

Aus dem Institut für Pathologie
(Prof. Dr. med. Philipp Ströbel)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und
funktionelle Analyse der *KMT2A-MAML2*
Translokation in epithelialen Thymus-
neoplasien und den humanen Zelllinien
1889c und MP-57**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Marcellus Rose

aus

Hildesheim

Göttingen 2023

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer*in: Prof. Dr. med. P. Ströbel

Ko-Betreuer*in: PD Dr. med. A. von Hammerstein-Equord

Prüfungskommission

Referent*in: Prof. Dr. med. P. Ströbel

Ko-Referent*in:

Drittreferent*in:

Datum der mündlichen Prüfung:

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und funktionelle Analyse der *KMT2A-MAML2* Translokation in epithelialen Thymusneoplasien und den humanen Zelllinien 1889c und MP-57“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den
.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Anatomie, Funktion und Involution des Thymus.....	1
1.2 Epitheliale Thymustumore	2
1.2.1 Epidemiologie und Klassifikation der Thymusneoplasien.....	2
1.2.2 Molekulare Genetik und Mutationslast von Thymusneoplasien.....	5
1.2.3 Therapie und Prognose von Thymomen und Thymuskarzinomen	6
1.3 <i>KMT2A-MAML2</i> Translokation in aggressiven Thymom-Subtypen.....	7
1.3.1 Ätiologie und Bedeutung von Translokationen in der Onkologie.....	7
1.3.2 Funktion und Molekularbiologie von <i>KMT2A</i>	9
1.3.3 Molekulargenetik von <i>MAML2</i> und seine Bedeutung für den Notch-Signalweg.....	10
1.3.4 Die <i>KMT2A-MAML2</i> Translokation – Prävalenz und funktionelle Spezifika.....	11
1.3.5 Das <i>Sleeping Beauty</i> Transposon System	13
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	15
2 Material und Methoden.....	17
2.1 Chemikalien und Reagenzien	17
2.2 Gebrauchsmaterialien.....	18
2.3 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme	19
2.4 Geräte und Zubehör.....	19
2.5 Software.....	21
2.6 Puffer und Lösungen.....	21
2.7 Pharmazeutika und zytotoxische Agentien.....	22
2.7.1 Chemotherapeutika und Inhibitoren	22
2.7.2 Antibiotika	22
2.8 Zelllinien.....	22
2.8.1 Humane Tumorzelllinien.....	22
2.8.2 Sonstige Zelllinien.....	23
2.8.3 Prokaryontische Zellen	23
2.9 Zellkulturmedien.....	23
2.10 Plasmide	23
2.11 Antikörper.....	24
2.11.1 Primärantikörper.....	24
2.11.2 Sekundärantikörper.....	24
2.12 Synthetische Oligonukleotide	25
2.13 FISH-Sonden.....	25
2.14 Zellbiologische Methoden	25
2.14.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen.....	25

2.14.2	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	26
2.14.3	Bestimmung der Zellkonzentration	26
2.14.4	Analyse der Zellviabilität.....	26
2.14.5	<i>Scratch</i> -Assay.....	27
2.14.6	Chemosensitivitätstest.....	28
2.14.7	Klonalitätsassay in Methylcellulose	28
2.14.8	Transfektion mit Plasmid-Vektoren und klonale Aussäung	29
2.14.9	<i>Side population assay</i>	30
2.15	Molekularbiologische Methoden	31
2.15.1	Plasmid-Amplifikation und Extraktion	31
2.15.2	Proteinchemische Methoden	32
2.15.3	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.....	36
2.15.4	Nukleinsäuren-Isolation.....	37
2.15.5	Polymerase-Kettenreaktion (<i>PCR</i>)	39
2.15.6	RT-PCR.....	40
2.15.7	Sanger-Sequenzierung	41
2.15.8	<i>Archer-NGS</i>	42
2.16	Untersuchung mit Patientenmaterial	42
2.16.1	Kollektiv neoplastischer Thymuspräparate	42
2.16.2	Histologische Techniken	43
2.17	Statistische Analysen	45
3	Ergebnisse	46
3.1	Detektion der <i>KMT2A-MAML2</i> Translokation in Thymustumoren	46
3.1.1	Immunhistochemische Analyse von <i>KMT2A</i> und <i>MAML2</i>	46
3.1.2	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zur Detektion der <i>KMT2A-MAML2</i> Fusion	48
3.1.3	Validierung FISH-positiver Fälle mit <i>Archer-NGS</i>	49
3.2	In vitro Experimente zur Charakterisierung der <i>KMT2A-MAML2</i> Translokation.....	50
3.2.1	Sequenzierung des verwendeten <i>Sleeping Beauty</i> Plasmids	50
3.2.2	Etablierung von <i>KMT2A-MAML2</i> konstitutiv exprimierenden Zellklonen für funktionelle Analysen	51
3.2.3	Phänotypische Charakterisierung der <i>KMT2A-MAML2</i> Genfusion	54
3.3	Etablierung der RT-PCR als <i>Screening</i> -Methode für die <i>KMT2A-MAML2</i> Translokation.....	62
4	Diskussion	64
4.1	Validierung der Prävalenz der Genfusion und ihres Effekts auf die Genexpression im Gewebe humaner Thymusneoplasien.....	64
4.1.1	Genexpression in Thymusneoplasien.....	64
4.1.2	Methodologische Überlegungen zu FISH- und <i>Archer</i> -Analysen.....	65
4.2	Validierung der RT-PCR als <i>Screening</i> -Methode für epitheliale Thymustumoren.	67
4.3	<i>In-vitro</i> Effekte fusionspositiver Zellklone auf die zelluläre Plastizität.....	68
4.3.1	Bedeutung von <i>HES1</i> für die Klonselktion	69
4.3.2	Fusionspositive Zellen zeigen signifikant verminderte Proliferationsraten.....	70
4.3.3	Effekt der Translokation auf die Zellmigration	71
4.3.4	Validierung der Analyse zu Stammzelleneigenschaften der Zellklone	73

4.3.5	Beurteilung des Ansprechens der Klone auf verschiedene Zytostatika.....	74
4.3.6	Apoptose, Autophagie und Aktivierung EGFR-Signalwegs im Kontext der Translokation.....	76
4.4	Überlegungen zur Entstehung dieser chromosomalen Aberration	78
4.5	Validierung des <i>KMT2A-MAML2</i> -Modells im onkologischen Kontext.....	79
5	Zusammenfassung	81
6	Literaturverzeichnis.....	82

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Übersicht über die beschriebenen <i>KMT2A-MAML2</i> Fusionsvarianten.....	12
Abbildung 1.2: Auffaltung endogener <i>KMT2A</i> - und <i>MAML2</i> -Proteine sowie zweier Fusionsproteine.	12
Abbildung 1.3: Vereinfachte Darstellung der Transposition der <i>KMT2A-MAML2</i> Translokation in die DNS der Zellen.....	14
Abbildung 1.4: Darstellung der verschiedenen Teilbereiche der Fragestellung.	16
Abbildung 3.1: Immunhistochemische Untersuchungen in Thymusneoplasien.	46
Abbildung 3.2: Statistische Analyse zu Verteilung, Masaoka-Stadium, Myasthenie und Gesamtüberleben.	47
Abbildung 3.3: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von <i>MAML2</i> und <i>KMT2A</i> in Thymusneoplasien.	49
Abbildung 3.4: Validierung FISH-positiver Fälle mit <i>Archer-NGS</i>	50
Abbildung 3.5: Übersicht über das SB-Plasmid und das Fusionskonstrukt dieses Plasmids.....	51
Abbildung 3.6: Etablierung geeigneter Zellklone mittels PCR und <i>Western Blot</i>	53
Abbildung 3.7: Einfluss der <i>KMT2A-MAML2</i> Translokation auf das Wachstum der Zellklone.	54
Abbildung 3.8: Untersuchung des Migrationsverhaltens fusionspositiver Klone.	56
Abbildung 3.9: Untersuchungen der Stammzeleigenschaften der Klone.	57
Abbildung 3.10: Graphische Darstellung des Ansprechens der Klone auf verschiedene zytotoxische Agentien.	59
Abbildung 3.11: Analyse der Proteinexpression von EMT und Stammzellmarkern in den Zelllinien 1889c, HEK und MP-57.....	60
Abbildung 3.12: Analyse der Proteinexpression von Anti-Apoptose und dem EGFR-Signalweg in den Zellklonen.	61
Abbildung 3.13: Etablierung und Anwendung der RT-PCR als <i>Screening</i> -Methode.....	63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Chemikalien und Reagenzien nach Hersteller.....	17
Tabelle 2.2: Gebrauchsmaterialien nach Hersteller.....	18
Tabelle 2.3: Reaktionssysteme nach Hersteller.	19
Tabelle 2.4: Verwendete Geräte nach Hersteller.....	19
Tabelle 2.5: Verwendete Software nach Hersteller.	21
Tabelle 2.6: Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen.	21
Tabelle 2.7: Auflistung verwendeter Chemotherapeutika und Inhibitoren.	22
Tabelle 2.8: Verwendete Antibiotika nach Hersteller.	22
Tabelle 2.9: Auflistung verwendeter humaner Tumorzelllinien.	22
Tabelle 2.10: Auflistung verwendeter sonstiger Zelllinien.	23
Tabelle 2.11: Aufstellung und Zusammensetzung verwendeter Zellkulturmedien.	23
Tabelle 2.12: Auflistung verwendeter Antikörper und deren Verdünnung.	24
Tabelle 2.13: Auflistung verwendeter sekundärer Antikörper und deren Konzentration.	24
Tabelle 2.14: Primer und deren Sequenz.....	25
Tabelle 2.15: FISH-Sonden nach Hersteller.....	25
Tabelle 3.1: Auflistung FISH-positiver Fälle nach histologischem Subtyp.....	48
Tabelle 3.2: Verwendete zytotoxische Agentien mit Inkubationszeit und verwendeter Konzentration.	58

Abkürzungsverzeichnis

2D / 3D	zweidimensional / dreidimensional
AIRE	<i>autoimmune regulator</i>
ALL/AML	Akute lymphatische/myeloische Leukämie
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Bp	Basenpaar(e)
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNS	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNS)
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
ctrl	Kontrolle
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
(d)dNTP	(di)desoxyNukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbruch
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	<i>epithelial growth factor receptor</i> (epithelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor)
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
ESMO	<i>european society for medical oncology</i> (Europäische Gesellschaft für medizinische Onkologie)
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
FFPE	Formalin-fixiert, Paraffin-eingebettet
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FOXP1	<i>forkhead Box N1</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GTF2I	<i>general transcription factor II-I</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HES1	<i>hairy and enhancer of split-1</i>
HOX	<i>homeobox</i>
HRAS	<i>Harvey Rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
ITR	<i>inverted terminal repeat</i>
kDa	Kilodalton
KMT2A	Histon-Lysin-N-Methyltransferase 2A
LB-Medium	<i>lysogeny broth medium</i>
MAML2	<i>Mastermind like transcriptional coactivator 2</i>

MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MTS	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGS	<i>next Generation Sequencing</i>
NICD	<i>notch intracellular domain</i> (intrazelluläre Notch-Domäne)
NP-40	Nonyl-Phenoxypolyethoxyethanol
NRAS	<i>Neuroblastoma Rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
ORI	<i>origin of replication</i> (Replikationsursprung)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rcf	<i>relative centrifugal force</i> (relative Zentrifugalkraft)
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute-1640
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i> (reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion)
SB	<i>Sleeping beauty</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumlaurysulfat)
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SSC	<i>side scatter</i>
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TCR	<i>t-cell receptor</i> (T-Zell Rezeptor)
(c/m)TEC	<i>(cortical/ medullary) thymic epithelial cell</i> ((kortikale/medulläre Thymusepithelzelle)
TMA	<i>tissue Microarray</i>
TP53	<i>tumor protein p53</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
WHO	World Health Organization

1 Einleitung

1.1 Anatomie, Funktion und Involution des Thymus

Der Thymus liegt retrosternal im *Trigonum thymicum* des *Mediastinum superius* und *anterioris*. Aus dem ventralen Endoderm der dritten Schlundtasche beginnt sich der Thymus zu entwickeln. Die nach kaudal wachsenden paarigen Aussackungen dieser Schlundtasche bilden die späteren zwei Thymus-Lappen. Der reife Thymus weist eine lobuläre Struktur auf und lässt sich in eine lymphozytenreiche Rinde, den Kortex, und ein weniger lymphozytenreiches Mark, die Medulla, gliedern. In der Medulla finden sich auch die für den Thymus charakteristischen Hassall-Körperchen. Es handelt sich hierbei um zwiebelschalenartig aneinander gelagerte Epithelzellen.

Das Grundgerüst dieses primär lymphatischen Organs bilden sechs verschiedene, maschenartig angeordnete Epithelarten, die sich unter dem Einfluss des Transkriptionsfaktors FOXP1 aus einer gemeinsamen Vorläuferpopulation entwickeln (Bleul et al. 2006; Garfin et al. 2013). In dieses Maschenwerk aus stratifiziertem Epithel wandern unreife T-Lymphozyten aus dem Knochenmark ein. Die Koexistenz von Epithelzellen und Lymphozyten charakterisiert den Thymus als lymphoepitheliales Organ. Neben Lymphozyten spielen auch noch weitere Zellen des Immunsystems, wie dendritische Zellen oder Makrophagen, eine wichtige Rolle für die Funktion des Thymus.

Die primäre Funktion des Thymus besteht in der Reifung und Differenzierung von T-Lymphozyten, das Organ leistet daher einen Beitrag zur Ausbildung eines adaptiven Immunsystems. Die unreifen prä-T-Lymphozyten wandern im dritten Entwicklungsmonat aus dem Knochenmark in den Thymus ein und proliferieren in der Rinden-Region. Sie exprimieren bei Einwanderung keine CD4- oder CD8-Komplexe und werden als doppelt negativ bezeichnet. In dem als MHC-Restriktion benannten ersten Selektionsschritt überleben nur diejenigen Thymozyten, die in der Lage sind, mit ihrem T-Zell-Rezeptor die MHC-Komplexe der kortikalen Epithelzellen niedrigaffin zu binden. Bei diesem Schritt werden die T-Lymphozyten in Abhängigkeit des Erkennens von MHC-I oder -II auf eine CD4- oder CD8-positive Linie determiniert. Die Thymozyten migrieren anschließend ins Mark, wo sie einem zweiten Selektionsschritt unterliegen. Diese sogenannte negative Selektion dient durch die Präsentation von Autoantigenen der Epithelzellen über die MHC-Komplexe einer Induktion der zentralen Toleranz für die T-Lymphozyten. Unter Mitwirkung des Autoimmunregulator-Gens (AIRE) exprimieren die medullären Epithelzellen (mTECs) promiskuitiv gewebe-spezifische Antigene, also Peptide, die normalerweise nur im peripheren Gewebe (z. B. Leber, Schilddrüse, Muskeln) vorkommen. Es werden dabei rund 3000 Gene allein von den mTECs exprimiert (Miragaia et al. 2018; St-

Pierre et al. 2013). In diesen Selektionsschritten sterben über 95 % der Thymozyten aufgrund von Autoreaktivität ab, die anderen verlassen den Thymus als reife, naive T-Zellen und wandern in die sekundär lymphatischen Organe.

Die Aktivität und Größe des Thymus erreicht im Kindesalter ihr Maximum. In der Pubertät beginnt die Involution des Thymus, es kommt dabei zur Verringerung der Masse und Verlust seiner Struktur. Die Menge an Thymus-Parenchym nimmt linear ab und wird durch Fettgewebe ersetzt. Obwohl der Thymus bei Erwachsenen auf eine Masse von etwa 5 g atrophiert, besteht die Thymopoese bis in die vierte Lebensdekade fort (Thapa und Farber 2019). Eine verminderte Expression von FOXP1 konnte mit einer beschleunigten Involution in Verbindung gebracht werden, eine artifizielle Überexpression hingegen schwächte die Involution und die Regression von T-Zellen ab (Chen et al. 2009; Zook et al. 2011). Neben der FOXP1 Expression scheinen auch Androgene eine Rolle bei der Involution des Thymus zu spielen, indem sie sich negativ auf das Überleben von Progenitorzellen auswirken (Zoller und Kersh 2006). Als Folge dieser Involution kommt es zur verminderten Produktion naiver T-Zellen und zur Abnahme der T-Zell-Diversität. Dieser Effekt könnte ursächlich mit der Entstehung einer erhöhten Infektanfälligkeit, Autoimmunerkrankungen und dem Auftreten von Krebserkrankungen in Verbindung stehen (Aw und Palmer 2011).

1.2 Epitheliale Thymustumore

1.2.1 Epidemiologie und Klassifikation der Thymusneoplasien

Primäre mediastinale Neoplasien sind in ihrer Gesamtheit seltene Tumoren. Unter diesen bilden die vom Thymusepithel ausgehenden Tumoren mit einem Anteil von 50 % die häufigste Entität, gefolgt von den Lymphomen (Macchiarini und Ostertag 2004). Diese Thymustumore werden in Thymome und Thymuskarzinome untergliedert, die zusammen genommen etwa 0,2 – 1,5 % aller Krebserkrankungen ausmachen. In der histologischen Klassifikation der Mediastinaltumoren nach WHO werden über 40 verschiedene epitheliale und nicht-epitheliale Entitäten unterschieden, von denen jedoch die überwiegende Mehrheit wie Lymphome oder Sarkome auch in anderen Organen vorkommt. Von Bedeutung für diese Klassifikation sind neben morphologischen und funktionellen Kriterien auch klinische Faktoren (Travis et al. 2021). Im Gegensatz dazu kommen Thymome und Thymuskarzinome ausschließlich im Mediastinum vor. Die Klassifikation und Klinik dieser Thymustumore werden im folgenden Unterkapitel genauer skizziert (Kap. 1.2.1.1/2). Die Inzidenz der Thymome liegt bei $2 - 4 / 10^6$ Einwohner pro Jahr, die der Thymuskarzinome ist mit $0,2 - 0,4 / 10^6$ Einwohnern pro Jahr zehnmal geringer. Während Thymome gehäuft in der Altersgruppe von 40 bis 70 Jahren und in beiden Geschlechtern gleich häufig vorkommen, betreffen die Karzinome verhältnismäßig öfter Männer (2 : 1) und Altersgruppen ab 50 Jahren (Radovich et al. 2018). Für Thymome und Thymuskarzinome existiert das von

Masaoka entwickelte System (Masaoka et al. 1981) als spezifisches *Staging*-System. Dieses System berücksichtigt neben der lokalen Ausdehnung auch etwaige Metastasierungen. In Stadium I liegt ein abgekapselter, nicht infiltrativer Tumor vor, im Stadium II beginnt der Tumor ins umliegende Thymus- oder Fettgewebe zu invadieren. Durch fortschreitende Invasivität werden im Stadium III benachbarte Organe (Lunge, Perikard, größere Gefäße) infiltriert. Stadium IVa ist bei Vorliegen pleuraler oder perikardialer Metastasen erreicht, bei lymphogener oder hämatogener Disseminierung wird von Stadium IVb gesprochen. Diese Masaoka-Stadien haben sich als prognostische Marker etabliert und korrelieren mit dem Gesamtüberleben von Patienten mit Thymomen und Thymuskarzinomen (Detterbeck et al. 2011; Masaoka 2010). 2018 wurde erstmals auch ein Staging-System nach der universellen TNM-Klassifikation eingeführt.

1.2.1.1 Thymome

Thymome sind Tumore, die aus Thymusepithelzellen entstehen oder eine Differenzierung zu diesen hin aufweisen. Thymome sind organotypisch und ähneln dem normalen Thymus morphologisch wie funktionell (Ströbel et al. 2010a). Da Thymome spezifische Muster kortikaler und medullärer Differenzierung ausweisen, wird eine mögliche Entstehung der Thymome von einer bipotenten thymischen Vorläuferzelle diskutiert (Ströbel et al. 2014). Weitere ätiologische Ursachen sind nicht bekannt, familiäre und syndromale Fälle bilden die Ausnahme. Die WHO unterteilt Thymome aufgrund ihrer Histologie und ihrer molekularen Genetik in zahlreiche Subentitäten. Dabei gibt es zwei prädominante Entitäten, die Typ A-Thymome und die Typ B-Thymome, die weiter in B1, B2 und B3 unterteilt werden, sowie den Mischtyp, das AB-Thymom (Travis et al. 2021). Neben morphologischen Aspekten berücksichtigt diese Klassifikation auch die Verteilung der T-Lymphozyten, sowie die Menge und Zytologie der Epithelien. Typ A-Thymome zeichnen sich durch sehr hohe Anteile spindelförmiger oder ovaler Epithelien aus, während lymphozytäre Anteile schwach ausgeprägt sind. B1-Thymome sind dem normalen Thymus hinsichtlich Zytologie und Architektur am ähnlichsten und bilden den lymphozytenreichsten Thymom-Subtyp. Das B2-Thymom weist die für den B-Typ spezifischen polygonalen Epithelzellen auf, die hier zahlreicher vertreten sind als im Normalthymus oder im B1-Typ. In 3 % aller Fälle metastasieren B2-Thymome. Der B3-Typ ist ein stark epithelreicher Tumor mit einem variablen Gehalt an unreifen T-Lymphozyten. Der Grad der Invasivität nimmt zum B3-Subtyp hin zu. Eine Mischform aus diesen beiden Typen bildet das AB-Thymom. Es stellt den häufigsten Subtyp dar und zeichnet sich durch variable Anteile einer lymphozytenarmen Typ-A Komponente und einer lymphozytenreichen B-Komponente aus (Travis et al. 2021). Zahlreiche Thymome präsentieren sich klinisch asymptomatisch und werden daher häufig nur zufällig diagnostiziert. Raumfordernde Prozesse, wie sie insbesondere bei den invasiveren Subtypen B1 – B3 vorkommen, können zu lokalen Symptomen wie Husten, Dyspnoe oder einer oberen Einflusstauung führen, die differentialdiagnostisch ein Thymustumor vermuten lassen. Weiterhin können Symptome durch Paraneoplasien, wie sie

im folgenden Abschnitt erläutert werden, zur Diagnosestellung beitragen (Travis et al. 2021). Prädiktive Marker fehlen bisher bei Thymomen (Marx und Weis 2015).

Aufgrund der funktionellen Ähnlichkeit zum Thymus bewahren die neoplastischen Epithelzellen die Fähigkeit mit Thymozyten zu interagieren und sind auf diese Weise zur Entwicklung und zum Export reifer, naiver CD4⁺-T-Zellen befähigt. Diese Fähigkeit zum Export naiver CD4⁺-T-Zellen aus dem Thymus korreliert stark mit dem Auftreten paraneoplastischer Phänomene wie der *Myasthenia gravis* (Ströbel et al. 2002). Die Myasthenie tritt bei etwa 30 % der Thymom-Patienten auf und stellt das häufigste paraneoplastische Syndrom bei Thymomen dar. Bei dieser Autoimmunerkrankung richten sich Autoantikörper gegen Acetylcholinrezeptoren der neuromuskulären Endplatte, was zu Symptomen wie Ptosis, Dysphagie oder Augenmuskelparesen führen kann. Weitere mit Thymomen assoziierte Autoimmunphänomene sind die isolierte aplastische Anämie (*pure red cell aplasia*), Polymyositis und endokrine Erkrankungen wie das Cushing-Syndrom (Marx et al. 2010). Eine Hypogammaglobulinämie in Rahmen des Good-Syndroms, das mit einer schlechten Prognose und hoher Sterblichkeitsrate korreliert, tritt in 5 – 20 % der Fälle auf (Guevara-Hoyer et al. 2021; Marx et al. 2010).

1.2.1.2 Thymuskarzinome

Wie auch bei den Thymomen, werden bei den Thymuskarzinomen verschiedene Subgruppen differenziert: Plattenepithelkarzinome bilden mit 70 % aller thymischen Karzinome den größten Anteil, gefolgt von basaloiden Karzinomen oder Adenokarzinomen. Thymuskarzinome sind bösartige Neubildungen der Thymusepithelien, die im Gegensatz zu Thymomen die Fähigkeit zur T-Zell-Reifung verloren haben. Dadurch lässt sich die fehlende Assoziation mit Autoimmunerkrankungen erklären (Marx et al. 2010). Die Ätiologie dieser Tumore ist nicht bekannt (Travis et al. 2021). Thymuskarzinome präsentieren sich histopathologisch häufig mit infiltrierenden Inseln großer polygonaler Zellen. Das umliegende Stroma kann unterschiedlich stark von chronischen Entzündungen oder koagulativer Nekrose gekennzeichnet sein. Karzinome zeigen in Abgrenzung zu den Thymomen eindeutige zytologische und histologische Merkmale von Malignität (Travis et al. 2021).

Im Gegensatz zu den häufig indolent verlaufenden Thymomen weisen Thymuskarzinome Lymphknotenmetastasen in 30 % und Fernmetastasen in 50 % der Fälle auf, was in einer deutlich schlechteren Prognose resultiert (Ströbel et al. 2016). Symptome entstehen daher häufig durch lokale Masseneffekte oder sind Folge der Metastasen. 5 – 10 % der Thymuskarzinome weisen Imatinib-sensitive *KIT*-Mutationen auf (Ströbel et al. 2004).

1.2.2 Molekulare Genetik und Mutationslast von Thymusneoplasien

Die genomische Landschaft der Thymome unterscheidet sich von der vieler anderer Krebsarten. Mit 0,48 Mutationen pro Megabase weisen sie die geringste Mutationslast unter den Krebserkrankungen des Erwachsenenalters auf (Marx et al. 2021; Radovich et al. 2018). Die Mutationslast des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms liegt vergleichsweise bei ≥ 10 Mutationen pro Megabase (Stein et al. 2019). Trotz insgesamt niedriger Prävalenz genomischer Veränderungen unterscheiden sich die molekulargenetischen Merkmale der einzelnen Subtypen: ausgehend vom Typ A-Thymom kann über die Subtypen B2 und B3 hin zu den Thymuskarzinomen eine zunehmende Mutationslast beobachtet werden (Travis et al. 2021).

Bei Thymomen lassen sich (bisher) vier rekurrente Mutationen finden: *GTF2I*, *TP53*, *NRAS* und *HRAS*. *GTF2I* scheint ein den Thymomen vorbehaltenes Onkogen zu sein, das eine hohe Mutationsfrequenz aufweist und überwiegend bei den Subtypen A (82 % der Fälle) und AB (74 %) mutiert ist (Petrini et al. 2014). *GTF2I* kodiert für einen Transkriptionsfaktor, dem eine regulierende Funktion bei der Transkription zugesprochen wird. Bei dieser *single codon*-Mutation von *GTF2I* wurden 91 Gene signifikant geringer exprimiert, darunter Gene aus den Clustern Apoptose, Zellzyklus und DNS-Schadensreaktionen (Radovich et al. 2018). In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass aus dieser Mutation eine abweichende Thymusarchitektur und eine verminderte thymopoetische Aktivität resultiert. Da außerdem die Differenzierung der Thymusepithelien partiell blockiert wird, ergibt sich hieraus eine Anhäufung unreifer Thymusepithelzellen (Giorgetti et al. 2022). Trotz erhöhter Proliferationsrate (Überexpression von *GTF2-I*) in mutationspositiven Zellen, korreliert diese *missense* Mutation mit einer besseren Prognose und besserem Gesamtüberleben (Petrini et al. 2014).

Neben den Mutationen mit Funktionszugewinn des jeweiligen Gens (*gain-of-function*) bei *HRAS* und *NRAS* mit unbekannter Funktion in Thymustumoren, existieren auch Mutationen mit Funktionsverlust (*loss-of-function*), wie die von *TP-53*. Diese Mutation korreliert mit einem aggressiveren Verhalten der Thymome sowie einer schlechteren Prognose und geringerem Gesamtüberleben (Moreira et al. 2015). Der Verlust von Chromosom 16q lässt sich bei Thymuskarzinomen beschreiben, die allseits über eine höhere genomische Instabilität und höhere Mutationslast verfügen (Zettl et al. 2000).

Weiterhin wurden bei Thymomen zwei wiederkehrende Translokationen beschrieben. Dazu zählt die *YAP-MAML2* Translokation, die bei metaplastischen Thymomen auftritt. Diese Fusion könnte differenzialdiagnostisch zur Abgrenzung von Typ A-Thymomen genutzt werden. Eine Funktion oder phänotypische Charakteristika dieser Funktion sind noch nicht beschrieben worden (Vivero et al. 2020; Zhao et al. 2021). Eine zweite bei Thymomen auftretende Translokation ist die *KMT2A-MAML2* Fusion, welche das Hauptthema dieser Arbeit darstellt. Sie wird in Kapitel 1.3.4 genauer abgehandelt.

Diese rekurrenten Mutationen und Translokationen bei Thymomen und Thymuskarzinomen können bisher nicht therapeutisch genutzt werden (Radovich et al. 2018). Auf die Therapie und die damit verbundenen Herausforderungen soll nun eingegangen werden.

1.2.3 Therapie und Prognose von Thymomen und Thymuskarzinomen

Aufgrund der geringen Prävalenz epithelialer Tumore ist die Evidenz der Datenlage eingeschränkt. Trotz verschiedener biologischer und molekulargenetischer Eigenschaften, ist die Therapie von Thymomen und Thymuskarzinomen bisher weitgehend identisch (Ströbel et al. 2010a). Die vollständige, chirurgische Resektion stellt den einzigen kurativen Therapieansatz dar und hat sich daher als oberstes Therapieziel etabliert. Bei fehlender Resektabilität versagen kurative Ansätze oft, obwohl strahlen-therapeutische Interventionen eine nicht zu vernachlässigende Zahl an Patienten retten können (Girard et al. 2015; Jackson et al. 2017). Bei Versagen der Chemotherapie rezidivierender Thymome oder Thymuskarzinome gibt es praktisch keine standardisierten Behandlungsoptionen mehr (Litvak et al. 2014).

Die ESMO-Leitlinien (*european society for medical oncology*) orientieren sich bei ihren Therapieempfehlungen an den Masaoka-Stadien der jeweiligen Tumorentität. Diesen Leitlinien zufolge sind für die Behandlung von Thymomen und Thymuskarzinomen das Masaoka-Stadium und der Resektionsstatus die wichtigsten Kriterien zur Therapiefindung, gefolgt von der Histologie (Girard et al. 2015). Für die Stadien I bedarf es bei vollständiger Resektion von Thymomen keiner weiteren Therapie. Bei Thymuskarzinomen kann eine Strahlentherapie in Betracht gezogen werden. Im Stadium II sollte beim R0-Status nur für B2-/B3-Thymome und Thymuskarzinome eine Radiotherapie in Erwägung gezogen werden. Bei inkompletter Resektion wird in diesen Stadien für beide Entitäten eine postoperative Bestrahlung empfohlen. Für die Stadien III und IVa wird unabhängig vom Resektionsstatus eine Strahlentherapie vorgeschlagen. Um eine etwaige Resektabilität zu erreichen wird bei R > 0 eine Chemotherapie empfohlen. Bleibt der Tumor irresektabel, wird eine Radiochemotherapie nahegelegt. Bei der Chemotherapie gibt es verschiedene Platin-basierte Schemata, die in Phase-II Studien untersucht worden. Dazu zählt das PAC-Schema (Cisplatin, Doxorubicin und Cyclophosphamid) oder das ADOC-Schema (PAC-Therapeutika + Vincristin) (Girard et al. 2015). Das Ziel der Behandlung fortgeschrittener, metastasierter Thymustumore (Stadium IVb) ist es, durch Platin-basierte Chemotherapie die tumorbedingten Symptome in einem palliativen Rahmen zu lindern. Rückfälle oder ein Fortschreiten der Erkrankung treten in 10 – 30 % der Fälle auf. Bei 20 – 30 % der Fälle können Platin-basierte Therapien zur objektiven Remission führen. Rund 50 % der Patienten können mit aktuellen Therapiemöglichkeiten nicht geheilt werden und sind Kandidaten für eine Zweitlinientherapie (Ströbel et al. 2010a; Ströbel et al. 2007).

Um ein besseres Therapieresultat für die Zweitlinienbehandlung zu erzielen, wurden Studien zum Einsatz von *targeted therapies* durchgeführt, die das Behandlungsspektrum erweitern

sollen. Diese Therapeutika zielen auf molekularer Ebene auf spezifische Schlüsselgene aberranter Signalwege der Tumoren ab und können so den Stoffwechsel oder das Wachstum gezielt hemmen. So erzielten beispielsweise Sunitinib als Tyrosinkinase-Hemmstoff (Ströbel et al. 2010b), der EGFR-Inhibitor Erlotinib (Christodoulou et al. 2008) oder Lenvatinib als *Multitarget*-Inhibitor (Sato et al. 2020) antineoplastische Aktivität.

Die Prognose der Thymusneoplasien ist entitätsabhängig. Typ A-Thymome haben mit einer 10-Jahres-Überlebensrate von 100 % die beste Prognose. Die Typen AB und B1 haben mit einer 10-Jahres-Überlebensrate von 85 bis 100 % eine ähnlich gute Prognose wie der Typ A. Die Rezidivrate des B1-Thymoms liegt zwischen 11 und 14 %. Der Typ B2 hat eine schlechtere Prognose, die 10- bzw. 20-Jahres-Überlebensrate liegt bei etwa 80 % bzw. 60 %. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Rezidiven liegt innerhalb von 10 Jahren bei 32 %. Das B3-Thymom hat eine Rezidivrate von 44 % und eine 20-Jahres-Überlebensrate von 25 – 36 %. Die Thymuskarzinome haben die schlechteste Prognose, die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 57 – 65 %. Aufgrund der teilweise hohen Rezidivrate und dem Auftreten von Spätrezidiven wird eine langfristige klinische Nachsorge für diese Patienten empfohlen (Travis et al. 2021).

1.3 *KMT2A-MAML2* Translokation in aggressiven Thymom-Subtypen

1.3.1 Ätiologie und Bedeutung von Translokationen in der Onkologie

Genomische Instabilität und Mutationen, die sich auch als chromosomale Mutation in Form von Translokationen präsentieren können, zählen zu den *Hallmarks of Cancer* (Hanahan 2022). Es ist bekannt, dass derartige genetische Veränderungen ursächlich mit Krebserkrankungen in Verbindung stehen. Dabei handelt es sich häufig um Onkogene, Tumorsuppressorgene oder DNS-Reparaturgene, die Deletionen, Inversionen oder Translokationen unterliegen können. Es besteht schon lange die Vermutung, dass Translokationen, die durch Austausch chromosomaler Abschnitte entstehen, für die Malignität entarteter Zellen verantwortlich sein könnten. Es konnten einige Translokationen als wesentliche Ursache für Krebsarten wie Lymphome oder Leukämien ausfindig gemacht werden (Nambiar et al. 2008; Stern 1950). Derartige Translokationen können zwei grundlegende Veränderungen zur Folge haben: einerseits kann ein Gen durch Relokalisation in die Nähe des Promotors des Partnergens rücken und dadurch in seiner Expression vom Promotor des Partners reguliert werden, was *par exemple* in einer konstant höheren Expression resultieren könnte. Andererseits ist die Bildung eines Fusionsgens durch Translokation möglich. Aus diesen Fusionsgenen können wiederum Fusionsproteine entstehen, deren Funktion kaum untersucht ist und die *de novo* onkogene Funktionen erhalten können (Wächter et al. 2014). Die Entstehung eines solchen Fusionsproteins wird für die *KMT2A-MAML2* Translokation vorhergesagt, konnte jedoch bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden (Massoth et al. 2020).

Die Pathogenese von Translokationen im Allgemeinen ist nach wie vor unklar, es scheinen aber zwei wesentliche Schritte zur Entstehung notwendig zu sein: Es müssen an den zu brechenden Gen-Loci Doppelstrangbrüche (kurz DSB) zeitgleich existieren. Unter Umgehung etwaiger Reparaturmechanismen müssen sich die Enden annähern und dann wieder verschließen (Zheng 2013). Die zahlreichen Einflussfaktoren dieser beiden Ereignisse und die unklaren molekularen Abläufe verdeutlichen die Komplexität von Translokationen. Als endogene Ursachen konnte unter anderem die räumliche Nähe der Gene mit der Ausbildung eines Fusionsgens korreliert werden (Mathas et al. 2009). Diese durch Chromosomenfaltung entstehende Nähe kann bei Interphasen-Chromosomen die Wahrscheinlichkeit einer illegitimen Religation erhöhen (Meaburn et al. 2007; Zheng 2013). Zu den exogenen Ursachen für DSBs zählen unter anderem Chemotherapeutika und ionisierende Strahlung (Byrne et al. 2014).

Bei den translozierten Genen handelt es sich meistens um Gene, die für Tyrosinkinasen oder Transkriptionsfaktoren kodieren. Zwar liegen die DSBs meist in den Transkriptionsstartstellen, sie fusionieren jedoch meistens nicht in funktionellen Domänen (Chiarle et al. 2011; Zheng 2013). Translokationen haben vielfältige Funktionen, die zwischen geringer Bedeutung für den Phänotyp und direkter Einleitung der Apoptose sehr breit gestreut sein können (Zheng 2013). Prinzipiell unterscheiden sich Fusionsproteine von ihren Elternproteinen, sie können neue Funktionen erhalten und auch selber als Transkriptionsfaktoren fungieren. Die *EWS-FLI* Translokation unterstreicht diesen Zusammenhang, denn *FLI* hat trotz derselben enthaltenden Domänen wie das Elternprotein grundsätzlich andere Transkriptionseigenschaften (Patel et al. 2012). Entgegen ihrer vielfältigen und teilweise gegensätzlichen Funktion können Translokationen auch klinisch genutzt werden: einige Translokationen haben sich als prognostische Indikatoren etablieren können (Bloomfield et al. 1984). Andere wiederum, wie zum Beispiel weitere *KMT2A*-Translokationen, korrelieren oft mit einer schlechteren Prognose (Rowley 2001). Die WHO-Klassifikation hämatopoetischer Neoplasien berücksichtigt in der Therapieempfehlung den Translokationstyp. Dieser kann Einfluss auf die Wahl des Chemotherapeutikums haben (Swerdlow SH 2017). Zwar besteht die Hypothese, dass Translokationen alleine nicht ausreichen, um eine Krebserkrankung auszulösen (Rowley 2001), auch weil sie in gesunden Zellen gefunden werden konnten (Nambiar und Raghavan 2013; Uckun et al. 1998), sie könnten den Zellen jedoch einen Wachstumsvorteil bieten und so die Chance auf weitere Mutationen erhöhen, die dann die maligne Transformation auslösen (Zheng 2013). Bei Mutationen lassen sich prinzipiell zwei Arten von Mutationen unterscheiden: zum einen die sogenannten *Driver*-Mutationen, die in der Tumorgenese entscheidend sind und zum anderen die sogenannten *Passenger*-Mutationen, die nicht zur Tumorentstehung beitragen (Iranzo et al. 2018; McFarland et al. 2013). Inwieweit es sich bei der *KMT2A-MAML2* Translokation um eine *Passenger*- oder *Driver*-Mutation handelt, ist bislang unklar. Die genaue Unterscheidung zwischen diesen beiden Mutationsformen stellt jedoch bis heute eine große Herausforderung der Genforschung dar (Iranzo et al. 2018). Gewiss ist, dass Translokationen neue

therapeutische und prognostische Möglichkeiten bei der Behandlung von Krebserkrankungen bieten können.

1.3.2 Funktion und Molekularbiologie von *KMT2A*

Das Onkogen *KMT2A* kodiert für die Histon-Lysin-N-Methyltransferase 2A. Als transkriptioneller Koaktivator ist das vom *KMT2A*-Gen kodierte Protein für die Regulierung der Genexpression in der frühen Entwicklung und der Hämatopoese von Bedeutung. Das Gen befindet sich auf Chromosom 11 bei q23.3 und besteht aus insgesamt 37 Exons.

Das zugehörige Protein wird nach der Translation rasch prozessiert. Die Endopeptidase Taspase 1 spaltet das Protein in zwei Fragmente (Takeda et al. 2006; Yokoyama et al. 2002). Während das C-terminale Fragment nach der Spaltung phosphoryliert wird und starke transkriptionsfördernde Eigenschaften besitzt, unterdrückt das N-terminale Fragment die Transkription. Durch Interaktion der beiden Fragmente miteinander und mit anderen Proteinen werden Multiproteinkomplexe gebildet, die dann regulierend auf die Transkription wirken (Yokoyama et al. 2002). Auf diese Weise ist *KMT2A* epigenetisch an der Regulation der Genexpression zahlreicher Gene beteiligt und spielt eine globale Rolle bei dieser Regulation. Die Histon-Methylierung durch *KMT2A* (Methyltransferase) steht dabei im Zusammenhang mit der Regulation transkriptionsfördernder oder -hemmender Chromatinzustände. Neben der Methylierung ist *KMT2A* an der Aufrechterhaltung eines Transkriptionsgedächtnisses auf epigenetischer Ebene zuständig (Guenther et al. 2005). Die Trimethylierung von Histon H3 am Lysin 4 (H3-K4-Methylierung) in der kodierenden Region bleibt auch nach Termination der Transkription erhalten und korreliert mit einer transkriptionsfördernden Chromatinstruktur (Bernstein et al. 2002). *KMT2A* besitzt eine H3-K4-Methyltransferase Aktivität; sowohl die Präsenz von *KMT2A* als auch die der Trimethylierung an stark exprimierten Genen unterstreichen die globale Rolle von *KMT2A*. Die Bindung von *KMT2A* nahe der mit Polymerasen besetzten Startstellen der Transkription korreliert sowohl mit der Trimethylierung als auch mit der Genexpression. Diese Trimethylierung durch *KMT2A* könnte ein molekulares Gedächtnis für den aktiven Zustand des Gens bilden (Guenther et al. 2005) und stellt eine wesentliche Funktion dieses Gens dar.

Trotz beschriebener Transkriptionsregulation zahlreicher Gene durch *KMT2A* sind nur wenige definierte nachgeschaltete Zielgene bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass *KMT2A* die Expression von *HOX*-Genen in hämatopoetischen Zellen reguliert (Ernst et al. 2004). Weiterhin interagiert es mit der *EF2*-Familie, einer Familie von Transkriptionsfaktoren, die die Aktivierung essentieller Gene für die Zellzyklusprogression orchestrieren (Blais und Dynlacht 2004). Eine weitere Funktion liegt in der Regulation der Expression von Stammzellgenen und Genen des *Wnt*-Stoffwechselweges (Grinat et al. 2020).

Klinisch korreliert eine hohe Expression von *KMT2A* mit einer schlechten Gesamtüberlebensrate von Darmkrebspatienten. In Knockdown-Experimenten von *KMT2A* wurden sowohl Tumorwachstum als auch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung reduziert

(Grinat et al. 2020). Eine fehlende Taspase 1 zur Prozessierung des Proteins korreliert mit einer signifikanten Reduktion der Thymusgewichts und der Thymozytenzahl durch fehlende Proliferation der doppelt-positiven T-Lymphozyten (Takeda et al. 2006).

1.3.3 Molekulargenetik von *MAML2* und seine Bedeutung für den Notch-Signalweg

Die *MAML*-Gene (*Mastermind like transcriptional coactivator*) kodieren für eine Gruppe dreier nukleärer Proteine, die als transkriptionelle Koaktivatoren der Notch-Signalgebung fungieren und die Expression der Zielgene dieses Signalweges regulieren (McElhinny et al. 2008). Das *MAML2* Gen besteht aus 5 Exons und ist auf Chromosom 11 bei q21 lokalisiert (Verdorfer et al. 2009). Mit seiner N-terminalen Domäne kann *MAML2* an die Ankyrin-Domäne einiger Notch Proteine binden und beteiligt sich so an dem Notch-Transkriptionskomplex. Neben ihrer Beteiligung am Notch Signalweg ist die Familie der MAML-Proteine auch als Koaktivator an anderen Stoffwechselwegen beteiligt. Dazu zählen neben der Myogenese (Shen et al. 2006), der Tumorsuppressor Signalweg TP53 (Zhao et al. 2007) sowie die Regulation von β -Catenin im Wnt-Signalweg (Alves-Guerra et al. 2007).

Der Notch-Signalweg spielt unter anderem eine Rolle bei der Proliferation, Apoptose und Vaskulogenese (Kimble und Crittenden 2007; Krebs et al. 2000) und hält so die Zellhomöostase aufrecht. Dieser Signalweg ist neben dem Wnt- und Shh-Signalweg (*Sonic Hedgehog*) für die Reaktion der Zelle auf extrazelluläre Signale von Bedeutung, weshalb Notch in vielen Organen vertreten ist. In Abgrenzung zu anderen Signalwegen besteht dieser Stoffwechselweg aus wenigen Komponenten, eine Signalverstärkung gibt es nicht. Input und Output stehen dabei in einem stöchiometrischen Verhältnis, wodurch die Signalstärke sehr fein reguliert werden kann (Andersson et al. 2011). Nach Ligandenbindung wird der transmembranäre Rezeptor proteolytisch prozessiert, sodass die intrazelluläre Domäne, auch NICD genannt, freigesetzt wird (Kopan 2012). Die Domäne wird in den Zellkern verlagert, wo sie dann mit CSL, einem DNA-bindenden Adaptor, interagiert und neben MAML weitere Proteine rekrutiert (Kopan und Ilagan 2009). Durch Bildung eines solchen Protein-Komplexes können die Notch Zielgene transkribiert und exprimiert werden. Zu den wenigen bekannten Zielgenen zählen die *Hes*-Genfamilie (Iso et al. 2003), *c-Myc* (Weng et al. 2006), *p21* (Rangarajan et al. 2001), *CyclinD1* (Ronchini und Capobianco 2001) und *Bcl-2* (Deftos et al. 1998).

Die *HES*-Genfamilie (*hairy and enhancer of split*) kodiert für sieben Proteine, denen durch ihre *basic* Helix-Loop-Helix Konformation transkriptionsrepressive Eigenschaften zugeschrieben werden (Kageyama et al. 2008). Eines dieser Gene ist das Notch-Zielgen *HES1*. *HES1* ist insbesondere in der Embryogenese für die Aufrechterhaltung der Stammzellen von Bedeutung, indem es durch eine Rekrutierung von Histondeacetylasen die Transkription dieser Zellen aktiv hemmt (Sang et al. 2010; Yao et al. 2001). Weiterhin korrelieren hohe *HES1*-Spiegel mit vermehrtem Auftreten von Metastasen durch Affektion von EMT

(Epithelial-mesenchymale Transition) mit Ausbildung eines mesenchymalen Phänotyps der Zellen (Sumual et al. 2010). *HES1* konnte des Weiteren mit einer vermehrten Resistenz gegen chemotherapeutische Agentien in Verbindung gebracht werden (Liu et al. 2015). Eine aberrante Notch-Signalgebung und eine anormale Expression von *Hes1* scheinen mit einer erhöhten Invasivität und gesteigerten Metastasierungsraten in aggressiven Tumoren einherzugehen (Dailey et al. 2013).

1.3.4 Die *KMT2A-MAML2* Translokation – Prävalenz und funktionelle Spezifika

Die *KMT2A-MAML2* Translokation wurde 1998 von Obama und Kollegen erstmalig bei einem Erwachsenen mit T-Zell-Leukämie beschrieben (Obama et al. 1998). Diese Translokation präsentiert sich als Inversion der beiden auf Chromosom 11 liegenden Banden q21 und q23 (Inv(11)(q21q23)). Diese Fusion wurde einzelne Male bei verschiedenen Leukämie Subtypen (ALL (Akute lymphatische Leukämie) und AML (Akute myeloische Leukämie) beschrieben (Mariani et al. 2020), scheint aber keinem spezifischen Subtyp zu eigen zu sein. 2020 wurde diese Translokation erstmalig für Thymome beschrieben. Es wurden initial elf B2- und B3-Thymom-Patienten mit dieser Fusion gefunden. Sie ist spezifisch für diese Thymom-Entitäten und wurde bisher in keinem anderen Subtyp gefunden, abgesehen von einem kombinierten B3-Thymom mit geringen Thymuskarzinom-Anteilen. Außer bei Thymomen und Leukämien wurde diese Translokation bisher nur bei einem Plasmozytom und einem Fall von myelodysplastischem Syndrom gefunden (Massoth et al. 2020). Es handelt sich um eine *in-Frame*-Fusion, die in etwa 6 % der B2- und B3-Thymome vorzukommen scheint. Das mediane Alter der Patienten mit dieser Fusion lag bei 48 Jahren, zu 55 % waren Männer betroffen. Weiterhin wurden verschiedene Varianten dieser Translokation gefunden, die die Exons 8 – 11 von *KMT2A* sowie das Exon 2 von *MAML2* beinhalteten (Massoth et al. 2020). Bei einem Fall einer akuten Leukämie wurde zusätzlich ein Variante mit Exon 7 von *KMT2A* beschrieben (Menu et al. 2017). Die Fusion scheint daher immer vor dem Exon 2 aufzutreten, nur ein Fall berichtet von dieser Translokation mit Beteiligung des Exons 3 von *MAML2* (Takahashi et al. 2020). Abbildung 1.1 gibt eine Übersicht über die verschiedenen beschriebenen Fusionsprodukte.

Obwohl die Fusion vereinzelt Male beschrieben wurde, sind die funktionellen Auswirkungen kaum bekannt. Es wird eine Störung des Notch-Signalweges durch Unterdrückung des Notch-Zielgens *HES1* diskutiert. Die Fusion könnte dabei die NICD-induzierte Aktivität von *HES1* supprimieren (Nemoto et al. 2007). Es existieren keine Publikationen über weitere funktionelle Aspekte dieser Fusion, ebenso wenig über eine potenzielle onkogene Treiberfunktion. Die Fusion ist derzeit nicht spezifisch therapierbar (Massoth et al. 2020).

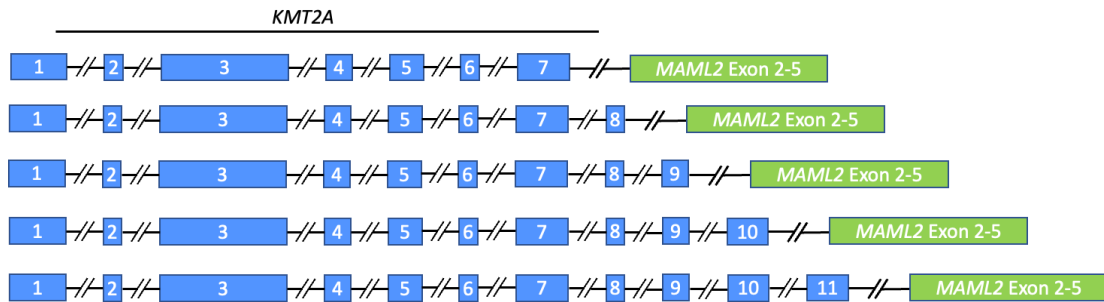


Abbildung 1.1: Übersicht über die beschriebenen *KMT2A-MAML2* Fusionsvarianten. Die Abbildung zeigt die insgesamt fünf bisher beschriebenen Fusionskonstrukte. Die Länge des jeweiligen Exons in der Graphik stellt die relative Größe der beteiligten Exons zueinander dar. Die Exons von *KMT2A* sind durchnummeriert, die Introns sollen durch die dazwischen liegenden Horizontalen angedeutet werden.

Wie in Kapitel 1.3.1 beschrieben, wird für diese Translokation die Entstehung eines Fusionsproteins vorhergesagt. Es sollte versucht werden die Expression eines solchen Proteins *in-vivo* vorherzusagen. Dazu wurden die jeweiligen Sequenzen für die beschriebenen Fusionskonstrukte in eine Proteinsequenz translatiert. Es wurden dabei nur Fusionen berücksichtigt, die innerhalb der Introns auftreten. Bei nicht bekannten exakten Fusionsstellen im Exon-Bereich kann aufgrund von Leserasterverschiebungen die Entstehung eines solchen Fusionsproteins nicht zuverlässig vorherbestimmt werden. Alle beschriebenen Fusionen schienen *in-frame* zu sein, was auf die Entstehung eines Fusionsproteins hindeutet. Nur bei der Fusion von Exon 7 (*KMT2A*) mit *MAML2* wird vorzeitig ein Stopcodon eingebaut, weshalb hier kein Fusionsprotein entstehen sollte. Abbildung 1.2 zeigt die Auffaltung der endogenen Proteine sowie exemplarisch die Tertiärstruktur zweier Fusionsproteine. Trotz verschiedener Längen und Domänen der beiden Fusionsproteine zeigt sich kein wesentlicher Unterschied der Tertiärstruktur zwischen diesen. Die Fusionsproteine unterscheiden sich jedoch stark von den Wildtyp-Proteinen.

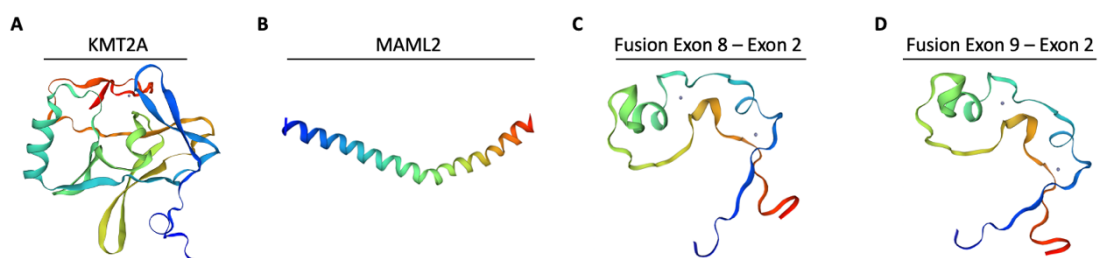


Abbildung 1.2: Auffaltung endogener *KMT2A*- und *MAML2*-Proteine sowie zweier Fusionsproteine. Die zum Auffalten verwendeten Sequenzen wurden der Ensembl-Datenbank entnommen (ensembl.org), in eine Proteinsequenz translatiert (web.expasy.org) und anschließend aufgefaltet (swissmodel.expasy.org). Referenz-Sequenzen: *KMT2A*: NM_001197104.2, *MAML2*: NM_032427.4 **A** Abbildung des aufgefalteten

KMT2A-Gens. **B** Tertiärstruktur von MAML2. **C/D** Exemplarische Übersicht der Struktur zweier möglicher Fusionsproteine bestehend aus Exon 1 – 8 / 9 (*KMT2A*) und Exon 2 – 5 (*MAML2*).

1.3.5 Das *Sleeping Beauty* Transposon System

Die Erforschung der Funktion von Genen und ihrer zugehörigen Proteine stellt eine große Herausforderung in der Zellbiologie dar. Die künstliche Expression dieser Gene hat sich als nützliches Werkzeug zur Funktionsaufklärung erwiesen. Neben transienter Expression durch Plasmide, erlauben retro- oder lentivirale Transduktionen eine stabile Expression des zu untersuchenden Gens durch genomische Integration. Die fehlende chromosomale Integration einiger viraler Systeme und die Größe der zu transfizierenden DNS-Sequenz, stellen dabei einige Herausforderungen dieser Methodik dar (Kebriaei et al. 2017; Kowarz et al. 2015). Das *Sleeping Beauty* Transposon System ermöglicht die Insertion einer definierten DNS-Sequenz in Wirbeltierzellen mit stabiler Expression für *In-vivo*- und *In-vitro*-Experimente. Durch zusätzliche optionale Kombination mit Selektionsmarkern und der Expression fluoreszierender Proteine stellt sich diese Methode den experimentellen Anforderungen (Kowarz et al. 2015).

Transposons kommen in der Natur als mobile genetische Elemente vor, die ihre Position im Genom verändern können. Mit Hilfe des Transposase-Enzyms können diese DNS-Einheiten mittels *Cut-and-Paste* Mechanismus an einer Stelle exzidiert und dann beliebig reintegriert werden. Das *Sleeping Beauty* Transposon System wurde 1998 aus inaktiven Transposon-Sequenzen des Fischgenoms isoliert. Nach Rekonstruktion eines aktiven Transposons, wurde es nach dem Märchen der Brüder Grimm benannt (Dornröschen) (Ivics et al. 1997). Damit stellt es das erste DNS-basierte Transposon dar, das aus inaktivem genetischem Material rekonstruiert werden konnte. Das Transposon besteht aus einer DNS-Sequenz, die von invertierten terminalen Wiederholungen (*inverted terminal repeats*, ITRs) flankiert wird. Die ITRs sind rund 200 – 250 Bp lange Sequenzen, die je ein Paar von Bindungsstellen für die Transposase tragen. Die Transposase verfügt über eine N-terminale DNS-bindende Domäne, die der einiger Transkriptionsfaktoren ähnelt und die eine spezifische Substraterkennung ermöglicht (Izsvák et al. 2002; Vos und Plasterk 1994). Weiterhin verfügt das Enzym neben einer katalytischen Domäne für die DNS-Spaltung über ein Kernlokalisierungssignal. Bei der Transposition bindet die Transposase an die ITRs. Anschließend erfolgt die Exzision des Transposons mit der gewünschten DNS-Sequenz durch die Transposase. Die dann folgende Integration des Transposons findet an TA-Zielnukleotiden statt, wobei diese TA-Sequenz bei Insertion dupliziert wird und einen molekularen Fußabdruck des Systems darstellt (Ivics und Izsvák 2015). Für eine experimentelle Überexpression von Genen können zwischen diesen ITRs beliebige Gene eingefügt und so überexprimiert werden (Ivics und Izsvák 2015). Abbildung 1.3 Abbildung 1.3 veranschaulicht diesen Transpositionsmechanismus.

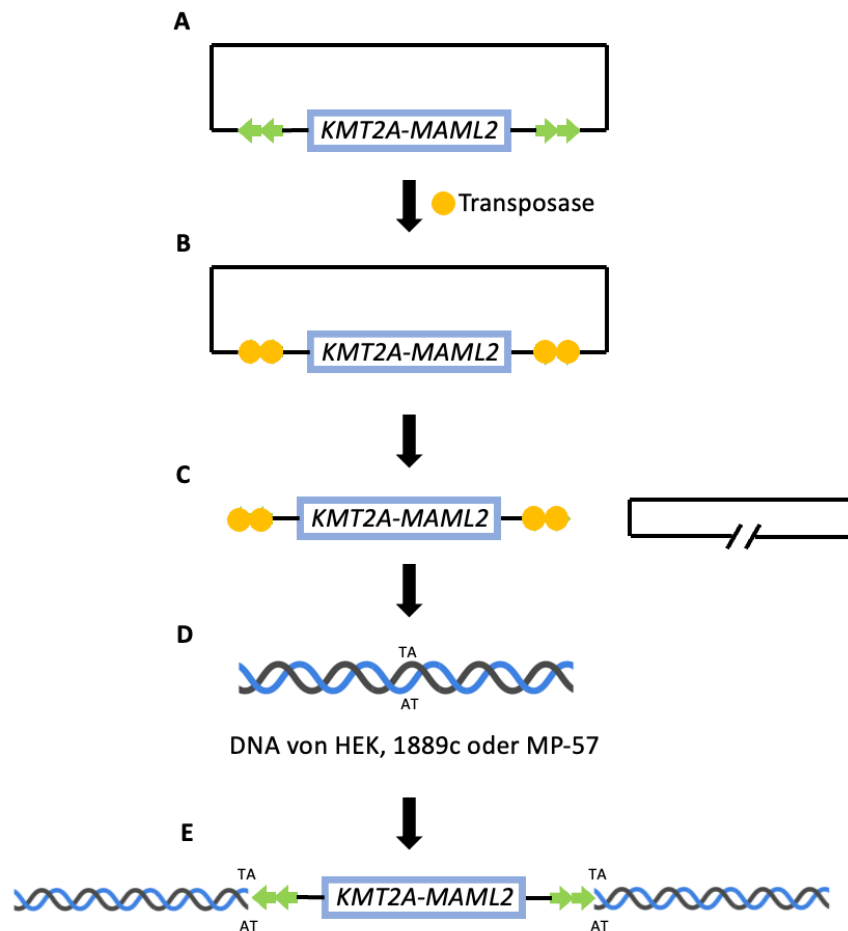


Abbildung 1.3: Vereinfachte Darstellung der Transposition der *KMT2A-MAML2* Translokation in die DNS der Zellen. **A** Simplifiziertes das SB-Plasmid. Die grünen Pfeile stellen die ITRs dar, die die Fusionsssequenz flankieren. **B** Die zugegebene Transposase (gelber Kreis) erkennt und bindet an den ITRs. **C** Durch enzymatische Aktivität der Transposase wird das Transposon aus dem Plasmid herausgeschnitten. **D** Das Transposon rückt in räumliche Nähe zur genomischen DNS der zu transfizierenden Zellen. **E** Erfolgreiche Insertion des Transposons an den TA-Sequenzen ins Genom.

Das *Sleeping Beauty* (SB) Transposon System erlaubt eine Integration von bis zu 100 kB Größe mit angemessener Effizienz (Rostovskaya et al. 2012). Weiterhin ist das System mit einer geringen Immunogenität assoziiert (Yant et al. 2000), die Transposase liefert eine sehr präzise Substratspezifität für die ITRs des Transposons (Izsvák et al. 2002) und die Expression besteht über die Keimbahntransmission hinaus (Yant et al. 2000). Durch Konstruktion eines Zwei-Komponentensystems, bestehend aus dem Transposase-Plasmid und der Transposase, lassen sich Gene und Genfusionen *in-vivo* überexprimieren und gestatten eine funktionelle Analyse und Aufdeckung molekularer Mechanismen.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Fragestellung dieser Arbeit ergibt aus der *KMT2A-MAML2* Translokation im Kontext epithelialer thymischer Neoplasien. Thymome und Thymuskarzinome weisen eine einzigartige genomischen Landschaft auf, die unter anderem durch eine der geringsten Mutationslasten adulter Tumore charakterisiert wird (Marx et al. 2021; Radovich et al. 2018). Nur wenige rekurrente Mutationen und Translokationen sind beschrieben, prädiktive Marker fehlen weitestgehend (Marx und Weis 2015) und die Therapie dieser Malignitäten stellt ein Problemfeld dar (Ströbel et al. 2010a; Ströbel et al. 2007). Eine der wenigen für diese Tumore beschriebene chromosomale Aberration ist die *KMT2A-MAML2* Translokation. Sie tritt in den B2- und B3-Thymomen auf. Die Entstehung, die Funktion und die klinische Bedeutung dieses Fusionsproduktes sind praktisch unbekannt und sollen in dieser Arbeit untersucht werden (Marx et al. 2021).

Ziel dieser Arbeit ist es durch Untersuchung eines Kollektivs von 165 Gewebeproben die Prävalenz und das Auftreten der *KMT2A-MAML2* Fusion in den verschiedenen Thymom-Subtypen und Thymuskarzinomen mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), *Next Generation Sequencing* (NGS) und quantitativer PCR zu detektieren. Dabei soll versucht werden, eine mögliche klinische Relevanz bzw. eine Korrelation zu klinischen Markern zu finden. Im experimentellen Teil sollen unter Verwendung zweier Thymuskarzinomzelllinien (1889c und MP-57) und einer embryonalen Nierenzelllinie (HEK293) mittels *Sleeping Beauty* Transposition Zellklone generiert werden, die ein spezifisches *KMT2A-MAML2* Fusionsprodukt überexprimieren. Es soll dabei modellhaft versucht werden, die Auswirkungen dieser Translokation auf diverse Phänotypen (Wachstum, Migration, etc.) hin zu untersuchen und darüber hinaus soll die Entstehung eines Fusionsproteins nachgewiesen werden. Ferner war es Ziel dieser Arbeit, eine einfache *Screening*-Methode für diese Translokation zu finden.

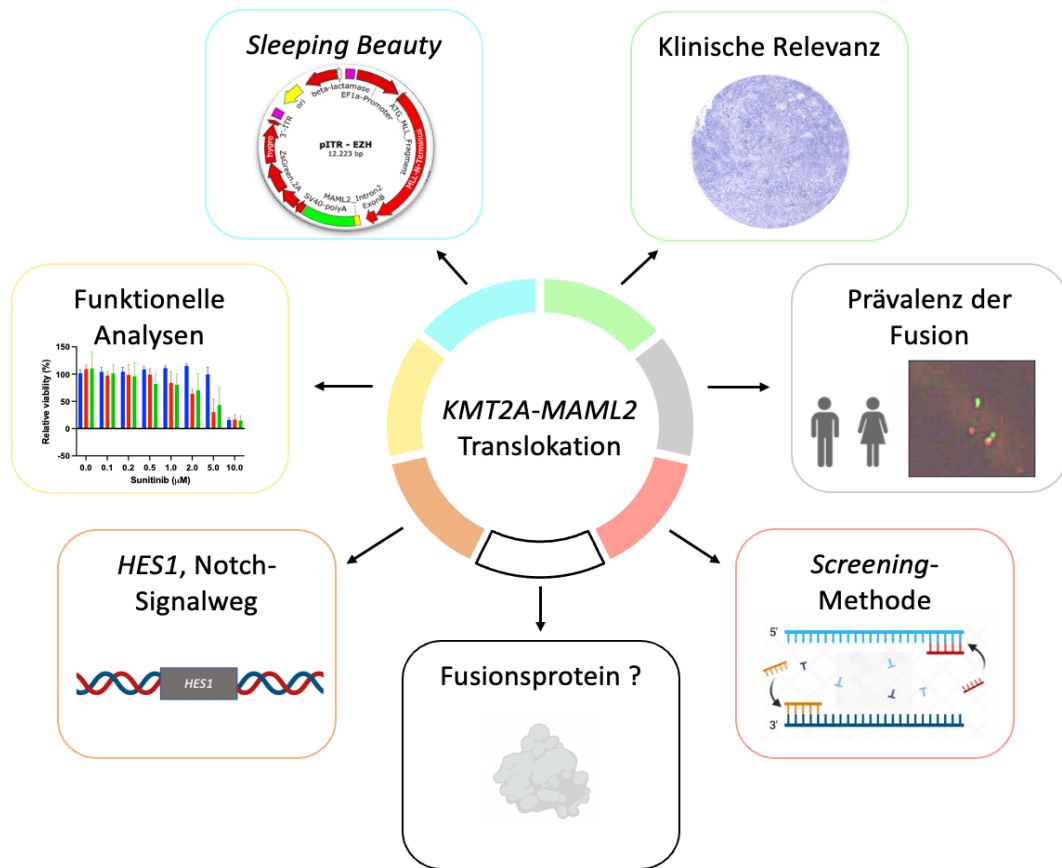


Abbildung 1.4: Darstellung der verschiedenen Teilbereiche der Fragestellung. Im klinischen Teil sollten Prävalenz und prognostische Relevanz der Fusion untersucht werden. Im experimentellen Teil sollten unter Zuhilfenahme der *Sleeping Beauty* Methode funktionelle Analysen und der Nachweis eines Fusionsproteins erfolgen. Weiterhin soll versucht werden, eine *Screening*-Methode für diese Translokation zu entwickeln.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2.1: Chemikalien und Reagenzien nach Hersteller.

Chemikalie / Reagenz	Hersteller	
VP 2000 Pretreatment Reagent	Abbott Laboratories, Chicago, Illinois, Vereinigte Staaten	
VP 2000 Protease Buffer (0,01 N HCL)		
Chloroform: Isoamylalkohol 24	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland	
Aqua ad injectabilia Braun, Mini-Plasco® connect	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland	
PBS Dulbecco	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland	
10x TGS	BioRad Laboratories, Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten	
4x Laemmli Sample Buffer		
DC™ Protein Assay Reagent A, B und S	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	
Trans-Blot® Turbo™ 5x Transfer Puffer		
Albumin Fraktion V aus bovinem Serum		
LB-Medium (Laira/Miller)		
Milchpulver		
Natriumchlorid		
Natriumhypochloritlösung 12 %		
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)		
Ponceau S		
TRIS Pufferan®		
Tris-hydrochlorid Pufferan®		
Dimethylsulfoxid (DMSO)		Honeywell International, Inc., Morristown, Vereinigte Staaten
Wasserbad-Schutzmittel Aqua Stabil		Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland
MyTaq™ HS Mix		Meridian Bioscience, Inc., Cincinnati, Ohio, Vereinigte Staaten
StemMACS HSC-CFU basic, human	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland	
2x qPCRBIO SyGreen 1-Step Lo-ROX	PCR Biosystems Inc., Wayne, Pennsylvania, Vereinigte Staaten	
20x RTase with RNase inhibitor		
DNase I	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland	
HiPerFect Transfection Reagent		
Puregene® Proteinase K		
RNase A Solution		
RNase free water		
Bisbenzimid H 33342 (Hoechst-Farbstoff)		Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
cOmplete™ (Protease-Inhibitor)		
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)		
Essigsäure, 100 %		
Ethanol, reinst. 99 %		
IGEPAL® CA-630 (NP-40)		
2-Mercaptoethanol		
Natriumdesoxycholat		
Natriumorthovanadat		
Paraformaldehyd		
Propidiumiodid (PI)		
Tween® 20		

Chemikalie / Reagenz	Hersteller
X-tremeGENE™ HP DNA Transfection Reagent	
2-Propanol, reinst	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
Ethanol 99 % (vergällt)	
ExoSAP-IT™ PCR Produkt Cleanup	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Heat Inactivated FCS (<i>Fetal calf serum</i>)	
L-Glutamin 200 mM (100X)	
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	
Pen Strep (Penicillin, Streptomycin)	
TRIzol® Reagent	
Trypsin-EDTA 0,05 % (1X)	
Zellkulturmedien	
RPMI Medium 1640 (1X) (ohne L-Glutamin)	
IMDM (1X) (mit L-Glutamin, mit 25 mM HEPES)	

2.2 Gebrauchsmaterialien

Tabelle 2.2: Gebrauchsmaterialien nach Hersteller.

Material	Hersteller
Anode Buffer Container (ABC) 3500 Series	Applied Biosystems Inc., Kalifornien, Vereinigte Staaten
Conditioning Reagent 3500 Series	
Cathode Buffer Container (CBC) 3500 Serien	
Retainer & Base Set for Genetic Analyzers (96 Well)	
BD Discardit™ II, sterile Spritze (10 ml, 5 ml, 2 ml, 1 ml)	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, Verinigte Staaten
BD Eclipse Needle™ (25 G, 16 G, 14 G)	
Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels	BioRad Laboratories, Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Trans-Blot® Turbo™ Mini-size Nitrocellulose	
Mini-size Transfer Stacks	
Falcon® 5 ml Round Bottom Polystyrene Test Tube	Corning Incorporated, New York, Vereinigte Staaten
Combitips advanced® (1,0 ml, 5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Whatman Filter	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Cellstar Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturplatte (6 Well, 12 Well, 96 Well)	
PARAFILM® M	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Pre-Separation Filters (70 µm)	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland
CryoPure Röhrchen, 1,8 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Filtopur S 0,45 µm, Sterilfilter	
Mikro-Schraubenröhre, 1,5 ml	
Mikrotestplatte, 96 Well	
Pipettenspitzen Biosphere® Filter Tips (0,5 – 20 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl)	
Pipettenspitzen Biosphere® Quality Filter Tips (0,5 – 20 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl)	
Reagiergefäß (1,5 ml, 2 ml)	
Serologische Pipette (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml,	

Material	Hersteller
25 ml)	
TC-Flasche (T25, T75)	
Zellschaber 25 cm	
Untersuchungshandschuh Sempercare nitrile skin ²	Semperit Technische Produkte Gesellschaft m. b. H., Wien, Österreich
PCR-tube 8-strip (0,2 ml)	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Labsolute [®] Pasteurpipetten, Kalk-Soda-Glas, 230 mm	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
Objektträger: Menzel-Gläser Superfrost [®] Plus POP-7 TM (384) Performance Optimized Polymer 3500 Dx Series	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
3M Comply TM Indicator Tape	3M, Saint Paul, Minnesota, Vereinigte Staaten
Durapore TM Kunstseidenpflaster, 2,5 cm	

2.3 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Tabelle 2.3: Reaktionssysteme nach Hersteller.

Reaktionssystem	Hersteller
DC TM Protein Assay	BioRad Laboratories, Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten
EnVision FLEX+, Mouse, High pH (Link)	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
FusionPlex [®] Solid Tumor Panels	Invitae Corporation, San Francisco, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Muse [®] Count & Viability Kit	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Western-Lightning [®] Plus-ECL	PerkinElmer Inc., Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
CellTiter 96 [®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)	Promega Corp., Madison, Wisconsin, Vereinigte Staaten
Maxwell [®] RSC RNA FFPE Kit	
Plasmid Midi Kit (25)	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Puregene [®] Core Kit A	
QIAxcel [®] DNA Screening Cartridge	
RNeasy [®] Micro Kit (50)	
BigDye [®] X Terminator TM Purification Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
BigDye [®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	

2.4 Geräte und Zubehör

Tabelle 2.4: Verwendete Geräte nach Hersteller.

Gerät / Zubehör	Hersteller
VP2000 Processor	Abbott Laboratories, Chicago, Illinois, Vereinigte Staaten
BD FACSCanto TM II Clinical Flow Cytometry System	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Mini-PROTEAN [®] Tetra System	BioRad Laboratories, Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten
PowerPac TM 300 Basic Power Supply	
Trans-Blot [®] Turbo TM Transfer System	
Accu-Jet [®] pro	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland

Gerät / Zubehör	Hersteller
Canon EOS 650D	Canon Inc., Ōta, Tokyo, Japan
Axiovert 25 Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Axio Scope.A1 Mikroskop	
Stemi SV 11 Mikroskop	
Immersionöl 518 F (Immersionöl für Fluoreszenzmikroskope)	
Stuart® SRT6 Tuber Roller Mixer (Rollenmischer)	Cole-Parmer Instrument Company, LLC Staffordshire, Vereinigtes Königreich,
Autostainer Link48	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
PT Link, Pre-Treatment Module for Tissue Specimens	
Eppendorf Multipipette® plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Reference Pipette (1 – 10 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl)	
Eppendorf-Zentrifugen: 5424, 5430R, 5804	
Thermomixer comfort	
Wasserbad 1002	GFL GmbH, Burgwedel, Deutschland
Polymax 1040 Schüttel- & Mischgerät	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Megafuge 1.0 (Zentrifuge)	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Sicherheitswerkbank HERAsafe HS 12	
Scotsman® AF 80 Ice Flaker	Hubbard Systems, Great Blakenham, Ipswich, Vereinigtes Königreich
NextSeq 550 System (Sequenziergerät)	Illumina, Inc., San Diego, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Fluoreszenzmikroskop BZ-X800	KEYENCE Deutschland GmbH, Neu- Isenburg, Deutschland
Schlittenmikrotom Leica SM2000R	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Leica CTR5500 Microscope Control Unit with power supply	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leica DM5500 B (Forschungsmikroskop)	
Leica EL6000 externe Lichtquelle zur Fluoreszenz-Anregung	
Kühl-Gefrierkombination CN 4713-23	LIEBHERR-Hausgeräte Lienz GmbH, Lienz, Deutschland
Milli-Q® Direct 8 Reinstwassersystem	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Muse™ Cell Analyzer	
Microm HM550	Micron International GmbH, Walldorf, Deutschland
Maxwell® RSC Instrument	Promega GmbH, Walldorf, Deutschland
QIAxcel® Advanced Instrument	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
CO ₂ -Inkubator MCO-17AI	Sanyo Electric Co., Ltd., Osaka, Japan
Sanyo MDF-592 Laboratory Freezer	
BP 110 S Analytical Balance (Analysewaage)	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Incucyte® S3 Live-Cell Analysis System	
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Inc., New York, Vereinigte Staaten
Labcycler Basic	SensoQuest GmbH, Göttingen, Deutschland
Erlenmeyer Kolben	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Autoklav Systec VX-100	Systec GmbH, Linden, Deutschland
Plattenleser Infinite® M200 Pro	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
Mr. Frosty™ Freezing Container	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham,

Gerät / Zubehör	Hersteller
NanoDrop™ 2000 Spektralphotometer	Massachusetts, Vereinigte Staaten
3500 Genetic Analyzer	
LABSOLUTE® Laborflasche mit Schraubkappen (250 ml, 2000 ml)	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
Fusion Fx Vilber Lauromat	VWR International LLC, Radnor, Pennsylvania, Vereinigte Staaten
Incubating Orbital Shaker Modell 3500I	

2.5 Software

Tabelle 2.5: Verwendete Software nach Hersteller.

Software	Hersteller
BioRender	BioRender, Toronto, Ontario, Kanada
Diskus Viewer	Hilgers Technisches Buero, Königswinter, Deutschland
Endnote X9	Clarivate Analytics, Jersey, Vereinigte Staaten
Ensemble	European Molecular Biologie Laboratory, Hinxton, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Fusion FX7	Vilber Lourmat, Collégien, Frankreich
Geneious Prime® V 2022.0.2	Biomatters Ltd., Auckland, Neuseeland
ImageJ V1.53	NIH, Bethesda, Maryland, Vereinigte Staaten
Magellan™ V 7.1	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
Tecan i-control™ V 3.6	
Microsoft Excel® für Mac	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, Vereinigte Staaten
Microsoft Word® für Mac	
Microsoft PowerPoint® für Mac	
Phyre2	Structural Bioinformatics Group, Imperial College, London
Prism® 9 für Mac	GraphPad Software, Inc., La Jolla, Kalifornien, Vereinigte Staaten
SnapGene® Viewer V 6.0.6	GSL Biotech LLC, San Diego, Kalifornien, Vereinigte Staaten

2.6 Puffer und Lösungen

Zur Herstellung der Puffer und Lösungen wurde, falls notwendig, bidestilliertes Wasser verwendet (ddH₂O). In Klammern angegebenen Werte beziehen sich auf die finalen Konzentrationen im Puffer bzw. in der Lösung.

Tabelle 2.6: Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen.

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
10x PBS (<i>Phosphate-buffered saline</i>)	9,55 g PBS Dulbecco gelöst in 1 l ddH ₂ O
Ponceau S	495 ml ddH ₂ O 5 ml 100 % Essigsäure (1 %) 0,5 g Ponceau S (0,1 %)
Protein-Lyse Puffer	940 µl RIPA-Puffer + Inhibitoren (frisch dazugegeben) 10 µl 100 mM PMSF (1 mM) 10 µl 100 mM Orthovanadat (1 mM) 40 µl cComplete™ EDTA (4 %Vol.)

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
RIPA Puffer	0,5 g Natriumdesoxycholat (0,5 %) 1 ml NP-40 (1 %) gelöst in 100 ml PBS (pH 7,4)
TBS-Stammlösung (10x)	1 l ddH ₂ O 292,7 g NaCl (5 M) 4,24 g TRIS (0,035 M) 26 g TRIS-HCL (0,165 M)
TBS-T Waschlösung	9 l ddH ₂ O 1 l 10x TBS-Lösung 10 ml Tween [®] -20 (0,1 %)

2.7 Pharmazeutika und zytotoxische Agentien

2.7.1 Chemotherapeutika und Inhibitoren

Tabelle 2.7: Auflistung verwendeter Chemotherapeutika und Inhibitoren.

Agens	Firma
Cisplatin	Accord Healthcare GmbH, München, Deutschland
Etoposid	TEVA GmbH, Ulm, Deutschland
Gefitinib	Sellek Chemicals GmbH, Planegg, Deutschland
Sch772984 (ERK 1/2 Inhibitor)	
Sunitinib malate	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

2.7.2 Antibiotika

Tabelle 2.8: Verwendete Antibiotika nach Hersteller.

Antibiotikum	Hersteller
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Hygromycin B- Lösung	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

2.8 Zelllinien

Die beiden verwendeten Thymuskarzinomzelllinien wurden von den Erstbeschreibern zur Verfügung gestellt. Die HEK-293T Zelllinie ist kommerziell erhältlich.

2.8.1 Humane Tumorzelllinien

Tabelle 2.9: Auflistung verwendeter humaner Tumorzelllinien.

Bezeichnung	Tumorentität	Beschreibung und Referenz
1889c	Thymuskarzinom	Humane Karzinomzelllinie, die von einem undifferenziertem Thymuskarzinom stammt. (Ehemann et al. 2008)
MP-57	Thymuskarzinom	Humane Thymuskarzinom-Zelllinie aus einem schlecht differenzierten Karzinom. (Alberobello et al. 2016; Tiseo et al. 2013)

2.8.2 Sonstige Zelllinien

Tabelle 2.10: Auflistung verwendeter sonstiger Zelllinien.

Bezeichnung	Entität	Beschreibung und Referenz
HEK-293, nachfolgend HEK	Embryonale Niere	Humane Zelllinie aus einer embryonalen Niere. ATCC, Manassas, Vereinigte Staaten Katalognummer: CRL-3216

2.8.3 Prokaryontische Zellen

Für die Vermehrung und spätere Isolierung von DNS-Plasmiden wurde der chemisch kompetente *E. coli* Stamm DH5 α von Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, Vereinigte Staaten, erworben (Katalognummer: 18265017).

2.9 Zellkulturmedien

Tabelle 2.11: Aufstellung und Zusammensetzung verwendeter Zellkulturmedien.

Zelllinie	Zellkulturmedium mit Zusammensetzung
Medium für 1889c, MP-57 und HEK	RPMI-Medium + 100 U/ml Penicillin + 100 μ g/ml Streptomycin + 1 % Glutamin + 10 % FCS
Medium für transformierte DH5 α (prokaryontische Zellen)	LB-Medium (Luria/Miller) + Ampicillin 100 μ g/ml (zur Selektion)

2.10 Plasmide

Als Plasmid diente das pITR-EZH als humanes DNS-Plasmid, das für die *KMT2A-MAML2* Translokation kodiert. Nach Transfektion kann die Fusion mithilfe der *Sleeping Beauty* Methode (Kap. 1.3.5) ins Genom der Zellen inseriert und so überexprimiert werden. Die in dem Plasmid enthaltene Fusion liegt zwischen Exon 8 von *KMT2A* und Exon 2 von *MAML2*. Weiterhin verfügt das Plasmid über eine ORI-Sequenz (origin of replication), die eine Amplifizierung des Plasmids mit chemisch kompetenten Bakterien ermöglicht. Zur anschließenden Selektion der Bakterien nach Amplifikation ist ebenfalls eine Ampicillin-Resistenz kodiert. Die ORI-Sequenz und die Ampicillin-Resistenz liegen außerhalb des Transposons und werden nicht ins Genom der Zellen inseriert. Das Plasmid wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Rolf Marschalek (Frankfurt a.M.) zur Verfügung gestellt (Wächter et al. 2014). Das Plasmid für die Transposase ist kommerziell erhältlich bei addgene.org. (Katalognummer: 127909, Stand August 2022). Zur Identifizierung der einzelnen Komponenten dieses Plasmids (z. B. Promotoren) wurde das Plasmid sequenziert. Eine detaillierte Beschreibung seiner Komponenten erfolgt in Kapitel 3.2.1.

2.11 Antikörper

2.11.1 Primärantikörper

Tabelle 2.12: Auflistung verwendeter Antikörper und deren Verdünnung.

Monoklonaler Antikörper	Spezies	Verdünnung	Katalognummer	Hersteller
ATG7	Kaninchen	1 : 1000	8558	CST
BCL-XL	Kaninchen	1 : 1000	2764	CST
CD133	Kaninchen	1 : 1000	86781	CST
Claudin-1	Kaninchen	1 : 1000	13995	CST
E-Cadherin	Kaninchen	1 : 1000	3195	CST
GAPDH	Maus	1 : 1000	97166	CST
HES1	Kaninchen	1 : 1000 (WB) 1 : 500 (IHC)	11988	CST
KMT2A (MLL1)	Kaninchen	1 : 1000 (WB) 1 : 100 (IHC)	14197	CST
LC3B	Kaninchen	1 : 1000	3868	CST
MAML2	Kaninchen	1 : 1000 1 : 100 (IHC)	4618	CST
MCL-1	Kaninchen	1 : 1000	4572	CST
Nanog	Kaninchen	1 : 1000	4903	CST
N-Cadherin	Kaninchen	1 : 1000	13116	CST
Phospho-AKT	Kaninchen	1 : 1000	3787	CST
Phospho-EGFR	Kaninchen	1 : 1000	3777	CST
Phospho-ERK	Kaninchen	1 : 1000	4377	CST
Phospho-FOXO1	Kaninchen	1 : 1000	9464	CST
Phospho-STAT3	Kaninchen	1 : 1000	9145	CST
Slug	Kaninchen	1 : 1000	9585	CST
Snail	Kaninchen	1 : 1000	3879	CST
SOX2	Kaninchen	1 : 1000	3579	CST
STAT3	Kaninchen	1 : 1000	4904	CST
TCF-8 (ZEB1)	Kaninchen	1 : 1000	3396	CST
TGF- β	Kaninchen	1 : 1000	3711	CST
Vimentin	Kaninchen	1 : 1000	5741	CST
ZO-1	Kaninchen	1 : 1000	8193	CST
β -Catenin	Kaninchen	1 : 1000	8480	CST

Abkürzungen: CST: Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, Vereinigte Staaten; WB: *Western Blot*; IHC: Immunhistochemie. Die Katalognummern beziehen sich auf die Nummern des Herstellers im August 2022.

