „Single-vector inducible lentiviral RNAi system for oncology target validation“. In: *Cell Cycle* 8.3 (2009), S. 498–504. DOI: 10.4161/cc.8.3.7701.
- [78] Sunil J. Wimalawansa. „Calcitonin Gene-Related Peptide and Its Receptors: Molecular Genetics, Physiology, Pathophysiology, and Therapeutic Potentials“. In: *Endocrine Reviews* 17.5 (Okt. 1996), S. 533–585. ISSN: 0163-769X. DOI: 10.1210/edrv-17-5-533.
- [79] Sunil J. Wimalawansa *et al.* „Isolation, purification and characterization of β -hCGRP from human spinal cord“. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 167.3 (1990), S. 993–1000. ISSN: 0006-291X. DOI: 10.1016/0006-291X(90)90621-S.
- [80] Jennifer Worch *et al.* „Ethnic and racial differences in patients with Ewing sarcoma“. In: *Cancer* 116.4 (2010), S. 983–988. ISSN: 0008-543X. DOI: 10.1002/cncr.24865.

- [81] Mone Zaidi *et al.* „The Calcitonin Gene Peptides: Biology and Clinical Relevance“. In: *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 28.2 (1990), S. 109–174. ISSN: 1040-8363. DOI: 10.3109/10408369009105900.
- [82] Shuai Zheng *et al.* „Calcitonin gene-related peptide promotes angiogenesis via AMP-activated protein kinase“. In: *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 299.6 (2010), S. C1485–C1492. DOI: 10.1152/ajpcell.00173.2010.
- [83] Romain Zufferey *et al.* „Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo“. In: *Nature Biotechnology* 15.9 (1997), S. 871–875. ISSN: 1087-0156. DOI: 10.1038/nbt0997-871.

Danksagung

Ein großer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Thomas G. P. Grünewald, PhD für die Überlassung des Promotionsthemas, die Finanzierung des Projekts und die enge wissenschaftliche Betreuung. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Thomas Kirchner für die Mitbetreuung und die zur Verfügung gestellten Räumlichkeiten und Geräte. Ein großer Dank gilt auch den Mitarbeitern der AG Grünewald. Hier ist insbesondere die Unterstützung durch Rebeca Alba Rubio, Jing Li, Tilman Hölting und Dr. Shunya Ohmura bei der Umsetzung der *in vitro* und *in vivo* Versuche hervorzuheben. Darüber hinaus möchte ich Manuela Urbischek, Aruna Marchetto, Giuseppina Sannino, PhD und Frau Pascale Gilardi-Hebenstreit für die Unterstützung bei den Klonierungsarbeiten danken. Michaela Baldauf danke ich für die Hilfe durch bioinformatische Analysen und die darüber hinausgehende Beratung. Ein weiterer Dank gilt Frau Sendelhofert und Frau Heier für die Anfertigung der immunhistochemischen Färbungen, sowie Herrn Horacio Bach, PhD für die Durchführung der Massenspektrometrie. Julian Musa, Dr. Martin Orth und Max Knott danke ich für die wissenschaftliche Beratung und Unterstützung.

Dieses Projekt wurde durch ein Promotionsstipendium der „Deutschen Stiftung für junge Erwachsene mit Krebs“ gefördert. Ich möchte den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der „Deutschen Stiftung für junge Erwachsene mit Krebs“ herzlich für ihr Engagement danken, welches weit über die reine finanzielle Unterstützung hinausging.

Einen großen Dank möchte ich auch Jörg Olschewski für die Beratung und die große Hilfe bei der Erstellung dieses Manuskripts aussprechen. Meiner Mutter, Beate Dallmayer, danke ich für die umfangreichen Korrekturen. Abschließend danke ich ganz besonders meinen Eltern, Beate und Wolfgang Dallmayer, meinem Bruder, Vitus Dallmayer, und Jörg Olschewski für den anhaltenden Zuspruch und die kontinuierliche Unterstützung während der Zeit meines Studiums und der Durchführung dieser wissenschaftlichen Arbeit.

Abkürzungsverzeichnis

ADM	Adrenomedullin
CALCA	Calcitonin related polypeptide α
CALCB	Calcitonin related polypeptide β
CALCR	Calcitonin receptor
CALCRL	Calcitonin receptor like receptor
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CAR	Chimeric antigen receptor
cDNA	Complementary DNA
CDF	Chip Description File
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CGRP1	Calcitonin gene-related peptide 1
CGRP2	Calcitonin gene-related peptide 2
ChIP-Seq	Chromatin-immunoprecipitation followed by sequencing
CTR	Calcitonin-Rezeptor
DNA	Deoxyribonucleic acid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBI	European Bioinformatics Institute
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENCODE	Encyclopedia of DNA Elements
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
EWSR1	EWS RNA binding protein 1
FBS	Fetal bovine Serum
FC	Fold change
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FLI1	Fli-1 proto-oncogene, ETS transcription factor
GEO	Gene Expression Omnibus
GSEA	Gene set enrichment analysis
H3K4me1	Methylierung des Lysin-4 im Histon 3
H3K27ac	Acetylierung des Lysin-27 im Histon 3
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF-1 α	Hypoxia inducible factor 1 subunit α
IAPP	Islet amyloid polypeptide (Amylin)
IRS	Immunreaktiver Score
mRNA	Messenger RNA

MSigDB	Molecular signatures database
NGS	Next-generation sequencing
NUSE	Normalized Unscaled Standard Error
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PD-1	Programmed cell death protein 1
PD-L1	Programmed cell death 1 ligand 1
qRT-PCR	Real time quantitative polymerase chain reaction
RAMP1/-2/-3	Receptor activity modifying protein 1/-2/-3
RLE	Relative Log Expression
RMA	Robust Multi-array Average
RNA	Ribonucleic acid
SEM	Standard error of the mean
shRNA	Small hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA
SST	Signal Space Transformation
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TMA	Tissue-Microarray
UCSC	University of California, Santa Cruz
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor