

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN I
PROF. DR. MED. MARTINA MÜLLER-SCHILLING
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Ein genomweites CRISPR/Cas9-Screening identifiziert den
Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) als epigenetischen
Regulator des Dimethylfumarat-induzierten Zelltods in Tumoren
mit konstitutiver NF- κ B-Aktivierung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Jan Peter Teubner

2025

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN I
PROF. DR. MED. MARTINA MÜLLER-SCHILLING
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Ein genomweites CRISPR/Cas9-Screening identifiziert den
Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) als epigenetischen
Regulator des Dimethylfumarat-induzierten Zelltods in Tumoren
mit konstitutiver NF- κ B-Aktivierung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Jan Peter Teubner

2025

Dekan: Prof. Dr. med. Dipl.-Phys. Dirk Hellwig

Berichterstattein: Prof. Dr. med. Martina Müller-Schilling, MHBA

2. Berichterstattein: Prof. Dr. med. Christina Hackl

Tag der mündlichen Prüfung: 17.11.2025

Die Inhalte dieser Dissertationsschrift wurden im *The FEBS Journal* unter folgendem Titel veröffentlicht:

CRISPR-Cas9 screen reveals histone-3 methylation as a sensitizer for dimethyl fumarate-induced death of malignant T cells

Jan P. Teubner^{1*}, Deniz Tümen^{1*}, Arne Kandulski¹, Philipp Heumann¹, Patricia Mester-Pavel¹, Elisabeth Aschenbrenner¹, Barbara Volz¹, Tobias Hein², Florian Voll³, Marina Kreuz³, Claudia Kunst¹, Jan P. Nicolay², Martina Müller¹ and Karsten Gölzow^{1*}

¹ Department of Internal Medicine I, Gastroenterology, Hepatology, Endocrinology, Rheumatology, and Infectious Diseases, University Hospital Regensburg, Regensburg, Germany.

² Department of Dermatology, Venereology and Allergology, University Medical Center Mannheim/ University of Heidelberg, Mannheim, Germany.

³ Department of Internal Medicine III, Hematology and Oncology, University Hospital Regensburg, Regensburg, Germany

* Equal contribution

* Corresponding author

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	<i>Pathogenese maligner Erkrankungen.....</i>	5
1.2	<i>Therapie maligner Erkrankungen.....</i>	7
1.2.1	Chemotherapien zur Behandlung maligner Erkrankungen	7
1.2.2	Zielgerichtete Therapien.....	7
1.2.3	Drug Sensitizer	9
1.3	<i>Genomweites CRISPR-Cas9 basiertes Screening</i>	10
1.3.1	Das CRISPR/Cas9-System.....	10
1.3.2	CRISPR/Cas9 Screening	11
1.4	<i>Die zentrale Rolle des NF-κB-Signalwegs in Tumoren</i>	12
1.5	<i>Das kutane T-Zell-Lymphom.....</i>	13
1.6	<i>Die T-Zell akute lymphoblastische Leukämie (T-ALL)</i>	15
1.7	<i>Dimethylfumarat (DMF).....</i>	16
1.8	<i>Fragestellung</i>	19
2	Methoden	20
2.1	<i>Molekularbiologische Methoden und Klonierung</i>	20
2.1.1	Primer- und Gendesign	20
2.1.2	PCR zur molekularen Klonierung.....	20
2.1.3	DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen	20
2.1.4	DNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	20
2.1.5	DNA-Ligation und Gibson-Assembly.....	21
2.1.6	Bakterielle Transformation und Kultivierung.....	21
2.1.7	Plasmid-DNA-Aufreinigung und Sequenzierung	21
2.2	<i>Zellkultur und zellbiologische Methoden</i>	22
2.2.1	Zellkultur	22
2.2.2	Zelluläre Transfektion.....	22
2.2.3	Herstellung lentiviraler Konstrukte.....	22
2.2.4	Transduktionseffizienz.....	23
2.2.5	Erstellung einer stabilen monoklonalen Cas9-Zelllinie.....	23
2.2.6	Erstellung einer stabilen polyklonalen GFP-Zelllinie	24
2.2.7	EZH2-Knockout Zellen	24
2.2.8	Competition Assay	24
2.2.9	Apoptose Assay	25
2.3	<i>Genomweites CRISPR/Cas9 Knockout Screening.....</i>	26

2.3.1	Screening	26
2.3.2	Next Generation Sequencing (NGS)	28
2.3.3	Bioinformatische Analyse	28
2.4	<i>Proteinbiochemische Methoden</i>	29
2.4.1	Western Blot	29
2.5	<i>Statistische Analysen</i>	31
3	Ergebnisse	32
3.1	<i>Genomweites CRISPR-Cas9 Knockout Screening</i>	32
3.1.1	Auswahl des Screening Systems	32
3.1.2	Erstellung einer stabilen Cas9-exprimierenden Zelllinie	33
3.1.3	Genomweites CRISPR Cas9 Knockout Screening	34
3.1.4	Bioinformatische Analyse zur Identifikation von Drug Sensitizern	37
3.1.5	EZH2 als vielversprechender DMF Sensitizer	42
3.2	<i>Validierung der Screening-Ergebnisse</i>	44
3.2.1	CRISPR-vermittelte Validierung von EZH2 als Drug Sensitizer	44
3.3	<i>Etablierung einer Kombinationstherapie</i>	48
3.3.1	EZH2-Inhibition durch Tazemetostat verstärkt DMF-induzierten Zelltod	48
3.3.2	DMF-Sensitivierung durch Inhibition verschiedener PRC2-Komponenten	52
4	Diskussion	56
5	Zusammenfassung	70
6	Anhang	72
7	Literaturverzeichnis	75
8	Abkürzungsverzeichnis	87
9	Danksagung	89

1 Einleitung

1.1 Pathogenese maligner Erkrankungen

Der Begriff maligne Erkrankung bezeichnet in der Regel neoplastische Entartungen von Zellen unterschiedlicher Gewebe. Während sich solide Tumoren durch eine unkontrollierte Proliferation von Gewebszellen, wie beispielsweise Epithelzellen, auszeichnen, gehen Leukämien und Lymphome aus Zellen des hämatopoetischen Systems hervor.^{1,2} Diese malignen Erkrankungen betreffen insbesondere Vorläuferzellen der myeloischen oder lymphatischen Zellreihen und führen zu einer gestörten Blutbildung sowie einer krankhaften Akkumulation unreifer oder dysfunktionaler Blutzellen.³ Neoplasien entstehen durch eine unkontrollierte und überschießende Vermehrung von Zellen, die nicht mehr den normalen Regulationsmechanismen des Körpers unterliegen.⁴ Unter physiologischen Bedingungen durchlaufen Zellen einen streng kontrollierten Zyklus aus Wachstum, Teilung und programmiertem Zelltod (u.a. Apoptose), um das Gleichgewicht innerhalb von Geweben aufrechtzuerhalten.⁵ Dieser Zyklus wird durch eine Vielzahl von Signalen gesteuert, die das Zellwachstum entweder fördern oder hemmen.⁶ Dabei sorgen Zellreparaturmechanismen und das Immunsystem kontinuierlich dafür, dass fehlerhafte oder geschädigte Zellen erkannt und eliminiert werden. Wird dieser fein abgestimmte Prozess jedoch durch genetische oder epigenetische Veränderungen gestört, kann es zur Entstehung einer Neoplasie kommen.⁷

Der Ursprung einer Neoplasie liegt meist in genetischen Veränderungen, sogenannten Mutationen, die in bestimmten Genen auftreten.⁸ Diese betreffen häufig drei zentrale Gruppen von Genen: Proto-Onkogene, Tumorsuppressorgene und Reparaturgene. Proto-Onkogene sind Gene, die das Zellwachstum und die Zellteilung regulieren.⁹ Wenn sie durch eine Mutation dauerhaft aktiviert werden, können sie sich in sogenannte Onkogene verwandeln, die das Wachstum der Zelle unkontrolliert vorantreiben. Tumorsuppressorgene hingegen wirken normalerweise als eine Art „Bremse“ für das Zellwachstum, indem sie fehlerhafte Zellen in den programmierten Zelltod überführen oder deren Vermehrung stoppen.¹⁰ Ein prominentes Beispiel für ein Tumorsuppressorgen ist p53, das als „Wächter des Genoms“ bezeichnet wird, da es bei DNA-Schäden den Zellzyklus stoppt oder Apoptose einleitet, um die Integrität des Genoms zu bewahren.^{11–18} Wird ein solches Gen durch eine Mutation inaktiviert, fehlt

diese Schutzfunktion, und betroffene Zellen können sich ungehindert teilen.¹⁹ Reparaturgene sind für die Korrektur von DNA-Schäden verantwortlich.²⁰ Wenn diese ausfallen, können Mutationen unkontrolliert akkumulieren und die Krebsentstehung weiter begünstigen.²¹

Neben genetischen Mutationen spielen auch epigenetische Veränderungen eine bedeutende Rolle in der Tumorentstehung.⁷ Hierbei handelt es sich um Mechanismen, die ohne Veränderung der DNA-Sequenz die Aktivität von Genen steuern. Eine Fehlregulation dieser epigenetischen Mechanismen kann dazu führen, dass Gene, die normalerweise das Zellwachstum kontrollieren, dauerhaft abgeschaltet werden oder sich Onkogene verstärkt exprimieren.²² Ein Beispiel hierfür ist die DNA-Methylierung, bei der bestimmte chemische Markierungen auf die DNA aufgebracht werden, wodurch Gene stillgelegt werden können.²³ Eine Fehlregulation der DNA-Methylierung ist in vielen Krebserkrankungen nachweisbar und kann zur Entstehung und Progression der Erkrankung beitragen.²⁴

Ob eine Neoplasie als gutartig (benigne) oder bösartig (maligne) eingestuft wird, hängt von mehreren Faktoren ab. Benigne Tumore wachsen meist langsam, sind in der Regel klar begrenzt und dringen nicht in umliegendes Gewebe ein. Obwohl sie in manchen Fällen durch ihre Größe oder Lage Beschwerden verursachen können, neigen sie nicht zur Streuung und sind häufig durch eine chirurgische Entfernung heilbar.⁴ Maligne Tumore hingegen zeichnen sich durch ein unkontrolliertes Wachstum und die Fähigkeit aus, in umliegendes Gewebe einzudringen (Invasion). Sie können zudem Zellen ins Blut- oder Lymphsystem abgeben, wodurch sich Tochtergeschwülste, sogenannte Metastasen, in entfernten Organen bilden können.²⁵ Dieser Prozess, die Metastasierung, ist charakteristisch für Krebserkrankungen und macht sie besonders schwer behandelbar.

Die Entwicklung einer malignen Neoplasie erfolgt oft nicht plötzlich, sondern in mehreren Phasen, die als Tumorprogression bezeichnet werden.⁸ Zunächst führt eine initiale genetische Veränderung zu einer gesteigerten Zellproliferation, was als Initiation bezeichnet wird. In der darauffolgenden Promotion-Phase kommt es durch zusätzliche Mutationen zu einer weiteren Wachstumssteigerung und zur Ausbildung einer genetisch heterogenen Zellpopulation.²⁶ Die endgültige Progression ist

gekennzeichnet durch eine zunehmende Unkontrollierbarkeit des Zellwachstums, die Ausbildung einer resistenten Zellklone und die Fähigkeit zur Metastasierung.²⁷

1.2 Therapie maligner Erkrankungen

1.2.1 Chemotherapien zur Behandlung maligner Erkrankungen

Die medikamentöse Behandlung maligner Erkrankungen basiert lange Zeit auf der gezielten Hemmung von Zellproliferation.²⁸ Diese Wirkstoffe lassen sich in verschiedene Klassen unterteilen, die jeweils in spezifische Mechanismen der Zellteilung eingreifen. Alkylierende Substanzen wie Cyclophosphamid oder Cisplatin führen zu DNA-Quervernetzungen und verhindern so die korrekte Replikation und Transkription der DNA, was letztlich zu Zellzyklusarrest und Apoptose führt.²⁹ Antimetabolite wie Methotrexat oder 5-Fluorouracil (5-FU) wirken durch die Hemmung essenzieller Enzyme des Nukleotidstoffwechsels.³⁰ Dies führt zu einem „falschen“ Einbau von Nukleotiden in die DNA und RNA, was eine fehlerhafte Replikation zur Folge hat. Topoisomerase-Hemmer wie Irinotecan oder Etoposid binden reversibel an DNA-Topoisomerase-Komplexe und führen zu stabilisierten Einzel- oder Doppelstrangbrüchen.³¹

Eine Gemeinsamkeit und große Limitierung dieser Wirkstoffe ist ihre mangelnde Selektivität. Da klassische Chemotherapeutika auf grundlegende Zellteilungsmechanismen abzielen, werden nicht nur maligne, sondern auch gesunde, und hierbei vor allem sich schnell teilende Gewebe geschädigt. Dies betrifft insbesondere das hämatopoetische System, das gastrointestinale Epithel sowie Haarfollikel und äußert sich in Myelosuppression, Mukositis und Alopezie. Diese Nebenwirkungen limitieren nicht nur die Dosierung und Therapiedauer, sondern können auch zu Therapieabbrüchen führen, wodurch die Effektivität der Behandlung reduziert wird.³²

1.2.2 Zielgerichtete Therapien

Im Gegensatz zu den traditionellen ungerichteten Therapien liegt der Fokus moderner Krebstherapie auf zielgerichteten Therapieansätzen, sogenannter „targeted therapies“. Hierbei werden Wirkstoffe eingesetzt, die spezifisch gegen Zielstrukturen maligner Zellen gerichtet sind. Dies können spezielle Oberflächenmarker wie Cluster-of-Differentiation-Moleküle (CD-Moleküle) oder Zielstrukturen innerhalb des für die

ungerichtete Proliferation verantwortlichen Signalweges sein.³³ Durch ihre hohe Spezifität gegenüber malignen Zellen zeichnen sich zielgerichtete Therapien durch ein deutlich geringeres Nebenwirkungspotenzial im Vergleich zu konventionellen Behandlungsmethoden aus.³⁴

Zu dem Spektrum verwendeter Substanzen gehören neben monoklonalen Antikörpern wie beispielsweise Rituximab auch sogenannte Small Molecules (kleine Moleküle). Diese chemischen Verbindungen weisen in der Regel eine Molekularmasse von weniger als 900 Dalton auf und sind in der Lage intrazelluläre Prozesse zu beeinflussen, indem sie mit bestimmten Zielen wie Enzymen, Rezeptoren oder Proteinen interagieren.³⁵

Ein herausragendes Beispiel für eine zielgerichtete Therapie ist die Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie (CML). Hier gelang der Durchbruch mit der Identifikation des BCR-ABL-Fusionsgens, das durch eine chromosomale Translokation (Philadelphia-Chromosom) entsteht.³⁶ Dieses Onkogen codiert für eine konstitutiv aktive Tyrosinkinase, die eine unkontrollierte Proliferation myeloischer Zellen antreibt. Die Einführung von Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKIs) wie Imatinib (Glivec) markierte einen Wendepunkt in der Therapie.³⁷ Imatinib blockiert gezielt die Aktivität der BCR-ABL-Tyrosinkinase und verhindert so die Signalübertragung, die für das Überleben und Wachstum der malignen Zellen erforderlich ist.³⁸ Diese Therapie revolutionierte die Behandlung der CML, indem sie die Prognose der Patienten dramatisch verbesserte. Während die CML früher mit einer schlechten Überlebensrate assoziiert war, haben TKIs die Erkrankung für viele Betroffene in eine chronische, gut kontrollierbare Krankheit verwandelt.³⁹

Die Therapie der CML mit Tyrosinkinase-Inhibitoren kann als Blaupause zur modernen Behandlung maligner Erkrankungen dienen. Hierbei wird deutlich, dass ein Verständnis der Pathophysiologie und die Identifikation potenzieller therapeutischer Ziele die Grundbausteine moderner zielgerichteter Therapien darstellen.

Der große Vorteil zielgerichteter Therapien - die hohe Spezifität - kann auch gleichzeitig eine signifikante Limitation sein. Durch die spezifische Inhibition eines einzelnen Signalwegs kann es zu einer schnellen Resistenzentwicklung kommen,

wenn die Zellen in der Lage sind, den Signalweg zu entkoppeln oder alternative Wege zur Umgehung der Inhibition zu aktivieren.²⁸ Darüber hinaus beruhen viele maligne Entitäten pathophysiologisch nicht nur auf einem einzelnen entarteten Signalweg, sondern entstehen durch das Aufeinandertreffen mehrerer Mutationen und Dysregulationen. Die Inhibition eines einzelnen Signalwegs reicht in solchen Fällen häufig nicht aus, um die vollständige Suppression der malignen Proliferation zu erreichen.

Durch diese Limitationen wurde in den letzten Jahren der Fokus immer weiter auf sogenannte kombinierte zielgerichtete Therapien gelegt. Hierbei soll durch eine Kombination verschiedener spezifischer Wirkstoffe eine Resistenzentwicklung erschwert oder eine verbesserte zytostatische Wirkung der Therapie erreicht werden.⁴⁰

1.2.3 Drug Sensitizer

Neben der Kombination zweier unabhängiger zytotoxischer Wirkstoffe gewinnt die Entwicklung sogenannter „Drug Sensitizer“ zunehmend an Bedeutung. Dabei handelt es sich um pharmakologische oder molekulare Modulatoren, die gezielt die Empfindlichkeit maligner Zellen gegenüber einer bestimmten Therapie erhöhen. Sie greifen in zentrale Signalwege der Zellproliferation, des programmierten Zelltodes oder der zellulären Stressantwort ein und modulieren so die Reaktion der Tumorzellen auf den eigentlichen zytotoxischen Wirkstoff.

Ein wesentlicher Vorteil der Kombination von Drug Sensitizern mit etablierten Krebstherapien liegt in der Möglichkeit, die notwendige Wirkstoffdosis zu senken und damit therapieassoziierte Nebenwirkungen potenziell zu reduzieren. Während sie als Einzelwirkstoff typischerweise keine direkte zytotoxische Wirkung entfalten, können sie die Therapieeffizienz steigern, ohne die hohe Spezifität der zugrundeliegenden Therapie zu beeinträchtigen.^{41,42}

Die Identifikation und Entwicklung von Drug Sensitizern stellt daher einen vielversprechenden Ansatz dar, um die Wirksamkeit hochspezifischer Krebstherapien entscheidend zu steigern. Dies stellt einen bedeutenden Schritt in Richtung individualisierter, präziser und nebenwirkungsärmerer Krebstherapien dar.

1.3 Genomweites CRISPR-Cas9 basiertes Screening

1.3.1 Das CRISPR/Cas9-System

Die gezielte Modifikation des Erbguts stellt eine der größten Errungenschaften der Molekularbiologie dar und eröffnet neue Methoden im Bereich der Grundlagenforschung, Medizin und Biotechnologie. Möglich macht dies die Entdeckung und Beschreibung des CRISPR/Cas9-Systems durch Jinek et al. im Jahr 2012.⁴³ CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) basiert auf einem adaptiven Immunmechanismus von Bakterien und Archaea zur Abwehr viraler Infektionen, dessen zentrale Funktion es ist fremde DNA zu erkennen und gezielt durch Cas-Proteine zu spalten. Cong et al. ermöglichten es schließlich dieses System auch in eukaryotischen Zellen zu nutzen und entwickelten so eine leistungsfähige Methode spezifische genomische Sequenzen zu modifizieren.⁴⁴

Das CRISPR/Cas9-System besteht aus zwei entscheidenden Komponenten. Zum einen die bakterielle Endonuklease Cas9, die einen gezielten Doppelstrangbruch (DSB) der DNA vermittelt. Die andere Komponente ist die sogenannte single guide RNA (sgRNA), die an Cas9 bindet und die genaue DNA-Sequenz vorgibt, an der der Doppelstrangbruch durch das Cas9-Enzym gesetzt wird.⁴⁵ Die sgRNA besteht aus einer tracrRNA und einer crRNA. Während die tracrRNA die Bindung an Cas9 ermöglicht, enthält die crRNA eine 20-Nukleotid-lange Sequenz, die komplementär zur Ziel-DNA ist und so die spezifische Bindung an die genomische Zielregion vermittelt. Sie dirigiert somit Bindung an die DNA und gibt so den Ort der Doppelstrangbrüche vor. In der natürlichen bakteriellen CRISPR-Abwehr bestehen crRNA und tracrRNA aus separaten Molekülen. Für die Anwendung in eukaryotischen Zellen wurden diese zu einer synthetischen single guide-RNA (sgRNA) fusioniert, um die Handhabung zu vereinfachen.⁴⁶

Das gezielte Design der crRNA-Sequenz erlaubt die präzise Induktion von Doppelstrangbrüchen an spezifischen Genom-Regionen. Diese Brüche aktivieren zelluläre DNA-Reparaturmechanismen, insbesondere die Nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ) oder die homologe Rekombination (HDR), wodurch gezielte Genmodifikationen möglich werden. Beim NHEJ kommt es zu einer direkten Verknüpfung der DNA-Enden was häufig zu Insertionen oder Deletionen führt. Dies bedeutet wiederum eine Loss-of-Function-Mutation, was zu einem Funktionsverlust

des entsprechenden DNA-Abschnittes führt. Die HDR ermöglicht hingegen durch das zeitgleiche Einbringen einer Donor-DNA einen gezielten Genaustausch oder Korrektur.

1.3.2 CRISPR/Cas9 Screening

Das CRISPR/Cas9-System hat in den letzten Jahren nahezu alle Bereiche der medizinischen Forschung revolutioniert. Eine der herausragenden Anwendungen ist das CRISPR/Cas9-basierte Screening, bei dem Zellkulturen und tierische Modelle eingesetzt werden, um die Rolle von Genen und deren Produkten in Krankheitsprozessen zu untersuchen.⁴⁷ Durch den Einsatz großer sgRNA-Bibliotheken (Libraries) können die Auswirkungen unterschiedlicher Genmodifikationen systematisch und direkt miteinander verglichen werden. Hierbei spielen insbesondere Whole-Genome-Screenings eine herausragende Rolle. Die hier genutzten Bibliotheken enthalten sgRNAs, die Zielsequenzen für jeden codierenden Abschnitt des menschlichen Genoms enthalten. In einem Knock-Out-Screening werden so Doppelstrangbrüche mit anschließenden Loss-of-Function-Mutationen induziert. In einer Zellkultur, in der jede Zelle eine andere sgRNA erhält, kann so der Einfluss des Knockouts jedes einzelnen Gens auf eine spezifische Screening-Bedingung untersucht werden.⁴⁸

Nach Abschluss eines Screeningexperiments können die in den Zellen enthaltenen sgRNA-Sequenzen mittels PCR amplifiziert werden. Die Anzahl der resultierenden sgRNA-Amplikons korreliert direkt mit der Anzahl der Zellen, die die spezifische sgRNA enthalten. Auf diese Weise lässt sich das Proliferationsverhalten der Zellen beurteilen: sgRNAs aus Zellen mit schneller Proliferation werden gegenüber dem Durchschnitt überrepräsentiert, während sgRNAs aus langsamer proliferierenden Zellen unterrepräsentiert sind. Diese Analyse ermöglicht die Identifikation von sgRNAs und damit spezifischen Knockouts von Genen, die einen direkten Einfluss auf die Zellproliferation unter den jeweiligen experimentellen Bedingungen ausüben.

Genomweite Screenings werden dazu genutzt zelluläre Prozesse besser zu verstehen und neue therapeutische Ziele zu identifizieren.⁴⁹ Führt man ein genomweites Screening unter dem Selektionsdruck einer bereits etablierten zytotoxischen Therapie durch, können die Ergebnisse dazu genutzt werden potenzielle Drug Sensitizer zu

Identifizieren. Mithilfe diesen Systems konnten in den letzten Jahren neue zielgerichtete Therapien entwickelt und neue Kombinationstherapien etabliert werden.⁵⁰ Genomweite CRISPR/Cas9-Screenings bieten somit eine wertvolle Möglichkeit, neue Therapien für maligne Erkrankungen zu entwickeln und bestehende Therapien durch gezielte Drug Sensitizer zu verbessern.

1.4 Die zentrale Rolle des NF- κ B-Signalwegs in Tumoren

Eine Vielzahl von Studien hat gezeigt, dass eine konstitutive Aktivierung von NF- κ B in zahlreichen menschlichen Tumoren vorliegt, häufig bedingt durch ein entzündliches Mikromilieu oder onkogene Mutationen.^{51,52} Diese dauerhafte Aktivierung fördert die Proliferation von Tumorzellen, hemmt apoptotische Prozesse und unterstützt die Angiogenese. Zudem induziert NF- κ B den epithelial-mesenchymalen Übergang (EMT), der die Metastasierung erleichtert.^{51,53} Darüber hinaus beeinflusst NF- κ B die Interaktion zwischen Tumorzellen und ihrer Umgebung, indem es inflammatorische Zytokine reguliert und somit zur Tumorprogression beiträgt.^{54,55} Diese Erkenntnisse haben dazu geführt, dass der NF- κ B-Signalweg als vielversprechendes therapeutisches Ziel betrachtet wird. Trotz dieser Fortschritte bleibt die gezielte Modulation von NF- κ B herausfordernd, da dieser Signalweg auch in vielen physiologischen Prozessen eine essenzielle Rolle spielt.^{56,57} Daher konzentriert sich die aktuelle Forschung darauf, spezifische Komponenten des NF- κ B-Signalwegs zu identifizieren, die selektiv in Tumorzellen adressiert werden können, um effektive und nebenwirkungsarme Therapien zu entwickeln.^{52,57,58}

Trotz der zentralen Bedeutung des NF- κ B-Signalwegs in der Tumorbilogie stehen bislang nur begrenzt geeignete präklinische Modellsysteme zur Verfügung, die eine differenzierte Untersuchung NF- κ B-abhängiger Mechanismen in malignen Zellen erlauben. In den meisten Studien werden Tumore des Immunsystems – insbesondere bestimmte lymphatische Neoplasien mit konstitutiver NF- κ B-Aktivierung – als Modell verwendet, da sie eine stabile, reproduzierbare Aktivität des Signalwegs aufweisen. Solche Modelle bieten wertvolle Einblicke in die molekularen Grundlagen der NF- κ B-Signalweiterleitung und deren potenzieller therapeutischer Beeinflussbarkeit.

Zu den am besten etablierten präklinischen Modellsystemen zur Untersuchung NF- κ B-abhängiger Tumorerkrankungen zählen das kutane T-Zell-Lymphom (CTCL) und seine leukämische Variante, das Sézary-Syndrom,^{57,59–62} sowie die T-Zell-basierte akute lymphoblastische Leukämie (T-ALL).^{56,63,64} Diese Modelle ermöglichen funktionelle Analysen in malignen T-Zellen mit stabiler NF- κ B-Aktivierung und sind daher besonders geeignet zur Identifikation neuer therapeutischer Zielstrukturen innerhalb des NF- κ B-Signalwegs.

1.5 Das kutane T-Zell-Lymphom

Das CTCL und sein leukämischer Subtyp, das Sézary-Syndrom, sind Non-Hodgkin-Lymphome, die von malignen T-Zellen ausgehen und primär die Haut betreffen.⁶⁵ Ausgangspunkt der Erkrankung sind CD4+-T-Helferzellen, die durch genetische Mutationen ihre Funktionen verlieren und sich der Immunüberwachung entziehen.⁶⁶ Beim CTCL kommt es zu einer kutanen Invasion dieser entarteten CD4+-T-Zellen mit der Folge einer Zytokin-vermittelten chronischen Entzündungsreaktion und der Bildung erythematöser Plaques und Hautulzerationen. Das Sézary-Syndrom beschreibt die aggressivere leukämische Variante des CTCL. Hierbei handelt es sich um eine Systemerkrankung mit dem Nachweis maligner T-Zellen im peripheren Blut. Hierbei entsteht das Sézary-Syndrom nicht notwendigerweise aus einem CTCL, sondern entwickelt sich meist unabhängig. Die molekularen und pathophysiologischen Grundlagen sind zwar weitestgehend identisch zu denen des CTCL, jedoch geht das Sézary-Syndrom aufgrund des systemischen Charakters der Erkrankung mit einer deutlichen höheren Morbidität und Mortalität einher.⁶⁷

Pathophysiologische Grundlage der malignen Proliferation ist insbesondere eine konsekutive Aktivierung des nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells (NF- κ B)-Signalweges.^{59,60} Hierbei handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der unterschiedliche zelluläre Funktionen beeinflusst.⁶⁸ Unter anderem fördert NF- κ B die Expression anti-apoptotischer Proteine.⁶⁹ Im Rahmen der konsekutiven Aktivierung des NF- κ B-Signalweges kommt es zu einer unkontrollierten Expression dieser anti-apoptotischer Proteine, sodass sich diese Zellen dem physiologischen Zelltod entziehen und unkontrolliert proliferieren können.⁷⁰

Neben der konsekutiven NF- κ B-Aktivierung konnten zudem weitere Mutationen mit pathogenetischer Relevanz identifiziert werden. Dazu zählen unter anderem aktivierende Mutationen in Genen der RAS-MAPK-Signalkaskade wie NRAS und KRAS, die zu einer Proliferationsstimulation beitragen.^{71,72} Auch Mutationen im PLCG1-Gen, das an der T-Zell-Rezeptor-Signalweiterleitung beteiligt ist, konnten bei einem Teil der Patienten nachgewiesen werden und fördern eine Ligand-unabhängige Aktivierung.⁷³ Diese genetischen Veränderungen scheinen jedoch im Vergleich zur konstitutiven NF- κ B-Aktivierung eine eher untergeordnete Rolle in der Pathogenese des CTCL zu spielen, da sie nur in einem Teil der Patienten nachgewiesen werden konnten.⁷³

Zur Behandlung des CTCL werden in frühen Phasen insbesondere lokale Therapien wie Kortikosteroid haltige Salben oder UVB-Therapien eingesetzt. Beim Sézary-Syndrom und fortgeschrittenen CTCL-Stadien kommen systemische Wirkstoffe zum Einsatz. Neben klassischen Chemotherapien mit Methotrexat, Gemcitabin oder liposomalem Doxorubicin werden seit kurzem auch zielgerichtete antikörperbasierte Therapien mit Mogamulizumab (anti-CCR4-Antikörper) oder Brentuximab Vedotin (Anti-CD30-Antikörper-Wirkstoff-Konjugat) verwendet. Zudem wird beim Sézary-Syndrom eine extrakorporale Photophorese durchgeführt, bei der eine UV-Bestrahlung des Blutes Apoptose induzieren soll.⁷⁴

Die Prognose des CTCL ist trotz der verschiedenen Therapiemodalitäten insbesondere in fortgeschrittenen Stadien mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 25-40% insgesamt schlecht. Aufgrund des aggressiven systemischen Charakters ist das Sézary-Syndrom mit einer noch schlechteren Prognose assoziiert. Die Medianüberlebenszeit liegt hier bei 2-4 Jahren. Derzeit steht keine kurative Therapie für das CTCL oder Sézary-Syndrom zur Verfügung.^{67,75}

Diese insgesamt schlechte Prognose verdeutlicht den Bedarf an neuen Therapieansätzen zur Behandlung des CTCL und Sézary-Syndroms.

Ein vielversprechender Ansatz ist die zielgerichtete Modulation des konstitutiv aktivierten NF- κ B-Signalwegs. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass eine gezielte Inhibition des NF- κ B-Signalwegs zur Induktion von Zelltod in CTCL und

Sézary-Zellen führen kann.^{61,76} Dies macht insbesondere das CTCL und das Sézary-Syndrom zu idealen Modellsystemen für Tumoren mit konstitutiver NF-κB-Aktivierung.

1.6 Die T-Zell akute lymphoblastische Leukämie (T-ALL)

Die T-Zell-akute lymphoblastische Leukämie (T-ALL) ist eine hämatologische Neoplasie, die aus maligne entarteten Vorläuferzellen der T-Zell-Linie hervorgeht. Sie tritt überwiegend bei Kindern und Jugendlichen auf, kann jedoch auch Erwachsene betreffen. Charakteristisch für die T-ALL ist die Akkumulation unreifer, leukämischer T-Zellen im Knochenmark, im peripheren Blut und häufig auch in lymphatischen Organen wie dem Thymus.

Die Behandlung der T-ALL basiert derzeit auf intensiven, mehrstufigen Chemotherapie-Protokollen, die häufig durch eine allogene Stammzelltransplantation ergänzt werden – insbesondere bei Hochrisikopatient:innen oder nach einem Rückfall.⁷⁷ Trotz hoher Remissionsraten bleibt die Prognose bei häufigen refraktären oder rezidivierenden Verläufen weiterhin ungünstig.

Die Pathogenese der T-ALL ist durch eine Vielzahl genetischer Aberrationen gekennzeichnet, die in zentrale Prozesse der Zellzyklusregulation eingreifen. Hierzu zählen unter anderem Mutationen in NOTCH1, PTEN, CDKN2A sowie aberrante Aktivierungen der TAL1- und LMO2-Transkriptionsnetzwerken. Darüber hinaus wurde auch in Zellen der T-ALL eine Aktivierung des NF-κB-Signalwegs beobachtet.^{63,64} Obwohl spezifische Mutationen in NF-κB-Genen bei T-ALL selten sind, wurde eine konstante Aktivierung dieses Signalwegs in humanen T-ALL-Zellen und Mausmodellen nachgewiesen.^{60,78} In *in-vitro*-Experimenten führte die Inhibition des kanonischen NF-κB-Signalwegs zu einer Beeinträchtigung des Wachstums von T-ALL-Zellen, was auf eine pro-onkogene Rolle von NF-κB in der T-ALL hinweist.⁵⁶

Angesichts der Bedeutung des NF-κB-Signalwegs in der Pathogenese maligner T-Zell-Erkrankungen könnten therapeutische Ansätze, die auf eine gezielte Inhibition dieses Signalwegs abzielen, auch bei der T-Zell-akuten lymphoblastischen Leukämie (T-ALL) vielversprechend sein. Die T-ALL zeichnet sich in bestimmten Subtypen durch eine konstitutive NF-κB-Aktivierung aus und eignet sich daher nicht nur als potenzielles Ziel für NF-κB-gerichtete Therapien, sondern auch als experimentelles Modellsystem zur

Untersuchung der funktionellen Relevanz und therapeutischen Beeinflussbarkeit dieses Signalwegs in T-Zell-basierten Malignomen.

1.7 Dimethylfumarat (DMF)

Dimethylfumarat (DMF) ist ein von der FDA zugelassenes Small Molecule, das zur Behandlung der schubförmig verlaufenden Multiplen Sklerose sowie der Psoriasis eingesetzt wird.⁷⁹ Dabei werden insbesondere die immunmodulatorischen Effekte von DMF genutzt. DMF hemmt die Differenzierung und Funktion von Th1- und Th17-Zellen und reduziert die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-17, IFN- γ und TNF- α , was die autoimmune Inflammation kontrolliert.⁸⁰

In-vitro-Experimente zeigten zudem, dass DMF die Aktivität des NF- κ B-Signalwegs signifikant hemmt.⁸¹ Nicolay et al. und Schroeder et al. zeigten, dass DMF in NF- κ B-abhängigen malignen T-Zelllinien, einschließlich primären CTCL- und Sézary-Zellen sowie T-ALL Zellen, Apoptose oder Necroptose induziert.^{56,57} Ihre in-vivo-Untersuchungen belegten darüber hinaus, dass DMF das Tumorwachstum hemmt und die Metastasierung reduziert.

Die NF- κ B-Familie besteht aus Rel-assoziierten Proteinen wie RelA (p60), RelB, cRel, p50 und p52. Dabei lassen sich zwei zentrale Signalwege unterscheiden: der kanonische (canonical) und der nicht-kanonische (non-canonical) NF- κ B-Signalweg. Der nicht-kanonische NF- κ B-Signalweg wird durch Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie wie BAFFR oder CD40 aktiviert. Über eine Stabilisierung und Aktivierung der NF- κ B-induzierenden Kinase (NIK) erfolgt eine Bildung funktioneller p52/RelB-Dimere, die in den Zellkern translozieren und dort die Expression spezifischer Zielgene fördern, insbesondere solcher, die für Lymphorganogenese, B-Zell-Maturation und Überleben essenziell sind.⁸² DMF inhibiert überwiegend den kanonischen NF- κ B-Signalweg, in dessen Fokus ein p60/p50-Heterodimer steht, das in seiner inaktiven Form an den regulatorischen I κ B α -Komplex gebunden im Zytoplasma vorliegt.⁸³ Durch Phosphorylierung und proteasomalen Abbau von I κ B α wird NF- κ B freigesetzt und in den Zellkern transloziert. Als Transkriptionsfaktor bindet NF- κ B dort an die DNA und fördert die Expression anti-apoptotischer Proteine wie Bcl-2, Bcl-xL, c-FLIP und IAPs. Entscheidend für die Transkriptionsaktivität ist die Affinität der DNA-Bindedomäne von

NF- κ B zur DNA, die maßgeblich durch die Aktivität von Thioredoxin-1 (Trx1) beeinflusst wird.⁸⁴ Trx1 reduziert spezifische Cysteinreste in der DNA-Bindedomäne von NF- κ B und ermöglicht so die DNA-Interaktion.⁸⁵ Trx1 ist aktiv, wenn seine Cysteinreste C32 und C35 in reduzierter Form vorliegen. Diese Reduktion wird durch die Thioredoxin-Reduktase-1 (TrxR1) katalysiert, wobei der Cysteinrest C73 von Trx1 die Interaktion mit TrxR1 reguliert. Schroeder et al. zeigten, dass DMF gezielt Trx1 an C73 modifiziert und dadurch dessen Aktivität hemmt. Dies führt zu einer verringerten Affinität von NF- κ B zur DNA und damit zu einer Abnahme seiner Transkriptionsaktivität. Infolgedessen wird die Expression anti-apoptotischer Proteine reduziert.^{56,86}

Darüber hinaus belegten Schroeder et al., dass die Hemmung von Trx1 und die Inhibition von NF- κ B durch DMF zu einem signifikanten Verlust zellulärer IAPs führt. Dieser Verlust ist eng mit der Induktion des programmierten Zelltodes (PCD) verbunden. Die Einleitung des PCD erfolgt dabei unabhängig von der Aktivierung von Todesrezeptoren. Stattdessen wird durch die NF- κ B-Hemmung ein Ripoptosom gebildet, bestehend aus Caspase-8, RIPK1 und FADD. In DMF-behandelten Zellen induziert die Ripoptosom-Bildung sowohl apoptotischen als auch necroptotischen PCD. Die mitochondriale Verstärkungsschleife spielt dabei eine zentrale Rolle für das Ausmaß der Ripoptosom-Bildung und beeinflusst die Balance zwischen den beiden Formen des PCD.⁵⁶

Die Ergebnisse dieser Studien führten zu einer klinischen Erprobung von DMF in der Therapie des CTCL und Sézary-Syndroms. In einer klinischen Studie der Phase IIA testeten Nicolay et al. die Behandlung von Patienten mit CTCL oder Sézary-Syndrom mit DMF oder Placebo. Primäre Endpunkte waren neben der Effektivität auch die Sicherheit des Präparates. Bezüglich der Wirksamkeit zeigte sich ein Ansprechen von ca. 30% aller eingeschlossenen Patienten. Bei Patienten mit schwerer Krankheitslast und insbesondere Sézary-Syndrom-Patienten konnten deutlich höhere Ansprechraten bis zu 80% festgestellt werden. Auch die Sicherheit des Präparates konnte in dieser Studie bestätigt werden.⁶²

Insgesamt zeigte die Studie aber erneut die Limitationen auch von zielgerichteten Therapien. Die Heterogenität des Ansprechens auf die Therapie mit DMF unterstreicht, dass zur suffizienten Suppression des Tumorwachstums der Wirkstoff DMF allein

unzureichend ist. Gleichzeitig zeigt diese Arbeit aber auch, dass DMF ein vielversprechender therapeutischer Ansatz zur Therapie des CTCL, des Sézary-Syndroms und weiterer NF- κ B-Abhängiger Tumorentitäten ist. Ein entscheidender Punkt kann dabei die Sensitivierung der Zellen für die Behandlung mit DMF sein. Hierdurch kann das minimale Nebenwirkungsspektrum von DMF beibehalten werden, während seine Wirkung verstärkt wird.

1.8 Fragestellung

Die Identifikation, Validierung und gezielte Modulation von Drug Sensitizern stellt einen vielversprechenden Ansatz dar, um die Wirksamkeit zielgerichteter Therapien bei malignen Erkrankungen mit konstitutiver NF- κ B-Aktivierung zu verbessern. Solche Tumoren sind häufig durch ausgeprägte Therapieresistenz und aggressives Wachstum gekennzeichnet, was die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien besonders erforderlich macht.

Das kutane T-Zell-Lymphom (CTCL) und insbesondere das Sézary-Syndrom dienen in diesem Zusammenhang als etabliertes und gut charakterisiertes Modellsystem, um molekulare Mechanismen der Arzneimittelsensitivierung sowie potenzielle Kombinationstherapien systematisch zu untersuchen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, mithilfe von CTCL-Zelllinien und primären Sézary-Zellen als Modellsystem, potenzielle Drug Sensitizer zu identifizieren, die die Wirksamkeit von DMF in Tumoren mit konstitutiver NF- κ B-Aktivierung gezielt verstärken.

Die zentralen Zielsetzungen dieser Arbeit lassen sich in drei Hauptpunkte gliedern:

- I. **Genomweites CRISPR/Cas9-Knockout-Screening** zur Identifikation von Drug Sensitizern, die die zelltodinduzierende Wirkung von DMF in NF- κ B-abhängigen Tumoren verstärken.
- II. **Validierung der Screening-Ergebnisse** aus I. in Single-Knockout Zellkulturen.
- III. **Etablierung einer Kombinationstherapie aus Dimethylfumarat (DMF) und neu identifizierten Drug Sensitizern zur Behandlung von Tumoren mit konstitutiver NF- κ B-Aktivierung** – Evaluation und Validierung der synergistischen Wirkung unter Verwendung von CTCL- und Sézary-Zelllinien.

Durch diese Untersuchungen soll ein neues, therapeutisch relevantes Target für die Kombinationstherapie mit DMF identifiziert und die Grundlage für zukünftige präklinische und klinische Studien geschaffen werden.

2 Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden und Klonierung

2.1.1 Primer- und Gendesign

Die synthetisierten Primer und gBlocks-Gensequenzen wurden von Integrated DNA Technologies (IDT) bezogen. Das Design der Primer für Sequenzierungen und molekulare Klonierungen sowie die Planung der Gensequenzen erfolgte mit der Software Geneious Prime. DNA-Oligonukleotid-Primer wurden in nukleasefreiem Wasser (Carl Roth) zu einer Stammlösung von 100 μ M verdünnt. Lyophilisierte gBlocks-Gensequenzen wurden in nukleasefreiem Wasser zu einer Stammlösung von 10 ng/ μ l gelöst. Die Plasmide für die Zellkultur-Experimente wurden in Elutionspuffer (EB-Puffer, QIAGEN) gelöst.

2.1.2 PCR zur molekularen Klonierung

Die PCR-Reaktionen wurden mit Q5 Hot Start High-Fidelity 2 $\times$ Master Mix (New England Biolabs, NEB) durchgeführt. Entsprechend des Protokolls des Herstellers erfolgte die PCR-Amplifikation aus Plasmid-DNA (1 ng). Die resultierenden PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) aufgereinigt.

2.1.3 DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Die Plasmid-DNA wurde mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (NEB) entsprechend den Herstellerangaben in einem Reaktionsvolumen von 40 μ l und einer Gesamt-DNA-Menge von 3 μ g verdaut. Die Auftrennung der DNA-Fragmente nach Molekulargewicht erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese, gefolgt von einer Gel-Extraktion zur Reinigung (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN). Anschließend wurde die Konzentration der gereinigten DNA-Fragmente mit einem Nanophotometer (IMPLEN) bestimmt.

2.1.4 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Je nach erwarteter Fragmentgröße wurden Agarose-Gele mit 0,5 % (> 8 kb), 1 % (1–8 kb) oder 2 % (< 1 kb) Agarose (Biozym LE Agarose) in 1x TAE-Puffer hergestellt und mit SYBR Safe (1:10.000, Thermo Fisher Scientific) gefärbt. Die Elektrophorese

erfolgte bei 120 V für 1 Stunde. Zur Fragmentanalyse wurde der GeneRuler 1 kb DNA-Ladder verwendet. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben im Verhältnis 1:6 mit 6x Purple Loading Dye (NEB) gemischt.

2.1.5 DNA-Ligation und Gibson-Assembly

Für die DNA-Ligation wurden verdaut Plasmid-Backbones und DNA-Fragmente mit komplementären Überhängen equimolar gemischt und mit dem Quick Ligation Kit (NEB) entsprechend der Herstellerangaben ligiert.

Für die Gibson-Assembly wurden verdauter Plasmid-Rückgrat und DNA-Fragmente mit Überlappungssequenzen ($T_m \sim 65^\circ\text{C}$) equimolar gemischt. Die Reaktion erfolgte mit dem NEBuilder HiFi DNA Assembly Kit (NEB) gemäß den Herstellerangaben. Nach der Inkubation wurde das Reaktionsprodukt 10 Minuten gegen destilliertes Wasser dialysiert. 5 μl der Dialyse-Lösung wurden anschließend in NEB Turbo elektrokompetente E. coli-Zellen transformiert.

2.1.6 Bakterielle Transformation und Kultivierung

Ligierte oder assemblierte Plasmide wurden durch Elektroporation in NEB Turbo elektrokompetente E. coli-Zellen eingeführt. Hierzu wurden 1–5 μl DNA mit 50 μl aufgetauten elektrokompetenten Zellen vermischt und in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (2 mm, Merck) überführt. Die Elektroporation erfolgte mit dem Gene Pulser II (Bio-Rad) bei 2,5 kV, gefolgt von einer sofortigen Inkubation in 950 μl SOC-Medium (NEB) für 1 Stunde bei 37°C und 300 U/min.

Für die chemische Transformation wurden 1–5 μl Plasmid-DNA mit chemisch kompetenten 10-beta E. coli-Zellen vermischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 30 Sekunden, gefolgt von einer weiteren Inkubation auf Eis für 5 Minuten. Danach wurden die transformierten Zellen in 950 μl 10-beta Outgrowth-Medium (NEB) überführt und für 1 Stunde bei 37°C und 300 U/min kultiviert.

Alle transformierten Zellen wurden anschließend auf vorgewärmten LB-Agar-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.1.7 Plasmid-DNA-Aufreinigung und Sequenzierung

Nach der Transformation und anschließender Inkubation wurden Einzelkolonien aufgenommen und in 2,5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum für 7

Stunden (NEB Turbo) bzw. über Nacht (10-beta kompetente E. coli) inkubiert. Plasmid-DNA aus 2 ml der bakteriellen Kultur wurde mit dem QIAprep Plasmid MiniSpin Kit (QIAGEN) gereinigt. Die gereinigten Plasmide wurden zur Sequenzierung an Eurofins (GATC Services) gesendet und mit Geneious Prime analysiert.

Die Plasmid-DNA für Zellkulturexperimente wurde aus 200 ml bakterieller Kultur mit dem QIAfilter Plasmid Maxi Kit (QIAGEN) gemäß Herstellerangaben extrahiert.

2.2 Zellkultur und zellbiologische Methoden

2.2.1 Zellkultur

Für die Experimente wurden die T-Zelllinien CEM (ATCC CRL-2265) und HH (ATCC CRL-2105) sowie die HEK293T-Zelllinie (ATCC ACS-4500) verwendet. Die Kultivierung der CEM- und HH-Zellen erfolgte in RPMI-1640-Nährmedium (Gibco, Thermo Fisher Scientific), das mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS, anprotec, Fetal Clone II) sowie 100 µg/ml Penicillin-Streptomycin (Gibco, Thermo Fisher Scientific) ergänzt wurde. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

HEK293T-Zellen wurden in DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific) kultiviert, das mit 10 % fetalem Kälberserum (anprotec, Fetal Clone II) und 100 µg/ml Penicillin-Streptomycin (Thermo Fisher Scientific) angereichert war. Die Inkubation erfolgte ebenfalls bei 37 °C, jedoch unter einer CO₂-Konzentration von 10 %.

2.2.2 Zelluläre Transfektion

Die Transfektion der lentiviralen Plasmide in die HEK293T-Zelllinien erfolgte mittels Lipofektion unter Verwendung von X-tremeGENE HP (Roche) gemäß den Herstellerangaben.

2.2.3 Herstellung lentiviraler Konstrukte

Für die Herstellung lentiviraler Konstrukte bedarf es eines zellulären Systems. Hierfür wurde die Zelllinie HEK293T verwendet. Die kodierenden lentiviralen Plasmide wurden gemeinsam mit Verpackungsplasmiden der dritten Generation mittels Lipofektion (X-treme GENE HP, Roche) nach Herstellervorgaben in die HEK293T-Zellen transfiziert. Die Zusammensetzung der Plasmide erfolgte hier nach dem Protokoll des Herstellers. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurde das virushaltige Überstandmedium gesammelt und mittels Lenti-X™ Concentrator (Takara Bio) gemäß den Herstellerangaben konzentriert. Die viralen Partikel wurden anschließend bei -80 °C

gelagert. Die Viruskonzentration wurde unter Verwendung des Lenti-X p24 Rapid Titer Kit (Takara Bio) bestimmt.

Zur Erstellung lentiviraler Partikel wurden folgende Plasmide verwandt:

Tabelle 1 *Verwendete lentivirale Plasmide.* Verpackungsplasmide eines lentiviralen Vektorsystems der dritten Generation

Kodierende Plasmide	
Kodierung	Plasmid
Cas9-Enzym	lentiCas9-Blast ⁸⁷
sgRNA	sgRNA-Sequenz in lentiGuide-Puro ⁸⁷
eGFP	lenti Δ Guide-Puro-eGFP
Verpackungsplasmide (Envelope)	
pRSV-Rev71, Addgene	
pMDLg/pRRE71, Addgene ⁸⁸	
pCMV-VSVg, Addgene ⁸⁹	

2.2.4 Transduktionseffizienz

Die Zelllinien HH und CEM wurden verwendet, um ihre individuelle Transduktionseffizienz zu bestimmen. Hierfür wurden eGFP-exprimierende lentivirale Partikel hergestellt und auf HH- und CEM-Zellen titriert. 48 Stunden nach der Transduktion wurde die Anzahl der GFP-exprimierenden und somit erfolgreich transduzierten Zellen mittels Durchflusszytometrie (LSR-Fortessa, BD Biosciences) bestimmt. Basierend auf diesen Messungen wurden die infektiösen Einheiten (Infectious Units, IU) berechnet und die benötigte Virusmenge für eine definierte Multiplicity of Infection (MOI) festgelegt.

2.2.5 Erstellung einer stabilen monoklonalen Cas9-Zelllinie

Die CEM-Ziellinie wurde verwendet, um eine stabile Cas9-Exprimierende Zelllinie zu erzeugen. Hierfür wurden die Zellen mit Cas9 tragenden lentiviralen Partikeln für 48h Co-Kultiviert. Die Menge der lentiviralen Partikel wurde zunächst so bestimmt, dass eine MOI von 0,3 erreicht wurde (0,3 lentivirale Partikel/Zelle). So sollte eine multiple Transduktion verhindert werden. Im Anschluss an die Transduktion erfolgte eine Selektion mit Blasticidin (5µg/ml) über 5 Tage. Überlebende Zellen wurden im Anschluss über ein Durchflusszytometer (BD FACS Aria III) via Single-Cell-Sorting

vereinzelte und in 96-Well-Plates ausgesät. Diese Zellen wurden im Anschluss expandiert und in Zellkulturflaschen überführt. Die Expression von Cas9 in diesen Klonen wurde im Anschluss mittels Western Blot-Analyse verifiziert.

2.2.6 Erstellung einer stabilen polyklonalen GFP-Zelllinie

Das lentiGuide-Puro-Plasmid diente als Ausgangsplasmid zur Generierung eines lentiviralen Vektors zur Expression von eGFP. Durch enzymatischen Verdau und anschließende Ligatur wurde die ursprüngliche Guide-Sequenz durch eine eGFP-kodierende Sequenz ersetzt. Anschließend wurden aus dem modifizierten Plasmid lentivirale Partikel generiert. Nach der Transduktion von CEM-Zellen und einer Selektion mit Puromycin (1 µg/ml) wurden die GFP-exprimierenden Zellen mittels Durchflusszytometrie isoliert und durch Kohortensortierung angereichert. Somit entstand die stabile GFP exprimierende polyklonale Zelllinie CEM-GFP.

2.2.7 EZH2-Knockout Zellen

Zur lentiviralen Expression von sgRNAs gegen den Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) wurde das lentiCas9-Puro-Plasmid als Ausgangsvektor verwendet. Die 2 verschiedene sgRNA-Sequenzen wurden mithilfe der Geneious Prime Software designt und in den Vektor kloniert. Anschließend erfolgte die Produktion lentiviraler Partikel wie unter 2.2.3 beschrieben. Für die Transduktion wurden CEM-Wildtypzellen mit den zwei unterschiedlichen sgRNAs, die auf verschiedene Sequenzabschnitte von EZH2 abzielen, infiziert. Die Transduktion erfolgte bei einem niedrigen Multiplicity of Infection (MOI) von ~0,3, um sicherzustellen, dass die meisten Zellen nur eine einzelne Integration erhalten. Nach einer 48-stündigen Inkubation wurde eine Selektionsphase mit 1 µg/ml Puromycin über sieben Tage durchgeführt. In den sgRNA#mix-Proben wurden gleiche Mengen infektiöser Einheiten beider sgRNA-Sequenzen eingesetzt. Die Sequenzen der sgRNAs finden sich im Anhang.

2.2.8 Competition Assay

Für die Experimente wurden die Zelllinien CEM-Wildtyp, CEM-sgRNA#3, CEM-sgRNA#5 und CEM-sgRNA#mix als experimentelle Zelllinien verwendet. Zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens wurde jede experimentelle Zelllinie im Verhältnis 1:1 mit CEM-GFP-Zellen gemischt. Die CEM-GFP-Zellen fungierten hier als Kontrollzellpopulation. Die Zellmischungen wurden in dreifacher biologischer

Replikation entweder mit dem DMSO (Vehicle) oder mit Dimethylfumarat (DMF, 18 μ M) behandelt und unter standardisierten Bedingungen bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Zu den Zeitpunkten 0 Stunden, 48 Stunden und 96 Stunden wurden jeweils 500 μ l der Zellsuspension entnommen und der Anteil GFP-positiver Zellen mittels Durchflusszytometrie (LSR Fortessa, BD Biosciences) bestimmt. Die Analyse der erhobenen Daten erfolgte mit der FACSDiva™ Software (BD Biosciences).

Auf Grundlage der erhobenen Messwerte wurde die spezifische Veränderung der GFP-positiven Zellfraktion berechnet, um den Einfluss des EZH2-Knockdowns auf die Proliferation unter DMF zu quantifizieren. Hierbei wurden die CEM-GFP-Zellen als Basis genutzt auf derer die relative Proliferation bestimmt werden konnte.

2.2.9 Apoptose Assay

Zur Analyse der durch DMF oder Kombinationsbehandlungen induzierten Apoptose wurden CEM- und HH-Zellen in 6-Well-Platten mit einer Zelldichte von 100.000 Zellen pro Well in 2 ml Zellkulturmedium ausgesät. Die Behandlungen wurden jeweils für 48 Stunden durchgeführt. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Zellsuspension in 15-ml-Reaktionsgefäße auf Eis überführt und bei 300 x g für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und schließlich in 500 μ l Annexin-Bindungspuffer (BD Biosciences) resuspendiert. Für die Markierung apoptotischer Zellen wurden 10 μ l Annexin V-FITC (BD Biosciences, 1:100) und 5 μ l DAPI (3 μ M, BD Biosciences) hinzugefügt. Die Zellen wurden für 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben durch Filtrieren über 40- μ m-Zellfiltersiebe vereinzelt und am LSR Fortessa (BD Biosciences) mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Auswertung erfolgte mit der FACSDiva™ Software (BD Biosciences).

Zur Unterscheidung der Zellpopulationen wurden vier verschiedene Quadranten definiert:

- Q1: DAPI-positiv (unspezifisch)
- Q2: Annexin V- und DAPI-doppelpositiv (spät-apoptotische Zellen)
- Q3: Annexin V-positiv, DAPI-negativ (früh-apoptotische Zellen)
- Q4: Annexin V- und DAPI-negativ (lebende Zellen)

Annexin V bindet spezifisch an Phosphatidylserin, das während der Apoptose von der inneren zur äußeren Seite der Zellmembran transloziert wird. Dies macht Annexin V zu einem empfindlichen Marker für frühe apoptotische Prozesse. DAPI ist ein DNA-interkalierender Farbstoff, der nicht in intakte Zellmembranen eindringen kann, jedoch in nekrotischen oder spät-apoptotischen Zellen mit Membranintegritätsverlust detektiert wird.

Die spezifische Zelltodrate wurde auf Basis der gemessenen Zellpopulationen anhand folgender Formel berechnet⁹⁰:

$$\text{specific cell death [\%]} = \frac{\% \text{ Cell death}_{\text{treated}} (Q2 + Q3) - \% \text{ Cell death}_{\text{control}} (Q2 + Q3)}{100 - \% \text{ Cell death}_{\text{control}} (Q2 + Q3)}$$

2.3 Genomweites CRISPR/Cas9 Knockout Screening

2.3.1 Screening

Für das genomweite CRISPR/Cas9 Knockout-Screening wurde die humane CRISPR Knockout pooled Library (Brunello) verwendet, welche 76.441 sgRNAs umfasst, die auf 19.114 Gene abzielen. Diese Bibliothek liegt als vorgefertigter Plasmid-Pool vor, wobei die sgRNA-Sequenzen im lentiGuide-Puro-Plasmid gebunden sind. Für die Herstellung der CRISPR/Cas9 Knockout-Library wurde die Brunello sgRNA-Bibliothek amplifiziert. Zunächst wurde die Library auf eine Konzentration von 50 ng/µl gelöst und anschließend mittels Elektroporation in elektrokompente Bakterien mit einer Transformationseffizienz von $>10^9$ KBE/µg DNA übertragen. Zur Bewertung der Transformationseffizienz wurde eine Verdünnung der transformierten Bakterien angelegt und die Kolonien ausgezählt. Die Gesamtzahl der Kolonien wurde anhand der Verdünnung hochgerechnet und musste $>3 \times 10^6$ betragen, um eine ausreichend hohe Repräsentation der Library zu gewährleisten. Anschließend wurden die Kolonien mit LB-Medium gelöst, durch Zentrifugation pelletiert und für die Plasmid-Isolierung mittels QIAfilter Plasmid Maxi Kit (QIAGEN) nach Herstellerangaben aufbereitet. Die Erzeugung der lentiviralen Partikel erfolgte gemäß des unter 2.2.3 erläuterten Vorgehens.

Als Zelluläre Grundlage des Screenings diente die CEM-Cas9-Zelllinie. Die je Replikat benötigte Zellzahl wurde aus der Anzahl der sgRNAs, der gewünschten „Covarage“ und der MOI berechnet wie folgt berechnet. Bei 76.441 sgRNAs einer gewünschten Covarage von 400-facher Abdeckung und einer Ziel MOI von 0,3 (0,3 Partikel/Zelle) ergab sich eine benötigte Zellzahl von ca. 9×10^7 Zellen je Replikat. Die Zellen wurden mit einer entsprechenden Menge an lentiviralen Partikeln für 48h inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen in frischem Nährmedium resuspendiert. Zur Selektion transduzierter Zellen erfolgte eine Puromycin-Selektion mit $1 \mu\text{g/ml}$ für 7 Tage. Nach der Selektion wurden die Zellen bis zu einer Anzahl von 6×10^7 je Replikat expandiert und jeweils die Hälfte der Zellen als Tag 0 Kontrolle entnommen. Die entnommenen Zellen wurden zentrifugiert, mit PBS gewaschen und das Zellpallet bei -20°C gelagert. Die im Screening verbleibenden Zellen wurden entweder mit DMSO (Vehicle) oder $18 \mu\text{M}$ DMF für 12 Tage inkubiert. Diese Zeitspanne entspricht bei der verwendeten Zelllinie etwa 10 Zellzyklen. Nach Abschluss des Screenings wurden erneut 3×10^7 Zellen entnommen und entsprechend auf -20°C eingelagert. Die genomische DNA (gDNA) asservierten Zellen wurden im nächsten Schritt mithilfe des QIAmp Blood Maxi Kit (Qiagen) entsprechend der Herstellervorgaben isoliert.

Die in die gDNA integrierten sgRNA-Sequenzen wurden im nächsten Schritt mithilfe einer PCR unter Verwendung des Q5 Hot Start High-Fidelity $2 \times$ Master Mix (New England Biolabs, NEB) herausamplifiziert. Hierzu wurde eine zweistufige PCR durchgeführt. In der Primär-PCR wurden pro Reaktion $10 \mu\text{g}$ genomische DNA in einem Gesamtvolumen von $100 \mu\text{L}$ eingesetzt. Um eine ausreichende Library-Abdeckung sicherzustellen, wurden pro Probe mehrere PCR-Replikate durchgeführt. Basierend auf der Annahme von $6,6 \mu\text{g}$ gDNA pro 10^6 Zellen wurden für das Brunello-CRISPR-Genom-Screening mit einer angestrebten 400-fachen Abdeckung insgesamt 22 PCR-Replikate pro Probe angesetzt. Nach der Poolung aller Primär-PCR-Produkte wurde eine sekundäre PCR durchgeführt, um Adapter-Sequenzen für die Hochdurchsatzsequenzierung hinzuzufügen. Die resultierenden PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) aufgereinigt. Die Sequenzen der verwendeten Primer finden sich im Anhang.

2.3.2 Next Generation Sequencing (NGS)

Zur Vorbereitung der Hochdurchsatzsequenzierung wurden die PCR-Produkte der sekundären Amplifikation zunächst mittels Mag-Bind® Total Pure NGS Kit (OMEGA Bio-tek) aufgereinigt. Dabei wurden unerwünschte Nebenprodukte und unspezifische Amplifikate entfernt. Die Reinigung erfolgte nach den Herstellerangaben durch selektive Bindung der DNA an magnetische Beads, gefolgt von mehreren Waschschritten zur Entfernung von Verunreinigungen. Die aufgereinigten sgRNA-Sequenzen wurden gemäß den Vorgaben des Illumina NextSeq 550 Sequencing Protocols für die Hochdurchsatzsequenzierung aufbereitet. Zunächst erfolgte die Adapter-Ligation, bei der die DNA-Fragmente mit spezifischen Illumina TruSeq Adaptern versehen wurden. Diese Adapter ermöglichen die Cluster-Generierung und Sequenzierung auf der NextSeq 550-Plattform. Gleichzeitig wurden Index-Sequenzen eingebracht, um eine parallele Sequenzierung mehrerer Proben (Multiplexing) zu ermöglichen. Nach der Adapter-Ligation wurden die DNA-Fragmente durch eine PCR-Amplifikation angereichert. Diese Amplifikation selektierte gezielt die Adapter-tragenden Moleküle, um nicht ligierte DNA-Fragmente aus dem Reaktionsgemisch zu entfernen. Die Anzahl der PCR-Zyklen wurde so optimiert, dass eine Überamplifikation und die Entstehung unspezifischer Nebenprodukte vermieden wurden. Im Anschluss an die PCR erfolgte eine erneute Aufreinigung der Bibliotheken mit dem Mag-Bind® Total Pure NGS Kit (OMEGA Bio-tek), um überschüssige Primer, Adapter-Dimere und nicht ligierte Fragmente zu eliminieren. Im Anschluss hieran erfolgte die Sequenzierung auf der Illumina NextSeq 550 Plattform gemäß den Vorgaben des Herstellers. Nach Abschluss der Sequenzierung auf der Illumina NextSeq 550-Plattform wurden die Rohsequenzdaten mittels bcl2fastq Conversion Software (Illumina) verarbeitet. In diesem Schritt erfolgte das Demultiplexing, bei dem die unterschiedlichen Index-Sequenzen erkannt und die einzelnen Reads den jeweiligen Proben zugeordnet wurden. Dadurch konnten die Sequenzierungsdaten korrekt getrennt und als FASTQ-Dateien für die weitere bioinformatische Analyse exportiert werden.

2.3.3 Bioinformatische Analyse

Die bioinformatische Analyse, einschließlich der Qualitätskontrolle der NGS-Daten, der Bestimmung der sgRNA-Lesewerte und der Identifikation signifikanter Treffer, wurde gemäß der MAGeCK-Flute-Pipeline durchgeführt.⁹¹

Zur Identifikation der positiv oder negativ selektierten Gene wurde das bereitgestellte FASTQ-Sequenzierungsdaten-Set mit dem MAGeCK Maximum Likelihood Estimation (MLE)-Algorithmus verarbeitet. Dabei wurde für jedes Gen ein Selektionsscore (Z-Score) berechnet, der angibt, inwieweit das Knockout des Gens unter DMF-Behandlung eine Anreicherung oder Depletion erfahren hat. Grundlage für MAGeCK-MLE bildet die Python 3.7-Plattform.

Die Qualitätskontrolle, das statistische Modellieren und die Ergebnisvisualisierung wurden über den MAGeCK-VISPR-Workflow durchgeführt. Hierbei erfolgte eine umfassende Bewertung der Datenqualität, einschließlich der Mapping-Rate, der sgRNA-Abdeckung, des Gini-Index zur Homogenitätsbewertung der sgRNA-Verteilung sowie der Replikationskorrelation. Die finalen Ergebnisse wurden mittels Square-Plots, Volcano-Plots und Ranked-Enrichment-Plots grafisch aufbereitet. Grundlage für MAGeCK-VISPR bildet die R-Plattform.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Western Blot

Zur Untersuchung der Proteinexpression mittels Western Blot wurden die Zellen geerntet, bei 13.000 x g für 30 Sekunden zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Für die Analyse von löslichen Proteinen wurden ca. 1 Million Zellen in 100 µl RIPA-Lysepuffer (Merck) mit Proteaseinhibitoren (cOmplete Tablets Mini EDTA-free, Roche) und Phosphataseinhibitoren (PhosSTOP, Roche) resuspendiert. Die Zellysate wurden 20 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend bei 13.000 x g für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in frische Reaktionsgefäße überführt.

Für die Extraktion von Histonen wurde das Histon Extraction Kit (abcam, ab113476) gemäß Herstellerprotokoll verwendet.

Die Proben wurden für die SDS-PAGE durch Zugabe von 6x Laemmli SDS-Sample-Buffer (Thermo Fisher Scientific) mit 50 µM DTT (Merck) vorbereitet und für 10 Minuten bei 95 °C unter mildem Schütteln inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte im Mini

PROTEAN Tetra System (Bio-Rad) mit Mini PROTEAN TGX Gelen (4-20 % Gradient, 10 Wells, Bio-Rad). Das Kammerpuffer-System bestand aus 25 mM Tris (Carl Roth), 250 mM Glycin (Carl Roth), 5 mL 20 % SDS (Carl Roth) in 1 L Milli-Q-Wasser. Die Elektrophorese wurde bei 150 V für 40 Minuten durchgeführt. Zur Bestimmung der Proteinmolekulargewichte wurde der PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Für den Western Blot Transfer wurden die Proteine mittels eines semi-trockenen Blotting-Systems (TE77XP, Hoefner) auf eine PVDF-Membran (Thermo Fisher Scientific) übertragen. Der Transfer wurde für 50 Minuten bei 80 mA pro Gel/Blot durchgeführt. Anschließend wurden die Membranen für 1 Stunde in 5 % Magermilch (Carl Roth) in TBS-T-Puffer bei Raumtemperatur unter mildem Schütteln blockiert. Die Primärantikörper wurden in Blockierpuffer mit den entsprechenden Verdünnungsfaktoren angesetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Membranen 5x für je 5 Minuten mit TBS-T-Puffer unter mildem Schütteln gewaschen.

Anschließend wurden die sekundären HRP-konjugierten Antikörper mit den jeweiligen Verdünnungsfaktoren für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Detektion der HRP-Signale erfolgte durch Zugabe von 0,01 % H₂O₂ in ECL-Lösung (1 mM Luminol-Natriumsalz (Merck), 0,36 mM p-Cumarsäure (Merck), 100 mM Tris-Base in Milli-Q-Wasser). Die Signalmessung wurde im ChemiDoc XRS+ Imaging System (Bio-Rad) durchgeführt.

Verwendete Primär- und Sekundärantikörper:

Primärantikörper:

- Anti-CRISPR/Cas9 (1:1000, NBP2-36440, Novusbio)
- Anti-Di-Methyl-Histon H3 (1:1000, #9728, Cell Signaling)
- Anti-Tri-Methyl-Histon H3 (1:1000, #9733, Cell Signaling)
- Anti-Histon H3 (1:1000, #9715, Cell Signaling)
- Anti-Beta-Actin HRP-konjugiert (1:10.000, ab49900, Abcam)

Sekundärantikörper:

- Anti-Maus-IgG HRP-konjugiert (1:2500, ab6728, Abcam)
- Anti-Kaninchen-IgG HRP-konjugiert (1:20.000, 31460, Thermo Fisher)

2.5 Statistische Analysen

Die statistischen bioinformatischen Analysen des genomweiten CRISPR/Cas9 Knockout Screenings erfolgten über die MAGeCKFlute-Pipeline basierend auf R und Python-Plattformen.

Die statistischen Analysen des Competition Assays und der Apoptose Assays erfolgten über GraphPad Prism 9. Messwerte werden als Mittelwert + Standardabweichung dargestellt. Verwendet wurde der Student's t-test. Statistische Signifikanz ab einem p-Wert $<0,5$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ **** $P < 0.0001$.

3 Ergebnisse

3.1 Genomweites CRISPR-Cas9 Knockout Screening

3.1.1 Auswahl des Screening Systems

Die Grundlage des genomweiten CRISPR/Cas9-Knockout-Screenings war die Etablierung eines geeigneten zellulären Modellsystems, das eine effiziente und stabile lentivirale Transduktion ermöglichen musste. Da das Screening auf der Einführung von sgRNAs in Zellen mittels eines lentiviralen Vektors basierte, war eine hohe Transduktionseffizienz entscheidend, um eine ausreichende Anzahl genetisch modifizierter Zellen zu generieren und somit eine repräsentative Abdeckung der verwendeten sgRNA-Bibliothek sicherzustellen.

Zur Auswahl einer geeigneten Zelllinie wurden zwei Modelle getestet: die T-ALL-Zelllinie CEM sowie die Sézary-Zelllinie HH, welche jeweils für kutane T-Zell-Lymphome bzw. das Sézary-Syndrom repräsentativ sind. Schroeder et al. konnte in diesen NF- κ B abhängigen Zelllinien signifikante Zelltodinduktion durch DMF nachweisen, sodass diese Zelllinien als ideale Screeningplattformen in Betracht kamen.⁵⁶ Beide Zelllinien wurden mit einem GFP-exprimierenden lentiviralen Vektor transduziert. Nach einer 48-stündigen Inkubationszeit erfolgte die Analyse der Transduktionseffizienz mittels Durchflusszytometrie, indem der Anteil GFP-positiver Zellen bestimmt wurde.

Die Ergebnisse zeigten, dass die CEM-Zellen eine signifikant höhere Transduktionseffizienz aufwiesen als HH-Zellen (Abb. 1). Aufgrund dieser

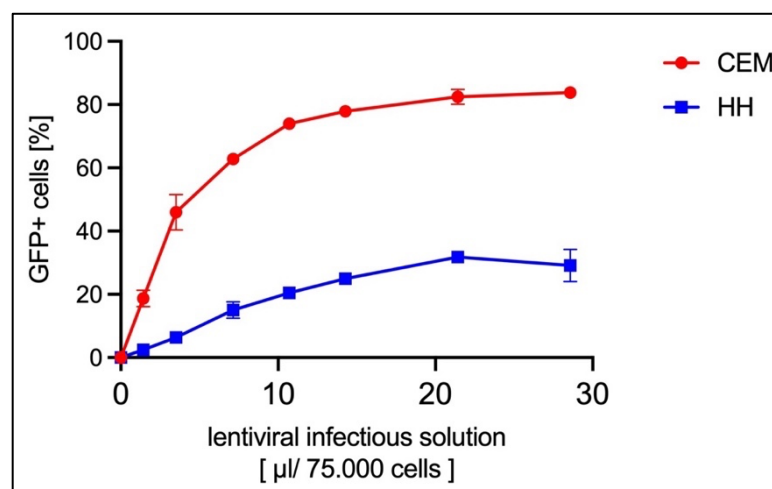


Abbildung 1: Bestimmung der lentiviralen Transduktionseffizienz in CEM- und HH-Zellen CEM- und HH-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen an GFP tragenden lentiviralen Partikeln transduziert. Nach einer Inkubationszeit von 48h wurde der Anteil GFP-positiver Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

überlegenen Transduktionsrate wurde die CEM-Zelllinie als bevorzugtes Modell für das genomweite CRISPR/Cas9-Screening ausgewählt.

3.1.2 Erstellung einer stabilen Cas9-exprimierenden Zelllinie

Für die Durchführung eines genomweiten CRISPR/Cas9-Screenings wurde eine stabile Cas9-exprimierende Zelllinie auf Basis der T-Zell-ALL-Zelllinie CEM etabliert.

Zu diesem Zweck wurden CEM-Zellen mit einem lentiviralen Vektor infiziert, der die Cas9-Sequenz und seinen konstitutiven Promotor retroviral in das Genom der Zellen integriert. Zusätzlich zum Cas9-Konstrukt enthielt der Vektor eine Blasticidin-Resistenz-Kassette, die eine Selektion erfolgreich transduzierter Zellen ermöglichte. Die Selektion erfolgte mit 5µg/ml Blasticidin über 7 Tage. Die selektierten Zellen wurden anschließend einem Single-Cell-Sorting unterzogen, wobei ein Durchflusszytometer zum Einsatz kam, um die Zellen zu vereinzeln und in 96-Well-Platten auszusäen. Die so erhaltenen monoklonalen, Cas9-transduzierten Zellklone wurden weiter expandiert. Die Expression des transduzierten Cas9-Gens in den verschiedenen Klonen wurde mittels Western Blot analysiert.

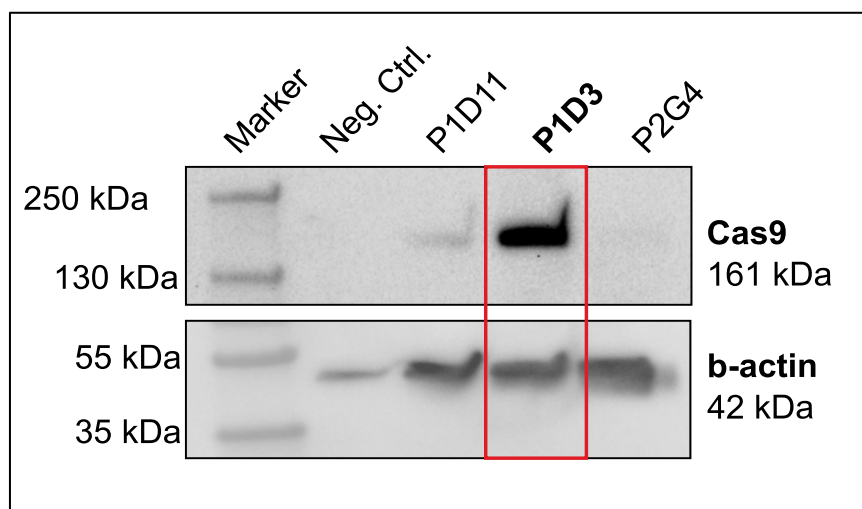


Abbildung 2 Überprüfung der Cas9 Expression: *Western Blot-Analyse der generierten monoklonalen Cas9-Exprimierenden CEM-Zellen. Beta-Actin als Ladekontrolle. Der Klon P1D3 zeigte die stärkste Cas9-Expression.*

Hierbei zeigte insbesondere der Klon P1D3 eine stabile Cas9-Expression (Abb. 2). Dieser Klon diente als zelluläre Grundlage für die weitere Durchführung des Screenings. Er wird im Weiteren als „CEM-Cas9“ bezeichnet.

Die Funktionalität des exprimierten Cas9-Gens wurde durch die lentivirale Transduktion einer Test-sgRNA geprüft. Hierbei diente der CD95-Oberflächenrezeptor als Zielstruktur. Nach der Transduktion der Zellen mit einer CD95-spezifischen sgRNA und anschließender Selektion wurde die CD95-Expression mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die gemessene Reduktion der CD95-Oberflächenexpression im Vergleich zu Kontrollzellen bestätigte die Funktionalität des Cas9 in der CEM-Cas9 Zelllinie (Abb. 3).

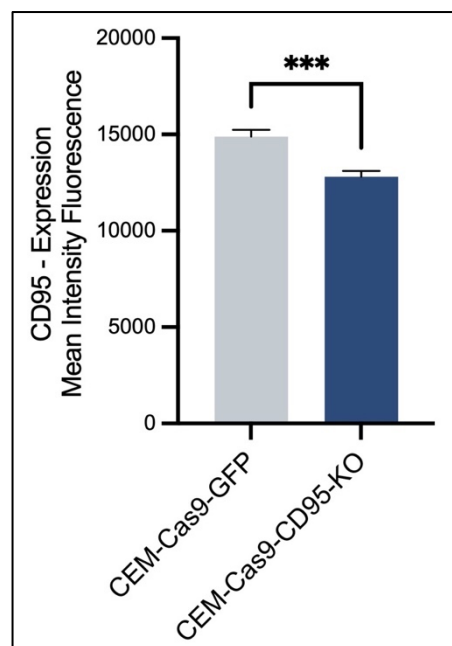


Abbildung 3 Bestimmung der CD95-Expression: CEM-Cas9 Zellen wurden lentiviral mit einer sgRNA transduziert, die sich gegen CD95 richtet. Nach 48h Inkubationszeit erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der CD95-Expression. Als Kontrolle diente ein lentiviraler GFP tragender Vektor.

3.1.3 Genomweites CRISPR Cas9 Knockout Screening

Der genomweite CRISPR/Cas9-Screen wurde mit dem Ziel durchgeführt, Gene zu identifizieren, die die Sensitivität gegenüber Dimethylfumarat (DMF) modulieren. Grundlage muss also ein Screening bilden, welches die Effekte möglichst vieler Gene analysiert. Hierfür wurde die Human Brunello CRISPR Knockout Library verwendet, die aus 76.441 sgRNAs besteht und 19.114 Gene des menschlichen Genoms abdeckt.⁹²

Um eine gleichmäßige und reproduzierbare Verteilung der sgRNAs in der Zellpopulation zu gewährleisten, wurden die CEM-Cas9-Zellen in einem definierten Verhältnis mit der sgRNA-Bibliothek transduziert. Dabei wurde eine niedrige Multiplicity of Infection (MOI ~0.3) gewählt, um sicherzustellen, dass die Mehrheit der Zellen jeweils nur eine einzelne sgRNA aufnimmt. Diese Strategie minimiert Off-Target-Effekte durch multiple genetische Veränderungen innerhalb einzelner Zellen. Um eine ausreichende statistische Aussagekraft zu gewährleisten, wurde eine 400-fache Abdeckung der gesamten Bibliothek angestrebt. Bei 76.441 sgRNAs und in Kombination mit einer MOI von 0,3 ergab sich daraus eine erforderliche Zellzahl von 9×10^7 Zellen pro Probe. Nach der Transduktion wurden die Zellen für 48 Stunden inkubiert, bevor eine Selektion mit Puromycin über sieben Tage erfolgte.

Nach erfolgreicher Selektion wurden die Zellen in zwei Gruppen aufgeteilt für die jeweils 2 Replikate erstellt wurden:

- Eine Kontrollgruppe, die mit DMSO (Vehikelkontrolle) behandelt wurde
- Eine Testgruppe, die mit 18 μ M DMF behandelt wurde

Beide Gruppen wurden jeweils für 12 Tage inkubiert. Diese Zeitspanne entspricht ca. zehn Zellzyklen, wodurch ausreichend Zeit gegeben war, um Effekte durch die sgRNA-vermittelten Knockouts zu detektieren.

Für das Screening entscheidende Messzeitpunkte waren zum einen die initiale sgRNA-Verteilung innerhalb der Replikate und zu anderen die Verteilung der sgRNAs nach 12 Tagen. Somit erfolgte eine Probengewinnung jeden Replikates an Tag 0 und Tag 12. Es ergaben sich folgende in die Analyse einfließende Messpunkte, die im Weiteren folgende Nomenklatur tragen werden:

Kontrollgruppe:

Replikat 1, Tag 0: D0C1

Replikat 2, Tag 0: D0C2

Replikat 1, Tag 12: D12C1

Replikat 2, Tag 12: D12C2

DMF-Gruppe:

Replikat 1, Tag 0: D0T1

Replikat 2, Tag 0: D0T2

Replikat 1, Tag 12: D12T1

Replikat 2, Tag 12: D12T2

Nach Beendigung der Behandlung wurde die genomische DNA aus den Zellen unter Verwendung eines DNA-Extraktionskits isoliert. Anschließend erfolgte die spezifische Amplifikation der in die genomische DNA integrierten sgRNA-Sequenzen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Hierbei wurden Primer eingesetzt, die an die flankierenden Regionen der sgRNA-Insertion im lentiGuide-Puro-Plasmid binden, um eine selektive Anreicherung der gewünschten Fragmente zu gewährleisten. Die gereinigten PCR-Produkte wurden anschließend für die Hochdurchsatz-Sequenzierung vorbereitet. Dazu erfolgten eine Adapter-Ligation sowie eine Größen-Selektion der Fragmente.

Die Sequenzierung wurde auf einer Illumina NextSeq 550-Plattform durchgeführt, die eine hohe Sequenziertiefe und Präzision ermöglicht. Dabei wurden sogenannte FASTQ-Dateien generiert, die die rohen Sequenzdaten in Form von linearen Sequenzstrings enthalten. Jedes FASTQ-File besteht aus Millionen einzelner Lesevorgänge („Reads“), die sowohl die Nukleotidsequenz als auch eine zugehörige Qualitätsbewertung für jede Base enthalten. Diese Qualitätswerte (Phred-Scores) geben an, mit welcher Wahrscheinlichkeit eine Base korrekt identifiziert wurde und sind essenziell für die nachfolgende Datenfilterung. Aufgrund der gewählten Probengröße und der Sequenziertiefe der Plattform ergaben sich so pro Replikat mehrere Millionen Reads. Diese Reads repräsentieren die amplifizierten sgRNA-Sequenzen aus den experimentellen Zellpopulationen. (Abb. 4)

3.1.4 Bioinformatische Analyse zur Identifikation von Drug Sensitizern

Zur Analyse der differentiellen sgRNA-Repräsentation zwischen den behandelten und unbehandelten Proben wurde das bioinformatische Tool MAGeCKFlute verwendet.⁹¹ Dieser vereint unterschiedliche Algorithmen in einer Pipeline. Die Qualitätskontrolle wird dabei durch MAGeCK-Vispr berechnet und visualisiert. Die eigentliche Gen-Analyse erfolgt über den MAGeCK-MLE-Algorithmus. Dieses speziell für CRISPR-Screening-Experimente entwickelte und auf Python basierte Softwarepaket ermöglicht somit die Normalisierung, Qualitätskontrolle und statistische Auswertung von sgRNA-Sequenzierungsdaten in einer Pipeline.

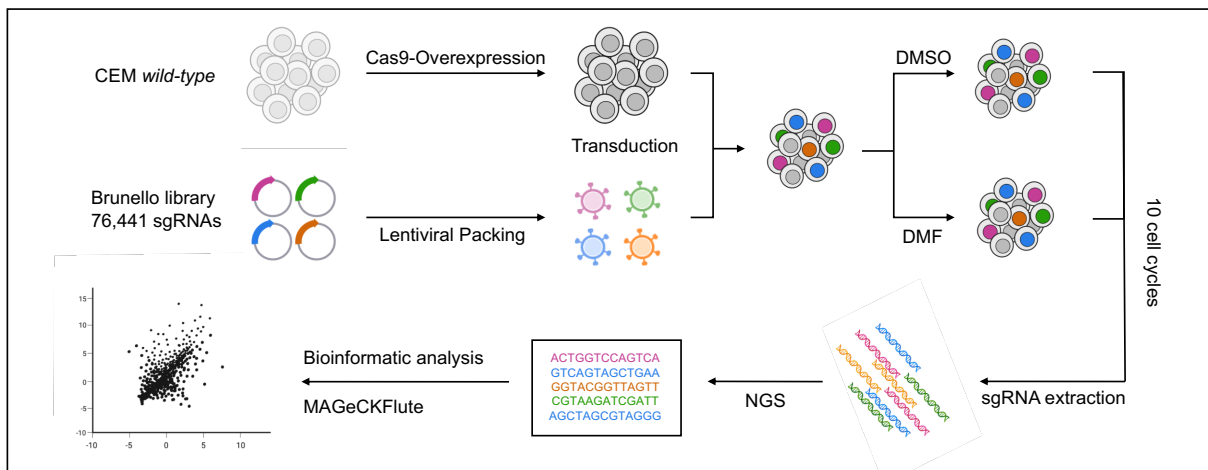


Abbildung 4 Genomweites CRISPR/Cas9 Knockout Screening: Schematischer Versuchsaufbau des genomweiten CRISPR/Cas9 basierten Knockout Screenings in CEM-Zellen. Die Grafik wurde durch BioRender erstellt.

Vor der eigentlichen bioinformatischen Analyse wurden die Rohsequenzdaten einer Qualitätskontrolle unterzogen. Dabei wurden minderwertige Reads mit niedrigen Phred-Qualitätswerten entfernt, Adapter-Sequenzen getrimmt und Artefakte aus der PCR-Amplifikation erkannt und ausgeschlossen. Anhand des Phred-Scores ermöglichte MAGeCK-VISPR so die Qualitätsbewertung der verbleibenden Sequenzen (Abb. 5). Je höher der Phred-Score, desto wahrscheinlicher ist die angegebene Base Korrekt. Der Phred-Score Q ist logarithmisch mit der „base-calling Error“-Wahrscheinlichkeit P assoziiert. Ein Phred-Score von 30 entspricht hierbei einer 99,9% Sicherheit für die Korrektheit der angegebenen Base. Über alle Proben hinweg konnte ein Phred-Score von deutlich über 30 erreicht werden, was für eine optimale Sequenzierungsqualität spricht.

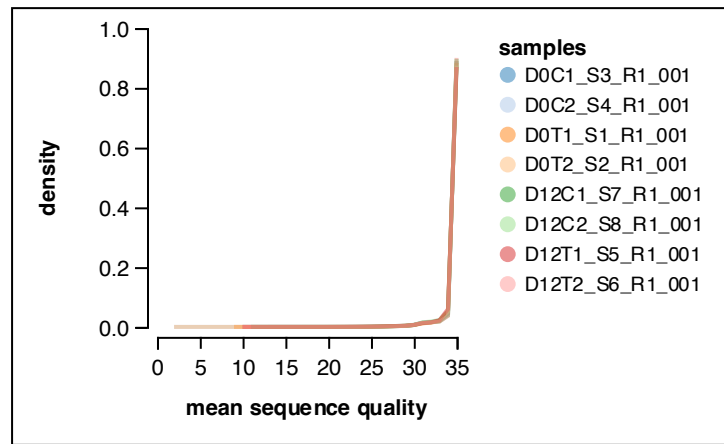


Abbildung 5 Sequence Quality: Mittlere Sequenz-Qualität anhand des zugehörigen Phred-Scores. Grafik erstellt durch MAGeCK-Vispr-Algorithmus über R.

Anschließend wurden die Reads gegen die Referenzdatenbank der sgRNA-Bibliothek kartiert, um die exakte Identifikation und Quantifizierung jeder einzelnen sgRNA zu ermöglichen. Hierbei werden die einzelnen abgelesenen Sequenzen der Sequenzierung den zugehörigen sgRNAs zugeordnet. Die Qualität der Kartierung wurde unter anderem durch die Analyse von “Mapped” und “Unmapped” Reads in MAGeCK-VISPR überprüft. Dabei konnten in allen Proben >90% der Reads erfolgreich einer bekannten sgRNA-Sequenz zugeordnet werden (Mapped Reads), was auf eine hohe Sequenzierungsqualität hinweist. Der Anteil an Unmapped Reads lag im erwarteten Bereich (Abb. 6).

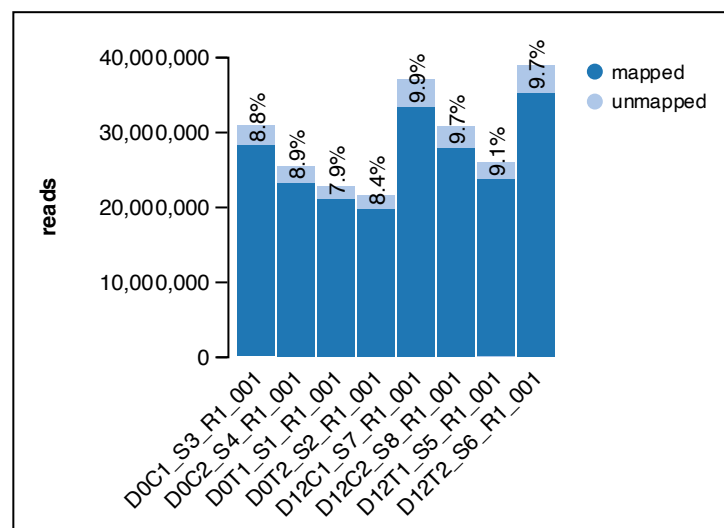


Abbildung 6 Mapped - Unmapped reads: Analyse der kartierten sgRNAs. Eine Sequenz wird als „mapped“ verzeichnet, wenn ihr eine zugehörige sgRNA der Bibliothek zugeordnet werden kann. Grafik erstellt durch den MAGeCK-Vispr-Algorithmus über R

Im nächsten Schritt wurde die Häufigkeit jeder einzelnen sgRNA innerhalb der Probe quantifiziert. Da die Gesamtzahl der Sequenzierungsreads zwischen den einzelnen Proben variieren kann, wurde zunächst eine Normalisierung der sgRNA-Häufigkeiten durchgeführt. Diese Normalisierung ist essenziell, um Verzerrungen durch Unterschiede in der Sequenziertiefe zu minimieren und eine direkte Vergleichbarkeit zwischen den Gruppen zu ermöglichen. Hierzu wurde eine Median-Ratio-Normalisierung angewandt, bei der die sgRNA-Verteilungen zwischen den Proben ins Verhältnis gesetzt wurden. Zusätzlich wurde der Gini-Index berechnet, um die Gleichmäßigkeit der sgRNA-Verteilung zu überprüfen. Ein niedriger Gini-Index ($<0,2$) bestätigt hierbei eine gleichmäßige Repräsentation der sgRNAs in der Ausgangsbibliothek und eine hohe Qualität der Daten. In allen Proben konnte ein Gini-Index im angestrebten Bereich $<0,2$ erreicht werden (Abb.7).

Aus den so erstellten Read-Counts wurde berechnet, welche sgRNAs in den Proben

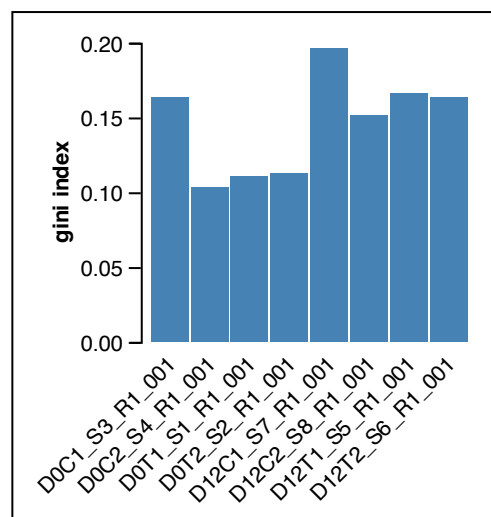


Abbildung 7 Bestimmung des Gini-Index: Gini-Indices der einzelnen Proben. Der Gini-Index gibt die Gleichmäßigkeit der sgRNA-Verteilung innerhalb der Proben an. Grafik erstellt durch den MAGeCK-Vispr-Algorithmus über R

an Tag 12 im Vergleich zu den Kontrollproben (Tag 0) signifikant angereichert oder depletiert waren. Hierbei verwendete MAGeCKFlute den MAGeCK-MLE-Algorithmus, eine robuste Rang-basierte Testmethode zur Identifikation differentiell selektierter Gene. Die Berechnung der p-Werte erfolgte unter Berücksichtigung der False Discovery Rate (FDR), um multiple Testungen zu kontrollieren und Fehlerraten zu

minimieren. Als Schwellenwert für die Signifikanz wurde ein FDR-adjustierter p-Wert von <0.05 verwendet.

Da in der Library mehrere sgRNAs für einzelne Gene codiert sind, erfolgte ein zweiter Mapping-Schritt, in dem die jeweiligen sgRNAs ihren Zielgenen zugeordnet wurden. Besonders relevant waren dabei Gene, bei denen mehrere unabhängige sgRNAs konsistent betroffen waren, da dies auf eine hohe biologische Relevanz hinweist. Nach Abschluss der differentiellen Analyse wurde eine Rangliste der Gene erstellt, die basierend auf der statistischen Signifikanz ihrer sgRNA-Depletion oder -Anreicherung geordnet wurde.

Im letzten Schritt der bioinformatischen Analyse wurden die Ergebnisse der verschiedenen experimentellen Bedingungen miteinander verglichen. Diese Analyse erfolgte mithilfe eines Square-Plots, dem zentralen Werkzeug von MAGeCK-MLE, das Gene basierend auf ihrer Selektionseffizienz und ihrer Veränderung unter den verschiedenen Versuchsbedingungen klassifiziert (Abb. 8).

Hierbei verwendet der MAGeCK-MLE-Algorithmus den sogenannten Beta-Score, der durch ein lineares Regressionsmodell berechnet wird, das die Veränderungen der sgRNA-Häufigkeiten zwischen behandelten und unbehandelten Proben analysiert. Der Beta-Score ist ein Maß für den Einfluss eines Gens auf die Zellfitness unter einer bestimmten Bedingung. Ein negativer Beta-Score weist darauf hin, dass der Knockout eines Gens die Zellen empfindlicher für die getestete Substanz macht (Sensitizer-Effekt), während ein positiver Beta-Score darauf hindeutet, dass das Gen für das Zellüberleben essenziell ist.

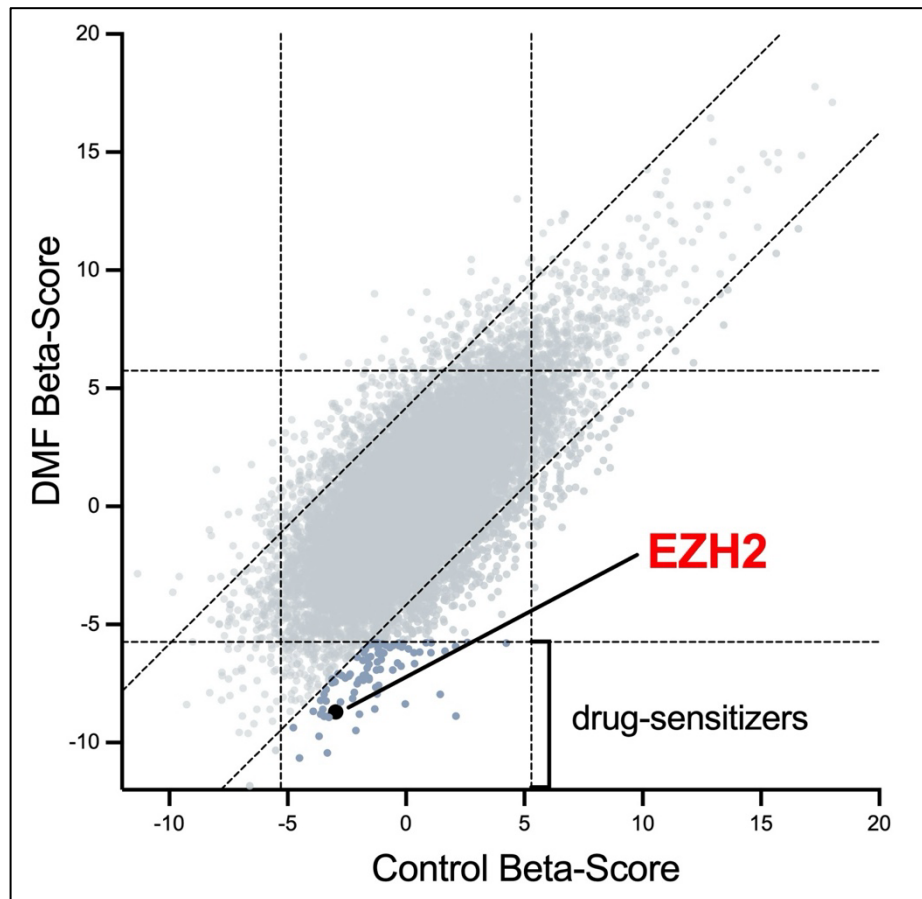


Abbildung 8 Square-Plot des genomweiten CRISPR/Cas9-Knockout-Screenings zur Identifikation von genetischen Faktoren, die die Sensitivität gegenüber DMF erhöhen. Die Gene wurden basierend auf ihren Beta-Scores in der Kontroll- und der DMF-behandelten Gruppe dargestellt. EZH2 zählt zu den am stärksten negativ selektierten Genen und ist Teil der identifizierten ‚Drug-Sensitizer‘-Gruppe. Die gestrichelten Linien markieren die Signifikanzgrenze (FDR < 0,5).

Mithilfe des Square-Plots lassen sich die signifikant selektierten Gene in 4 Gruppen unterteilen:

1. Signifikant überrepräsentiert in der DMF-Probe und normal repräsentiert in der DMSO-Probe
2. Signifikant überrepräsentiert in der DMSO-Probe und normal repräsentiert in der DMF-Probe
3. Signifikant unterrepräsentiert in der DMF-Probe und normal repräsentiert in der DMSO-Probe
4. Signifikant unterrepräsentiert in der DMSO-Probe und normal repräsentiert in der DMF-Probe

Je nach Forschungsfrage kann eine andere dieser Gruppen von Interesse sein. Gruppe 1 bündelt beispielsweise Gene deren Knockout zu einer verbesserten Proliferation unter einer Behandlung mit DMF führten, während es ihr Knockout unter normalen Bedingungen keinen relevanten Einfluss auf die Proliferation hatte. Das Silencing dieser Gene können potenzielle Resistenztreiber darstellen.

In Gruppe 3 finden sich die Gene, deren Knockout zu einer reduzierten Proliferation unter einer Behandlung mit DMF geführt haben. Die sgRNAs der Gene in dieser Gruppe waren in den Proben der Normalbedingungen nicht signifikant über- oder unterrepräsentiert. Ein Knockout dieser Gene scheint also spezifisch die Effektivität von DMF zu erhöhen. Diese Gene sind somit vielversprechende Zielstrukturen für Drug Sensitizer.

3.1.5 EZH2 als vielversprechender DMF Sensitizer

Insgesamt konnten 103 Gene identifiziert werden deren sgRNAs in der DMF-Gruppe signifikant unterrepräsentiert und in der Kontrollgruppe normal repräsentiert waren. Eine Liste mit allen identifizierten Genen mit den jeweiligen Beta-Score-Werten ist im Anhang angefügt (Tab. 2).

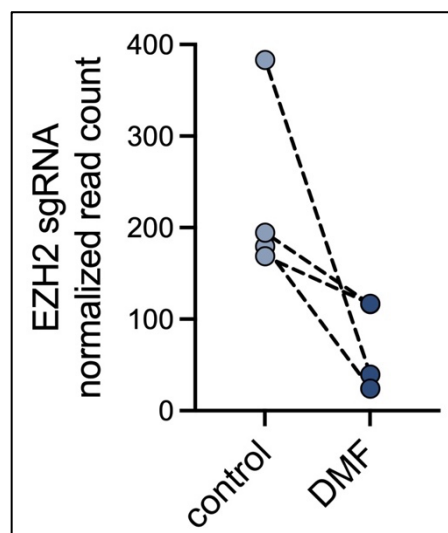


Abbildung 9 EZH2 als potenzielles Sensitivierungs-Target bei DMF-Behandlung: Vergleich der Read-Counts der EZH2-kodierenden sgRNAs nach 12 Tagen in der Kontroll- und der DMF-behandelten Gruppe. Die Linien verbinden jeweils identische sgRNAs in beiden Gruppen. In der DMF-Gruppe sind die EZH2-spezifischen sgRNAs deutlich unterrepräsentiert, was auf eine negative Selektion hindeutet und EZH2 als potenzielles Target identifiziert, um Tumorzellen für eine DMF-basierte Therapie zu sensibilisieren.

Mit einem Beta-Score von -8,70 in der DMF-behandelten Probe und einem FDR-Wert von 0,457 war EZH2 eines der am stärksten negativ selektierten Gene. Im Screening zeigte es eine deutliche und konsistente Depletion seiner 4 sgRNAs, was die Robustheit dieses Ergebnisses untermauert (Abb. 9). Besonders interessant macht EZH2 seine Rolle als bereits etabliertes therapeutisches Ziel in diversen malignen Erkrankungen. Als katalytische Untereinheit des Polycomb-Repressor-Komplexes 2 (PRC2) ist es für die H3K27-Methylierung verantwortlich und beeinflusst dadurch maßgeblich die Genexpression.

Ein entscheidender Aspekt ist darüber hinaus die Verfügbarkeit des FDA-zugelassenen EZH2-Inhibitors Tazemetostat, der bereits in der Behandlung bestimmter maligner Erkrankungen wie dem Prostata-Karzinom eingesetzt wird. Dies ermöglicht nicht nur eine gezielte pharmakologische Hemmung, sondern auch eine potenzielle Übertragung der Ergebnisse in den klinischen Kontext. Aufgrund dieser biologischen und translationalen Relevanz wurde EZH2 als vielversprechender Kandidat für weiterführende funktionelle Analysen ausgewählt, um den Einfluss seiner Inhibition auf die DMF-Sensitivität genauer zu untersuchen.

3.2 Validierung der Screening-Ergebnisse

3.2.1 CRISPR-vermittelte Validierung von EZH2 als Drug Sensitizer

Um die im CRISPR/Cas9-Screening identifizierte Rolle von EZH2 als potenziellen Drug Sensitizer weiter zu validieren, wurden gezielte Knockout-Experimente durchgeführt.

Hierfür wurden CEM-Wildtypzellen mit spezifischen sgRNAs gegen EZH2 transduziert, die über einen lentiviralen Vektor sowohl die Cas9-Nuklease als auch die sgRNA exprimierten. Zur Erhöhung der Knockout-Effizienz wurden zwei unterschiedliche sgRNAs (sgRNA#3 und sgRNA#5) sowie eine Kombination beider (sgRNA#mix) eingesetzt. Während sgRNA#3 bereits im Screening verwendet wurde, wurde sgRNA#5 gezielt ergänzt, um sgRNA-spezifische Effekte auszuschließen. Um die Screening-Ergebnisse möglichst genau nachzuvollziehen, erfolgte die Erstellung der Knockout-Zellen nach dem gleichen experimentellen Protokoll wie im ursprünglichen Screening. Nach der Transduktion und einer 48-stündigen Inkubationszeit wurden die Zellen mittels Puromycin-Selektion angereichert und anschließend expandiert. Die Zelllinien werden im Folgenden entsprechend ihrer verwendeten sgRNA als CEM-sgRNA#3, CEM-sgRNA#5 und CEM-sgRNA#mix bezeichnet, ergänzt durch die Ordnungszahl der jeweiligen Replikate.

Die Knockout-Effizienz wurde mittels Western Blot analysiert. Hierbei zeigte sich eine deutliche Reduktion der EZH2-Expression, insbesondere in den CEM-sgRNA#5- und CEM-sgRNA#mix-Zellen (Abb. 10). Der Klon CEM-sgRNA#3.1 zeigte keine Reduktion der EZH2-Expression. Ein vollständiger Knockout konnte mit keiner der eingesetzten sgRNAs erzielt werden, sodass es sich in diesem Fall um einen partiellen Knockdown handelt. Es ist daher anzunehmen, dass auch im ursprünglichen Screening kein vollständiger Knockout von EZH2 erreicht wurde, sondern lediglich eine funktionelle Reduktion der Expression, die dennoch ausreichte, um eine verstärkte Sensitivität gegenüber DMF nachzuweisen.

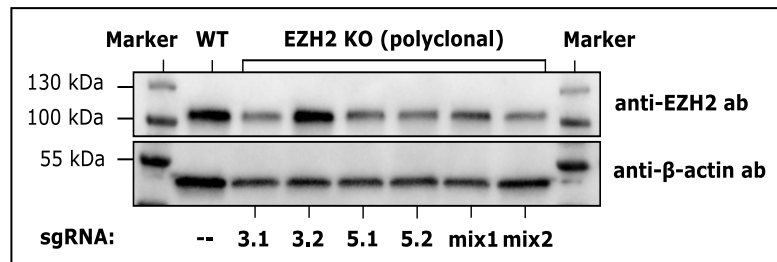


Abbildung 10 Alle getesteten EZH2-spezifischen sgRNAs führen zu einem deutlichen Knockdown der EZH2-Proteinexpression in CEM-Zellen. Gezeigt ist eine Western Blot-Analyse der EZH2-Expression in CEM-Zellen nach sgRNA-vermittelterm Knockout. CEM-Wildtyp-Zellen dienen als Kontrolle. Für jede sgRNA wurden zwei Replikate untersucht. β -Actin wurde als Ladekontrolle verwendet.

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob der Knockout von EZH2 tatsächlich zu einer veränderten Sensitivität gegenüber DMF führt. Hierfür wurde zunächst zur Bewertung des Proliferationsverhaltens unter DMF ein Competition-Assay durchgeführt. Hierbei wurden die EZH2-Knockdown-Zellen in einem 1:1-Verhältnis mit stabil GFP exprimierenden CEM-Zellen vermischt. Anschließend wurden die Zellmischungen entweder mit DMF behandelt oder als unbehandelte Kontrolle kultiviert. Die Zellpopulation wurden nach 48 und 96 Stunden mittels Durchflusszytometrie analysiert, wobei der Anteil an GFP-positiven Zellen als Referenz für die relative Proliferation der Knockout-Zellen diente. In Abbildung 11 dargestellt sind die DMF-bedingten spezifischen Veränderungen des GFP+-Zellanteils. Als Grundlage zur Berechnung dienten der Vergleich der GFP+ Zellanteile unter Kontroll- und DMF-Behandlung. Hier zeigt sich unter der DMF-Behandlung eine signifikante Zunahme von GFP+-Zellen in den Proben der CEM-sgRNA-Klone im Vergleich zu den Wildtyp Zellen, was für eine schnellere Proliferation der GFP+-Zellen im Vergleich zu den CEM-sgRNA-Zellen spricht. Im Umkehrschluss zeigt dies, dass CEM-sgRNA-Zellen unter DMF-Behandlung eine reduzierte Proliferation und erhöhte Sensitivität für DMF aufweisen. Das Proliferationsverhalten der Wildtyp Zellen scheint keinen Unterschied zu den GFP+-Zellen aufzuweisen (Abb. 11).

Zur Überprüfung der Hypothese, dass eine verminderte EZH2-Expression zu einer Sensitivierung der Zellen für DMF führt, wurde ein Apoptose Assay auf der Basis Annexin V/DAPI-Färbung durchgeführt. Annexin V bindet spezifisch an phosphatidylserin-exponierende Zellen, ein frühes Kennzeichen apoptotischer Zellen, während DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) zur Markierung permeabilisierter, nicht

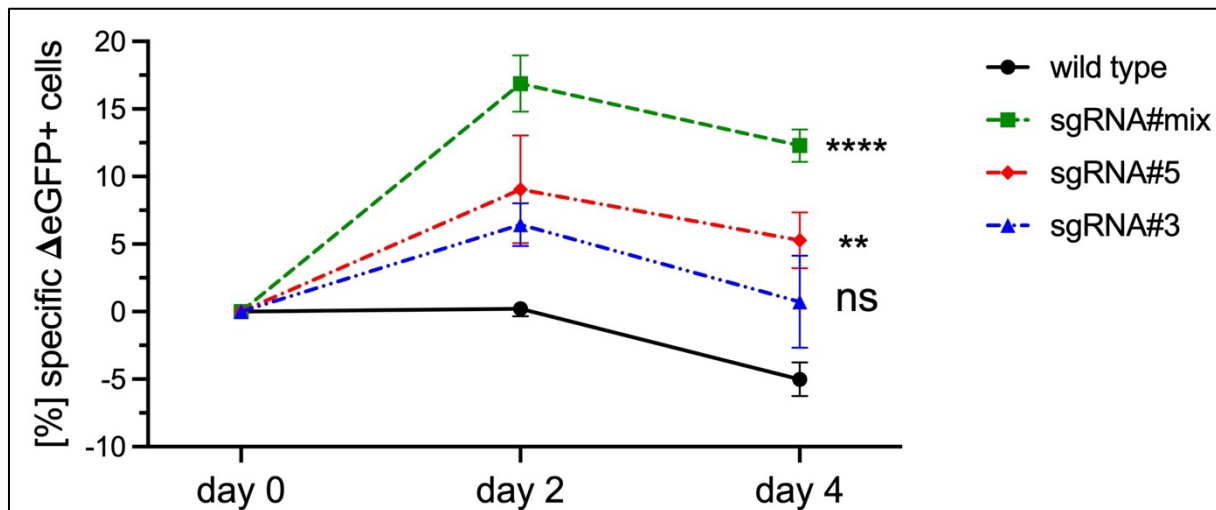


Abbildung 11 Competition Assay mit CEM-Zellen: Vergleich der Proliferation von EZH2-knockout-Zellen (CEM-sgRNA, GFP⁺) mit CEM-Wildtyp-Zellen (GFP⁻) unter DMF-Behandlung. Gezeigt wird die DMF-abhängige Veränderung des Anteils GFP⁺ Zellen im Zeitverlauf. Eine signifikante Abnahme des Anteils EZH2-defizienter Zellen weist auf eine erhöhte Sensitivität gegenüber DMF hin. Mittelwert $\pm$ SD, Student's t-Test: *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001..

mehr lebensfähiger Zellen dient. Durch diese Kombination lassen sich früh- und spät-apoptotische Zellen differenzieren. Für den Apoptose-Assay wurden die CEM-sgRNA-Zellen sowie CEM-Wildtyp Zellen mit 20 μ M DMF behandelt und für 48h kultiviert. Im Anschluss erfolgte eine Färbung mit Annexin V und DAPI und die Quantifizierung der Apoptose mittels Durchflusszytometrie (Abb. 12). Im Quadranten Q4 (unten links) der durchflusszytometrischen Analyse zeigten sich vitale Zellen. Der Anteil frühapoptotischer und apoptotischer Zellen konnte aus den Quadranten Q2 (oben rechts) und Q3 (unten rechts) bestimmt werden. Hieraus konnte der spezifische Zelltod berechnet werden.

Unter Kontrollbedingungen zeigten alle Zelllinien eine vergleichbare Viabilität, was darauf hindeutet, dass der Knockdown von EZH2 allein keine zytotoxische Wirkung hatte (Abb. 12). Nach DMF-Behandlung hingegen war in den CEM-sgRNA-Zellen eine signifikante Zunahme der apoptotischen Zellpopulation zu beobachten. In der spezifischen Zelltodanalyse konnte für die Wildtyp Zellen eine DMF-Induzierter Zelltod von 15,8% berechnet werden. Besonders deutlich zeigte sich die zusätzliche Zelltodinduktion in den Klonen CEM-sgRNA#mix und CEM-sgRNA#5. Mit einem spezifischen Zelltod von 30,2% in den CEMsgRNA#mix1 Zellen, war in diesen Zellen der spezifische Zelltod beinahe doppelt so hoch wie in den Kontrollzellen (Abb. 13). In den CEM-sgRNA#3-Klonen konnte kein zusätzlicher spezifischer Zelltod nachgewiesen werden.

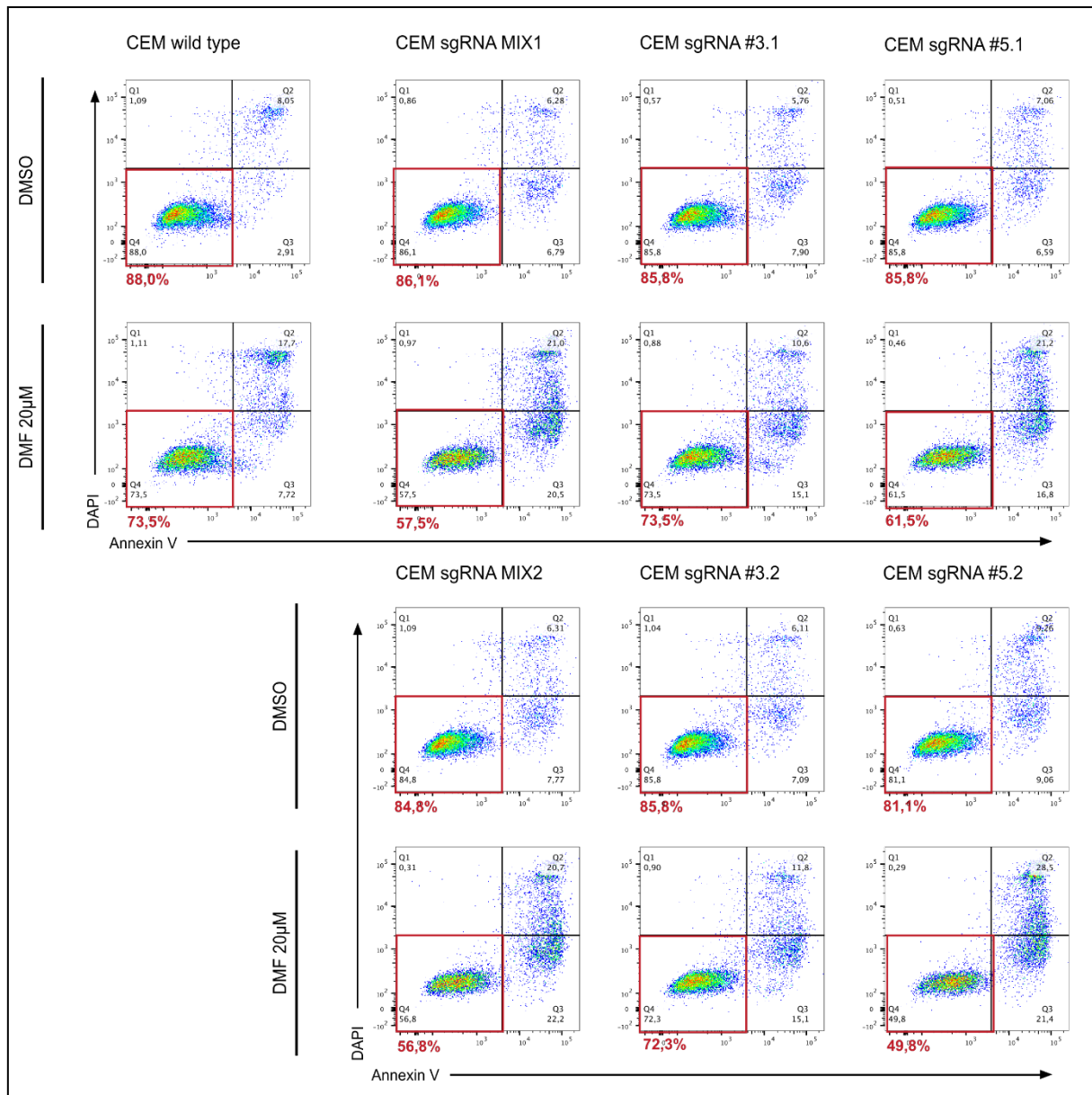


Abbildung 12 Apoptose-Analyse nach EZH2-Knockout und DMF-Behandlung: : CEM Wildtyp-Zellen und EZH2-defiziente CEM-sgRNA-Zellen wurden mit 20 µM DMF für 48 h behandelt. Anschließend erfolgte eine Annexin V/DAPI-Färbung und die Analyse mittels Durchflusszytometrie. Der Anteil vitaler Zellen ist im Q4-Quadranten dargestellt. .

Diese Versuche bestätigten die Ergebnisse des CRISPR-Screenings. Während der Knockdown von EZH2 unter unbehandelten Bedingungen keinen Einfluss auf die Zellviabilität hatte, führte er unter DMF-Behandlung zu einer signifikanten Verstärkung der apoptotischen Zelltodinduktion. Dies stützt die Hypothese, dass EZH2 ein potenzielles Ziel für einen Drug Sensitizer darstellen kann. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde EZH2 als Zielstruktur für weiterführende Experimente zur pharmakologischen Hemmung in Kombination mit DMF priorisiert.

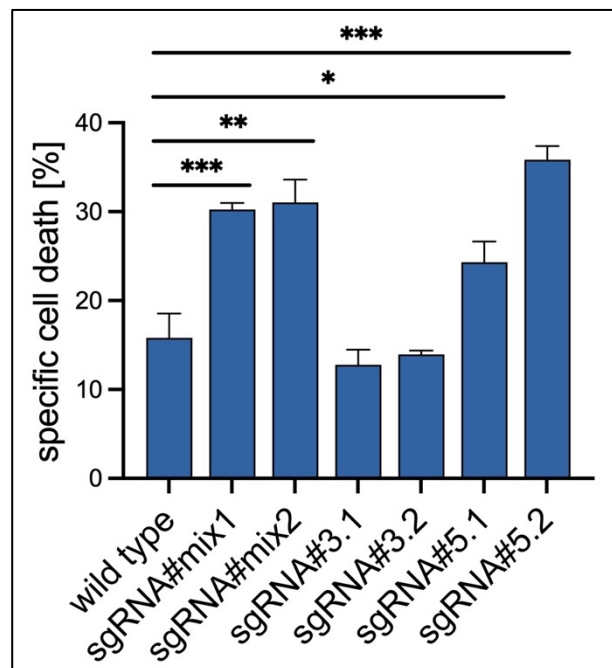


Abbildung 13 Berechnung des spezifischen Zelltods nach DMF-Behandlung: Analyse des spezifischen Zelltods basierend auf den apoptotischen Zellpopulationen (Q2 + Q3) aus dem Annexin V/DAPI-Assay (siehe Abbildung 12). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student's *t*-Test; $P < 0,05$ (), $P < 0,01$ (), $P < 0,001$ (), $P < 0,0001$ (****).

3.3 Etablierung einer Kombinationstherapie

3.3.1 EZH2-Inhibition durch Tazemetostat verstärkt DMF-induzierten Zelltod

Der Polycomb-Repressor-Komplex 2 (PRC2) besteht aus mehreren Untereinheiten und spielt eine zentrale Rolle in der epigenetischen Regulation. Er ist für die Trimethylierung von Histon H3 an Lysin 27 (H3K27me3) zuständig und fördert so die Transkriptionsrepression zahlreicher Gene, die an Zellzykluskontrolle, Differenzierung und Apoptose beteiligt sind. EZH2 fungiert dabei als katalytische Untereinheit, während EED und SUZ12 als regulatorische Komponenten die Aktivität des Komplexes stabilisieren und verstärken. Zusätzlich sind RBBP4 und RBBP7 an der Zielerkennung und Bindung beteiligt (Abb. 14). Eine Fehlregulation von PRC2 ist mit verschiedenen malignen Erkrankungen assoziiert und kann zur Suppression tumorsuppressiver Signalwege beitragen.

Nachdem EZH2 als Ziel potenzieller Drug Sensitizer für DMF identifiziert und seine Rolle durch Knockdown-Experimente bestätigt wurde, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob die pharmakologische Inhibition von EZH2 mittels Tazemetostat die Wirkung von DMF verstärken kann.

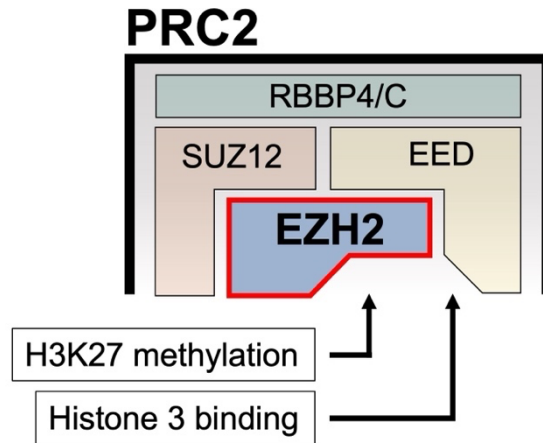


Abbildung 14 Überblick PRC2: Der PRC2 besteht aus 4 Untereinheiten. EZH2 ist das katalytische Zentrum und für die H3K27-Methylierung verantwortlich. Das Polycomb Protein Embryonic Ectoderm Development (EED) vermittelt die Histon 3 Bindung. Die Polycomb Repressive Complex 2 Subunit (SUZ12) und das RB Binding Protein 4 (RBBP4/C) sind für die Stabilität des Komplexes zuständig.

Tazemetostat ist ein selektiver EZH2-Inhibitor, der bereits von der FDA zur Behandlung bestimmter Malignome zugelassen wurde. Um die optimale Konzentration für die Kombinationstherapie zu bestimmen, wurde zunächst eine Dosis-Wirkungs-Analyse durchgeführt. Um die Ergebnisse zu validieren und deren Übertragbarkeit auf andere Modelle zu prüfen, wurde nun neben der T-ALL-Ziellinie CEM auch die Sézary-Zelllinie HH in die Untersuchungen einbezogen. Die Zellen wurden mit einer Reihe steigender Tazemetostat-Konzentrationen (0,5–50 μM) behandelt und die H3K27-Di- und Trimethylierung (H3K27me₂/H3K27me₃) als funktioneller Marker für die EZH2-Aktivität mittels Western Blot analysiert. In beiden Zelllinien führte die Behandlung mit Tazemetostat zu einer dosisabhängigen Reduktion der H3K27me₂- und H3K27me₃-Level. (Abb. 15,16)

Zusätzlich wurde der Einfluss von Tazemetostat auf die Viabilität der Zellen in einem Zelltod-Experiment mit ansteigenden Tazemetostat-Konzentrationen untersucht. Hierbei wurden die Zellen über 48 Stunden mit steigenden Konzentrationen des Inhibitors (1–50 μM) behandelt und die Apoptoserate mittels Annexin V/DAPI-Färbung analysiert. Während niedrige Konzentrationen (<10 μM) kaum Einfluss auf die Zellviabilität beider Zelllinien hatten, führte die Behandlung mit höheren Konzentrationen (>20 μM) zu einer dosisabhängigen Zunahme der Zellsterblichkeit. (Abb. 17, 18)

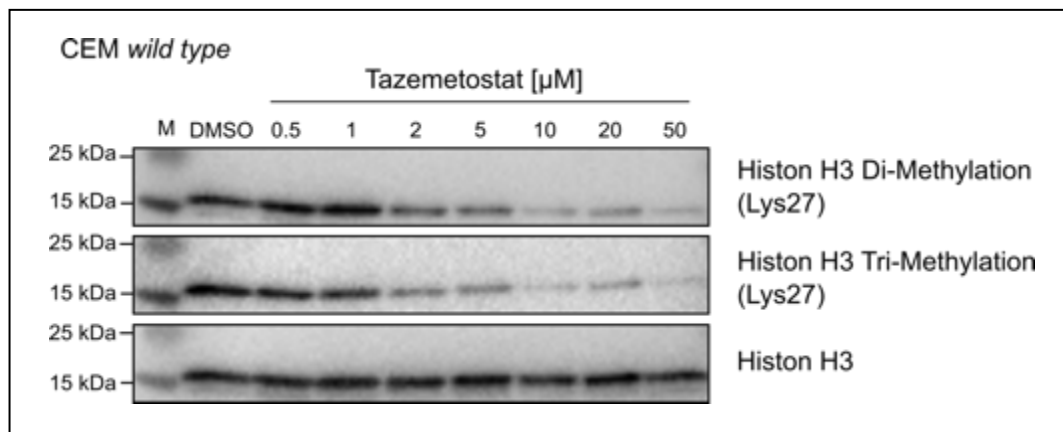


Abbildung 15 Tazemetostat reduziert die Histon-3-Methylierung in CEM-Zellen: *Western Blot-Analyse der Histone 3 Di- und Tri-Methylierung in CEM Wildtyp Zellen. Die Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen Tazemetostat behandelt und für 48h inkubiert. Als Ladekontrolle dient der Gesamtgehalt an Histone 3.*

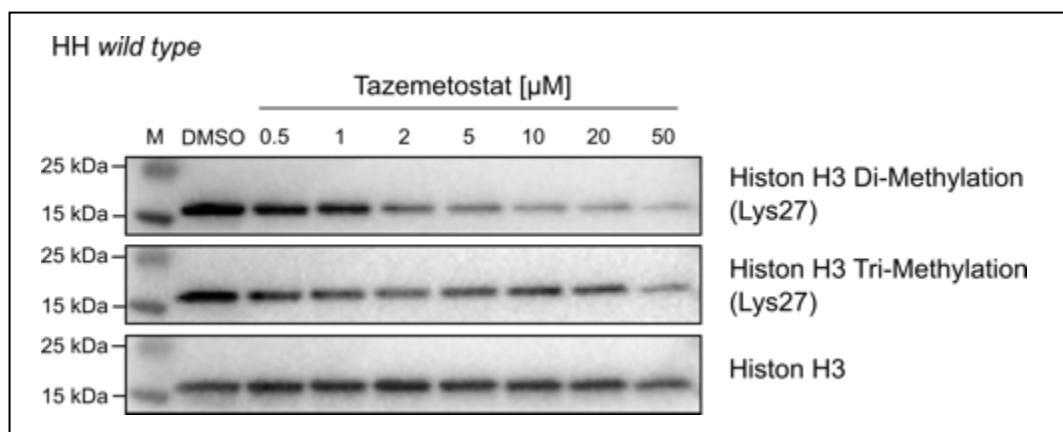


Abbildung 15 Tazemetostat reduziert die Histon-3-Methylierung in CEM-Zellen: *Western Blot-Analyse der Histone 3 Di- und Tri-Methylierung in HH Wildtyp Zellen. Die Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen Tazemetostat behandelt und für 48h inkubiert. Als Ladekontrolle dient der Gesamtgehalt an Histone 3.*

Interessanterweise korrelierte die beobachtete Zelltodinduktion nicht mit der Inhibition der Methylierungsaktivität von EZH2, was darauf hindeutet, dass der durch Tazemetostat ausgelöste Zelltod nicht primär auf die Blockade von PRC2 zurückzuführen ist. Mögliche Einflussfaktoren könnten unspezifische Effekte höherer Wirkstoffkonzentrationen, wie etwa durch die Trägerlösung bedingte Toxizität, sein.

Diese Ergebnisse bestätigen die zuvor getroffene Beobachtung, dass die spezifische Hemmung der EZH2-Aktivität allein keinen Einfluss auf die Zellviabilität zu haben scheint. Basierend auf diesen Daten wurde eine Tazemetostat-Konzentration von 5 μM für die Kombinationsexperimente festgelegt, da hier eine maximale Inhibition der EZH2-Aktivität ohne eine zusätzliche Zelltodinduktion erreicht wurde.

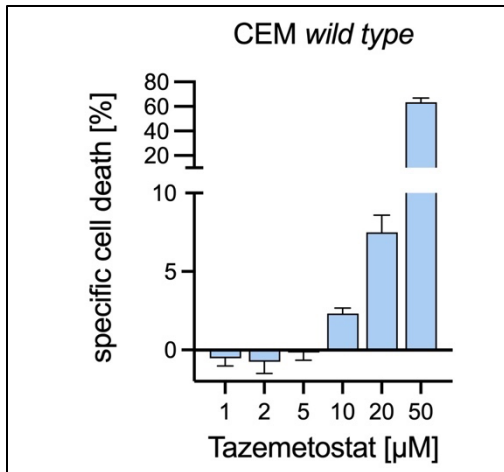


Abbildung 17 Tazemetostat-induzierter Zelltod in CEM-Zellen: *Tazemetostat-Titration in CEM-Wildtyp Zellen. Der Zelltod wurde durch einen Annexin V/DAPI-Assay durchflusszytometrisch bestimmt.*

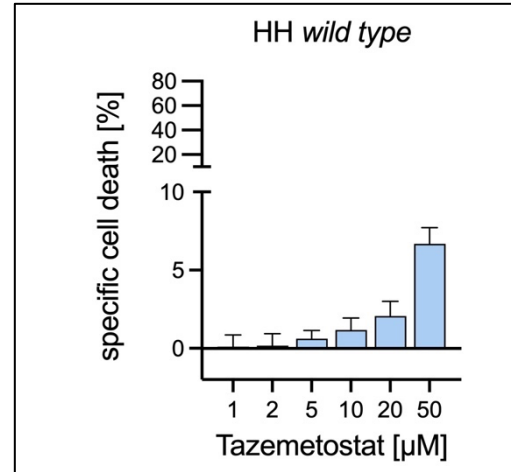


Abbildung 16 Tazemetostat-induzierter Zelltod in HH-Zellen: *Tazemetostat-Titration in HH Wildtyp Zellen. Der Zelltod wurde durch einen Annexin V/DAPI-Assay durchflusszytometrisch bestimmt.*

Nachdem die optimale Tazemetostat-Konzentration bestimmt wurde, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob die EZH2-Inhibition durch Tazemetostat die Wirkung von DMF verstärkt. Hierfür wurden CEM- und HH-Zellen über 48 Stunden mit DMF (25µM) allein, Tazemetostat (5µM) allein oder der Kombination beider Wirkstoffe behandelt und anschließend mittels Annexin V/DAPI-Assay die Apoptoserate bestimmt.

Während DMF als Monotherapie eine deutliche Apoptoseinduktion im Bereich früherer Veröffentlichungen zeigte, führte die Kombination mit Tazemetostat zu einer signifikanten Steigerung der DMF-induzierten Apoptoserate. In CEM-Zellen wurde eine signifikante, bis zu 10% höhere spezifische Zelltodinduktion beobachtet (Abb. 19). Interessanterweise war dieser Effekt in HH-Zellen noch ausgeprägter. Hier konnte die apoptotische Zellfraktion durch eine Kombination aus DMF mit Tazemetostat mehr als verdoppelt werden (Abb. 20). Diese Ergebnisse zeigen, dass die pharmakologische Hemmung von EZH2 durch Tazemetostat die Sensitivität gegenüber DMF signifikant steigern kann, und unterstreichen die Rolle von EZH2 als potenziellen Drug Sensitizer für DMF.

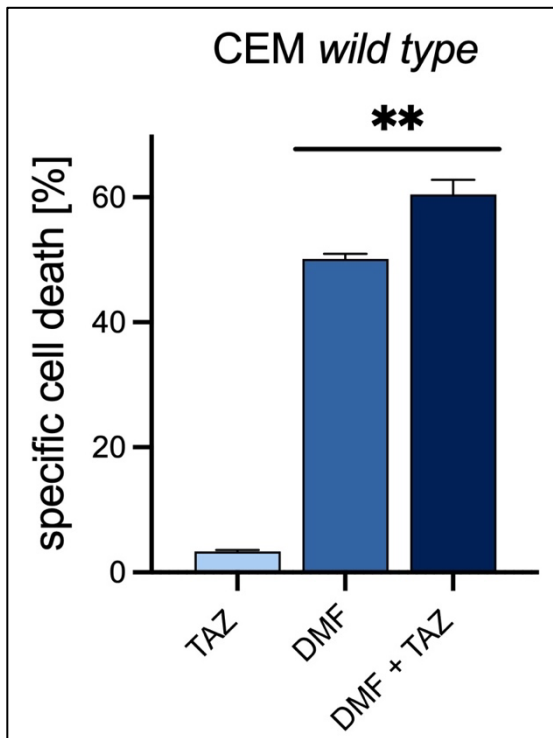


Abbildung 19 Kombinationstherapie von DMF mit Tazemetostat in CEM-Zellen: Spezifische Zelltodinduktion in CEM-Wildtyp Zellen die mit Tazemetostat (5 μ M), DMF (25 μ M) oder einer Kombination von Tazemetostat und DMF behandelt wurden. Durchflusszytometrische Annexin V/DAPI basierte Zelltodanalyse nach 48h Inkubationszeit. Student's t-test * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ **** $P < 0.0001$.

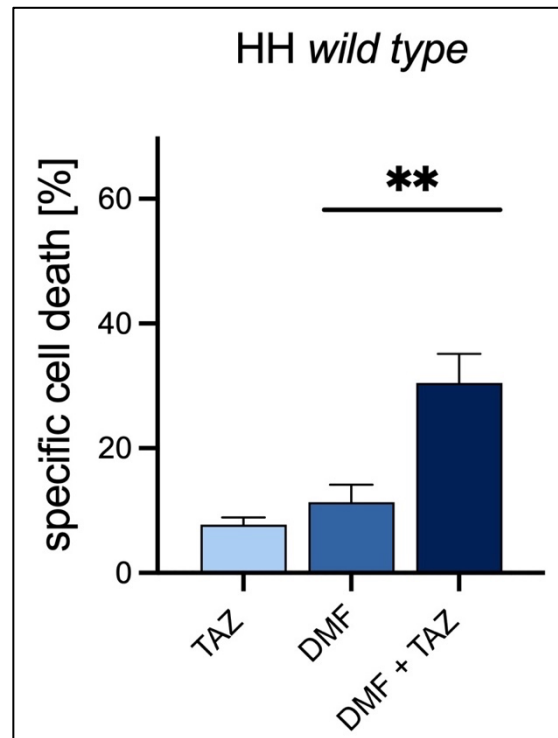


Abbildung 17 Kombinationstherapie von DMF mit Tazemetostat in CEM-Zellen: Spezifische Zelltodinduktion in HH-Wildtyp Zellen die mit Tazemetostat (5 μ M), DMF (25 μ M) oder einer Kombination von Tazemetostat und DMF behandelt wurden. Durchflusszytometrische Annexin V/DAPI basierte Zelltodanalyse nach 48h Inkubationszeit. Student's t-test * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ **** $P < 0.0001$.

3.3.2 DMF-Sensitivierung durch Inhibition verschiedener PRC2-Komponenten

Während EZH2 die katalytische Untereinheit von PRC2 darstellt, gibt es Hinweise darauf, dass EZH2 auch PRC2-unabhängige Funktionen besitzt. In verschiedenen malignen Entitäten wurde gezeigt, dass EZH2 über Mechanismen jenseits der Histonmethylierung an der Regulation der Genexpression, der Tumorprogression und der Immunmodulation beteiligt ist. Daher wurde in den folgenden Experimenten untersucht, ob die beobachteten Effekte der EZH2-Hemmung auf die Sensitivität gegenüber DMF primär durch die PRC2-Inhibition vermittelt werden oder ob andere PRC2-unabhängige Mechanismen von EZH2 eine Rolle spielen. Zu diesem Zweck wurden neben Tazemetostat auch weitere PRC2-Inhibitoren, die gezielt andere Komponenten des Komplexes adressieren, in Kombination mit DMF getestet.

A-395 und MAK683 setzen an unterschiedlichen molekularen Mechanismen an, um die PRC2-Funktion zu hemmen. A-395 wirkt als kompetitiver Inhibitor, der die H3K27-

Bindungsstelle von EED blockiert und dadurch die Interaktion von PRC2 mit seinem Substrat verhindert. Dies führt zu einer reduzierten Stabilisierung des PRC2-Komplexes, ohne jedoch direkt die Interaktion zwischen EZH2 und EED zu unterbinden. MAK683 hingegen unterbindet die direkte Interaktion zwischen EED und EZH2, was dazu führt, dass der gesamte PRC2-Komplex nicht mehr funktionsfähig ist. Während A-395 somit eher die Enzymaktivität von PRC2 hemmt, führt MAK683 zur kompletten Dissoziation des Komplexes.

Zunächst wurde die Effektivität der PRC2-Inhibitoren in CEM- und HH-Zellen untersucht. Dazu wurden die Zellen mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen Inhibitoren behandelt und über 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die H3K27-Methylierung als Marker für die PRC2-Aktivität mittels Western Blot analysiert. Dabei zeigte sich, dass beide Inhibitoren eine deutliche Reduktion der H3K27-Methylierung bewirkten, was ihre Wirksamkeit in der gezielten Hemmung der PRC2-Funktion bestätigt. (Abb. 21, 22)

Ihre Fähigkeit zur Sensitivierung von DMF wurde anschließend in einem Apoptose Assay getestet. CEM- und HH-Zellen wurden mit A-395 (0,5µM) oder MAK683 (0,5µM) in Kombination mit DMF (25µM) behandelt und anschließend mittels Annexin V/DAPI-Assay die Apoptoserate bestimmt. Hierbei zeigten beide Inhibitoren in Monotherapie keinen signifikanten Einfluss auf die Zellviabilität, führten jedoch in Kombination mit DMF zu einer deutlich erhöhten Apoptoserate. In den CEM-Zellen konnten beide Inhibitoren eine signifikante zusätzliche Zelltodinduktion vermitteln, hier konnte der spezifische Zelltod um 22,3% gesteigert werden (Abb. 23). Ähnlich wie in den vorherigen Versuchen konnten diese Effekte in den HH noch stärker beobachtet werden. Hier konnten die Inhibitoren die spezifische Zelltodinduktion im Vergleich zur Monotherapie mit DMF beinahe verdoppeln (Abb. 24). Interessanterweise entsprach die durch PRC2-Inhibitoren hervorgerufene Verstärkung der DMF-Wirkung nahezu der Sensitivierung, die unter Tazemetostat beobachtet wurde. Dies legt nahe, dass der Effekt nicht primär auf eine spezifische Hemmung von EZH2 zurückzuführen ist, sondern vielmehr auf eine allgemeine Beeinträchtigung der PRC2-Funktion beruht.

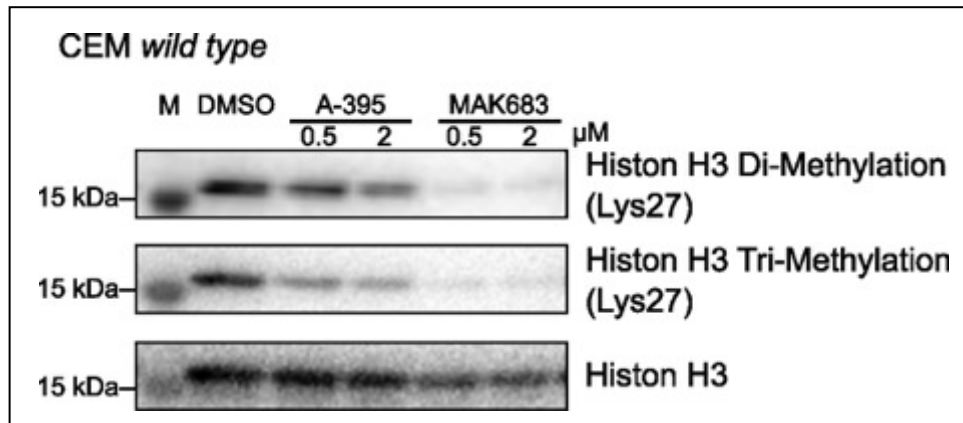


Abbildung 21 PRC2-Inhibitoren reduzieren die H3K27-Methylierung in CEM-Zellen: *Western Blot Analyse der Di- und Tri-Methylierung an Lysin 27 im Histon 3. CEM-Wildtyp Zellen wurden mit A-395 und MAK683 in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt und für 48h inkubiert. Die absolute Histon 3 Menge fungiert als Ladekontrolle.*

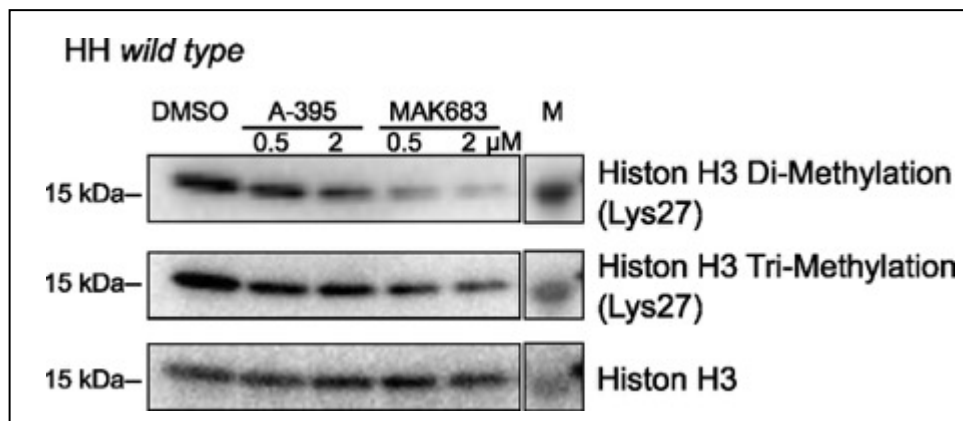


Abbildung 18 PRC2-Inhibitoren reduzieren die H3K27-Methylierung in HH-Zellen: *Western Blot Analyse der Di- und Tri-Methylierung an Lysin 27 im Histon 3. HH-Wildtyp Zellen wurden mit A-395 und MAK683 in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt und für 48h inkubiert. Die absolute Histon 3 Menge fungiert als Ladekontrolle.*

Diese Ergebnisse bestätigen, dass die beobachteten sensitivierenden Effekte von Tazemetostat auf der EZH2-vermittelten Inhibition der PRC2-Aktivität beruhen.

Da die reduzierte PRC2-Aktivität mit einer verminderten Trimethylierung von H3K27 einhergeht, legen die Ergebnisse nahe, dass der Methylierungsstatus von H3K27 ein zentraler Faktor in der Modulation der DMF-Effektivität sein könnte.

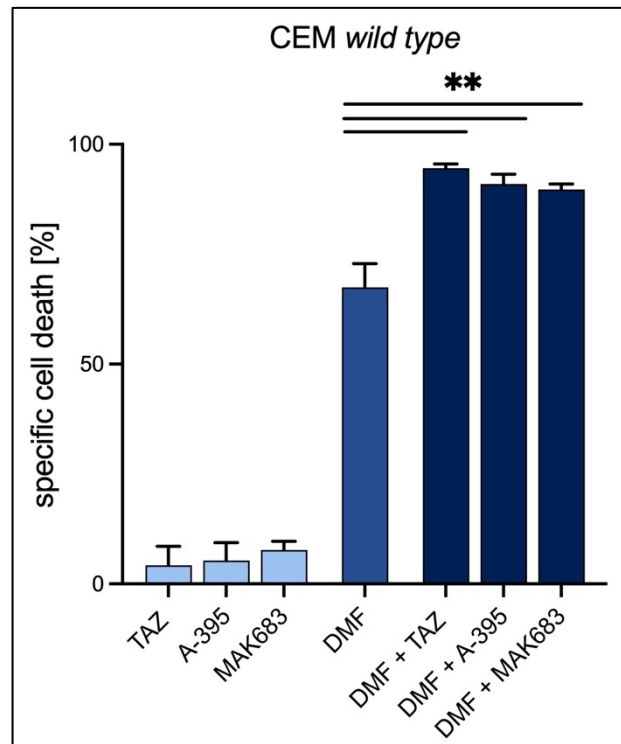


Abbildung 20 Kombinationstherapie von PRC2 Inhibitoren und DMF in CEM-Zellen: Spezifischer Zelltod in CEM-Wildtyp Zellen, die mit Tazemetostat (5 μ M), A-395 (0,5 μ M), MAK683 (0,5 μ M), DMF (25 μ M) und den jeweiligen Kombinationen behandelt wurden. Durchflusszytometrische Annexin V/DAPI basierende Zelltodanalyse nach 48h Inkubationszeit. Student's t-test * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ **** $P < 0.0001$.

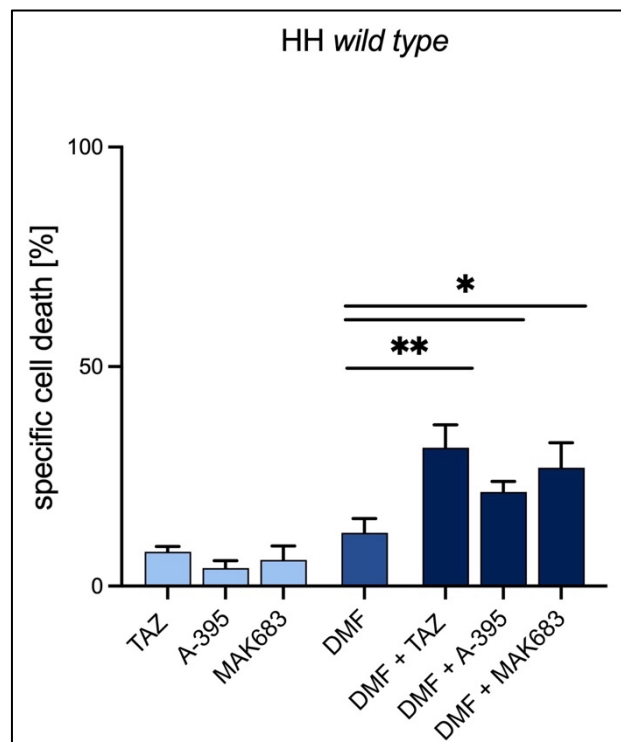


Abbildung 20 Kombinationstherapie PRC2 Inhibitoren und DMF in HH-Zelle: Spezifischer Zelltod in CEM-Wildtyp Zellen, die mit Tazemetostat (5 μ M), A-395 (0,5 μ M), MAK683 (0,5 μ M), DMF (25 μ M) und den jeweiligen Kombinationen behandelt wurden. Durchflusszytometrische Annexin V/DAPI basierende Zelltodanalyse nach 48h Inkubationszeit. Student's t-test * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ **** $P < 0.0001$.

4 Diskussion

Eine zentrale Rolle in der Pathogenese zahlreicher hämatologischer und solider Tumoren spielt der Transkriptionsfaktor NF- κ B, der als zentraler Überlebensfaktor an der Regulation von Proliferation, Apoptoseresistenz und Inflammation beteiligt ist. Aufgrund seiner herausragenden Bedeutung in der Tumorbilogie stellt der NF- κ B-Signalweg einen vielversprechenden therapeutischen Angriffspunkt dar.

Das Sézary-Syndrom, eine aggressive leukämische Variante des kutanen T-Zell-Lymphoms (CTCL), weist eine konstitutive NF- κ B-Aktivierung auf und eignet sich daher in besonderer Weise als Modellsystem zur Identifikation und funktionellen Validierung neuer Therapiekonzepte für NF- κ B-abhängige Malignome.^{57,61,62}

Beim Sézary-Syndrom zeigen etablierte Therapieoptionen wie klassische Chemotherapeutika oder die extrakorporale Photophorese häufig nur eine begrenzte Wirksamkeit. Selbst bei initialem Ansprechen entwickeln viele Patienten im weiteren Verlauf eine Therapieresistenz. Ein wesentlicher Grund für diese therapeutische Herausforderung liegt in der molekularen und epigenetischen Diversität der malignen T-Zellen, die sich in unterschiedlichen Mutationsprofilen, Signalweg-Dysregulationen und tiefgreifenden Veränderungen der Chromatinstruktur widerspiegeln.⁹³ In den letzten Jahren wurden bedeutende Fortschritte in der Therapie des CTCL und Sézary Syndroms gemacht. Unter anderem etablierten sich neue zielgerichtete Therapieoptionen wie Brentuximab Vedotin, einem CD30-Antikörper-Wirkstoff-Konjugat, das selektiv CD30-exprimierende Tumorzellen bindet und dadurch eine zytotoxische Wirkung entfaltet, oder Mogamulizumab, einem CCR4-Antikörper, der regulatorische T-Zellen und maligne T-Zellen mit hoher CCR4-Expression inhibiert und somit das Tumorwachstum hemmt.^{94,95} In bestimmten Patientengruppen insbesondere des CTCL konnte so das progressionsfreie Überleben und die objektiven Ansprechraten signifikant verbessert werden.^{96,97} Dennoch bleibt die therapeutische Wirksamkeit dieser Substanzen begrenzt, unter anderem da Therapieresistenzen und heterogene molekulare Profile das Langzeitansprechen beeinträchtigen. Insbesondere für Patienten mit fortgeschrittenem oder refraktärem Sézary-Syndrom sind die derzeit verfügbaren Behandlungsoptionen nicht ausreichend und unterstreichen den dringenden Bedarf an neuen zielgerichteten

Behandlungsstrategien, die gezielt Resistenzmechanismen überwinden und die Effektivität bestehender Therapieansätze verbessern können.

Ein vielversprechender Ansatz zur Behandlung dieser malignen T-Zell-Erkrankungen ist die gezielte Hemmung des NF- κ B-Signalwegs, der eine zentrale Rolle für das Überleben und die Proliferation von Tumorzellen spielt. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B reguliert über den kanonischen und den nicht-kanonischen Signalweg eine Vielzahl anti-apoptotischer und proliferationsfördernder Gene. In Zellen des CTCLs und insbesondere des Sézary-Syndroms ist vor allem der kanonische Signalweg konstitutiv aktiviert. Diese persistente Aktivierung trägt wesentlich zur Tumorprogression bei und stellt ein potenzielles therapeutisches Ziel dar.^{98,99}

Die Bedeutung des NF- κ B-Signalwegs beschränkt sich jedoch nicht auf das Sézary-Syndrom oder andere lymphatische Neoplasien. Auch in zahlreichen soliden Tumoren – darunter kolorektale Karzinome,^{100–102} Mammakarzinome^{52,103,104} oder das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom^{105–107} – wurde eine pathologische NF- κ B-Aktivierung nachgewiesen, die mit Therapieresistenz, Entzündungsprozessen im Tumormikromilieu und einem prognostisch ungünstigen Krankheitsverlauf assoziiert ist.^{51,52} Erkenntnisse, die im Sézary-Modellsystem gewonnen werden, können daher wertvolle Impulse für die Entwicklung neuer, NF- κ B-zielgerichteter Therapiekonzepte auch in anderen, häufigeren Tumorentitäten liefern.

DMF hat sich als ein vielversprechender Wirkstoff zur Hemmung des kanonischen NF- κ B-Signalwegs erwiesen und zeigte in *in-vitro*-Experimenten eine ausgeprägte zytotoxische Wirkung auf CTCL- und Sézary-Zellen.⁵⁷ In einer kürzlich veröffentlichten klinischen Studie der Phase II konnten diese Ergebnisse bei Patienten mit Mycosis fungoides und Sézary-Syndrom bestätigt werden. Hier wurden 25 Patienten mit unterschiedlichen Krankheitsstadien mit DMF behandelt.⁶² Insgesamt zeigte sich eine objektive Ansprechrate (ORR) von 30 %, wobei insbesondere Sézary-Syndrom-Patienten mit hoher Krankheitslast eine Ansprechrate von bis zu 80 % erreichten. Die Behandlung führte bei den Patienten mit Ansprechen auf eine DMF-Behandlung zu einer signifikanten Reduktion der Sézary-Zellen im peripheren Blut und einer klinischen Verbesserung der Hautläsionen. Nebenwirkungen waren vorwiegend mild und umfassten gastrointestinale Beschwerden und Flush-Symptome, ähnlich den

bekannten Nebenwirkungen aus der Anwendung von DMF in der Multiplen Sklerose.¹⁰⁸ In extrem seltenen Fällen wurde unter DMF-Therapie das Auftreten einer progressiven multifokalen Leukenzephalopathie (PML) beschrieben. Dieses Risiko ist vor allem bei langanhaltender Lymphopenie relevant und erfordert eine regelmäßige Kontrolle der Lymphozytenzahlen.¹⁰⁹ Im Vergleich zu anderen zugelassenen Therapien, wie Brentuximab oder Mogamulizumab, besitzt DMF den Vorteil einer deutlich günstigeren Nebenwirkungsbilanz und einer oralen Verfügbarkeit, was die praktische Anwendung erleichtert. Dennoch entwickelten die meisten Patienten nach durchschnittlich 1,5 Jahren eine sekundäre Resistenz, wodurch die Wirksamkeit der Monotherapie im Langzeitverlauf begrenzt war.

Dies unterstreicht zum einen das hohe Potenzial von DMF in der Behandlung NF- κ B-abhängiger Malignitäten, zum anderen aber auch die Notwendigkeit, Mechanismen der Therapieresistenz besser zu verstehen und Gene oder Proteine zu identifizieren, deren Modulation durch potenzielle Drug Sensitizer die Wirksamkeit von DMF gezielt verstärken kann.

Zur Identifizierung potenzieller therapeutischer Zielstrukturen wurde in dieser Arbeit systematisch der Einfluss einzelner Gene auf die DMF-induzierte Induktion von Zelltod in NF- κ B-abhängigen Tumorzellen untersucht. Hierzu wurde ein genomweites CRISPR/Cas9-basiertes Knockout-Screening in der T-Zell-Lymphom-Zelllinie CEM durchgeführt.

Durch den Einsatz der Brunello-sgRNA-Knockout-Bibliothek, die 76.441 verschiedene sgRNA-Sequenzen für 19.114 Gene umfasst, konnte eine umfassende genetische Analyse der DMF-Sensitivität in malignen T-Zellen erfolgen.⁹² Hierbei enthalten jeweils mehrere sgRNAs unterschiedliche Zielsequenzen für ein spezifisches Gen. Diese redundante Abdeckung trägt dazu bei, dass individuelle Off-Target-Effekte einzelner sgRNAs minimiert und belastbare Ergebnisse generiert werden. Die hohe Komplexität und Tiefe der Bibliothek sind entscheidende Faktoren für die Robustheit und Reproduzierbarkeit des Screenings. Aufgrund ihrer hohen Transduktionseffizienz und stabilen Expression der eingeführten Cas9-Sequenzen erwies sich die CEM Zelllinie als eine optimale Screening-Plattform.

Die bioinformatische Analyse erfolgte mit MAGeCK-VISPR, einem auf den Plattformen „R“ und „Python“ basierenden, etablierten Tool zur Bewertung von CRISPR-Screens. Eine zentrale Metrik zur Bewertung der Selektionsqualität war der Gini-Index, der eine gleichmäßige Verteilung der sgRNAs über alle getesteten Bedingungen überprüft. Die Analyse zeigte, dass die sgRNA-Verteilung über die Proben hinweg konsistent war, was auf eine geringe experimentelle Verzerrung hindeutet. Zudem war die Identifikation und Kartierung der initial eingebrachten sgRNAs sehr erfolgreich, was die Validität des Screenings weiter untermauert. Diese Qualitätsprüfung war essenziell, um sicherzustellen, dass die ermittelten Sensitizer-Gene nicht durch technische Artefakte beeinflusst wurden. Zusammenfassend war damit von einem technisch einwandfrei durchgeführten Screening und einer fehlerfreien bioinformatischen Analyse auszugehen.

Der im Screening generierte Datensatz bietet eine umfassende Grundlage zur Identifikation von Genen, die die Sensitivität gegenüber DMF modulieren. Neben der Analyse einzelner Kandidatengene ermöglicht der Datensatz auch die systematische Erfassung funktioneller Netzwerke und Signalwege, die an der Pathophysiologie maligner T-Zellen sowie an Wirk- und Resistenzmechanismen von DMF beteiligt sein könnten. Aufgrund der zentralen Rolle des NF- κ B-Signalwegs nicht nur im Sézary-Syndrom, sondern auch in einer Vielzahl weiterer hämatologischer und solider Tumoren, besitzt dieser Datensatz ein erhebliches Potenzial für weiterführende funktionelle Analysen. Er kann dazu beitragen, neue genetische Determinanten und therapeutische Zielstrukturen in NF- κ B-abhängigen Malignomen zu identifizieren – über die Fragestellung dieser Arbeit hinaus.

Die in dieser Arbeit untersuchte Fragestellung zur Identifikation potenzieller „Drug Sensitizer“ von DMF konnte durch eine gezielte bioinformatische Analyse des Screening-Datensatzes systematisch untersucht werden.

Besonders bemerkenswert war die deutliche Unterrepräsentation von EZH2-spezifischen sgRNAs in den DMF-behandelten Proben, während sie in den Kontrollproben keine signifikante Veränderung aufwiesen. EZH2 ist die katalytische Untereinheit des Polycomb-Repressive-Complex 2 (PRC2).¹¹⁰ PRC2 ist ein epigenetischer Regulator, der durch Trimethylierung von Lysin 27 am Histon H3 (H3K27me3) die Transkription zahlreicher Gene reprimiert. PRC2 besteht aus

mehreren zentralen Untereinheiten, darunter EZH2 (Enhancer of Zeste Homolog 2) als katalytische Untereinheit, sowie EED (Embryonic Ectoderm Development) und SUZ12 (Suppressor of Zeste 12), die für die Stabilisierung und Funktion des Komplexes essenziell sind.¹¹¹ Diese epigenetische Modifikation spielt eine entscheidende Rolle in der Zellzykluskontrolle, Differenzierung und Tumorbilogie.¹¹² Die konsistente Depletion von EZH2-spezifischen sgRNAs in allen Replikaten spricht für eine funktionelle Relevanz dieses Gens für die DMF-induzierte Zelltoxizität. Die Analyse mittels Square-Plots, die einen direkten Vergleich zwischen DMF- und Kontrollproben ermöglichten, bestätigte diesen Effekt und zeigte, dass EZH2-gezielte sgRNAs unter DMF-Behandlung stark depletiert, in den Kontrollproben jedoch ohne wesentlichen Einfluss auf die Zellproliferation waren. Damit lässt sich EZH2 eindeutig als potenzieller „Drug Sensitizer“ für DMF klassifizieren.

Die Identifikation von EZH2 als potenziellen „Drug Sensitizer“ ist besonders relevant, da PRC2 eine bekannte Rolle in der epigenetischen Regulation spielt und bereits therapeutisch adressiert wird. Mit Tazemetostat steht ein durch die FDA zugelassener selektiver EZH2-Inhibitor zur Verfügung, der insbesondere für die Behandlung des epitheloiden Sarkoms und des follikulären Lymphoms eingesetzt wird.^{113–115} Grundlage bei diesen Erkrankungen ist stets eine pathologische konsekutive Expression bzw. Überexpression von EZH2.¹¹⁶ Unsere Ergebnisse legen nun nahe, dass auch in Zellen mit regulärer Expression eine Inhibition von EZH2 einen Einfluss auf die Effektivität von DMF modulieren kann.

Die Ergebnisse des genomweiten CRISPR/Cas9-Screenings legten nahe, dass der Verlust von EZH2 die Sensitivität von malignen T-Zellen gegenüber DMF erhöht. Um diese Beobachtung zu bestätigen, wurden gezielte Knockout-Experimente durchgeführt. Hierbei wurde EZH2 durch lentivirale Transduktion von sgRNAs in CEM-Zellen gezielt ausgeschaltet und so die Screening-Bedingungen möglichst eng nachempfunden. Die Effizienz des Knockouts wurde zunächst mittels Western-Blot-Analysen überprüft. Dabei zeigte sich eine Reduktion der EZH2-Expression, wobei insbesondere in den mit sgRNA#5 und sgRNA#mix behandelten Zelllinien eine starke Abnahme der Proteinexpression nachgewiesen wurde. Die Tatsache, dass keine vollständige Eliminierung des Proteins erreicht werden konnte, deutet darauf hin, dass die im Screening beobachteten Effekte ebenfalls auf eine partielle Reduktion der

EZH2-Expression zurückzuführen sind. Dies spricht dafür, dass bereits eine moderate Abnahme der PRC2-Aktivität ausreicht, um eine verstärkte DMF-Sensitivität hervorzurufen.

Zur weiterführenden funktionellen Analyse wurde im nächsten Schritt der Einfluss der EZH2-Aktivität auf das Proliferationsverhalten der Zellen unter DMF-Behandlung untersucht. Hierzu wurde ein Competition-Assay durchgeführt, bei dem EZH2-depletierte Zellen und Kontrollzellen gemeinsam unter DMF-Exposition kultiviert wurden und direkt miteinander um die Proliferation konkurrierten. Zur besseren quantitativen Beurteilung der Zellpopulationen diente eine CEM-GFP-Zelllinie als Kontrolle, wodurch die relative Proliferation der EZH2-depletierten Zellen präzise erfasst werden konnte.

Zur Bewertung des Apoptose-Verhaltens wurden darüber hinaus Annexin V/DAPI-basierte Apoptose-Assays durchgeführt. Hierbei wurde die quantitative Zelltodinduktion durch DMF in Wildtypzellen und EZH2-depletierten Zellen verglichen. Auch hier konnten die Ergebnisse des Screenings bestätigt werden. Die EZH2-Knockdown-Zellen zeigten unbehandelt eine unbeeinflusste Viabilität. Unter DMF-Behandlung konnte jedoch signifikant mehr induzierter Zelltod festgestellt werden als in den Wildtyp Zellen.

Diese Ergebnisse unterstreichen das große Potential einer pharmakologischen Kombinationstherapie aus DMF und einem EZH2-Inhibitor. Dieser potenziell translationale Ansatz wurde in weiteren Experimenten untersucht. Für diese Versuche wurde nun auch die Sézary-Zelllinie HH mit einbezogen. Während die bisherigen Experimente an der CEM-Zelllinie durchgeführt wurden, bot die Ergänzung der HH-Zellen die Möglichkeit, die Relevanz der EZH2-Inhibition in einem weiteren malignen T-Zell-Modell zu untersuchen. Dadurch konnte nicht nur die Reproduzierbarkeit der Befunde gestärkt, sondern auch mögliche zelllinienspezifische Effekte erfasst und verglichen werden.

Zur pharmakologischen Inhibition von EZH2 wurde der von der FDA zugelassene Inhibitor Tazemetostat eingesetzt. Tazemetostat ist ein selektiver, kompetitiver Inhibitor von EZH2, der an die S-Adenosylmethionin (SAM)-Bindungsstelle im katalytischen Zentrum von EZH2 bindet. Durch diese kompetitive Hemmung wird die

Übertragung von Methylgruppen auf Lysin 27 von Histon H3 (H3K27) blockiert, wodurch die Trimethylierung von H3K27 (H3K27me3) reduziert wird.¹¹⁷

Zunächst konnte erneut gezeigt werden, dass die Reduktion der EZH2-Aktivität zu keiner Änderung der Viabilität führte. In der Westerblot-Analyse von CEM- und HH-Zellen, die mit steigenden Konzentrationen von Tazemetostat behandelt worden waren, konnte zunächst gezeigt werden, dass es tatsächlich zu einer relevanten dosisabhängigen Abnahme der Methylierung von H3K27 und somit der EZH2-Aktivität gekommen war. Zwar konnte in einem Apoptose-Assay eine starken Zelltodinduktion bei hohen Tazemetostat Konzentrationen nachgewiesen, jedoch bestand hier keine Korrelation zur eigentlichen Abnahme der EZH2-Aktivität. Diese Effekte scheinen somit eher durch eine Zytotoxizität von pharmakologischen Trägerstoffen als durch die Inhibition der EZH2-Aktivität hervorgerufen zu sein. In den anschließenden Kombinationsversuchen konnte dann gezeigt werden, dass die Kombination aus DMF und Tazemetostat tatsächlich zu einer signifikant höheren Zelltodinduktion führte als eine Behandlung nur mit DMF. Interessanterweise war dieser Effekt in den HH-Zellen noch ausgeprägter als in den CEM-Zellen, wobei der induzierte spezifische Zelltod mehr als verdoppelt wurde. Dies könnte darauf hindeuten, dass Sézary-Zellen (HH) stärker von der EZH2-Aktivität abhängig sind als CTCL-Zellen (CEM), was auf zelltypspezifische Unterschiede in der epigenetischen Regulation und Resistenzmechanismen schließen lässt.

EZH2 ist das aktive Zentrum des PRC2. Darüber hinaus gibt es aber auch Hinweise darauf, dass EZH2 auch unabhängig des PRC2 wirken kann. Neben Histonen kann EZH2 unabhängig vom PRC2 Proteine wie GATA4, AR und STAT3 methylieren, was deren Aktivität beeinflusst und zur Regulation von Genexpression beiträgt. Außerdem kann EZH2 unabhängig von PRC2 als Ko-aktivator für Transkriptionsfaktoren fungieren und somit die Transkription bestimmter Gene aktivieren.¹¹⁸ Hierbei interagiert EZH2 beispielsweise mit Faktoren wie STAT3, RelA/B und β -Catenin, was zur Aktivierung von Genen führt, die an Zellproliferation und Überleben beteiligt sind.¹¹⁹

Ziel war es also nun zu evaluieren, ob die beobachteten DMF-sensitivierenden Effekte von EZH2 auf der Hemmung der PRC2-Aktivität beruhen oder ob sie durch einen PRC2-unabhängigen Mechanismus vermittelt werden. Um diese Fragestellung gezielt

zu adressieren, wurde der Einfluss der EED-Inhibitoren A-395 und MAK683 auf die DMF-induzierte Apoptose untersucht. Diese Inhibitoren greifen an unterschiedlichen Stellen des PRC2-Komplexes an: Während A-395 spezifisch die H3K27-Bindung von EED antagonisiert, blockiert MAK683 die Interaktion zwischen EED und EZH2, was eine vollständige Dissoziation des PRC2-Komplexes bewirkt.^{120,121}

Zunächst wurde die Effektivität der PRC2-Inhibitoren A-395 und MAK683 in CEM- und HH-Zellen untersucht. Hierzu wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der Inhibitoren behandelt und über 48 Stunden inkubiert, bevor die H3K27-Methylierung mittels Western-Blot-Analyse überprüft wurde. Dabei zeigte sich, dass beide Inhibitoren eine signifikante Reduktion der H3K27-Trimethylierung bewirkten, was eine effektive Blockade der PRC2-Aktivität bestätigt.

In den darauffolgenden Apoptose-Assays zeigte sich, dass sowohl A-395 als auch MAK683 die DMF-induzierte Apoptoserate signifikant steigern konnten. Besonders in den HH-Zellen führte die Kombinationstherapie zu einer Verdopplung der spezifischen Apoptoserate im Vergleich zur DMF-Monotherapie. Auffällig war, dass die verstärkte DMF-Wirkung durch die PRC2-Inhibitoren nahezu identisch mit der durch Tazemetostat induzierten Sensitivierung war. Dies spricht dafür, dass die beobachtete Verstärkung der DMF-Wirkung nicht auf einen spezifischen EZH2-Effekt zurückzuführen ist, sondern vielmehr auf eine generelle Störung der PRC2-Funktion.

Die gezielte Inhibition von PRC2 – sei es durch EZH2- oder EED-Inhibitoren – verstärkt die DMF-induzierte Apoptose signifikant. Somit konnte gezeigt werden, dass der Verlust der PRC2-Aktivität der entscheidende Faktor für die Verstärkung des DMF-induzierten Zelltodes in CTCL- und Sézary-Zellen ist.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lassen sich mehrere Schlussfolgerungen ableiten: (1) Das genomweite CRISPR/Cas9 Knockout Screening konnte 103 potenzielle „Drug Sensitizer“ Gene identifizieren. EZH2 stach hierbei als bereits bekanntes und pharmakologisch adressierbares Zielgen besonders heraus.

(2) Die Ergebnisse des Screenings konnten validiert werden. Durch die erfolgreiche Reproduktion der Ergebnisse wird nicht nur EZH2 als potenzieller „Drug Sensitizer“

bestätigt. Vielmehr unterstreichen diese Befunde die Zuverlässigkeit und Integrität des gesamten Datensatzes sowie der angewandten Screening-Pipeline, wodurch das gewählte methodische Vorgehen als robust und aussagekräftig eingestuft werden kann. Die Ergebnisse können somit auch als ein „Proof of Principle“ für die erfolgreiche Identifikation funktioneller genetischer Interaktionen mittels CRISPR/Cas9-Screenings betrachtet werden.

(3) EZH2 ist ein potenzieller „Drug Sensitizer“. Es konnte gezeigt werden, dass das Knockdown von EZH2 allein keine Auswirkungen auf die Viabilität der CEM-Zellen hat, was auf eine geringe intrinsische Zytotoxizität hindeutet. Unter DMF-Behandlung hingegen führte der Verlust von EZH2 zu einer signifikant reduzierten Proliferation und einer deutlich verstärkten Zelltodinduktion, was die Sensitivierung der Zellen gegenüber DMF bestätigt. Damit vereint EZH2 zwei zentrale Eigenschaften eines „Drug Sensitizers“: das Fehlen unerwünschter Off-Target-Effekte und damit ein geringes Nebenwirkungspotenzial sowie die gezielte Verstärkung der Wirkung einer bestehenden Therapie, in diesem Fall der DMF-induzierten Apoptose.

(4) Die pharmakologische Inhibition von EZH2 und dem PRC2 stellt einen vielversprechenden und potenziell translationalen Ansatz dar, um die Effektivität von DMF in CTCL- und Sézary-Zellen gezielt zu modulieren.

(5) Die Aktivität des PRC2 und somit der Methylierungsstatus des Lysin 27 auf Histon 3 ist der entscheidende Faktor in der Sensitivierung maligner T-Zellen gegenüber einer Therapie mit DMF. Epigenetische Modifikation kann somit einen Einfluss auf die Effizienz zielgerichteter Therapien haben.

Die genauen Mechanismen, durch die die PRC2-Inhibition die DMF-induzierte Apoptose verstärkt, sind bisher nicht beschrieben worden und daher noch nicht vollständig geklärt. Da bisher keine direkte Verbindung zwischen PRC2 und der Sensitivierung gegenüber DMF hergestellt wurde, stellt diese Arbeit einen neuen Ansatz in der Erforschung epigenetischer Modulationen als potenzielle Strategien zur Verbesserung zielgerichteter Therapien dar. Die Identifikation von PRC2 als möglichen

Modulator der DMF-Response eröffnet neue Fragen bezüglich der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen.

Der PRC2 ist ein essenzieller epigenetischer Modulator. Seine Funktion beruht auf der gezielten Anlagerung von Trimethylgruppen an das Histon H3 an Position K27 (H3K27me3), eine Modifikation, die von der katalytischen Untereinheit EZH2 vermittelt wird.¹¹¹ Diese chemische Modifikation verändert die räumliche Struktur der Chromatinfasern, sodass die DNA dichter verpackt wird und für die RNA-Polymerase II, das Enzym, das Gene abliest und in mRNA umschreibt, nicht mehr zugänglich ist. Zusätzlich dient H3K27me3 als Erkennungsmarkierung für spezifische Proteine, die die Chromatinverdichtung weiter stabilisieren.¹²² Insbesondere binden Polycomb-Proteine, darunter PRC1, an diese modifizierten Histone und bewirken eine noch stärkere Kompaktierung der DNA, indem sie die Struktur der Nukleosomen verändern. Dies verstärkt die Repression der Genexpression, da Transkriptionsfaktoren und andere regulatorische Proteine daran gehindert werden, an die DNA zu binden.¹²³

Daher könnte eine Erklärung für die in dieser Arbeit beobachteten Effekte in der Rolle von H3K27me3 bei der Transkriptionsregulation pro-apoptotischer Gene liegen. Es ist bekannt, dass PRC2 eine Vielzahl von zellulären Prozessen reguliert, darunter die Differenzierung, Proliferation und Apoptose-Resistenz maligner Zellen.^{124,125} In diesem Zusammenhang könnte PRC2 durch die Methylierung von H3K27 die Expression pro-apoptotischer Gene unterdrücken und gleichzeitig die Transkription anti-apoptotischer Faktoren wie Bcl-2 oder XIAP fördern. Hinweise hierauf fanden sich zuletzt in Zellen des Nasopharynx-Karzinoms. Hier wurde gezeigt, dass es zu einer Anreicherung von H3K27me3 in der Promotorregion des OAS1-Gens kommt. Die hierdurch bedingte Reduktion der OAS1-Expression führte zu einer direkten Inhibition des pro-apoptotischen Bcl-2/BAX-Pathways und somit einem Überleben der Zellen. Interessanterweise konnte dieses Phänomen direkt mit der Resistenz dieser Zellen gegenüber einer Radiotherapie in Verbindung gebracht werden.¹²⁶ Dies deutet darauf hin, dass die PRC2-vermittelte Regulation pro-apoptotischer Gene ein allgemeiner Mechanismus zur Förderung der Therapieresistenz sein könnte. Auf Grundlage dieser Beobachtungen könnte die Inhibition von PRC2 auch in CTCL- und Sézary-Zellen dazu führen, dass H3K27me3-vermittelte Repressionen aufgehoben werden und somit eine verstärkte pro-apoptotische Antwort auf DMF ermöglicht wird.