2.11.2 Sekundärantikörper

Tabelle 2.13: Auflistung verwendeter sekundärer Antikörper und deren Konzentration.

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Anti-Kaninchen-Antikörper	Ziege	1 : 1000	Agilent Technologies Denmark
Anti-Maus-Antikörper	Kaninchen	1 : 1000	ApS, Glostrup, Dänemark

2.12 Synthetische Oligonukleotide

Tabelle 2.14: Primer und deren Sequenz.

Primer	Sequenz	Hersteller
KMT2A Ex 8 for (PCR, Sanger)	5' – CAGGAAGTCAAGCAAGCAGG – 3'	Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland
MAML2 Ex 2 rev (PCR, Sanger)	5' – TGAGCAGGGGTTAGGACTTG – 3'	
EF1a prom (Sanger)	5' – GGAGTTTCCCCACACTGAGT – 3'	
KMT2A Exon 7 for (RT-PCR, Sanger)	5' – ATCCTGCCCAAAGAAAAGC – 3'	
KMT2A Exon 8 for (RT-PCR, Sanger)	5' – GTCCAGAGCAGAGCAAACAG – 3'	
MAML Exon 2 rev (RT-PCR, Sanger)	5' – GAGTCTCTCCTGGCTCCTTC – 3'	

Abkürzungen: Ex: Exon; for: *forward*; rev: *reverse*; Sanger: Sanger-Sequenzierung; prom: Promotor. Die Tabelle zeigt die verwendeten Primer unter Angabe ihrer Bindungsstelle im Genom des jeweiligen Gens, ihrer Sequenzrichtung und ihrer Sequenz. Die Sequenz der für die RT-PCR eingesetzten Primer wurden einer Publikation entnommen (Menu et al. 2017).

2.13 FISH-Sonden

Tabelle 2.15: FISH-Sonden nach Hersteller.

FISH-Sonde	Katalognummer	Hersteller
ZytoLight [®] SPEC MAML2 Dual Color Break Apart Probe	Z-2014-200	ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Deutschland
ZytoLight [®] SPEC KMT2A Dual Color Break Apart Probe	Z-2193-200	

Die Katalognummern beziehen sich auf die Katalognummern des Herstellers im Juli 2022.

2.14 Zellbiologische Methoden

2.14.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Die in Tabelle 2.9 und 2.10 aufgelisteten, adhärent wachsenden Zelllinien wurden in T-75 Zellkultur-Flaschen der Firma Sarstedt in einem CO₂-Inkubator bei 37 °C, 5% CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Für alle Zelllinien wurde *advanced* RPMI 1640 Medium (Thermo Fischer Scientific) mit zusätzlichen 10% FCS (*fetal calf serum*), 1% Glutamin und 1% Pencillin/Streptomycin verwendet. Um eine konstante Eutrophie der Zellen zu gewährleisten, wurden diese bis zu einer Konfluenz von 60 bis 70 % kultiviert und dann verdünnt. Dazu wurde der subkonfluente Zellrasen zunächst mit 3 ml autoklaviertem PBS gewaschen und anschließend zur Ablösung mit 1,5 ml Trypsin-EDTA benetzt. Nach fünfminütiger Inkubation bei 37 °C erfolgte eine mikroskopische Kontrolle der Ablösung der Zellen. Diese enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von Medium (1:1) beendet und anschließend bei 500 rcf für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit frischem

Medium aufgenommen und die Zellsuspension konnte zur fortlaufenden Kultivierung der Zellen (i. d. R. 1 : 3 bis 1 : 10) und/oder für etwaige Versuche verwendet werden. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit der jeweiligen Zelllinie erfolgte die Teilung ein bis zwei Mal pro Woche.

2.14.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Um Zellen langfristig lagern zu können, müssen diese unter Verwendung eines Gefriermediums eingefroren werden. Dazu wurden die Zellen mittels Trypsin-EDTA abgelöst, mit Medium aufgenommen und anschließend für 5 min bei 500 rcf zentrifugiert. Darauf folgend wurde das Pellet mit Medium aufgenommen, das zusätzlich zur Kryoprotektion mit 10 % DMSO versetzt war. 1 ml dieser Zellsuspension wurde anschließend in ein Kryoröhrchen (Firma Sarstedt) überführt. Zur Sicherstellung einer konstanten Kühlrate von 1 °C/min wurden die befüllten Kryoröhrchen in einem mit Isopropanol gefüllten Kryocontainer (Thermo Fischer Scientific) auf -80 °C abgekühlt und sodann bei dieser Temperatur gelagert. Falls im Verlauf kryokonservierte Zellen benötigt wurden, wurden diese in einem 37 °C warmen Wasserbad rasch aufgetaut, mit Medium aufgenommen und zentrifugiert (500 rcf, 5 min). Das Zellpellet wurde resuspendiert und zur Kultivierung in eine Zellkulturflasche überführt.

2.14.3 Bestimmung der Zellkonzentration

Für die meisten zellbiologischen Versuche wurden definierte Zellkonzentrationen oder Zellmengen benötigt. Diese wurden unter Zuhilfenahme des Muse™ Cell Analyzers (Merck Millipore) bestimmt. Dazu wurden 20 µl der jeweiligen Zellsuspension mit 380 µl (1 : 20) Muse® Count & Viability Lösung vermischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Cell Analyzer gemäß der Herstelleranweisungen kalibriert und die Zellkonzentration gemessen. Das Prinzip dieses Messgeräts beruht auf fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie, genauer gesagt der Mikrokapillarzytometrie. Enthalten in der Muse® Count & Viability Lösung sind zwei fluoreszierende DNS-Interkalationsfarbstoffe (Substanznamen nicht preisgegeben), von denen einer membrandurchlässig ist und alle kernhaltigen Zellen anfärbt. Dies erlaubt die Unterscheidung zwischen lebenden Zellen, Zelltrümmern und kernlosen Zellen. Der zweite Farbstoff hingegen färbt nur solche Zellen, die bereits Membranschäden aufweisen, wobei sterbende Zellen eine geringere Fluoreszenzintensität aufweisen als abiotische Zellen. Sterbende oder bereits tote Zellen werden daher mit beiden Farbstoffen angefärbt. Auf diese Weise kann das Gerät zeitgleich die Gesamtkonzentration an Zellen und die Menge an toten Zellen messen.

2.14.4 Analyse der Zellviabilität

Zur Bestimmung der Zellviabilität wurde CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega Corporation) verwendet. Dieser Assay ist eine kolorimetrische

Methode, die auf der Aktivität der mitochondrialen Reduktase in stoffwechselaktiven Zellen beruht. Namensgebend für diesen Assay ist das Tetrazolium-Salz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-Tetrazol (MTS), das in der CellTiter-Lösung enthalten ist. Die gelbe Tetrazolium-Verbindung kann dabei durch das mitochondriale Reduktionsäquivalent NADH/H⁺ zu einem violetten Formazan-Produkt reduziert werden. Die Menge des anfallenden Produktes kann durch Absorption der violetten Farbe bei 490 nm gemessen werden. Diese Reaktion setzt intakte Mitochondrien voraus, die das benötigte Reduktionsäquivalent NADH/H⁺ nachliefern, sodass der Umsatz von MTS direkt proportional zur Mitochondrienzahl und damit zur Menge der lebenden Zellen im Kulturgefäß ist. Änderungen der Absorption erlauben daher direkte Rückschlüsse auf Viabilitätsänderungen und indirekte auf Zelltod und Proliferation. Die Grundlage für diesen Assay bildet das MTT-Assay, das ein ähnliches Tetrazolium-Salz enthält (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbrom; MTT). Das MTS-Assay bietet jedoch den Vorteil, dass ein wasserlösliches Formazan-Produkt entsteht, wodurch auf etwaige Extraktionschritte verzichtet werden kann.

Zur Messung der Zellviabilität wurden die Zellen gezählt und die benötigte Anzahl an Zellen zu fünf Replikaten in 100 µl Medium in je ein *Well* einer 96-*Well*-Platte ausgesät und bei 5 % CO₂ und 37 °C inkubiert. Nach Ablauf des jeweiligen Beobachtungszeitraums wurden jedem *Well* 20 µl der CellTiter-Lösung hinzugegeben und die Zellen für weitere ein bis drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Mithilfe des Plattenlesers Infinite[®] M200 Pro (Tecan Group AG) wurde die Zellviabilität kolorimetrisch durch Absorption bei 490 nm und 650 nm (Referenz) bestimmt. Die Bedienung des Plattenlesers erfolgte mit der i-control[™] Software desselben Anbieters. Zur Auswertung wurde jeder gemessene Wert durch den Mittelwert der Kontrollreplikate normalisiert und die Ergebnisse als Kurvendiagramm dargestellt. Alle Versuche wurden dabei mindestens dreimal durchgeführt und ein repräsentatives Ergebnis wurde in der Arbeit abgebildet.

2.14.5 *Scratch-Assay*

Unter Migration versteht man die Fortbewegung von Zellverbänden oder Zellen, wie bspw. Immunzellen, Fibroblasten oder Tumorzellen. Die Migration spielt als physiologischer Prozess eine wichtige Rolle bei u. a. der Wundheilung und der Aufrechterhaltung der Gewebemöostase. Eine pathologisch veränderte Migrationsfähigkeit bildet die Grundlage zur Metastasierung von Tumorzellen. Um die zweidimensionale Zellmigration *in vitro* untersuchen und innerhalb verschiedener Zellen vergleichen zu können, wurde ein *Scratch-Assay* durchgeführt. Hierbei wird mechanisch ein Kratzer in einem konfluenten Zell-*Monolayer* erzeugt. Da die Zellen sich in Richtung des Kratzers bewegen (migrieren), um neue Zell-Zell-Kontakte zu bilden und um den zellfreien Bereich wieder zu verschließen, kann so die Migrationsrate quantifiziert und verglichen werden (Liang et al. 2007).

Hierzu wurden zunächst 500.000 Zellen als Triplikat in einer 6-Well-Platte ausplattiert. Dabei wurden neben den transfizierten Klonen auch immer nicht-transfizierte Zellen derselben Zelllinie als Negativkontrolle mit ausplattiert. Die Zellen wurden anschließend unter Standardbedingungen bis zu einer Konfluenz von etwa 95 % inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten Konfluenz wurden die Zellen über Nacht auf *advanced* RPMI-Medium mit 1 % FCS gesetzt. Durch die Reduktion des FCS-Anteils von 10 % auf 1 % soll die Proliferation der Zellen als Störfaktor minimiert werden und die Zellen mitotisch synchronisiert werden, zeitgleich liefert das FCS aber noch genügend Nährstoffe um ein Ablösen der Zellen oder Apoptose zu verhindern. Am nächsten Tag wurden pro Well mithilfe einer 100 µl Pipettenspitze (Sarstedt AG) mechanisch zwei bis drei vertikale Kratzer in dem konfluenten Zell-Monolayer erzeugt. Anschließend wurde der Zellrasen mit PBS gewaschen und die Zellen wieder auf Medium mit 1 % FCS gesetzt. Unter dem Mikroskop wurden pro Vertiefung eines 6-Well ein bis zwei Kratzer ausgewählt und die Breite des Spaltes mit einem Foto dokumentiert (Zeitpunkt 0). Hierbei wurde darauf geachtet, dass der Spalt möglichst äquidistant und geradlinig verlief. Die jeweilige Position wurde vom Mikroskop gespeichert, sodass die Messung stets an der gleichen Stelle erfolgen konnte. Die Messung der Breite des Spaltes erfolgte zu definierten Zeitpunkten (0, 24, 48, 72 und 96 Stunden) und wurde graphisch dargestellt.

2.14.6 Chemosensitivitätstest

Um das Ansprechen verschiedener Zellklone auf zytotoxische Agentien in Abhängigkeit zur nicht-transfizierten Zelllinie zu evaluieren, wurden diese mit Chemotherapeutika und anderen zytotoxischen Reagenzien behandelt. Dazu wurden die Zellen trypsiniert, anschließend 5000 Zellen pro Well einer 96-Well-Platte ausgesät und für 24 h unter Standardbedingungen inkubiert. Am nächsten Tag wurde das alte Medium aspiriert und gegen neues Medium ausgetauscht, das sowohl alle Zusätze, als auch den jeweiligen zytotoxischen Wirkstoff in verschiedenen Konzentrationen enthielt. Die Dauer der Inkubation variierte je nach Therapeutikum und lag meistens zwischen 48 h und 72 h. Um das Ansprechen der Zellen auf die Behandlung und das Überleben der Zellen zu beurteilen, wurde anschließend die Zellviabilität gemessen (Kap. 2.14.3).

2.14.7 Klonalitätsassay in Methylcellulose

Zur Untersuchung der zellulären Proliferation wurde der Klonalitätsassay in Methylcellulose durchgeführt. Die Zellen wachsen hierbei nicht wie in der Zellkultur zweidimensional mit Kontakt zur Oberfläche des Zellkulturgefäßes, sondern dreidimensional in einem zähflüssigen Medium ohne Kontakt zu Oberflächen (*anchorage independent growth*). Das verankerungsunabhängige Wachstum ohne Kontakt zur extrazellulären Matrix oder zu Nachbarzellen korreliert dabei mit der Tumorgenität von Zellen. Der normale Klonalitätsassay mit Soft-Agar verwendet zwei Agar-Schichten unterschiedlicher Konzentration und dient der Bewertung der Zelltransformation (Borowicz et al. 2014;

Cifone und Fidler 1980). In dieser Arbeit wurde in Abgrenzung dazu ein Medium verwendet, das eigentlich zur Evaluierung des Differenzierungs- und Proliferationspotenzial von hämatopoetischen Stammzellen dient (StemMACS HSC-CFU basic, Miltenyi Biotech). Hierbei wurde die reproduktive Integrität und die Fähigkeit zur Bildung von Zellkolonien evaluiert (Franken et al. 2006). Sie gibt dabei auch Aufschluss über die Stammeigenschaften der verwendeten Zelllinien, da Stammzellen ein größeres Potenzial zur kontinuierlichen Proliferation haben. So wird die Notwendigkeit zweier Agar-Schichten umgangen, da das Medium nur aus einer Agar-Schicht besteht. Das verwendete StemMACS Medium enthält neben 30 % FCS noch L-Glutamin, einen *stemcell* Faktor und 2-Mercaptoethanol.

Die Zellen wurden mit Trypsin geerntet, anschließend wurden 4000 Zellen in ein Eppendorf-Gefäß überführt und bei 500 rcf für 5 min zentrifugiert. Die Zellen wurden daraufhin mit 800 µl IMDM-Medium aufgenommen. Die Suspension wurde im Folgenden mit 3,2 ml Methcellulose versetzt und durch Pipettieren homogenisiert. Zur Entfernung der Luftblasen wurde das Gemisch 20 min bei RT stehen gelassen. Anschließend wurde pro *Well* einer 6-*Well*-Platte je ein Milliliter des Gemisches gegeben und durch Schwenken gleichmäßig verteilt. Aufgrund der schlechten Pipettierbarkeit wurde jeweils ein Milliliter verworfen. Die 6-*Well*-Platte wurde 14 Tage bei 37 °C im Inkubator inkubiert. Nach Inkubation wurde die Anzahl der Zellklone unter dem Stereomikroskop gezählt.

2.14.8 Transfektion mit Plasmid-Vektoren und klonale Aussäung

Um stabile transgene Zelllinien und Zellklone zu erzeugen, wurden die Zellen mit zuvor amplifizierten Plasmidvektoren (Kap. 2.15.1) transfiziert. Bei der hier angewandten Lipofektion wird die Plasmid-DNS liposomenvermittelt in die Zellen geschleust. Die komplexierte DNS kann auf diese Weise die Zellmembran traversieren. Der Transfektionserfolg wird durch antibiotische Selektion mit entsprechender auf das Plasmid abgestimmten Resistenzen gewährleistet.

Zur Durchführung der Transfektion wurden zunächst je 300.000 Zellen pro *Well* einer 6-*Well*-Platte mit 2,3 ml Medium ausplattiert. Zur Erhöhung des Transfektionserfolges wurden die Zellen 24 h vor der eigentlichen Transfektion ausgesät und unter Standardbedingungen inkubiert. Nach Ablauf der 24 h wurden pro *Well* 100 µl Transfektionsmix angesetzt, dieser bestand aus 2 µl X-tremeGENE™ HP DNA Transfektions-Reagenz (Sigma Aldrich), 1 µl des *Sleeping Beauty* Plasmids, 4 µl des Transposase-Plasmids und 93 µl Medium ohne FCS. Um die Bildung der Transfektionskomplexe zu ermöglichen, wurde der Ansatz für 30 min bei RT inkubiert und dabei mehrfach gevortext. Unter Schwenken des Zellkulturgefäßes wurde dann der Transfektionsmix tröpfchenweise hinzugegeben und die Zellen für 48 h inkubiert. Im Folgenden wurden die Zellen zur Selektion für 72 h mit 400 µg/ml Hygromycin B behandelt. Zur Evaluation des Ansprechens auf das Antibiotikum wurde eine unbehandelte Negativkontrolle immer mit ausplattiert. Weiterhin wurde die benötigte

Konzentration zur Selektion der Zellen vorab getestet und das Sterbeverhalten dabei lichtmikroskopisch beurteilt. Nach erfolgreicher Selektion der Zellen, wurde diese auf Normalmedium gesetzt und bis zu einer Konfluenz von 75 % inkubiert (i.d.R. 2 bis 3 Wochen). Um homogene, klonale Zellpopulationen zu erzeugen, die genetisch identisch sind, wurden die Zellen als Einzelklone ausplattiert und ausgehend von einer Zelle zu einer Zellpopulation herangezogen. Dazu wurde die Zellkonzentration bestimmt, die Zellen auf 10 Zellen/ml verdünnt und ausgehend von dieser Suspension 100 µl pro *Well* einer *96-Well*-Platte ausgesät.

2.14.9 *Side population assay*

Das *Side population assay* dient der Überprüfung von Stammzeleigenschaften verschiedener Zelllinien. Dazu werden die Zellen mit dem Hoechst-Farbstoff (bisBenzimide H33342 trihydrochloride, Sigma Aldrich) inkubiert, wobei dieser Farbstoff nur durch aktiven Transport der ABC-Transporter aus den Zellen ausgeschleust wird. Zellen mit hohem Stammzellpotenzial schleusen den Farbstoff aktiv heraus, Zellen mit geringeren Stammzeleigenschaften, die über weniger ABC-Transporter verfügen, können den Farbstoff daher kaum ausschleusen. Mittels FACS (*fluorescence activated cell sorting*) werden die Zellen mit UV-Licht angeregt und die spezifische Fluoreszenz des Hoechst-Farbstoffes kann gemessen werden. Beim FACS werden die Zellen durch hydrodynamische Fokussierung durch das Flusszytometer geleitet und passieren einzeln einen Laser. Der *forward scatter* (FSS) bestimmt dabei die Zellgröße, da diese proportional zur Streuung des Lichts an der Oberfläche der Zellen ist. Mithilfe des *side scatter* (SSC) wird die Streuung des Lichts durch die Zelle selber gemessen, das erlaubt Rückschlüsse auf die Granularität der Zelle. Das FACS-Gerät kann auf die Weise die Zellen elektrostatisch sortieren und die Ergebnisse als 2D-Histogramm darstellen. Die Einstellungen des FACS-Gerätes für diesen Versuch wurden wie von Golebiewska und Kollegen beschrieben gesetzt (Golebiewska et al. 2011). Dazu wurde basierend auf den FSC- und SSC-Einstellungen zunächst zwischen Zellen und etwaigen Zelltrümmern unterschieden. Als nächstes wurden Zellaggregate ausgesondert, dazu wurde die SSC-Fläche gegenüber der SSC-Höhe dargestellt und lediglich der untere Bereich der *Dot Plots* ausgewählt. Durch Darstellung von PI (Propidiumjodid) gegenüber der FSC-Fläche konnten anschließend tote Zellen ausgeschlossen werden. Als letztes erfolgte durch Auftragen von Hoechst-Rot gegen Hoechst-Blau die Darstellung von Hoechst-negativen Zellen, also den Zellen mit höherem Stammzellpotenzial, als schwacher Schweif auf der linken Seite der Hoechst-Blau-Achse im FACS-Histogramm. Mithilfe des vom Gerät errechneten Gating-Baums konnte der prozentuale Anteil der Hoechst-Zellen abgelesen und anschließend als Balkendiagramm dargestellt werden.

Zur Durchführung dieses Assays wurde die Hoechst-Lösung zunächst auf 1 mg/ml verdünnt und lichtgeschützt bei -20 °C gelagert. Anschließend wurden pro Zelllinie oder pro Klon Triplikate mit je 500.000 Zellen in einem 6-Well ausplattiert. Am nächsten Tag wurde das Medium mit der Hoechst-Lösung (1 : 100) versetzt und anschließend 1 h lang unter

Standardbedingungen inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen trypsinisiert und in PBS aufgenommen, um dann 5 min bei 1000 rcf zentrifugiert zu werden. Nach Aspiration des Überstandes, wurden die Zellen in 500 µl kaltem PBS aufgenommen und durch ein Zellsieb der Porengröße 70 µm in ein FACS-Röhrchen überführt. Die Röhrchen wurden bis zu Analyse auf Eis inkubiert. Kurz vor der Analyse durch das FACS-Gerät (Becton Dickinson GmbH) wurde jedem Röhrchen 10 µl PI (50 µg/ml) hinzugegeben. Mithilfe des PI kann das FACS-Gerät zwischen gesunden und apoptotischen Zellen unterscheiden, da der Farbstoff nicht membrandurchlässig ist und daher nur bei Membranschäden an die DNS binden kann.

