

Cornelius Funk
Dr. med.

Characterization of chromosome 8 gain and EIF4EBP1 overexpression in Ewing sarcoma

Fach/ Einrichtung: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)
Doktorvater: Prof. Dr. Dr. med. Thomas Grünewald

Das Ewing-Sarkom ist ein seltener bösartiger Tumor, der vor allem Knochen und Weichteilgewebe befällt und am häufigsten bei Kindern und jungen Erwachsenen auftritt. Es ist genetisch durch ein pathognomonisches Fusionsprotein charakterisiert, am häufigsten *EWSR1::FLI1*. Das Fusionsprotein wirkt im Ewing-Sarkom als aberranter Transkriptionsfaktor und dereguliert hunderte Gene, unter anderem durch die Umwandlung von GGAA-Mikrosatelliten in de novo-Enhancer-Elemente. Neben dem Fusionsonkogen ist eine Amplifikation des Chromosoms 8 die zweithäufigste wiederkehrende somatische Veränderung im Ewing-Sarkom. Allerdings ist die genaue funktionelle Relevanz einer Chromosom-8-Amplifikation im Ewing-Sarkom bisher unklar. Das Ziel dieser Arbeit war es daher, die prognostischen und funktionellen Auswirkungen von Chromosom-8-Amplifikationen im Ewing-Sarkom zu untersuchen sowie potenzielle Gene zu charakterisieren, die eine mögliche Wirkung einer Chromosom-8-Amplifikation vermitteln. Anhand einer Kohorte von 196 Ewing-Sarkom-Proben (Kohorte 1) konnte gezeigt werden, dass eine Genexpressionssignatur, die auf eine Chromosom-8-Amplifikation hinweist, signifikant mit einem schlechteren Gesamtüberleben von Ewing-Sarkom-Patienten verbunden ist. Eine Analyse innerhalb der Kohorte 1 ergab, dass das Gen *EIF4EBP1* von allen erfassten Chromosom-8-Genen am stärksten mit einem schlechten Gesamtüberleben der Patienten assoziiert ist. Eine weitere Analyse kuratierter Expressionsdaten verdeutlichte, dass *EIF4EBP1* in Ewing-Sarkomen im Vergleich zu normalem Gewebe deutlich überexprimiert ist. Dementsprechend wurden Mechanismen der Ewing-Sarkom-spezifischen *EIF4EBP1*-Überexpression untersucht. Hierbei bestätigte die Analyse einer zweiten Kohorte, dass eine Chromosom-8-Amplifikation mit höheren intratumoralen *EIF4EBP1*-Expressionsleveln in Ewing-Sarkom-Patientenproben verbunden ist. Des weiteren bestätigte eine Analyse öffentlicher Genexpressionsdaten von Ewing-Sarkom-Zelllinien mit und ohne *EWSR1::FLI1*-Knockdown, dass die *EIF4EBP1*-Expression konkomitant zu *EWSR1::FLI1* herunterreguliert wurde. In diesem Zusammenhang zeigten Luciferase-Assays, dass ein an *EWSR1::FLI1* gebundener GGAA-Mikrosatellit in der Nähe des *EIF4EBP1*-Genkörpers Enhancer-Aktivität aufweist. Diese Ergebnisse legen nahe,

dass die *EIF4EBP1*-Expression in Ewing-Sarkomen sowohl durch eine Chromosom-8-Amplifikation als auch durch die Bindung von EWSR1::FLI1 an einen nahegelegenen GGAA-Mikrosatelliten beeinflusst wird. Um die funktionelle Rolle von EIF4EBP1 zu untersuchen, wurde ein Knockdown von EIF4EBP1 durch RNA-Interferenz in drei Ewing-Sarkom-Zelllinien durchgeführt. Der Knockdown von EIF4EBP1 verringerte die Proliferation, die Klonogenität und das sphäroide Wachstum *in vitro* signifikant. Darüber hinaus verringerte der Knockdown von EIF4EBP1 das Tumorwachstum von subkutanen sowie orthotopen Ewing-Sarkom-Xenografts *in vivo* signifikant. Proteomische und transkriptomische Analysen von drei Ewing-Sarkom-Zelllinien mit und ohne EIF4EBP1-Knockdown zeigten, dass EIF4EBP1 ein multifunktionales Protein-Netzwerk beeinflusst, zu dem Proteine der RNA-Verarbeitung, Translationsregulation und Chromatinmodifikation gehören. Ein 3D-Wirkstoffscreening mit 60 verschiedenen Wirkstoffen sowie *in vitro*-Wirkstoffsensitivitätstests zeigten daraufhin, dass eine hohe *EIF4EBP1*-Expression Ewing-Sarkom-Zellen für eine gezielte CDK4/6-Inhibition mit Palbociclib und Ribociclib sensibilisiert. Die Wirksamkeit einer Palbociclib-Behandlung von Ewing-Sarkom-Zellen wurde abschließend *in vivo* bestätigt. Diese Arbeit stellt einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Amplifikation des Chromosoms 8 und einem ungünstigen Krankheitsphänotyp in Ewing-Sarkomen her. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein solcher Effekt durch die Überexpression des Gens *EIF4EBP1* vermittelt wird, welches in Ewing-Sarkomen sowohl aufgrund seiner Position auf Chromosom 8 als auch möglicherweise durch die Hochregulierung durch EWSR1::FLI1 stark überexprimiert ist. *EIF4EBP1* weist in Ewing-Sarkomen onkogene Eigenschaften auf, da es die Tumorigenität positiv beeinflusst und zudem ein breites und multifunktionales Netzwerk an Proteinen dereguliert. Gleichzeitig sensibilisiert eine hohe *EIF4EBP1*-Expression Ewing-Sarkom-Zellen für eine CDK4/6-Inhibition. Zusammenfassend deuten diese Daten darauf hin, dass Chromosom-8-Amplifikationen und *EIF4EBP1*-Expressionslevel als prädiktive Marker in Ewing-Sarkomen dienen könnten. Da etwa 50% der Ewing-Sarkome eine Chromosom-8-Amplifikation aufweisen, könnte eine zytogenetische Testung auf Chromosom-8-Amplifikationen die Risikostratifizierung von Patienten verbessern. Ebenso könnte die Bewertung der *EIF4EBP1*-Expressionshöhe bei der Anpassung der therapeutischen Behandlung helfen, zum Beispiel durch die Einteilung von Ewing-Sarkom-Patienten in CDK4/6-Inhibitions-sensitive und nicht-sensitive Gruppen. Zusammenfassend liefert diese Arbeit wichtige Hinweise für eine neue therapeutische Strategie in Chromosom-8-amplifizierten, *EIF4EBP1*-überexprimierenden Tumoren.