Dimethylfumarat (DMF) ist ein bekannter NF- κ B-Inhibitor, der über die Hemmung dieses Signalwegs zur Reduktion anti-apoptotischer Faktoren beiträgt.¹²⁷ NF- κ B reguliert die Expression zahlreicher Überlebensproteine, darunter Bcl-2 und XIAP, die in Zellen des CTCL und Sézary-Syndroms überexprimiert sind und eine Schlüsselrolle bei der Zelltodresistenz spielen.^{57,69} Eine direkte Interaktion zwischen PRC2 und NF- κ B könnte daher eine schlüssige Erklärung für die DMF-sensitivierenden Effekte der PRC2-Inhibition darstellen, indem die Suppression von NF- κ B-Zielgenen durch PRC2 entfällt und dadurch die DMF-Wirkung verstärkt wird. Tatsächlich gibt es einige Arbeiten, die eine Verbindung zwischen Komponenten des PRC2 und dem NF- κ B-Signalweges nachweisen konnten. Es konnte unter anderem gezeigt werden, dass EZH2, die katalytische Untereinheit des PRC2-Komplexes, direkt mit der RelA/p65-Untereinheit des NF- κ B-Signalwegs interagiert. Diese Interaktion kann zur Aktivierung spezifischer NF- κ B-Zielgene beitragen, was insbesondere in Triple-negativen Brustkrebszellen beobachtet wurde.¹²⁸ Interessanterweise scheint diese Funktion von EZH2 jedoch unabhängig von seiner klassischen Rolle als Histonmethyltransferase zu sein. Da die in dieser Arbeit beobachteten Effekte auf einer Inhibition des gesamten PRC2 beruhen, erscheint eine PRC2-unabhängige Funktion von EZH2 als Erklärung für die verstärkte DMF-Wirkung somit unwahrscheinlich. Hinweise auf eine Interaktion zwischen dem gesamten PRC2 und dem NF- κ B-Signalweg oder seiner Zielgene gibt es bisher nicht.

Neben der epigenetischen Modulation durch PRC2 könnte ein zusätzlicher Mechanismus über die Beeinflussung der DNA-Reparatur erfolgen. Studien haben gezeigt, dass PRC2-Komponenten, einschließlich EZH2, an Stellen von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) rekrutiert werden und dort eine entscheidende Rolle in der Reparatur spielen.¹²⁹ Insbesondere wurde beobachtet, dass EZH2 über die H3K27me3-Modifikation eine strukturelle Veränderung des Chromatins bewirken kann, die für eine effiziente homologe Rekombination (HR) erforderlich ist. Diese Modifikation beeinflusst die Rekrutierung zentraler Reparaturfaktoren wie 53BP1 und BRCA1, die wiederum bestimmen, ob DNA-Doppelstrangbrüche durch homologe Rekombination oder den nicht-homologen Endjoining (NHEJ)-Mechanismus repariert werden.^{130,131} Es konnte gezeigt werden, dass eine Depletion von EZH2 oder eine pharmakologische PRC2-Hemmung in mehreren Zellmodellen zu einer gestörten

DNA-Schadensantwort, einer verzögerten Reparatur von DSBs und somit zu einer erhöhten Anfälligkeit für genotoxische Schäden führt. In diesen Zellen konnte durch den Einsatz von PRC2-Inhibitoren eine Sensitivierung für beispielsweise Cisplatin oder Bestrahlung erzielt werden.¹³² PRC2-Inhibitoren können somit auch im Kontext eines genotoxischen Agents als Drug-Sensitizer bezeichnet werden. Im Kontext einer Dimethylfumarat (DMF)-Therapie, die oxidative DNA-Schäden induziert, könnte die Hemmung von PRC2 die Reparatur dieser Schäden beeinträchtigen und somit die zytotoxische Wirkung von DMF verstärken.

Ein weiterer unterstützender Aspekt dieser Hypothese ist die direkte Beteiligung des Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) an der Regulation oxidativer Stressantworten. Studien haben gezeigt, dass PRC2 eine zentrale Rolle bei der Kontrolle der antioxidativen Kapazität von Zellen spielt, indem es Gene reprimiert, die an der Neutralisierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) beteiligt sind.^{133,133} Die durch EZH2-vermittelte H3K27me3-Modifikation kann beispielsweise zur Herunterregulierung von Enzymen wie Superoxiddismutase (SOD) oder Katalase beitragen, die unter physiologischen Bedingungen ROS abbauen und somit oxidativen Stress begrenzen.^{134,135} Dimethylfumarat (DMF) ist bekannt dafür, oxidativen Stress in malignen Zellen zu verstärken, indem es die Aktivität der Thioredoxin-Reduktase hemmt und dadurch die antioxidative Kapazität der Zelle reduziert.⁵⁶ In normalen Zellen existieren kompensatorische Mechanismen, meist Glutathion, die eine übermäßige ROS-Akkumulation abpuffern können.¹³⁶ Tumorzellen hingegen weisen häufig bereits eine dysregulierte ROS-Homöostase auf und sind besonders anfällig für zusätzliche oxidative Belastungen.¹³⁷ Eine PRC2-Inhibition könnte diesen Effekt weiter verstärken, indem sie die epigenetische Suppression antioxidativer Gene aufhebt und somit eine fehlgeleitete zelluläre Stressantwort auslöst. Dies würde bedeuten, dass Zellen unter PRC2-Hemmung weniger effizient in der Lage sind, ROS-induzierte Schäden zu reparieren oder oxidativen Stress zu kompensieren. Die kombinierte Hemmung von PRC2 und die durch DMF induzierte erhöhte ROS-Produktion könnte somit zu einem synergistischen Wirkmechanismus führen, der die Apoptose maligner T-Zellen gezielt verstärkt.

Trotz der vielversprechenden Ergebnisse dieser Arbeit sind einige Limitationen zu berücksichtigen, die nicht nur für das Sézary-Syndrom, sondern auch für andere NF-

κ B-abhängige Tumorerkrankungen relevant sind. Eine zentrale Einschränkung liegt in der ausschließlichen Verwendung zellulärer *in-vitro*-Modelle. Diese ermöglichen zwar detaillierte mechanistische Einblicke, können jedoch die komplexe Tumormikroumgebung – einschließlich immunologischer Wechselwirkungen und extrazellulärer Einflussfaktoren – nicht vollständig abbilden. Insbesondere immunmodulatorische Effekte, die durch die Interaktion mit dem Tumormilieu oder dem Immunsystem vermittelt werden, bleiben in diesem experimentellen Aufbau unberücksichtigt. Ein weiterer limitierender Aspekt betrifft die zelluläre Heterogenität NF- κ B-abhängiger Malignome. Obwohl die eingesetzten Zelllinien (CEM und HH) als etablierte Modelle für NF- κ B-abhängige Tumore gelten,^{57,61,62} ist unklar, inwieweit die identifizierten Mechanismen auf primäre Patientenproben oder andere Tumorentitäten mit konstitutiver NF- κ B-Aktivität übertragbar sind. Ermutigend ist in diesem Zusammenhang die kürzlich veröffentlichte Phase-II-Studie, in der sich die Wirkung von DMF erfolgreich in ein *in-vivo*- und letztlich auch klinisches Anwendungsmodell übertragen ließ.⁶² Inwiefern dies auch für die Kombinationstherapie aus DMF und Tazemetostat gilt, bleibt zu klären. Ein nächster Schritt wäre daher die Validierung der Kombinationswirkung an primären, aus Patienten gewonnenen Zellen, um die Übertragbarkeit auf heterogene Zellpopulationen noch besser untersuchen zu können.

Zusammenfassend liefern die vorliegenden Ergebnisse neue Einblicke in die epigenetische Regulation der DMF-Sensitivität durch den Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) und dessen Einfluss auf den programmierten Zelltod in malignen T-Zellen. Die Identifikation von EZH2 als potenziellen Drug Sensitizer unterstreicht die zentrale Bedeutung epigenetischer Modifikationen für das Ansprechen auf zielgerichtete Therapien und eröffnet neue Perspektiven für rationale Kombinationstherapien. Insbesondere die pharmakologische Hemmung von PRC2 stellt einen vielversprechenden Ansatz dar, um die Wirksamkeit von Dimethylfumarat zu steigern und potenzielle Resistenzmechanismen zu überwinden.

Die gewonnenen Erkenntnisse basieren zwar auf einem Modellsystem des Sézary-Syndroms, sind jedoch aufgrund der zentralen Rolle des NF- κ B-Signalwegs auf eine Vielzahl weiterer hämatologischer und solider Tumoren mit konstitutiver NF- κ B-Aktivierung übertragbar. Dies verleiht den Befunden eine hohe klinische Relevanz und

legt den Grundstein für weiterführende Untersuchungen zur gezielten epigenetischen Modulation der NF- κ B-Signalweiterleitung in unterschiedlichen Tumorentitäten.

Es bleiben offene Fragen zur molekularen Interaktion zwischen PRC2, NF- κ B und der zellulären Stressantwort. Zukünftige Studien sollten daher die zugrunde liegenden Mechanismen detaillierter charakterisieren, um das therapeutische Potential dieser Strategie voll auszuschöpfen und neue Behandlungsoptionen für NF- κ B-abhängige Malignome zu entwickeln.

5 Zusammenfassung

Das Sézary-Syndrom wurde in dieser Arbeit gezielt als experimentelles Modellsystem zur Untersuchung von Tumoren mit konstitutiver NF- κ B-Aktivierung genutzt. Die Erkrankung ist eine seltene Form des kutanen T-Zell-Lymphoms (CTCL) und zeichnet sich durch eine dauerhafte Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs aus. Aufgrund dieser molekularen Charakteristik eignet sich das Sézary-Syndrom besonders gut zur Untersuchung NF- κ B-abhängiger Signaltransduktion in Tumorzellen.

Klinisch ist das Sézary-Syndrom durch eine hohe Therapieresistenz und eine ungünstige Prognose gekennzeichnet. Etablierte Behandlungsoptionen wie Chemotherapien oder monoklonale Antikörper zeigen häufig nur begrenzte Wirksamkeit. Dimethylfumarat (DMF), ein pharmakologischer Inhibitor des NF- κ B-Signalwegs, hat in klinischen Studien vielversprechende Effekte gezeigt. Das uneinheitliche Ansprechen der Patient:innen stellt jedoch eine wesentliche therapeutische Herausforderung dar.

Ziel dieser Arbeit war es, genetische Faktoren zu identifizieren, die die Wirksamkeit von DMF verbessern. Zu diesem Zweck wurde ein genomweites CRISPR/Cas9-Knockout-Screening in Sézary-Zellen durchgeführt. Dabei wurde der Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) als eines der am stärksten negativ selektierten Gene unter DMF-Behandlung identifiziert. EZH2 ist die katalytische Untereinheit des Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2), der durch Trimethylierung von Lysin 27 im Histon H3 (H3K27me3) die Genexpression epigenetisch reguliert.

Funktionelle Validierungen zeigten, dass der Knockdown von EZH2 die Sensitivität von Sézary-Zellen gegenüber DMF signifikant erhöht. Auch die pharmakologische Hemmung von EZH2 mit dem zugelassenen Inhibitor Tazemetostat verstärkte die DMF-Wirkung deutlich. Darüber hinaus konnte ein ähnlicher Effekt durch die Hemmung weiterer PRC2-Komponenten wie des Polycomb-Proteins Embryonic Ectoderm Development (EED) mittels der Inhibitoren A-395 oder MAK683 beobachtet werden. Diese Befunde unterstreichen die zentrale Rolle des PRC2-Komplexes für die DMF-Sensitivität.

Diese Arbeit liefert erstmals einen systematischen Nachweis für den Einfluss epigenetischer Regulatoren auf die Wirksamkeit von DMF im Sézary-Syndrom. Darüber hinaus belegt sie die Eignung des Sézary-Syndroms als präklinisches

Modellsystem für die Untersuchung NF- κ B-abhängiger Tumorbilogie und die Entwicklung neuer therapeutischer Kombinationsstrategien.

Die wesentlichen Ergebnisse sind:

1. Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) ist ein zentraler Sensitizer für eine Therapie mit DMF. Die pharmakologische Hemmung von EZH2 oder weiteren Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2)-Komponenten verstärkt die Wirkung von DMF in malignen Zellen signifikant.
2. Epigenetische Modulation beeinflusst die Wirksamkeit zielgerichteter Therapien bei malignen T-Zell-Erkrankungen maßgeblich.
3. Die Kombination aus Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2)-Hemmung und NF- κ B-Inhibition eröffnet einen neuen Therapieansatz mit hohem translationalem Potenzial.

Aufbauend auf diesem Modellsystem und den durchgeführten funktionellen Untersuchungen liefert die vorliegende Arbeit zentrale Erkenntnisse, die im Sézary-Syndrom gewonnen wurden und über dieses seltene Lymphom hinaus eine hohe klinische Relevanz besitzen. Da eine konstitutive NF- κ B-Aktivierung ein gemeinsames Merkmal vieler hämatologischer und solider Tumoren darstellt, sind die identifizierten Mechanismen und therapeutischen Synergien potenziell auch auf andere NF- κ B-abhängige Malignome übertragbar. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern somit nicht nur neue Einsichten in die molekularen Wechselwirkungen im Sézary-Syndrom, sondern eröffnen auch neue Perspektiven für die Entwicklung gezielter Kombinationsstrategien bei einer breiteren Gruppe von Tumorerkrankungen mit NF- κ B-Signatur.

6 Anhang

Tabelle 2 Verwendete sgRNA-Sequenzen im Überblick.

sgRNA	Sequenz
CD95	GGAGTTGATGTCAGTCACTTTGCTGGAAACAGCATAGCAAGTTTAAATAAGGCTAG TCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCT
EZH2#3	GCCCTTATCTGGAAACATTGAGGTGCTGGAAACAGCATAGCAAGTTTAAATAAGGC TAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCT
EZH2#5	TTATGATGGGAAAGTACACGTGCTGGAAACAGCATAGCAAGTTTAAATAAGGCTAG TCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCT

Tabelle 3 Drug Sensitizer: 102 Gene wurden als potenzielle Drug Sensitizer identifiziert. Hier aufgelistet nach Rang vergeben durch MAGeCK-MLE mit den zugehörigen Beta-Scores in Kontroll- und DMF-Gruppe

Rank	Gene	Beta-Score Control	Beta-Score DMF
1	C11orf73	-4,4981787	-10,64566692
2	ZNF492	-3,328062184	-10,4341636
3	DLEU7	-3,668877403	-9,73531284
4	RFC1	-2,117349949	-9,482056442
5	CCT5	-4,764804456	-9,366379871
6	OSGIN1	-3,255131503	-8,92831475
7	IGSF1	-3,332939964	-8,885877191
8	FBXL4	-3,4596049	-8,884508238
9	MRVI1	2,103660695	-8,876978993
10	CAMSAP3	-3,607983825	-8,79757969
11	RTL1	-1,962913136	-8,794841783
12	EZH2	-2,964903585	-8,704490852
13	GAPDH	-3,916385408	-8,677111782
14	ZNF638	-3,509798831	-8,591552188
15	SAP25	-1,323373221	-8,583338467
16	GALR1	-0,033209029	-8,357461139
17	TBX6	-2,772624639	-8,275323929
18	COA7	-3,378098767	-8,236308754
19	SEZ6L2	-3,606331673	-8,208245207
20	GSDMC	-2,254321162	-8,135690671
21	C4B	1,446969876	-7,9611491
22	HNRNPU	-3,45433375	-7,958411193
23	FDX1L	-1,223300054	-7,948828518
24	STK32A	-2,190123282	-7,874220552
25	TPRN	-3,373929052	-7,754437121
26	GRID1	-1,276247571	-7,660663806
27	PLA2G12B	-1,16004626	-7,573735258
28	FSCN2	-2,05622035	-7,514870257
29	EIF4EBP1	-3,117609573	-7,462165548
30	BSX	-3,07630579	-7,437524384

31	TNPO1	-2,997553243	-7,421096942
32	RIF1	-1,806824172	-7,362231942
33	HNRNPCL4	-1,995798815	-7,360178512
34	PARVA	-1,565846098	-7,338959732
35	GAN	-1,966138765	-7,336221825
36	DLGAP5	-3,11957642	-7,311580662
37	TSHZ2	-1,555067778	-7,270512057
38	INCENP	-1,684328951	-7,26572072
39	AKT3	-2,568780634	-7,265036243
40	TRA2A	-2,414894538	-7,179476649
41	SFXN5	-1,810207148	-7,159626823
42	DPY30	-2,711573713	-7,156888916
43	IQCH	-1,704233441	-7,126771939
44	GALE	-2,365329998	-7,098708392
45	HIPK1	-2,872697806	-7,090494671
46	ASPH	-0,564862675	-6,928958158
47	PYY	-1,252488061	-6,926220251
48	EIF2S3	-1,091599991	-6,895418797
49	LZTFL1	-1,641923734	-6,84380925
50	PLSCR2	-0,20931184	-6,768174569
51	TTC31	-1,557821363	-6,68247808
52	RHOQ	0,358217879	-6,648664928
53	CCER1	-0,359012486	-6,631553009
54	APOBEC4	-1,21244306	-6,580970177
55	C22orf24	-1,821693534	-6,517108496
56	POGLUT1	-1,044395667	-6,482200182
57	CCDC64	-1,594168693	-6,416969548
58	SURF6	-2,067628061	-6,381787443
59	CDC14A	-1,487250899	-6,362279855
60	ZBTB37	-1,170431211	-6,219155766
61	CC2D2B	-0,938421959	-6,207656557
62	RUVBL1	-1,782435271	-6,199237493
63	XKR4	0,339383354	-6,197457853
64	GJB3	1,060051767	-6,191434458
65	RRM1	-1,03959656	-6,174254091
66	OR51V1	0,581171769	-6,173364272
67	RAD21L1	1,649319078	-6,122986783
68	DFFA	-1,805880085	-6,084382294
69	NRARP	-1,705649571	-6,040096648
70	PET117	0,099546052	-6,037564084
71	PROKR2	-1,177983903	-6,008268479
72	KNG1	-0,680395258	-5,974249985
73	VAPB	-0,177850158	-5,955769112
74	BAMBI	2,099884349	-5,918259786
75	PCDHGC4	-0,565492066	-5,901216315
76	STIL	-0,305144485	-5,892660356
77	ZNF296	-0,838270119	-5,878902373
78	FATE1	-1,519900556	-5,852276227
79	NUP133	-1,444688333	-5,830578314

80	OAS1	-1,006160164	-5,814424663
81	GABRR2	-0,120386761	-5,798271012
82	RNASEH1	4,239026962	-5,788551442
83	ABCC8	-0,313656998	-5,785539744
84	WFDC6	0,849756504	-5,781022198
85	TUBA3D	-1,202530152	-5,778489634
86	SIM1	1,065401591	-5,775888622
87	RTN4	-1,417860543	-5,76445786
88	ADH7	2,597417923	-5,761446162
89	AKAP9	-1,176725121	-5,71763965
90	GFRA3	-1,411881328	-5,704497697
91	STK16	-1,425255887	-5,694778127
92	TSPAN13	-1,573792159	-5,68054101
93	FDXR	-1,305514252	-5,668631115
94	RNF145	1,031021108	-5,663565987
95	EBI3	0,074533267	-5,632422295
96	PGRMC1	-0,126782947	-5,630368865
97	RSU1	-0,924811379	-5,615447271
98	FAHD2A	-0,787289449	-5,577390364
99	GRB10	-0,96422699	-5,564316858
100	CLCC1	-1,049430795	-5,547136492
101	FAM98A	-0,885474443	-5,516677276
102	REG3A	-1,270425704	-5,488203043

7 Literaturverzeichnis

1. Davey MG, Miller N, McInerney NM. A Review of Epidemiology and Cancer Biology of Malignant Melanoma. *Cureus*. 2021 May 18;13(5):e15087. PMID: PMC8210625
2. Gniadecki R, Guenova E, Querfeld C, Nicolay JP, Scarisbrick J, Sokol L. Haematogenous seeding in mycosis fungoides and Sézary syndrome: current evidence and clinical implications. *Br J Dermatol*. 2025 Feb 18;192(3):381–389. PMID: 39545505
3. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*. 2008 Feb 22;132(4):631–644. PMID: PMC2628169
4. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646–674. PMID: 21376230
5. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007 Jun;35(4):495–516. PMID: PMC2117903
6. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer*. 2009 Mar;9(3):153–166. PMID: 19238148
7. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*. 2008 Mar 13;358(11):1148–1159. PMID: 18337604
8. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*. Nature Publishing Group; 2004 Aug;10(8):789–799.
9. Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med*. 2008 Jan 31;358(5):502–511. PMID: 18234754
10. Sherr CJ. Principles of tumor suppression. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):235–246. PMID: 14744434
11. Kunst C, Haderer M, Heckel S, Schlosser S, Müller M. The p53 family in hepatocellular carcinoma. *Translational Cancer Research* [Internet]. AME Publishing Company; 2016 Dec [cited 2025 Mar 5];5(6). Available from: <https://tcr.amegroups.org/article/view/11030>
12. Pflaum J, Schlosser S, Müller M. p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer. *Front Oncol*. 2014;4:285. PMID: PMC4204435
13. Seitz SJ, Schleithoff ES, Koch A, Schuster A, Teufel A, Staib F, Stremmel W, Melino G, Krammer PH, Schilling T, Müller M. Chemotherapy-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma involves the p53 family and is mediated via the extrinsic and the intrinsic pathway. *International Journal of Cancer*. 2010;126(9):2049–2066.
14. Schilling T, Kairat A, Melino G, Krammer PH, Stremmel W, Oren M, Müller M. Interference with the p53 family network contributes to the gain of oncogenic function of mutant p53 in hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Apr 9;394(3):817–823. PMID: 20233581

15. Müller M, Schleithoff ES, Stremmel W, Melino G, Krammer PH, Schilling T. One, two, three--p53, p63, p73 and chemosensitivity. *Drug Resist Updat*. 2006 Dec;9(6):288–306. PMID: 17287142
16. Müller M, Wilder S, Bannasch D, Israeli D, Lehlbach K, Li-Weber M, Friedman SL, Galle PR, Stremmel W, Oren M, Krammer PH. p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med*. 1998 Dec 7;188(11):2033–2045. PMCID: PMC2212386
17. Schilling T, Schleithoff ES, Kairat A, Melino G, Stremmel W, Oren M, Krammer PH, Müller M. Active transcription of the human FAS/CD95/TNFRSF6 gene involves the p53 family. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Sep 18;387(2):399–404. PMID: 19615968
18. Yue X, Zhao Y, Xu Y, Zheng M, Feng Z, Hu W. Mutant p53 in Cancer: Accumulation, Gain-of-Function, and Therapy. *J Mol Biol*. 2017 Jun 2;429(11):1595–1606. PMCID: PMC5663274
19. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science*. 1991 Jul 5;253(5015):49–53. PMID: 1905840
20. Friedberg EC. DNA damage and repair. *Nature*. 2003 Jan 23;421(6921):436–440. PMID: 12540918
21. Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*. 2001 May 17;411(6835):366–374. PMID: 11357144
22. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*. 2002 Jun;3(6):415–428. PMID: 12042769
23. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. 2002 Jan 1;16(1):6–21. PMID: 11782440
24. Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet*. 2000 Apr;16(4):168–174. PMID: 10729832
25. Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell*. 2017 Feb 9;168(4):670–691. PMCID: PMC5308465
26. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature*. 2012 Jan 18;481(7381):306–313. PMCID: PMC3367003
27. McGranahan N, Swanton C. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell*. 2017 Feb 9;168(4):613–628. PMID: 28187284
28. Bukowski K, Kciuk M, Kontek R. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *Int J Mol Sci*. 2020 May 2;21(9):3233. PMCID: PMC7247559
29. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*. 2014 Oct 5;740:364–378. PMCID: PMC4146684
30. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*. 2003 May;3(5):330–338. PMID: 12724731

31. Delgado JL, Hsieh CM, Chan NL, Hiasa H. Topoisomerases as anticancer targets. *Biochem J*. 2018 Jan 23;475(2):373–398. PMID: PMC6110615
32. Livshits Z, Rao RB, Smith SW. An approach to chemotherapy-associated toxicity. *Emerg Med Clin North Am*. 2014 Feb;32(1):167–203. PMID: 24275174
33. Lee YT, Tan YJ, Oon CE. Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. *Eur J Pharmacol*. 2018 Sep 5;834:188–196. PMID: 30031797
34. Wilkes GM. Targeted Therapy: Attacking Cancer with Molecular and Immunological Targeted Agents. *Asia Pac J Oncol Nurs*. 2018;5(2):137–155. PMID: PMC5863423
35. Zhong L, Li Y, Xiong L, Wang W, Wu M, Yuan T, Yang W, Tian C, Miao Z, Wang T, Yang S. Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives. *Sig Transduct Target Ther*. Nature Publishing Group; 2021 May 31;6(1):1–48.
36. Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell*. 1984 Jan;36(1):93–99. PMID: 6319012
37. Chronische Myeloische Leukämie (CML) [Internet]. Onkopedia. [cited 2025 Mar 24]. Available from: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/chronische-myeloische-leukaemie-cml>
38. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2001 Apr 5;344(14):1031–1037. PMID: 11287972
39. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, Cornelissen JJ, Fischer T, Hochhaus A, Hughes T, Lechner K, Nielsen JL, Rousselot P, Reiffers J, Saglio G, Shepherd J, Simonsson B, Gratwohl A, Goldman JM, Kantarjian H, Taylor K, Verhoef G, Bolton AE, Capdeville R, Druker BJ, IRIS Investigators. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2003 Mar 13;348(11):994–1004. PMID: 12637609
40. Aldea M, Andre F, Marabelle A, Dogan S, Barlesi F, Soria JC. Overcoming Resistance to Tumor-Targeted and Immune-Targeted Therapies. *Cancer Discov*. 2021 Apr;11(4):874–899. PMID: 33811122
41. Wang Y, Skibbe JR, Hu C, Dong L, Ferchen K, Su R, Li C, Huang H, Weng H, Huang H, Qin X, Jin J, Chen J, Jiang X. ALOX5 exhibits anti-tumor and drug-sensitizing effects in MLL-rearranged leukemia. *Sci Rep*. 2017 May 12;7(1):1853. PMID: PMC5431828
42. Meidhof S, Brabletz S, Lehmann W, Preca BT, Mock K, Ruh M, Schüler J, Berthold M, Weber A, Burk U, Lübbert M, Puhr M, Culig Z, Wellner U, Keck T, Bronsert P, Küsters S, Hopt UT, Stemmler MP, Brabletz T. ZEB1-associated drug resistance in cancer cells is reversed by the class I HDAC inhibitor mocetinostat. *EMBO Mol Med*. 2015 Jun;7(6):831–847. PMID: PMC4459821

43. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012 Aug 17;337(6096):816–821. PMCID: PMC6286148
44. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013 Feb 15;339(6121):819–823. PMCID: PMC3795411
45. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Sep 25;109(39):E2579-2586. PMCID: PMC3465414
46. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 2013 Feb 15;339(6121):823–826. PMCID: PMC3712628
47. He C, Han S, Chang Y, Wu M, Zhao Y, Chen C, Chu X. CRISPR screen in cancer: status quo and future perspectives. *Am J Cancer Res*. 2021;11(4):1031–1050. PMCID: PMC8085856
48. Koike-Yusa H, Li Y, Tan EP, Velasco-Herrera MDC, Yusa K. Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library. *Nat Biotechnol*. 2014 Mar;32(3):267–273. PMID: 24535568
49. Tzelepis K, Koike-Yusa H, De Braekeleer E, Li Y, Metzakopian E, Dovey OM, Mupo A, Grinkevich V, Li M, Mazan M, Gozdecka M, Ohnishi S, Cooper J, Patel M, McKerrell T, Chen B, Domingues AF, Gallipoli P, Teichmann S, Ponstingl H, McDermott U, Saez-Rodriguez J, Huntly BJP, Iorio F, Pina C, Vassiliou GS, Yusa K. A CRISPR Dropout Screen Identifies Genetic Vulnerabilities and Therapeutic Targets in Acute Myeloid Leukemia. *Cell Rep*. 2016 Oct 18;17(4):1193–1205. PMCID: PMC5081405
50. Wei L, Lee D, Law CT, Zhang MS, Shen J, Chin DWC, Zhang A, Tsang FHC, Wong CLS, Ng IOL, Wong CCL, Wong CM. Genome-wide CRISPR/Cas9 library screening identified PHGDH as a critical driver for Sorafenib resistance in HCC. *Nat Commun*. 2019 Oct 15;10:4681. PMCID: PMC6794322
51. Xia Y, Shen S, Verma IM. NF- κ B, an active player in human cancers. *Cancer Immunol Res*. 2014 Sep;2(9):823–830. PMCID: PMC4155602
52. Mirzaei S, Saghari S, Bassiri F, Raesi R, Zarrabi A, Hushmandi K, Sethi G, Tergaonkar V. NF- κ B as a regulator of cancer metastasis and therapy response: A focus on epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Physiol*. 2022 Jul;237(7):2770–2795. PMID: 35561232
53. Oh A, Pardo M, Rodriguez A, Yu C, Nguyen L, Liang O, Chorzalska A, Dubielecka PM. NF- κ B signaling in neoplastic transition from epithelial to mesenchymal phenotype. *Cell Commun Signal*. 2023 Oct 18;21(1):291. PMCID: PMC10585759
54. Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer*. 2013 Aug 2;12:86. PMCID: PMC3750319