2.15 Molekularbiologische Methoden

2.15.1 Plasmid-Amplifikation und Extraktion

Um Klone stabil transfizierter Zelllinien erzeugen zu können, wurde die plasmidische DNS mithilfe chemisch kompetenter *E.-coli*-Zellen des Stammes DH5α (Thermo Fisher Scientific Inc.) amplifiziert, indem die DH5α-Zellen mit dem Plasmid transformiert wurden. Nach erfolgreicher Amplifikation, konnte die Plasmid-DNS aus den Zellen isoliert werden. Die *Sleeping Beauty* Plasmide wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Rolf Marschalek (Frankfurt a.M.) zur Verfügung gestellt.

2.15.1.1 Amplifikation der Plasmide mit DH5α-Zellen

Zur Amplifikation der Plasmide wurde eine geringe Menge von etwa 25 ng des jeweiligen Plasmids verwendet. Zunächst wurde das Nährmedium für die DH5α-Zellen angesetzt, dazu wurden 25 g des LB-Mediums (*lysogeny broth medium*) in 1 l Wasser gelöst und anschließend autoklaviert. 50 µl der DH5α-Zellsuspension wurden auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von 25 ng des jeweiligen Plasmids für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 42 °C für 30 s einem Hitzeschock ausgesetzt. Diese Zellen wurden durch die Kalziumchlorid-Methode (CaCl₂) chemisch kompetent gemacht, sie sind daher in der Lage von außen DNS-Moleküle aufzunehmen. Durch die Inkubation der Zellen auf Eis werden diese hyperton und schrumpfen. Der Hitzeschock sorgt für ein Anschwellen der Zellen und durch den entstandenen Unterdruck wird nun Wasser zusammen mit der Plasmid-DNS in die Zellen internalisiert. Danach wurden die Zellen zur Abkühlung zwei Minuten auf Eis gelagert. Zu den Zellen wurde dann 1 ml des LB-Mediums gegeben und diese bei 37 °C und 750 rpm für eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert. Die auf dem Plasmid enthaltene ORI-Sequenz (*origin of replication*) dient als Replikationsursprung und ist an der Initiation der Replikation beteiligt. So können doppelsträngige Plasmid-Moleküle extrachromosomal und autonom repliziert werden. Die Zellsuspension wurde anschließend in einen Erlenmeyerkolben mit 100 ml des LB-Mediums überführt. Um nur solche Zellen zu kultivieren, die das gewünschte Plasmid internalisiert haben, wurden zusätzlich 100 µg/ml Ampicillin dazugegeben. Hierbei kodiert das Plasmid zusätzlich für eine β-Lactamase-

Resistenz, die erst am Ende der Replikation abgelesen wird, sodass nur bei vollständiger Replikation des Plasmids eine Ampicillin-Resistenz gegeben ist. Die Zellen inkubierten anschließend für 16 h bei 37 °C und 220 rpm auf dem Schüttler.

2.15.1.2 Plasmidextraktion

Die angereicherten Plasmide wurden aus 100 ml SB-Medium mit den transformierten DH5 α -Zellen mit dem QIAGEN® Plasmid Midi Kit gemäß den Herstellerangaben isoliert. Hierbei werden die Plasmide in einem alkalischen Lyseverfahren aufgereinigt, sodass am Ende ein Pellet entstand, das lediglich die Plasmid-DNS enthält.

Zunächst wurden hierbei die Bakterien durch Zentrifugation bei 6000 rcf für 15 Minuten geerntet. Das Pellet wurde resuspendiert, die Zellen anschließend lysiert und die Proteine präzipitiert. Das Lysat wurde bei 20.000 rcf bei 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine zuvor äquilibrierte QIAGEN® 500 Filterspitze überführt. Die auf dem Anionenaustausch-Prinzip beruhende Reaktion sorgt dafür, dass die negativ geladenen DNS-Moleküle zunächst in den Filterspitzen hängen bleiben. In zwei folgenden Waschschritten wurden sämtliche nicht-DNS-Moleküle herausgewaschen. Anschließend wurde die DNS eluiert, mit Isopropanol präzipitiert und bei 15.000 rcf und 4 °C für zehn Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde mit Ethanol gewaschen und erneut bei 15.000 rcf und 4 °C für zehn Minuten zentrifugiert. Nach Trocknung des Pellets an der Luft, wurde es mit 100 μ l ddH₂O aufgenommen und zur Beschleunigung des Lösungsprozesses für eine Stunde bei 65 °C inkubiert.

2.15.1.3 Konzentrationsbestimmung des Plasmids

Nach erfolgreicher Resuspension des DNS-Pellets, wurde die Konzentration der amplifizierten Plasmide mit Hilfe von NanoDrop (Thermo Fisher) gemessen. Das Gerät misst spektrometrisch die Absorption des UV-Lichts durch Nukleinsäuren bei 260 nm. Je höher die Konzentration der DNS in der Probe ist, desto stärker wird das Licht bei 260 nm absorbiert. Das Gerät berechnet dann anhand des Absorptionskoeffizienten und der Lambert-Beer-Gleichung die Konzentration der in diesem Fall zu quantifizierenden Plasmide. Die Ausbeute lag in der Regel bei 3000 ng/ μ l. Die Plasmide wurden anschließend bei -20 °C gelagert.

2.15.2 Proteinchemische Methoden

2.15.2.1 Protein-Isolierung aus kultivierten Zellen

Zur Isolierung zellulärer Proteine für weitere Untersuchungen wurden die Zellen in einer Zellkulturflasche zunächst mit PBS gewaschen, um etwaigen Zelldetritus und nicht-adhärenente Zellen zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA geerntet und 2 ml der Zellsuspension in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Nach erfolgreicher Zentrifugation für 5 min bei 500 rcf wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde je

nach Größe mit 150 – 250 µl Lysepuffer resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Während dieser Inkubation wurde die Suspension regelmäßig gevortext und anschließend 30 min bei 20.000 rcf und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand, der die zu isolierenden Proteine enthielt, wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Bei der Protein-Isolierung von Zellen aus einer 6-Well-Platte, wie sie beispielsweise bei der Bestätigung eines *Knockdowns* Anwendung fand, wurde zur Erhöhung der Ausbeute auf Trypsin-EDTA verzichtet. Stattdessen wurden die Zellen analog zur Zellkulturflasche mit PBS gewaschen, anschließend mit 65 µl Lysepuffer benetzt und mit einem Zellschaber durch Kratzen vom Untergrund abgelöst. Die so entstandene Suspension wurde ebenfalls 30 min auf Eis inkubiert, dann zentrifugiert und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt.

Der verwendete Lysepuffer bestand aus 940 µl RIPA-Puffer (Radio-Immunpräzipitations-Assay), 40 µl 25-Complete-EDTA, 10 µl PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) und 10 µl 1-ortho-Vanadat. Der RIPA-Puffer enthält sowohl ionische, als auch nicht-ionische Detergenzien. Ionische Detergenzien, wie SDS, sorgen durch ihre hohe Affinität zu den Proteinbindungen für eine schnelle Denaturierung, während nicht-ionische Detergenzien, wie Triton-X, die Proteine nicht denaturieren und den Erhalt von Protein-Komplexen gewährleisten (Brown und Audet 2008). Durch hydrophob-hydrophile Wechselwirkungen lösen die Detergenzien die Phospholipidmembranen der Zellen auf und ermöglichen eine Isolierung von Membran-, Zellkern- und zytoplasmatischen Proteinen. Die während der Lyse freigesetzten Proteasen können die Proteine abbauen, weshalb zusätzlich zum RIPA-Puffer Proteaseinhibitoren wie PMSF verwendet wurden. Da einige Proteasen zweiwertige Metallionen als Cofaktoren benötigen, wird zur weiteren Hemmung dieser Enzyme EDTA verwendet, das die Metallionen in einem Chelatkomplex bindet und so die Enzymaktivität der Proteasen reduziert. Um die phosphorylierte Form einiger Proteine aufrecht zu erhalten, wurde der Phosphataseinhibitor 1-ortho-Vanadat verwendet.

2.15.2.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Proteinkonzentration der isolierten Lysate wurde unter Zuhilfenahme des DC™ Protein Assay Kit (BioRad Laboratories) nach Herstellerangaben bestimmt. Bei diesem Assay wird die Proteinkonzentration nach einer zweiteiligen Reaktion kolorimetrisch bestimmt, es handelt sich um eine modifizierte Variante des von Lowry beschriebenen Assays (Lowry et al. 1951). In dem ersten Reaktionsschritt, der auch als Biuret-Reaktion bekannt ist, bilden die Peptidbindungen der gelösten Proteine unter alkalischen Bedingungen einen blau-violetten Komplex mit Kupfer(II)-Ionen, die aus dem zugegebenen Kupfertartat stammen. Im zweiten Reaktionsschritt wird das gelbe Folin-Ciocalteu-Reagenz hinzugegeben, das u.a. aus Phosphowolframsäure und Phosphomolybdänsäure besteht. Bei dieser Redox-Reaktion wird das Folin-Ciocalteu-Reagenz reduziert, während aromatische Reste der Proteine oxidiert werden. Es entsteht bei der Reduktion das als Heteropolymolybdän bekannte

intensiv blaue Molekül, dessen Farbe im Bereich von 650 – 750 nm mit einem Maximum bei 750 nm kolorimetrisch gemessen werden kann (Peterson 1979).

Zur Quantifizierung der Proteinkonzentration wurden 2 µl des jeweiligen Proteinlysates als Triplikat in 96-Well Mikrotiterplatten pipettiert. Anschließend wurden je 20 µl eines Gemisches aus Lösung A und Lösung S (50 : 1) zu den 2 µl Proteinen gegeben und im Folgenden mit 200 µl Lösung B versetzt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Messung mit dem Plattenleser Infinite® M200 Pro (Tecan Group AG). Die Auswertung und Steuerung des Geräts erfolgte mit der Software Magellan™ V 7.1 (Tecan Group AG). Das Gerät misst die Extinktion bei 560 nm und berechnet aus dem Median der drei Proben die jeweilige Proteinkonzentration durch einen hinterlegten Standardkurven-Algorithmus. Als Referenzlösung während der Messung diente der verwendete Lysepuffer (2 µl im Triplikat).

2.15.2.3 SDS-PAGE zur Separation der Proteine

Um Proteingemische, wie sie bei der Protein-Isolierung entstehen, nach ihrem Molekulargewicht aufzuteilen, wurde die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) durchgeführt. In einem angelegten elektrischen Feld wurden die Proteine in der Gelmatrix aus Polyacrylamid nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Da das Polyacrylamid ein poröses Medium ist, fungiert es als Molekularsieb, wobei kleinere Proteine die Matrix schneller durchlaufen können. Auf diese Weise lassen sich Massen von 5 – 250 kDa auftrennen. In der hier verwendeten eindimensionalen SDS-PAGE nach Laemmli werden die Proteine nur nach ihrer Masse, nicht jedoch nach ihrer Ladung aufgetrennt. Durch Natriumlaurylsulfat (SDS) werden die Eigenladung der Proteine durch Bildung eines Protein-SDS-Komplexes maskiert und die dadurch nach außen hin negativ geladenen Proteine wandern im elektrischen Feld zur Anode (Laemmli 1970). Darüber hinaus zerstört SDS vor allem die Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine, wofür das SDS im Überschuss vorhanden sein muss. Dafür wurden die quantifizierten Proteinmengen im Verhältnis 3:1 mit 4x Laemmli-Probenpuffer (BioRad Laboratories) versetzt. Zur weiteren Denaturierung wurden die mit Laemmli-Puffer versetzten Proteine 5 min bei 95 °C erhitzt und anschließend kurz herunterzentrifugiert (30 s bei 1000 rcf). Das im Laemmli-Puffer enthaltene Glycerin erleichtert durch seine hohe Dichte das Wandern der Proteine im Gel nach unten, 2-Mercaptoethanol bricht zusätzlich die Disulfidbrücken auf und Bromphenolblau dient zur visuellen Beurteilung der Lage der Proteinbande im Gel. Die Geltaschen wurden mit den zuvor berechneten (Kap. 2.15.2.2) äquivalenten Proteinmengen (15 µg) und Laemmli-Puffer beladen. Als Gel wurden die gebrauchsfertigen Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gele von BioRad Laboratories verwendet. Hierbei handelt es sich um Konzentrationsgele (4 – 15 %), die einen größeren Trennbereich der Molekulargewichte erlauben. Die Elektrophorese wurde zur Stapelung der Proteine für 5 min bei 80 V gestartet und anschließend bei 200 V laufen gelassen. Der Lauf wurde gestoppt, wenn der blaue Farbstoff das Ende des Gels erreicht hatte. Als Proteinstandard wurde der PageRuler™ Plus Marker

(Thermo Fisher Scientific) verwendet. Als Laufpuffer diente der TGS-Laufpuffer (BioRad Laboratories), der durch seine enthaltenen Ionen den Strom durch das Gel leitete, wodurch die Proteine durch die Gelmatrix gezogen wurden.

2.15.2.4 *Western Blot* (Immunoblot)

Die in der SDS-PAGE leiterartig aufgetrennten Proteine wurden anschließend durch ein *Semi-Dry*-Verfahren auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Dieser Vorgang wird als *Blotting* bezeichnet. Bei der Übertragung der Proteine bleibt das in der SDS-PAGE erzeugte Trennungsmuster erhalten, sodass die Proteinleitern anschließend auf der Membran erscheinen. Zum *Blotting* wurde das Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (BioRad Laboratories) verwendet. In der Transferkassette wurden abwechselnd ein Transfer-*Stack*, die Nitrozellulose-Membran, das Gel und zuletzt wieder ein Transfer-*Stack* geschichtet. Das hierbei entstandene *Blotting-Sandwich* wurde in Transferpuffer eingeweicht. Nachdem etwaige Luftblasen herausgerollt wurden, wurde die Kassette geschlossen und in das Transfergerät eingesetzt. Beim *Semi-Dry*-Verfahren werden zwei Plattenelektroden genutzt, die den Strom durch das Gel leiten und so höhere Transfargeschwindigkeiten erlauben. Das Gerät erzeugt eine elektrische Spannung von 25 V bei 2,5 A für 3 min. Durch die senkrecht zum Gel gerichtete Spannung werden die Proteine irreversibel auf die Membran übertragen, wo sie durch hydrophobe Wechselwirkungen haften bleiben. Mithilfe der Ponceau-S-Lösung, die reversibel und unspezifisch an Proteine bindet, konnten die Qualität des Transfers sowie die Auftrennung der Proteine grob beurteilt werden. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde in 50 ml TBS-T mit zusätzlich 5 % Magermilchpulver bei Raumtemperatur inkubiert. Die Magermilch blockiert unspezifische Bindungsstellen, ermöglicht so ein spezifisches Binden der Antikörper und reduziert zeitgleich den Hintergrund für die spätere Auswertung (Mahmood und Yang 2012). Nach Inkubation wurde die Membran dreimal für je 5 min mit TBS-T gewaschen. Anschließend wurde der in TBS-T verdünnte Primärantikörper mit der Membran über Nacht unter stetigem Schwenken bei 4 °C inkubiert.

2.15.2.5 Proteindetektion

Nach Inkubation des Primärantikörpers wurde die Membran zur Entfernung aller ungebundener Antikörper mit TBS-T dreimal für 5 min gewaschen. Anschließend wurde der artspezifische Sekundärantikörper (1 : 1000, in TBS-T gelöst) für eine Stunde mit der Membran bei Raumtemperatur (RT) unter stetigem Schwenken inkubiert. Der Sekundärantikörper ist dem HRP-Enzym (*horseradish peroxidase*) verknüpft, das die spätere Detektion der Proteine ermöglicht. Nachfolgend wurde die mit dem Sekundärantikörper inkubierte Membran analog zum primären Antikörper dreimal mit TBS-T gewaschen. Die Membran wurde im Folgenden mit frisch dem angesetzten Peroxidasesubstrat Western Lightning Plus ECL Prime (PerkinElmer Inc.) für ca. 5 min behandelt. Das im Sekundärantikörper enthaltene HRP-Enzym setzt die ECL-Lösung in ein Produkt um, dessen dabei entstehende Lumineszenz messbar ist. Die Detektion erfolgte mit dem Fusion FX7 Chemilumineszenz-

Detektionssystem (VWR International) und der zugehörigen Software. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. Zur Quantifizierung der Signalintensität wurde ImageJ (*National Institutes of Health*, NIH) verwendet.

2.15.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, kurz FISH, findet in der Zytogenetik zur Identifizierung chromosomaler Aberrationen Anwendung. So können neben Deletionen und Translokationen auch Amplifikationen nachgewiesen werden (Cheng et al. 2017). Hierzu wurden DNS-Sonden für jeweilige Zielsequenzen konzipiert und mit fluoreszierenden Molekülen gekoppelt. Anschließend wurde die Sonde mit der DNS von Metaphasen-Chromosomen hybridisiert. Die Sonden können die je nach Art der Sonde lokusspezifisch und am Zentromer des Chromosoms binden, sodass durch Fluoreszenz pro Chromosom zwei und pro diploider Zelle vier Signale sichtbar wurden. Mittels geeigneter Fluoreszenz-Mikroskope konnte über die Lage der Sonde die spezifische Nukleinsäuresequenz visualisiert und ausgewertet werden. Die in diesem Falle verwendeten *Break Apart* Sonden (ZytoVision) banden jeweils *up-* und *downstream* der Bruchpunkte von *MAML2* bzw. *KMT2A*, sodass die beiden Fluoreszenzsignale eines Chromosoms im Falle einer Translokation auseinander sprangen.

Die technische Durchführung der FISH erfolgte mit dem VP 2000™ (Abbott). Nach Trocknung der Paraffin-Schnitte wurde im Rahmen der Vorbehandlung das Paraffin entfernt und das Gewebe für die spätere Hybridisierung permeabilisiert. Dazu wurde neben Xylol eine Ethanolreihe und Waschpuffer verwendet. Anschließend wurden die entsprechenden Sonden auf das vorbehandelte Gewebe aufgetragen, je nach Größe etwa 3 – 15 µl, und unter Luftausschluss eingedeckt. Zur Denaturierung der DNS wurde das Gewebe für 10 min auf 75 °C erhitzt und anschließend zwecks Hybridisierung über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde nach Entfernen des Deckgläschens das Gewebe einem Waschvorgang unterzogen, bei dem überschüssige und nicht-gebundene Sonden entfernt wurden. Hierbei kamen Waschpuffer, Ethanol und destilliertes Wasser zum Einsatz. Nach erfolgreichem Waschen wurde das Gewebe mit DAPI-Eindeckmedium (4',6-Diamidin-2-phenylindol) unter Luftausschluss eingedeckt. DAPI dient bei der späteren Auswertung unter dem Fluoreszenz-Mikroskop der Visualisierung der Zellkerne über Anfärben der DNS. Die Objektträger wurden bis zur Auswertung lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

Die verwendeten Sonden sind für die Detektion chromosomaler Bruchereignisse konzipiert und eignen sich daher zur Identifizierung von Translokationen. Zur Auswertung der Proben mit einem Fluoreszenzmikroskop wurde das jeweilige Tumoreal zunächst mit 63x Vergrößerung fokussiert. Es wurden anschließend 100 Zellkerne zusammenhängend ausgezählt und der prozentuale Anteil an *Break Apart* Signalen notiert, dabei wurde der Mittelwert beider positiver Duplikate für die Analyse verwendet. Die hier verwendeten Sonden bindet jeweils *up-* und *downstream* bekannter Bruchpunkte dieser Gene. Im Falle nicht

translozierter Gene ergeben sich pro Chromosom ein rot-grün fusioniertes Signal. Kommt es im Rahmen einer Translokation zum Auseinanderbrechen eines Gens, zerfällt das Fusionsignal in zwei separate rote und grüne Signale, die dann als *Break Apart* Signale gewertet werden. In Anbetracht der näheren chromosomalen Lage der beiden Gene zueinander, wurden nur eindeutig getrennte Signale in der Auswertung berücksichtigt. Weiterhin wurden nur diploide Zellkerne in die Auswertung übernommen, also solche Kerne, die über je zwei rote und grüne Signale verfügten. Die Validierung der FISH-Ergebnisse erfolgte mit *Archer-NGS* (Kap. 2.15.8).

2.15.4 Nukleinsäuren-Isolation

2.15.4.1 DNS-Extraktion

Zur Extraktion der DNS aus den gewünschten Zelllinien, wurden diese mit dem Puregene[®] Core Kit A (Qiagen) gemäß den Anweisungen des Herstellers behandelt. Das Kit bedient sich der Lyse der Zellen und der RNS mit anschließender Ausfällung der Proteine und führt am Ende zu einem Pellet, das aus reiner DNS besteht. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit Trypsin-EDTA geerntet und die Zellsuspension wurde in einem Eppendorf-Gefäß 5 min bei 500 rcf zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes, wurde das Pellet mit 300 µl *Cell lysis Solution* und 10 µl Proteinase K resuspendiert. Die Proteinase K sorgt durch Zerstörung der Peptidbindungen für einen Abbau der Proteine, da höhere Temperaturen ihre Aktivität verbessern, wurde das Lysat für eine Stunde bei 56 °C inkubiert. Anschließend wurden zur Degradierung der RNS 1,5 µl RNase A Lösung hinzugegeben, das Gefäß mehrmals invertiert und anschließend für 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Gefäß zur Inkubation eine Minute auf Eis gestellt. Mithilfe von 100 µl der *Protein Precipitation Solution* wurden die Löslichkeit der Proteine durch den hohen Salzgehalt der Lösung reduziert, was zur Ausfällung der Proteine führte. Die Proteine wurden im nächsten Schritt herunterzentrifugiert (3 min bei 14.000 rpm) und der Überstand, der die DNS enthielt, wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Durch Zugabe von 300 µl Isopropanol (100 %) wurde die DNS präzipitiert und war nun als Faden sichtbar. Daraufhin wurde die DNS durch Zentrifugation für 5 min bei 14.000 rpm pelletiert, mit 300 µl Ethanol (70 %) gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min bei 14.000 rpm). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde 10 min bei RT getrocknet. Im Folgenden wurde das Pellet mit 50 – 100 µl ddH₂O aufgenommen und zur Beschleunigung des Lösungsprozesses für eine Stunde bei 65 °C inkubiert. Die Konzentration der isolierten DNS wurde mit Hilfe von NanoDrop gemessen und die DNS-Lösung anschließend bei -20 °C gelagert.

2.15.4.2 RNS-Isolation aus eukaryontischen Zellen

Mithilfe des RNeasy[®] Micro Kits (Qiagen) wurde die RNS aus Zellen isoliert. Das Kit, das gemäß der Herstellerangaben verwendet wurde, kombiniert die Guanidin-Isocyanat-Lyse mit der Silikamembran-Aufreinigung. Bei Ersterer entsteht im Chloroform-Phenol-Gemisch ein

2-Phasen-System, bei dem sich die RNS in der wässrigen Phase und die DNS in der Interphase akkumuliert. Bei der Aufreinigung mit einer Silikamembran, werden Nukleinsäuren durch polare Bindungen an ein Gel adsorbiert und können nach etwaigen Waschschritten durch Wasser eluiert werden.

Zur Isolation der RNS wurden zunächst die Zellen pelletiert und zur Lyse mit 350 µl RLT-Puffer versetzt. Zur Besseren Denaturierung von RNAsen wurde der RLT-Puffer mit 10 µl β-Mercaptoethanol versetzt. Anschließend wurden der Lösung 350 µl 70 % Ethanol hinzugegeben. Im Folgendem wurde das Gemisch auf eine RNeasy MinElute Säule, die die Silikamembran enthält, übertragen und 15 s bei 8000 rcf zentrifugiert. Zur Entfernung von Biomolekülen, wie Proteinen oder Kohlenhydraten, wurde das Gemisch mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen und erneut 15 s bei 8000 rcf zentrifugiert. Zur Degradierung der DNS wurde 10 µl DNase I mit 70 µl Puffer RDD vermischt und ebenfalls in die RNeasy MinElute Säule gegeben. Nach 15 min Inkubation wurden zum erneuten Waschen 350 µl Puffer RW1 beigefügt und das Gemisch erneut 15 s bei 8000 rcf zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, mit 500 µl Puffer RPE gewaschen und wieder 15 s bei 8000 rcf zentrifugiert. Nach Zugabe von 500 µl 80 % Ethanol und Zentrifugation bei 8000 rcf für 2 min, wurde die Säule in ein neues Eppendorf-gefäß überführt und bei 20.000 rcf für 5 min getrocknet. Mit Zugabe von 14 µl ddH₂O und Zentrifugation für 1 min bei 20.000 rcf wurde die RNS eluiert und anschließend mittels Nanodrop quantifiziert.

2.15.4.3 RNS-Isolation aus Formalin-fixiertem Gewebe

Zur Isolierung der RNS aus Formalin-fixiertem Gewebe wurde das Maxwell® RSC Instrument (Promega) mit dem Maxwell® RSC RNA FFPE Kit (Promega) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Das Gerät kann die RNS automatisiert aufreinigen, indem es Nukleinsäuren vorübergehend an paramagnetische Partikel bindet. Nach etwaigen Lyse- und Waschschritten kann die RNS im Anschluss eluiert und quantifiziert werden.

Zur Isolierung wurden zunächst Gewebeschnitte der zur untersuchenden Patientenproben angefertigt. Diese Proben wurden nach Zentrifugation mit 300 µl Mineral-Öl zwecks Deparaffinisierung behandelt und anschließend gevortext. Nach kurzem Erhitzen für 2 min bei 80 °C wurde das Gewebe mit 250 µl Lyse-Mix bestehend aus Lyse-Puffer (224 µl), Proteinase K (25 µl) und Blue Dye (1 µl) lysiert und 20 s bei 10.000 rcf zentrifugiert. Zur weiteren Denaturierung wurde das Lysat 15 min auf 56 °C und dann 1 h auf 80 °C erhitzt. Zur Degradierung der DNS wurde die Lösung mit 50 µl DNase Cocktail bestehend aus 26 µl MnCl₂, 14 µl DNase Puffer und 10 µl DNase I behandelt. Nach 15 min Inkubation bei RT erfolgte eine Zentrifugation für 2 min bei 20.000 rcf. Im Folgenden konnte die an paramagnetische Partikel gebundene RNS aus der Lösung entfernt und mit Ethanol aufgereinigt werden.

2.15.4.4 RNS-Isolation aus Frischgewebe

Um die RNS aus Frischgewebe zu isolieren, wurde die Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform Extraktion angewendet (Chomczynski und Sacchi 1987). Mit dieser Methode können in einem Reaktionsschritt zeitgleich DNS und RNS gewonnen werden. Dazu wurde das Frischgewebe-Pellet zunächst in 1 ml TRIzol® Reagenz (Thermo Fisher Scientific) gelöst und 15 min zur vollständigen Lyse bei RT inkubiert. Das Reagenz enthält zur Zellyse und Inaktivierung von RNasen Phenol und Guanidiniumthiocyanat. Anschließend wurden 200 µl Chloroform zwecks Phasentrennung dazugegeben und 15 s invertiert. Nach Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 12.000 rpm war die Phasenbildung abgeschlossen. Die wässrige Phase enthält dabei die RNS, die DNS befindet sich in der Interphase und Proteine befinden sich in der organischen Phase. Es wurden im Verlauf etwa 500 µl der wässrigen Phase in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Die RNS wurde durch Zugabe von 500 µl 100 % Isopropanol präzipitiert und 5 min bei RT inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 12.000 rpm wurde das Pellet mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (10 min, 12.000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei RT getrocknet. Die RNS wurde in 50 µl ddH₂O gelöst, die Konzentration wurde bestimmt und die RNS bei -80 °C gelagert.

2.15.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um einen kurzen, definierten DNS-Abschnitt zu amplifizieren und damit nachweisbar zu machen, wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) durchgeführt. Dabei fungieren kurze Oligonukleotidsequenzen (Primer), die an beiden DNS-Strängen binden, als Startpunkt für DNS-replizierende Enzyme. Ausgehend von einem Primerpaar (*forward* und *reverse*) kann die hitzestabile Polymerase in drei aufeinander folgenden Reaktionsschritten einen neuen Strang synthetisieren, indem sie an die 3'-OH-Gruppe des jeweiligen Primers Nukleotide komplementär zur Zielsequenz anheftet. Die entstandenen Produkte vorheriger Zyklen dienen dabei jeweils als Ausgangssubstrat für den nächsten Zyklus, wodurch die Zielsequenz exponentiell amplifiziert wurde. Die Denaturierung stellte den ersten Reaktionsschritt eines jeden Zyklus dar, hierbei wurden durch Temperaturen von 95 °C die Wasserstoffbrückenbindungen der DNS aufgebrochen und die Stränge so voneinander getrennt. Bei dem sich anschließenden *annealing* bei 60 °C (abhängig von Primersequenz) wurden die Primer spezifisch an die DNS angelagert. Im letzten Reaktionsschritt, der Elongation, synthetisierte die Polymerase bei 72 °C in Richtung des 5'-Endes einen neuen DNS-Strang, der zur gewünschten Sequenz komplementär ist. In 35 hintereinandergeschalteten Zyklen konnte die Zielsequenz exponentiell amplifiziert und nachweisbar gemacht werden.

Zur Durchführung einer PCR muss zunächst wie in Kapitel 2.15.4.1 beschrieben die DNS des zu untersuchenden Gewebes isoliert werden. Pro Ansatz wurde dabei ein Reaktionsgemisch bestehend aus 7 µl MyTaq™ HS Mix (meridian BIOSIENCE®), 4,6 µl

ddH₂O und je 0,7 µl für den *forward* und den *reverse* Primer (10 µM) angesetzt. Diese 13 µl Reaktionsgemisches wurden in ein PCR-Tube überführt und mit 1 µl der zu untersuchenden DNS (1000 ng/µl) versetzt. Der MyTaqTM HS Mix enthält als gebrauchsfertiges Reaktionssystem die für die Reaktion benötigten desoxyNukleosidtriphosphate (dNTPs), die Polymerase, sowie MgCl₂, um die Anlagerung der Polymerase an die Primer zu stabilisieren. Die PCR wurde im Labcycler (SensoQuest GmbH) mit 95 °C Denaturierung für 15 s, 60 °C *Annealing* für 15 s und Elongation für 10 s bei 72 °C in 35 Zyklen durchgeführt. Zum Nachweis und zur Quantifizierung des PCR-Amplikons wurde eine PCR-Fragment-Analyse mit dem QIAxcel Advanced Instrument (Qiagen) und der Zugehörigen QIAxcel ScreenGel Software (Qiagen) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Die jeweiligen Fragmente wurden mittels Kapillarelektrophorese automatisiert größenbasiert aufgetrennt und dabei quantifiziert. Die Software wandelt die gemessenen Signale, anschließend in ein Gel-Bild und ein Elektropherogramm um, wodurch eine einfache Auswertung ermöglicht wird.

2.15.6 RT-PCR

In Abgrenzung zur PCR wird die RT-PCR (*reverse transcription* PCR) nicht auf DNS-Ebene, sondern auf cDNS-Ebene (*complementary DNA*) durchgeführt. Dazu muss die zuvor isolierte RNS (Kap. 2.15.4.2) zunächst mittels reverser Transkription in cDNS umgewandelt werden, um dann die RT-PCR durchführen zu können. Bei diesem Enzym handelt es sich um eine RNS-abhängige DNS-Polymerase, die RNS in DNS transkribiert, die dann als cDNS bezeichnet wird. Die hier verwendete RT-PCR wurde als Ein-Schritt-Reaktion durchgeführt, bei der nach reverser Transkription ohne weitere Schritte unmittelbar die PCR durchgeführt werden kann.

Das gemäß den Herstellerangaben verwendete qPCRBIO SyGreen 1-Step Kit (PCR Biosystems Inc.) enthält die thermostabile reverse Transkriptase mit zusätzlichen RNase-Inhibitoren, sowie MgCl₂. Pro Ansatz wurden dafür 5 µl 2x qPCRBIO SyGreen 1-Step Mix, jeweils 0,4 µl Primer (10 µM), 0,5 µl 20x RTase und 3,7 µl ddH₂O verwendet. Der Reaktionsmix wurde anschließend im PCR-Tube mit 1 µl RNS (0,5 – 1 µg) versetzt. Die Reaktion wurde im Labcycler (SensoQuest GmbH) durchgeführt. Hierbei wurde das Gemisch zur Durchführung der reversen Transkription für 10 min auf 45 °C erhitzt, anschließend wurde für 2 min bei 95 °C die reverse Transkriptase deaktiviert und zeitgleich die DNS-Polymerase aktiviert. Die nun folgende PCR wurde in nur zwei Reaktionsschritten durchgeführt. Zur Denaturierung wurde das Gemisch 5 s auf 95 °C erhitzt, danach folgten *Annealing* und Elongation in einem Schritt für 25 s bei 62 °C. In insgesamt 40 Zyklen wurde so die Zielsequenz amplifiziert und analog zur PCR mit dem QIAxcel Advanced Instrument (Qiagen), wie in Kapitel 2.15.5 beschrieben, ausgewertet.

2.15.7 Sanger-Sequenzierung

Zur Bestimmung der Nukleotidabfolge eines gewünschten DNS-Abschnittes, wurde die von Sanger beschriebene Sequenzierung durchgeführt (Sanger et al. 1977). Nachdem die zu untersuchende DNS-Sequenz mittels PCR (Kap. 2.15.5) amplifiziert wurde, wurde die Sanger-Sequenzierung, die sich der Kettenabbruch-Synthese bedient, effektiert. Durch den Einsatz fluoreszenzmarkierter didesoxyNukleosidtriphosphate (kurz ddNTPs) entstehen bei der Strangsynthese Fragmente beliebiger Länge, da die Synthese durch fehlende 3'-OH-Gruppen der ddNTPs zum Erliegen kommt. Die Fragmente können dann elektrophoretisch aufgetrennt und die Basenabfolge bestimmt werden.

Zunächst wurde das PCR-Amplikon mit dem ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (Applied Biosystems) aufgereinigt. Das Reaktionsgemisch besteht aus der Exonuklease I, die Primer und einzelsträngige DNS abbaut, sowie einer Phosphatase zum Abbau der dNTPs. Dazu wurden in einem neuen PCR-Tube 10 µl des PCR-Produktes mit 4 µl des 1:1 verdünnten ExoSAP-IT™ Reagenz vermischt. Das Gemisch wurde zum Abbau überschüssiger Primer und Nukleotide 15 min bei 37 °C inkubiert und anschließend zur Inaktivierung des ExoSAP-IT™ Reagenz für 15 min bei 80 °C inkubiert. Mit der auf der Sanger-Sequenzierung beruhende *Cycle-Sequencing* wurde die Kettenabbruch-Synthese durchgeführt. Das verwendete, gebrauchsfertige BigDye® Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit (Applied Biosystems) beinhaltet eine thermostabile Polymerase, dNTPs und fluoreszenzmarkierte ddNTPs. Um jeweils nur einen Strang pro Reaktion zu amplifizieren und zu analysieren, wurden *forward (for.)* und *reverse (rev.)* Primer jeweils getrennt voneinander eingesetzt. Es waren daher für jede Probe zwei Reaktionsgemische erforderlich. Zunächst wurde der BigDye® Mix bestehend aus 7 µl BigDye®, 18,5 µl BigDye® Puffer und 27,3 µl ddH₂O angesetzt. Pro Probenmischung wurden nun 2 µl des aufgereinigten PCR-Produktes, 3,2 µl Primer (*for.* oder *rev.*) sowie 4,8 µl des BigDye®-Mix zusammenpipettiert und zwecks Amplifizierung in den Labcycler gestellt. Nach initialer Denaturierung für 1 min bei 96 °C, folgten 25 Zyklen mit je 15 s Denaturierung bei 96 °C und 15 s *Annealing* und Elongation in einem Schritt bei 60 °C. Zur Entfernung nicht eingebauter Terminatoren (ddNTPs) wurde das Produkt mit dem BigDye® XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems) aufgereinigt. Dafür wurden jeder Probe 10 µl XTerminator™ Solution zur Entfernung der ddNTPs und 45 µl SAM™-Solution zur Stabilisierung der Reaktion hinzugefügt. Die Lösung wurde anschließend 30 min bei RT und 1400 rpm lichtgeschützt inkubiert. Von jeder Probe wurden zur Analyse 15 µl in eine 96-Well-Platte überführt.

Die Analyse erfolgte mittels Kapillarelektrophorese durch den 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Hierbei werden die verschiedenen langen Fragmente der Größe nach aufgetrennt und die Fluoreszenz der fluoreszenzmarkierten Terminatoren nach Anregung mit einem Laser bestimmt. Da jede der vier Basen eine spezifische Wellenlänge emittiert, kann so die Sequenz der DNS-Region von Interesse bestimmt werden. Die Daten wurden

mit der Software Geneious Prime[®] 11.0.12 (Biomatters Ltd.) ausgewertet, die zugehörigen Referenz-Sequenzen wurden von der Datenbank *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) heruntergeladen (ncbi.nlm.nih.gov).

2.15.8 *Archer-NGS*

Das *Next-Generation Sequencing* (kurz NGS) ist eine neuartige Sequenzierungsmethode, bei der mittels Hochdurchsatzsequenzierung simultan tausende DNS-Fragmente sequenziert werden können. Die Sequenzierung erfolgte mit dem NextSeq 550 System (Illumina) unter Zuhilfenahme des FusionPlex[®] Solid Tumor Panels (Invitae Corporation). Dieses Panel deckt 53 Gene ab, darunter auch *MAML2* mit Primern für Exon 2 und 3. Das Prinzip des *Archer-NGS* beruht auf der verankerten Multiplex-PCR: Zunächst wurde durch eine RT-PCR doppelsträngige cDNS synthetisiert. Anschließend wurde die Qualität der Nukleinsäuren durch eine Real-time PCR beurteilt. Nachdem die Stränge einer Endreparatur unterzogen wurden, bei der neben dem dA *tailing* die DNS-Enden phosphoryliert wurden, wurde die DNS mit einem halbfunktionalen Adapter ligiert. Dieser enthält neben einer universellen Primer Bindungsstelle einen molekularen Barcode, der später ausgelesen werden kann. Nach erfolgreicher Ligation erfolgen zwei hintereinander geschaltete PCR-Durchläufe. Bei der ersten PCR werden ein genspezifischer Primer und ein universeller Primer, der am Adapter bindet, verwendet, um so die durch spezifische Primer vorgegebenen Abschnitte zu amplifizieren. In der zweiten PCR findet neben dem universellen Primer ein zweiter genspezifischer Primer Anwendung, der in Abgrenzung zum ersten Primer mit einer zweiten Adaptersequenz versehen ist. So können spezifische Genabschnitte amplifiziert werden, die am Ende auf beiden Seiten eine Adaptersequenz enthalten (Zheng et al. 2014). Diese Amplikons werden im Folgenden quantifiziert und ähnlich wie bei der Sanger-Sequenzierung unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Nukleotide sequenziert. Mit der Archer Analysis Software (ArcherDx) werden die Sequenzen mit erstellten Datenbanken abgeglichen und analysiert. Auf diese Weise können eine Vielzahl chromosomaler Aberrationen nachgewiesen werden. In diesem Fall wurde versucht mit *Archer-NGS* die Ergebnisse der FISH-Analyse (Kap. 3.1.2) zu validieren und die *KMT2A-MAML2* Translokation nachzuweisen. Das Gerät kann dabei genau die Sequenz der Fusion und die beteiligten Exons aufdecken.

2.16 Untersuchung mit Patientenmaterial

2.16.1 Kollektiv neoplastischer Thymuspräparate

Ein Kollektiv neoplastischer Thymus-Entitäten, das über viele Jahre von Prof. Dr. Ströbel (Göttingen) und Prof. Dr. Marx (Mannheim) zusammengestellt worden war, wurde für immunhistochemische- und FISH-Analysen verwendet. Die im Kollektiv enthaltenen neoplastischen Gewebeproben wurde von beiden Pathologen unabhängig nach der aktuellen WHO-Klassifikation diagnostiziert (Marx et al. 2015). Die folgenden Analysen berufen sich

auf diese Klassifikation. Selbiges gilt für die zusätzlich zum Kollektiv verwendeten Frischgewebefälle. Für die mit Patientenproben durchgeführten Experimente liegt ein positives Votum seitens der Ethik-Kommission der UMG vor (Antragsnummer GÖ 9/2/15).

2.16.2 Histologische Techniken

2.16.2.1 Fixierung und Einbettung von Gewebe

Zur Konservierung der Zellen und Unterbindung autolytischer Prozesse wurden die Präparate, bei denen es sich in der Regel um OP-Resektate handelte, instantan nach Entnahme in 10 % Formalinlösung (in Wasser gelöstes Methanal) fixiert. Nach Entwässerung in einer Alkoholreihe aufsteigender Konzentration, wurde das Gewebe in Paraffin eingebettet. Das Gewebe wird auf diese Weise gehärtet und schneidbar gemacht.

2.16.2.2 Erstellung und Verarbeitung der TMAs

Bei *Tissue Microarrays* (TMAs) werden Gewebeprobe mehrere Patientenfälle im Duplikat auf einem Objektträger arrayartig angeordnet. Auf diesem Wege können etwaige Analysen wie immunhistochemische Färbungen standardisiert und vereinfacht werden. Weiterhin wird die Vergleichbarkeit der Proben durch Durchlaufen derselben Behandlungsschritte verbessert (Camp et al. 2008). Außerdem erlaubt die rasterartige Anordnung eine schnelle Begutachtung der Proben, wodurch ein hoher Durchsatz gewährleistet werden kann (Kononen et al. 1998).

Zur Erstellung der TMAs wurden zunächst Übersichtsschnitte der jeweiligen Tumoren erstellt und mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt. Nach Markierung der Tumor-Areale wurden zwei Stenzen aus den relevanten Arealen des Paraffinblockes entnommen und als Duplikat an eine definierte Stelle im TMA-Paraffinblock eingefügt (Wan et al. 1987). Der so entstandene TMA-Block enthielt bis zu 34 Patientenproben, die aus je zwei Stenzen unterschiedlicher Tumorareale bestand. Die TMA-Blöcke wurden anschließend mit einem Mikrotom (Leica SM 2000R, Leica Microsystems) in 1 µm dicke Schnitte geschnitten. Im Folgenden wurden die Schnitte mit einem Pinsel in ein 37 °C warmes Wasserbad überführt, um dann auf Objektträger aufgezogen zu werden. Nach Entparaffinierung der Schnitte durch Erhitzen auf 60 °C für eine Stunde in einem Inkubator, konnte diesen für etwaige Färbungen oder Hybridisierungen verwendet werden.