55. Park MH, Hong JT. Roles of NF- κ B in Cancer and Inflammatory Diseases and Their Therapeutic Approaches. *Cells*. 2016 Mar 29;5(2):15. PMCID: PMC4931664
56. Schroeder A, Warnken U, Röth D, Klika KD, Vobis D, Barnert A, Bujupi F, Oberacker T, Schnölzer M, Nicolay JP, Krammer PH, Gülow K. Targeting Thioredoxin-1 by dimethyl fumarate induces ripoptosome-mediated cell death. *Sci Rep*. 2017 Feb 24;7:43168. PMCID: PMC5324128
57. Nicolay JP, Müller-Decker K, Schroeder A, Brechmann M, Möbs M, Géraud C, Assaf C, Goerdts S, Krammer PH, Gülow K. Dimethyl fumarate restores apoptosis sensitivity and inhibits tumor growth and metastasis in CTCL by targeting NF- κ B. *Blood*. 2016 Aug 11;128(6):805–815. PMCID: PMC5026464
58. Seitz R, Tümen D, Kunst C, Heumann P, Schmid S, Kandulski A, Müller M, Gülow K. Exploring the Thioredoxin System as a Therapeutic Target in Cancer: Mechanisms and Implications. *Antioxidants*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2024 Sep;13(9):1078.
59. Juvekar A, Manna S, Ramaswami S, Chang TP, Vu HY, Ghosh CC, Celiker MY, Vancurova I. Bortezomib induces nuclear translocation of I κ B α resulting in gene-specific suppression of NF- κ B--dependent transcription and induction of apoptosis in CTCL. *Mol Cancer Res*. 2011 Feb;9(2):183–194. PMCID: PMC3078042
60. Vilimas T, Mascarenhas J, Palomero T, Mandal M, Buonamici S, Meng F, Thompson B, Spaulding C, Macaroun S, Alegre ML, Kee BL, Ferrando A, Miele L, Aifantis I. Targeting the NF-kappaB signaling pathway in Notch1-induced T-cell leukemia. *Nat Med*. 2007 Jan;13(1):70–77. PMID: 17173050
61. Sors A, Jean-Louis F, Pellet C, Laroche L, Dubertret L, Courtois G, Bachelez H, Michel L. Down-regulating constitutive activation of the NF-kappaB canonical pathway overcomes the resistance of cutaneous T-cell lymphoma to apoptosis. *Blood*. 2006 Mar 15;107(6):2354–2363. PMID: 16219794
62. Nicolay JP, Melchers S, Albrecht JD, Assaf C, Dippel E, Stadler R, Wehkamp U, Wobser M, Zhao J, Burghaus I, Schneider S, Gülow K, Goerdts S, Schürch CM, Utikal J, Krammer PH. Dimethyl fumarate treatment in relapsed and refractory cutaneous T cell lymphoma - a multicenter phase II study. *Blood*. 2023 May 22;blood.2022018669. PMID: 37217183
63. Toribio ML, González-García S. Notch Partners in the Long Journey of T-ALL Pathogenesis. *Int J Mol Sci*. 2023 Jan 10;24(2):1383. PMCID: PMC9866461
64. Girardi T, Vicente C, Cools J, De Keersmaecker K. The genetics and molecular biology of T-ALL. *Blood*. 2017 Mar 2;129(9):1113–1123. PMCID: PMC5363819
65. Jawed SI, Myskowski PL, Horwitz S, Moskowitz A, Querfeld C. Primary cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sézary syndrome): part I. Diagnosis: clinical and histopathologic features and new molecular and biologic markers. *J Am Acad Dermatol*. 2014 Feb;70(2):205.e1–16; quiz 221–222. PMID: 24438969
66. García-Díaz N, Piris MÁ, Ortiz-Romero PL, Vaqué JP. Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome: An Integrative Review of the Pathophysiology, Molecular Drivers,

and Targeted Therapy. *Cancers (Basel)*. 2021 Apr 16;13(8):1931. PMCID: PMC8074086

67. Larocca C, Kupper T. Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome: An Update. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2019 Feb;33(1):103–120. PMCID: PMC7147244

68. Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*. 1986 Aug 29;46(5):705–716. PMID: 3091258

69. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*. 1998 Sep 11;281(5383):1680–1683. PMID: 9733516

70. Fan Y, Dutta J, Gupta N, Fan G, Gélinas C. Regulation of programmed cell death by NF-kappaB and its role in tumorigenesis and therapy. *Adv Exp Med Biol*. 2008;615:223–250. PMID: 18437897

71. Kießling MK, Nicolay JP, Schlör T, Klemke CD, Süss D, Krammer PH, Gülow K. NRAS mutations in cutaneous T cell lymphoma (CTCL) sensitize tumors towards treatment with the multikinase inhibitor Sorafenib. *Oncotarget. Impact Journals*; 2017 May 7;8(28):45687–45697.

72. Kiessling MK, Oberholzer PA, Mondal C, Karpova MB, Zipser MC, Lin WM, Girardi M, Macconail LE, Kehoe SM, Hatton C, French LE, Garraway LA, Polier G, Süss D, Klemke CD, Krammer PH, Gülow K, Dummer R. High-throughput mutation profiling of CTCL samples reveals KRAS and NRAS mutations sensitizing tumors toward inhibition of the RAS/RAF/MEK signaling cascade. *Blood*. 2011 Feb 24;117(8):2433–2440. PMCID: PMC3952811

73. Vaqué JP, Gómez-López G, Monsálvez V, Varela I, Martínez N, Pérez C, Domínguez O, Graña O, Rodríguez-Peralto JL, Rodríguez-Pinilla SM, González-Vela C, Rubio-Camarillo M, Martín-Sánchez E, Pisano DG, Papadavid E, Papadaki T, Requena L, García-Marco JA, Méndez M, Provencio M, Hospital M, Suárez-Massa D, Postigo C, San Segundo D, López-Hoyos M, Ortiz-Romero PL, Piris MA, Sánchez-Beato M. PLCG1 mutations in cutaneous T-cell lymphomas. *Blood*. 2014 Mar 27;123(13):2034–2043. PMID: 24497536

74. Case KB, Allen PB. Advances in Novel Systemic Therapies for the Management of Cutaneous T Cell Lymphoma (CTCL). *Curr Hematol Malig Rep*. 2025 Jan 13;20(1):5. PMID: 39800801

75. Foss F, Kim YH, Scarisbrick J, Akilov O, Ristuccia R, Dwyer K, Wu W, Bagot M. Insights into treatment of patients with mycosis fungoides or Sézary syndrome using mogamulizumab. *J Dermatolog Treat*. 2025 Dec;36(1):2438794. PMID: 39894454

76. Kiessling MK, Klemke CD, Kaminski MM, Galani IE, Krammer PH, Gülow K. Inhibition of constitutively activated nuclear factor-kappaB induces reactive oxygen species- and iron-dependent cell death in cutaneous T-cell lymphoma. *Cancer Res*. 2009 Mar 15;69(6):2365–2374. PMID: 19258503

77. Akute Lymphatische Leukämie (ALL) [Internet]. Onkopedia. [cited 2025 Mar 24]. Available from: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/akute-lymphatische-leukaemie-all>

78. Dos Santos NR, Ghezzi MN, da Silva RC, Fernandes MT. NF- κ B in T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia: Oncogenic Functions in Leukemic and in Microenvironmental Cells. *Cancers (Basel)*. 2010 Nov 5;2(4):1838–1860. PMID: PMC3840450
79. Venci JV, Gandhi MA. Dimethyl fumarate (Tecfidera): a new oral agent for multiple sclerosis. *Ann Pharmacother*. 2013 Dec;47(12):1697–1702. PMID: 24259625
80. Brück J, Dringen R, Amasuno A, Pau-Charles I, Ghoreschi K. A review of the mechanisms of action of dimethylfumarate in the treatment of psoriasis. *Exp Dermatol*. 2018 Jun;27(6):611–624. PMID: 29603404
81. Gillard GO, Collette B, Anderson J, Chao J, Scannevin RH, Huss DJ, Fontenot JD. DMF, but not other fumarates, inhibits NF- κ B activity in vitro in an Nrf2-independent manner. *J Neuroimmunol*. 2015 Jun 15;283:74–85. PMID: 26004161
82. Sun SC. Non-canonical NF- κ B signaling pathway. *Cell Res*. 2011 Jan;21(1):71–85. PMID: PMC3193406
83. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF- κ B Family of Transcription Factors and Its Regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009 Oct;1(4):a000034. PMID: PMC2773619
84. Gallego-Selles A, Galvan-Alvarez V, Martinez-Canton M, Garcia-Gonzalez E, Morales-Alamo D, Santana A, Gonzalez-Henriquez JJ, Dorado C, Calbet JAL, Martin-Rincon M. Fast regulation of the NF- κ B signalling pathway in human skeletal muscle revealed by high-intensity exercise and ischaemia at exhaustion: Role of oxygenation and metabolite accumulation. *Redox Biol*. 2022 Sep;55:102398. PMID: PMC9287614
85. Muri J, Thut H, Feng Q, Kopf M. Thioredoxin-1 distinctly promotes NF- κ B target DNA binding and NLRP3 inflammasome activation independently of Txnip. *Elife*. 2020 Feb 25;9:e53627. PMID: PMC7062472
86. Vancurova I. DMF: a promising therapeutic option in CTCL. *Blood*. 2016 Aug 11;128(6):745–746. PMID: PMC4982450
87. Sanjana NE, Shalem O, Zhang F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Methods*. 2014 Aug;11(8):783–784. PMID: PMC4486245
88. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol*. 1998 Nov;72(11):8463–8471. PMID: PMC110254
89. Stewart SA, Dykxhoorn DM, Palliser D, Mizuno H, Yu EY, An DS, Sabatini DM, Chen ISY, Hahn WC, Sharp PA, Weinberg RA, Novina CD. Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *RNA*. 2003 Apr;9(4):493–501. PMID: PMC1370415
90. Kiessling MK, Linke B, Brechmann M, Süss D, Krammer PH, Gülow K. Inhibition of NF- κ B induces a switch from CD95L-dependent to CD95L-independent and JNK-mediated apoptosis in T cells. *FEBS Lett*. 2010 Nov 19;584(22):4679–4688. PMID: 20974135

91. Wang B, Wang M, Zhang W, Xiao T, Chen CH, Wu A, Wu F, Traugh N, Wang X, Li Z, Mei S, Cui Y, Shi S, Lipp JJ, Hinterndorfer M, Zuber J, Brown M, Li W, Liu XS. Integrative analysis of pooled CRISPR genetic screens using MAGeCKFlute. *Nat Protoc.* 2019 Mar;14(3):756–780. PMID: PMC6862721
92. Doench JG, Fusi N, Sullender M, Hegde M, Vaimberg EW, Donovan KF, Smith I, Tothova Z, Wilen C, Orchard R, Virgin HW, Listgarten J, Root DE. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol.* 2016 Feb;34(2):184–191. PMID: PMC4744125
93. Stadler R, Hain C, Cieslak C, Stranzenbach R. Molecular pathogenesis of cutaneous lymphoma-Future directions. *Exp Dermatol.* 2020 Nov;29(11):1062–1068. PMID: 33090576
94. Prince HM, Gautam A, Kim YH. Brentuximab vedotin: targeting CD30 as standard in CTCL. *Oncotarget.* 2018 Feb 23;9(15):11887–11888. PMID: PMC5844715
95. Makita S, Tobinai K. Mogamulizumab for the treatment of T-cell lymphoma. *Expert Opin Biol Ther.* 2017 Sep;17(9):1145–1153. PMID: 28649848
96. Prince HM, Kim YH, Horwitz SM, Dummer R, Scarisbrick J, Quaglino P, Zinzani PL, Wolter P, Sanches JA, Ortiz-Romero PL, Akilov OE, Geskin L, Trotman J, Taylor K, Dalle S, Weichenthal M, Walewski J, Fisher D, Dréno B, Stadler R, Feldman T, Kuzel TM, Wang Y, Palanca-Wessels MC, Zagadailov E, Trepicchio WL, Zhang W, Lin HM, Liu Y, Huebner D, Little M, Whittaker S, Duvic M, ALCANZA study group. Brentuximab vedotin or physician's choice in CD30-positive cutaneous T-cell lymphoma (ALCANZA): an international, open-label, randomised, phase 3, multicentre trial. *Lancet.* 2017 Aug 5;390(10094):555–566. PMID: 28600132
97. Bozonnat A, Beylot-Barry M, Dereure O, D'Incan M, Quereux G, Guenova E, Perier-Muzet M, Dalle S, Grange F, Viguier MA, Ram-Wolff C, Feldmeyer L, Beltraminelli H, Bonnet N, Amatore F, Maubec E, Franck N, Machet L, Chasset F, Brunet-Possenti F, Bouaziz JD, Battistella M, Donzel M, Pham-Ledard A, Bejar C, Moins-Teisserenc H, Mourah S, Saiag P, Hainaut E, Michel C, Bens G, Adamski H, Aubin F, Boulinguez S, Joly P, Tedbirt B, Templier I, Troin L, Montaudié H, Ingen-Housz-Oro S, Faiz S, Mortier L, Dobos G, Bagot M, Resche-Rigon M, Montlahuc C, Serret-Larmande A, de Masson A, Cutaneous Lymphomas French Study Group. Real-life efficacy of immunotherapy for Sézary syndrome: a multicenter observational cohort study. *EClinicalMedicine.* 2024 Jul;73:102679. PMID: PMC11245986
98. Mori N, Fujii M, Ikeda S, Yamada Y, Tomonaga M, Ballard DW, Yamamoto N. Constitutive activation of NF-kappaB in primary adult T-cell leukemia cells. *Blood.* 1999 Apr 1;93(7):2360–2368. PMID: 10090947
99. Damsky WE, Choi J. Genetics of Cutaneous T Cell Lymphoma: From Bench to Bedside. *Curr Treat Options Oncol.* 2016 Jul;17(7):33. PMID: 27262707
100. Orlandi G, Roncucci L, Carnevale G, Sena P. Different Roles of Apoptosis and Autophagy in the Development of Human Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2023 Jun 15;24(12):10201. PMID: PMC10299161
101. Ershov P, Poyarkov S, Konstantinova Y, Veselovsky E, Makarova A.

Transcriptomic Signatures in Colorectal Cancer Progression. *Curr Mol Med.* 2023;23(3):239–249. PMID: 35490318

102. Peng C, Ouyang Y, Lu N, Li N. The NF- κ B Signaling Pathway, the Microbiota, and Gastrointestinal Tumorigenesis: Recent Advances. *Front Immunol.* 2020;11:1387. PMID: PMC7338561

103. Guo Q, Jin Y, Lin M, Zeng C, Zhang J. NF- κ B signaling in therapy resistance of breast cancer: Mechanisms, approaches, and challenges. *Life Sci.* 2024 Jul 1;348:122684. PMID: 38710275

104. Pavitra E, Kancharla J, Gupta VK, Prasad K, Sung JY, Kim J, Tej MB, Choi R, Lee JH, Han YK, Raju GSR, Bhaskar L, Huh YS. The role of NF- κ B in breast cancer initiation, growth, metastasis, and resistance to chemotherapy. *Biomed Pharmacother.* 2023 Jul;163:114822. PMID: 37146418

105. Lawal B, Kuo YC, Wu AT, Huang HS. Therapeutic potential of EGFR/mTOR/Nf- κ b targeting small molecule for the treatment of non-small cell lung cancer. *Am J Cancer Res.* 2023;13(6):2598–2616. PMID: PMC10326574

106. Zhang L, Ludden CM, Cullen AJ, Tew KD, Branco de Barros AL, Townsend DM. Nuclear factor kappa B expression in non-small cell lung cancer. *Biomed Pharmacother.* 2023 Nov;167:115459. PMID: PMC10591792

107. Toloza EM, D'Amico TA. Targeted therapy for non-small cell lung cancer. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 2005;17(3):199–204. PMID: 16253823

108. Fox RJ, Miller DH, Phillips JT, Hutchinson M, Havrdova E, Kita M, Yang M, Raghupathi K, Novas M, Sweetser MT, Vigiotta V, Dawson KT. Placebo-Controlled Phase 3 Study of Oral BG-12 or Glatiramer in Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine.* Massachusetts Medical Society; 2012 Sep 20;367(12):1087–1097.

109. Jordan AL, Yang J, Fisher CJ, Racke MK, Mao-Draayer Y. Progressive multifocal leukoencephalopathy in dimethyl fumarate-treated multiple sclerosis patients. *Mult Scler.* 2022 Jan;28(1):7–15. PMID: PMC7889744

110. Shi Y, Wang X xi, Zhuang Y wen, Jiang Y, Melcher K, Xu HE. Structure of the PRC2 complex and application to drug discovery. *Acta Pharmacol Sin.* 2017 Jul;38(7):963–976.

111. Margueron R, Reinberg D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature.* 2011 Jan 20;469(7330):343–349. PMID: PMC3760771

112. Wu G, Wang Q, Wang D, Xiong F, Liu W, Chen J, Wang B, Huang W, Wang X, Chen Y. Targeting polycomb repressor complex 2-mediated bivalent promoter epigenetic silencing of secreted frizzled-related protein 1 inhibits cholangiocarcinoma progression. *Clin Transl Med.* 2023 Dec;13(12):e1502. PMID: PMC10696163

113. Zauderer MG, Szlosarek PW, Le Moulec S, Popat S, Taylor P, Planchard D, Scherpereel A, Koczywas M, Forster M, Cameron RB, Peikert T, Argon EK, Michaud NR, Szanto A, Yang J, Chen Y, Kansra V, Agarwal S, Fennell DA. EZH2 inhibitor tazemetostat in patients with relapsed or refractory, BAP1-inactivated malignant pleural mesothelioma: a multicentre, open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2022

Jun;23(6):758–767. PMID: 35588752

114. Italiano A, Soria JC, Toulmonde M, Michot JM, Lucchesi C, Varga A, Coindre JM, Blakemore SJ, Clawson A, Suttle B, McDonald AA, Woodruff M, Ribich S, Hedrick E, Keilhack H, Thomson B, Owa T, Copeland RA, Ho PTC, Ribrag V. Tazemetostat, an EZH2 inhibitor, in relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma and advanced solid tumours: a first-in-human, open-label, phase 1 study. *Lancet Oncol.* 2018 May;19(5):649–659. PMID: 29650362

115. Groisberg R, Subbiah V. EZH2 inhibition for epithelioid sarcoma and follicular lymphoma. *Lancet Oncol.* 2020 Nov;21(11):1388–1390. PMID: 33035458

116. Italiano A. Targeting epigenetics in sarcomas through EZH2 inhibition. *J Hematol Oncol.* 2020 Apr 7;13:33. PMCID: PMC7140314

117. Straining R, Eighmy W. Tazemetostat: EZH2 Inhibitor. *J Adv Pract Oncol.* 2022 Mar;13(2):158–163. PMCID: PMC8955562

118. Kim E, Kim M, Woo DH, Shin Y, Shin J, Chang N, Oh YT, Kim H, Rhee Y, Nakano I, Lee C, Joo KM, Rich JN, Nam DH, Lee J. Phosphorylation of EZH2 activates STAT3 signaling via STAT3 methylation and promotes tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells. *Cancer Cell.* 2013 Jun 10;23(6):839–852. PMCID: PMC4109796

119. Zimmerman SM, Lin PN, Souroullas GP. Non-canonical functions of EZH2 in cancer. *Front Oncol.* 2023 Aug 18;13:1233953. PMCID: PMC10473085

120. Huang Y, Sendzik M, Zhang J, Gao Z, Sun Y, Wang L, Gu J, Zhao K, Yu Z, Zhang L, Zhang Q, Blanz J, Chen Z, Dubost V, Fang D, Feng L, Fu X, Kiffe M, Li L, Luo F, Luo X, Mi Y, Mistry P, Pearson D, Piaia A, Scheufler C, Terranova R, Weiss A, Zeng J, Zhang H, Zhang J, Zhao M, Dillon MP, Jeay S, Qi W, Moggs J, Pissot-Soldermann C, Li E, Atadja P, Lingel A, Oyang C. Discovery of the Clinical Candidate MAK683: An EED-Directed, Allosteric, and Selective PRC2 Inhibitor for the Treatment of Advanced Malignancies. *J Med Chem.* 2022 Apr 14;65(7):5317–5333. PMID: 35352560

121. He Y, Selvaraju S, Curtin ML, Jakob CG, Zhu H, Comess KM, Shaw B, The J, Lima-Fernandes E, Szewczyk MM, Cheng D, Klinge KL, Li HQ, Pliushchev M, Algire MA, Maag D, Guo J, Dietrich J, Panchal SC, Petros AM, Sweis RF, Torrent M, Bigelow LJ, Senisterra G, Li F, Kennedy S, Wu Q, Osterling DJ, Lindley DJ, Gao W, Galasinski S, Barsyte-Lovejoy D, Vedadi M, Buchanan FG, Arrowsmith CH, Chiang GG, Sun C, Pappano WN. The EED protein–protein interaction inhibitor A-395 inactivates the PRC2 complex. *Nat Chem Biol.* 2017 Apr;13(4):389–395.

122. Chammas P, Mocavini I, Di Croce L. Engaging chromatin: PRC2 structure meets function. *Br J Cancer.* 2020 Feb;122(3):315–328. PMCID: PMC7000746

123. Blackledge NP, Farcas AM, Kondo T, King HW, McGouran JF, Hanssen LLP, Ito S, Cooper S, Kondo K, Koseki Y, Ishikura T, Long HK, Sheahan TW, Brockdorff N, Kessler BM, Koseki H, Klose RJ. Variant PRC1 complex-dependent H2A ubiquitylation drives PRC2 recruitment and polycomb domain formation. *Cell.* 2014 Jun 5;157(6):1445–1459. PMCID: PMC4048464

124. Blackledge NP, Klose RJ. The molecular principles of gene regulation by

Polycomb repressive complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2021 Dec;22(12):815–833. PMCID: PMC7612013

125. Chu L, Qu Y, An Y, Hou L, Li J, Li W, Fan G, Song BL, Li E, Zhang L, Qi W. Induction of senescence-associated secretory phenotype underlies the therapeutic efficacy of PRC2 inhibition in cancer. *Cell Death Dis.* 2022 Feb 15;13(2):155. PMCID: PMC8847585

126. Zhou Y, Xiao Y, Liu H, Chen Q, Zhu L, Zeng L, Liu X, Pan Y, Zhang J, Fu J, Shao C. Elevation of H3K27me3 level contributes to the radioresistance of nasopharyngeal carcinoma by inhibiting OAS1 expression. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2024 Jan 1;326(1):C60–C73. PMID: 38009194

127. Loewe R, Pillinger M, de Martin R, Mrowietz U, Gröger M, Holnthoner W, Wolff K, Wiegrebe W, Jirovsky D, Petzelbauer P. Dimethylfumarate inhibits tumor-necrosis-factor-induced CD62E expression in an NF-kappa B-dependent manner. *J Invest Dermatol.* 2001 Dec;117(6):1363–1368. PMID: 11886496

128. Dardis GJ, Wang J, Simon JM, Wang GG, Baldwin AS. An EZH2-NF-κB regulatory axis drives expression of pro-oncogenic gene signatures in triple negative breast cancer. *iScience.* 2023 Jun 14;26(7):107115. PMCID: PMC10319845

129. Campbell S, Ismail IH, Young LC, Poirier GG, Hendzel MJ. Polycomb repressive complex 2 contributes to DNA double-strand break repair. *Cell Cycle.* 2013 Aug 15;12(16):2675–2683. PMCID: PMC3865057

130. Kubalanza K, Konecny GE. Mechanisms of PARP inhibitor resistance in ovarian cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2020 Feb;32(1):36–41. PMID: 31815769

131. Li T, Cai J, Ding H, Xu L, Yang Q, Wang Z. EZH2 participates in malignant biological behavior of epithelial ovarian cancer through regulating the expression of BRCA1. *Cancer Biol Ther.* 2014 Mar 1;15(3):271–278. PMCID: PMC3974828

132. Hu S, Yu L, Li Z, Shen Y, Wang J, Cai J, Xiao L, Wang Z. Overexpression of EZH2 contributes to acquired cisplatin resistance in ovarian cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther.* 2010 Oct 15;10(8):788–795. PMID: 20686362

133. Qin H, Liu C, Li C, Feng C, Bo Huang null. Advances in bi-directional relationships for EZH2 and oxidative stress. *Exp Cell Res.* 2024 Jan 1;434(1):113876. PMID: 38070859

134. Zhou W, Zhu C, Zhou F. TXNIP mediated by EZH2 regulated osteogenic differentiation in hBmscs and MC3T3-E1 cells through the modulation of oxidative stress and PI3K/AKT/Nrf2 pathway. *Connect Tissue Res.* 2024 Jul;65(4):293–303. PMID: 38884152

135. Scuderi SA, Filippone A, Basilotta R, Mannino D, Casili G, Capra AP, Chisari G, Colarossi L, Sava S, Campolo M, Esposito E, Paterniti I. GSK343, an Inhibitor of Enhancer of Zeste Homolog 2, Reduces Glioblastoma Progression through Inflammatory Process Modulation: Focus on Canonical and Non-Canonical NF-κB/IκBα Pathways. *Int J Mol Sci.* 2022 Nov 11;23(22):13915. PMCID: PMC9694970

136. Ravi null, Singh J. Redox imbalance and hypoxia-inducible factors: a

multifaceted crosstalk. FEBS J. 2025 Feb 11; PMID: 39932073

137. Aboelella NS, Brandle C, Kim T, Ding ZC, Zhou G. Oxidative Stress in the Tumor Microenvironment and Its Relevance to Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel)*. 2021 Feb 27;13(5):986. PMCID: PMC7956301

8 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
ALL	Akute lymphatische Leukämie
ATCC	American Type Culture Collection
BAX	BCL2 Associated X protein
BCR	B-Zell-Rezeptor
BD	Becton Dickinson
CD	Cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA
CEM	T-Zell-Lymphom-Zelllinie
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CTCL	Kutanes T-Zell-Lymphom
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	Dimethylfumarat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EED	Embryonic Ectoderm Development
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GFP	Green Fluorescent Protein
HDAC	Histon-Deacetylase
HEK	Human Embryonic Kidney
HH	Sézary-Zelllinie
HRP	Horse Radish Peroxidase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
ml	Milliliter
MOI	Multiplicity of Infection
NEB	New England Biolabs
NF-κB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NGS	Next Generation Sequencing
NHEJ	Non-Homologous End Joining
ORR	Objective Response Rate
PARP	Poly (ADP-ribose) -Polymerase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate

sgRNA	Single Guide RNA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TNF	Tumornekrosefaktor
XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

9 Danksagung

Am Ende dieser Arbeit möchte ich mich herzlich bei all denjenigen bedanken, die mich auf dem Weg meiner Promotion begleitet und unterstützt haben. Ohne ihren wertvollen Beitrag wäre das Zustandekommen dieser Dissertation nicht möglich gewesen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Martina Müller-Schilling, die mir nicht nur die Möglichkeit gegeben hat, an diesem spannenden Forschungsthema zu arbeiten, sondern mich auch mit ihrer Expertise, ihren wertvollen Anregungen und ihrer kontinuierlichen Unterstützung während der gesamten Promotionszeit begleitet hat. Insbesondere ihre Förderung – sei es durch wissenschaftliche Diskussionen, konstruktives Feedback oder die Gelegenheit, meine Forschungsergebnisse auf nationalen und internationalen Kongressen zu präsentieren – war für mich eine große Bereicherung.

Ein ebenso herzlicher Dank Herrn PD Dr. rer. nat. Karsten Gülow für seine wertvollen Impulse und die inspirierenden Diskussionen, die meinen wissenschaftlichen Blick geschärft und mich stets weitergebracht haben. Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. rer. physiol. Deniz Tümen, der mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand und mich mit seiner Geduld und Hilfsbereitschaft unterstützt hat. Ebenso danke ich Elisabeth Aschenbrenner und Kirstin Pollinger, für ihre Unterstützung im Labor, für ihr offenes Ohr und für die kollegiale Zusammenarbeit.

Des Weiteren bedanke ich mich bei der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg, die mir durch ein Promotionsstipendium die Möglichkeit gegeben hat, mich dieser Forschung intensiv zu widmen.

Liebe Hannah-Lou, danke für alles.