2.16.2.3 Immunhistochemische Färbung

Die immunhistochemische Färbung der TMA-Blöcke wurde mit dem EnVision FLEX+, *Mouse, High pH (Link)* Kit (DAKO, Agilent Technologies Inc.) gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Der Färbeprozess wurde in einem Färbeautomaten (PT Link, DAKO, Agilent Technologies Inc.) durchgeführt.

Dazu wurde im ersten Schritt eine Epitopdemaskierung durchgeführt. Dadurch konnten Antigene renaturiert und so für Antikörper zugänglich gemacht werden. Die Objektträger wurden in den vorgeheizten Färbeautomaten gegeben und unmittelbar für 15 min auf 97 °C erhitzt. Als Puffer diente der auf TRIS-EDTA basierende Puffer *EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x)* (DAKO, Agilent Technologies Inc.). Nach Spülung des Gewebes auf dem Objektträger mit TBST-Waschpuffer (*EnVision FLEX Wash Buffer (20x)*), konnte das Gewebe zur Färbung in ein entsprechendes Färbegerät (*Autostainer Link 48*, DAKO.) überführt werden.

Im o.g. Färbegerät wurde das Gewebe zunächst mit einem Waschpuffer gewaschen und dann mit einem Phosphatpuffer (*EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent*, Agilent Technologies Inc.) behandelt. Diese Behandlung mit dem wasserstoffperoxidbasierten Puffer inhibiert die endogene Peroxidase-Aktivität und führt auf diese Weise zur Reduktion der unspezifische Hintergrundfärbungen. Nach einem weiteren Spülvorgang wurde das Gewebe für 30 min mit dem jeweiligen Primärantikörper (Cell Signaling Technologies) inkubiert. Der Antikörper wurde in einem TRIS-basierten Puffer (*EnVision FLEX Antibody Diluent*) in einem Verhältnis von 1:400 gelöst. Nach erneutem Spülen mit Waschpuffer wurde das Gewebe mit dem *EnVision FLEX/HRP Polymer* für 20 min inkubiert. Dieses Polymer ist mit dem HRP-Enzym verknüpft, das wiederum mit dem Sekundärantikörper konjugiert ist. Auf diese Weise wird später eine ausreichende Signalintensität gewährleistet. Nach zwei weiteren Waschschrritten wurde das in *EnVision FLEX Substrate Buffer* (DAKO, Agilent Technologies Inc.) gelöste HRP-Substrat für 10 min hinzugegeben (*EnVision FLEX DAB+ Chromogen*). Durch Oxidation dieses Substrates durch das HRP-Enzym entsteht ein brauner Farbstoff, der am Polymer und damit am Antigen gebunden bleibt. Nach erneuter Waschung wurden die Schnitte durch Zugabe von Hämatoxylin zwecks Kontrastierung (*EnVision FLEX Hematoxylin*) für 8 min inkubiert. Nach abschließender Waschung des Gewebes wurden die Schnitte eingedeckt und anschließend einer Auswertung unterzogen.

2.16.2.4 Immunreaktivitäts-Scoring

Die TMAs wurden nach Färbung gegen KMT2A und MAML2 einem Immunreaktivitäts-*Scoring* unterzogen. Nach Validierung der Färbung durch Prof. Ströbel, wurde die Expression der jeweiligen Gene analysiert. Dazu wurde ein Immunreaktivitäts-*Score* von 0 – 2 (in 0,5-Schritten) veranschlagt, der die Intensität und den Anteil gefärbter Zellen berücksichtigte. Bei der Auswertung war insbesondere die nukleäre Färbungen von Bedeutung. Es wurde für die abgebildeten Duplikate pro Patientenprobe auf den TMAs ein Mittelwert des *Scores* gebildet. Um sich anschließende statistische Analysen zu vereinfachen, wurden Werte von 0 bis 0,25 als negativ gewertet. *Score*-Werte von $\geq 0,5$ wurden als positive Färbung für das jeweilige Gen gewertet.

2.17 Statistische Analysen

Alle in dieser Arbeit abgebildeten Diagramme und deren statistische Analyse wurden mit der Statistiksoftware Prism 9 für macOS (GraphPad Software, LLC) erstellt bzw. durchgeführt. Für alle statistische Analysen wurde eine Stichprobengröße (n) ≥ 3 verwendet, als Signifikanzwert wurde den Konventionen folgend ein Wert von $p < 0,05$ angenommen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, das Konfidenzintervall betrug dabei 95 %. Um den signifikanten Unterschied zwischen zwei Gruppen zu evaluieren wurde der zweiseitige t -Test verwendet. Für Daten mit zwei unabhängigen Variablen wurde der Einfluss auf die abhängige Variable mittels zweiseitiger Varianzanalyse (*two-way analysis of variance*, kurz *two-way* ANOVA) untersucht. Bei Angabe relativer Werte wurden die Messwerte auf den Mittelwert zum Zeitpunkt 0 der zugehörigen Kontrolle bezogen, welche dann für den Vergleich gleich null oder gleich 1,0 gesetzt wurde. Bei etwaiger Abweichung von den hier genannten Analysen, wurde dies in der jeweiligen Legende der Abbildung vermerkt.

3 Ergebnisse

3.1 Detektion der *KMT2A-MAML2* Translokation in Thymustumoren

3.1.1 Immunhistochemische Analyse von *KMT2A* und *MAML2*

Auf der Suche nach einer generellen Relevanz von *KMT2A* und *MAML2* in Thymustumoren, wurden diese beiden Gene auf Expressionsebene in einem Kollektiv epithelialer Neoplasien des Thymus *in situ* untersucht. Diese semiquantitative Analyse dient der Erhebung der Prävalenz für die Expression dieser Gene. Für die Untersuchungen wurden, wie in Kap. 2.16.2 beschrieben, *Tissue Microarrays* (TMAs) verwendet. Zunächst wurde dabei die Verteilung der im Kollektiv vorhandenen Subtypen evaluiert (Abbildung 3.1A). Wie in Kapitel 2.16.2.4 beschrieben, wurden die TMAs nach Validierung der Färbung einem Immunreaktivitäts-*Scoring* unterzogen. Abbildung 3.1B zeigt exemplarisch Ausschnitte aus Tumoren mit dem ihnen zugeordneten niedrigen bzw. hohen *Score*.

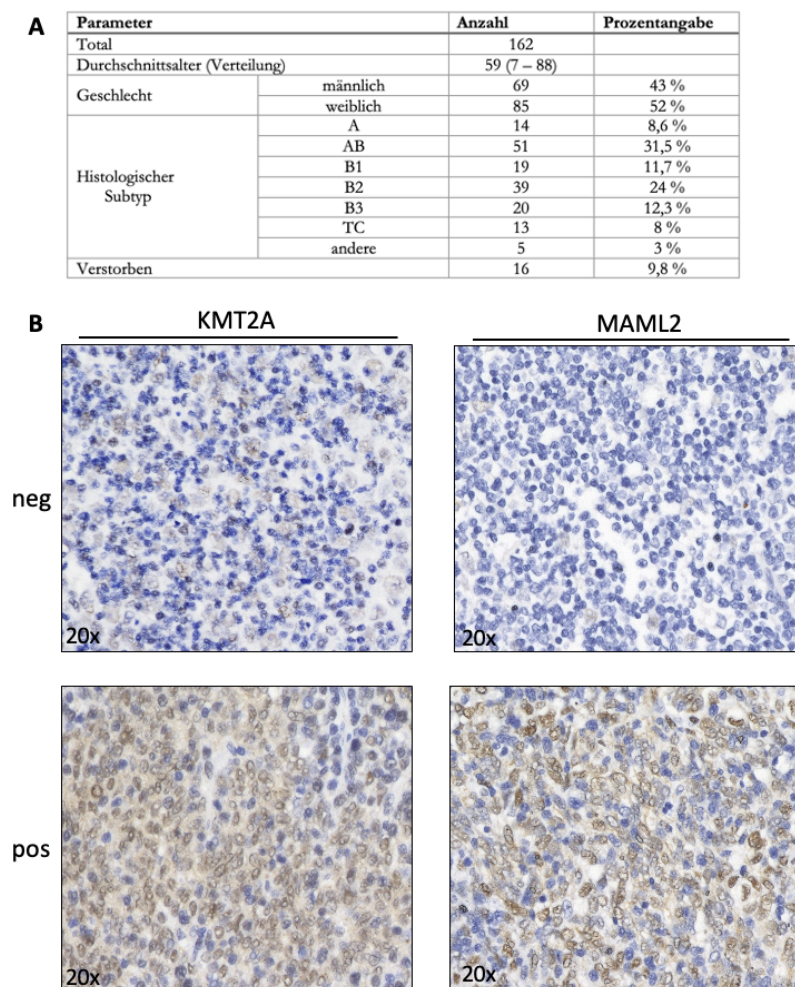


Abbildung 3.1: Immunhistochemische Untersuchungen in Thymusneoplasien. A Übersicht über die verwendeten 162 Patientenproben mit Verteilung nach Geschlecht und Subtyp sowie Angabe des

Durchschnittsalters. **B** Beispielhafte Darstellung verschiedener Ausschnitte aus Tumoren mit Färbung gegen *KMT2A* und *MAML2*. Es ist jeweils ein negativer ($Score = 0$) und ein stark positiver Fall ($Score \geq 1,5$) abgebildet. Anschließend wurden, ausgehend vom vergebenen *Score*, die klinischen Parameter des Kollektivs untersucht. Zuerst wurde die Abhängigkeit der Expressionsstärke vom histologischen Subtyp überprüft. Dazu wurde der Anteil der Expressionsstärke (positiv oder negativ) am jeweiligen Subtyp ermittelt. Wie in Abbildung 3.2A zu sehen, ist die Expression von *KMT2A* insbesondere in den Subtypen B1 bis B3 deutlich vermindert. Bei *MAML2* zeigt sich eine starke isolierte Expression in AB-Thymomen (40 %), während die anderen Entitäten eine eher geringes Expressionsprofil aufzuweisen scheinen (Abbildung 3.2B). Im Folgenden wurde versucht, die Höhe des jeweiligen Scores mit den Masaoka-Stadien zu korrelieren. Für beide Gene konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abbildung 3.2C/D). Weiterhin sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen den Expressionsniveaus und dem Auftreten einer paraneoplastischen Myasthenie untersucht werden. Für insgesamt 55 Patienten wurde bei Diagnose der Myasthenie-Status erhoben. Das Auftreten der Myasthenie (ja/nein) wurde dabei der Expressionsstärke gegenübergestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. (Abbildung 3.2E/F). Eine mögliche Auswirkung auf das Gesamtüberleben der Patienten konnte aufgrund fehlender positiver Fälle nicht mit *KMT2A* oder *MAML2* korreliert werden.

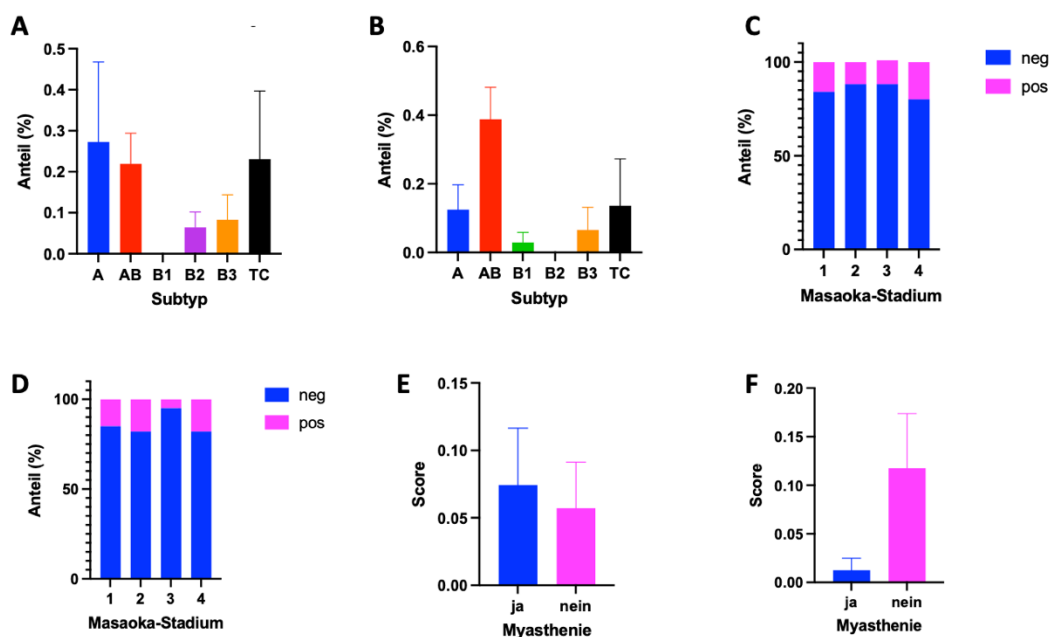


Abbildung 3.2: Statistische Analyse zu Verteilung, Masaoka-Stadium, Myasthenie und Gesamtüberleben. **A/B** Relative Verteilung der Expression von *KMT2A* (**A**) und *MAML2* (**B**) nach histologischem Subtyp. **C/D** Korrelation der Gen-Expression mit den Masaoka-Stadien für *KMT2A* (**C**) und *MAML2* (**D**). **E/F** Vergleich der Expression mit dem Vorliegen einer paraneoplastischen Myasthenie für *KMT2A* (**E**) und *MAML2* (**F**).

3.1.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zur Detektion der *KMT2A-MAML2* Fusion

Um die Inzidenz der *KMT2A-MAML2* Translokation und ihre Verteilung innerhalb der Thymom-Subtypen evaluieren zu können, wurde das Kollektiv bestehend aus 165 Patientenproben vielfältiger neoplastischer Thymus-Entitäten auf diese Translokation hin untersucht. Zum Nachweis der Translokation wurde die FISH-Analyse als Methode gewählt und wie in Kapitel 2.15.3 beschrieben durchgeführt. Zur Analyse wurde die DNS der auf den TMA-Blocken enthaltenen Gewebeproben mit *Break Apart* Sonden (ZytoVision) für je *MAML2* und *KMT2A* hybridisiert.

In der Routinediagnostik wird für FISH-Analysen ein *cut-off* Wert definiert, demzufolge nur solche Fälle als positiv gewertet werden, die mindestens 20 von 100 Zellkerne mit Translokationssignalen besitzen. Ein solcher Wert ist für die *KMT2A-MAML2* Translokation bisher nicht definiert. Um aufgrund der niedrigen Prävalenz das Auftreten dieser Fusion im Patientenkollektiv möglichst weitreichend abzudecken, wurde für die Auswertung der FISH zunächst kein *cut-off* Wert definiert. Anzahl und Verteilung der FISH-positiven Fälle sind in Tabelle 3.1 dargestellt. Es wurden exemplarische Bilder der Analyse dargestellt (Abbildung 3.3).

Tabelle 3.1: Auflistung FISH-positiver Fälle nach histologischem Subtyp.

		<i>KMT2A</i> Sonde	<i>MAML2</i> Sonde
Anzahl positiver Fälle		15	5
Histologischer Subtyp	A	1 (12,5/100)	1 (21/50)
	AB	6 (6,5 – 20/100)	2 (9 – 10/100)
	B1	-	-
	B2	-	1 (11/100)
	B3	6 (7,5 – 19/100)	1 (28/100)
	TC	2 (16 – 16,5/100)	-
	andere	-	1 (20/100)

Die Tabelle gibt eine Übersicht über die Anzahl positiver Fälle und deren Verteilung nach histologischen Subtypen. Die in Klammern gesetzten Werte beziehen sich auf das Spektrum der positiven Zellkerne von 100 ausgezählten Kernen für jeden Subtyp.

Es wurden insgesamt 165 Patientenproben untersucht. Aufgrund fehlender Signale oder beim Zuschneiden verlorenen gegangener Gewebestücke waren 43 Fälle nicht auswertbar, darunter 14 B2- und drei B3-Thymome. Aus den übrig gebliebenen 122 auswertbaren Fällen ergaben sich insgesamt 20 positive Fälle. Es wurden nur solche Fälle als positiv gewertet, bei denen beide Duplikate eindeutige *Break Apart* Signale aufwiesen. Für die Hybridisierung mit der *KMT2A* Sonde ergaben sich 15 positive Fälle, davon 1 Typ A-, 6 Typ AB-, 6 Typ B3-Thymome und 2 Thymuskarzinome. Mit der *MAML2* Sonde zeigten sich 5 FISH-positiv Fälle, darunter 1 Typ A-, 2 Typ AB-, 1 Typ B2-, 1 Typ B3-Thymom sowie ein metaplastisches Thymom. Ein Thymom vom Typ AB zeigt ein Fusionssignal für beide Sonden, davon 20/100 positive Zellkerne für die *KMT2A*-Sonde und 10 % Positivität für die *MAML2*-

Sonde. Die gefundenen Fälle wurden anschließend zwecks Validierung dem *Archer-NGS* zugeführt (Kapitel 3.1.3).

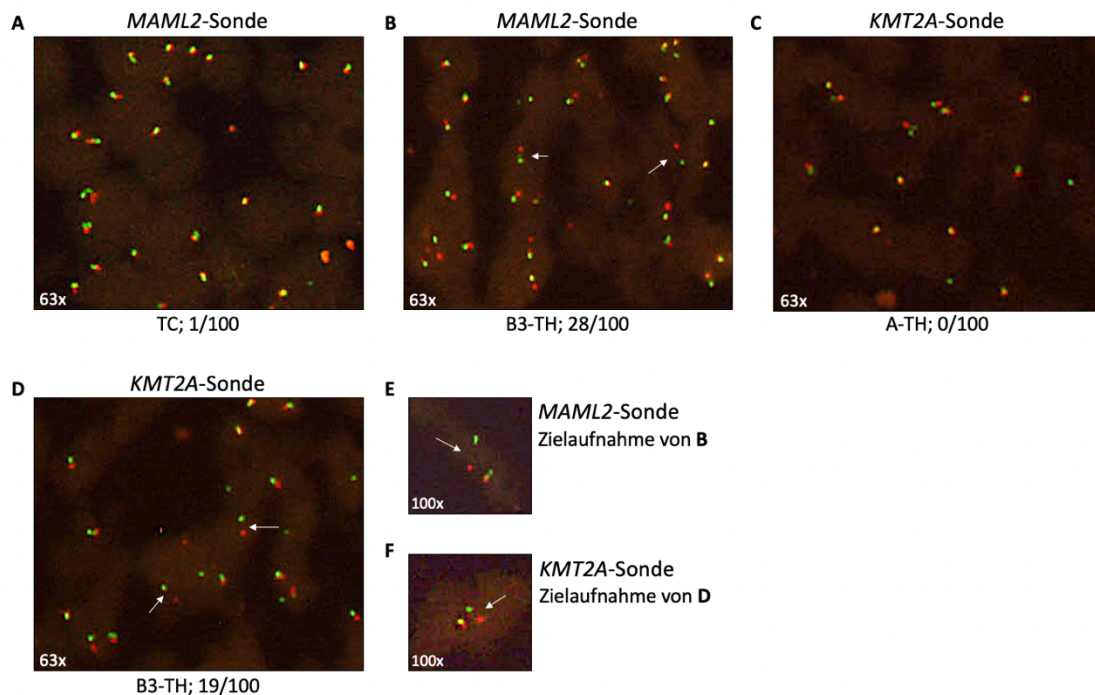


Abbildung 3.3: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von *MAML2* und *KMT2A* in Thymusneoplasien. **A/B** Exemplarische Darstellung eines in der FISH für die *MAML2*-Sonde negativen Thymuskarzinoms mit 1/100 positiven Zellkernen (**A**) und eines B3-Thymoms mit 28 % Positivität (**B**). **E** zeigt einen einzelnen translokationspositiven Zellkern aus **B**. **C/D** zeigen beispielhaft einen *KMT2A*-FISH-negativen Fall eines Typ A-Thymoms ohne positive Zellkerne (**C**) und den Fall eines B3-Thymoms mit 19/100 positiven Zellkernen (**D**). **F** bildet analog ein positives Beispiel aus **D** ab.

3.1.3 Validierung FISH-positiver Fälle mit *Archer-NGS*

In der FISH-Analyse erwiesen sich 20 Fälle als positiv und damit als potentiell transloziert. Um dies zu bestätigen und um die möglichen die Fusionspartner zu identifizieren, wurde wie in Kapitel 2.15.8 beschrieben eine Analyse mit *Archer-NGS* durchgeführt. Dazu wurde aus jeweiligen Formalin-fixierten Proben die RNS isoliert (Kap. 2.15.4.3). Im *Archer* wird die RNS dann in cDNS revers transkribiert und in zwei aufeinanderfolgenden PCR-Zyklen mit genspezifischen Primern amplifiziert und ausgewertet. Es wurde hierbei das Solid Tumor Panel (Invitae Corporation) verwendet. Das Panel deckt das *MAML2* Gen mit Primern für die Exons 2 und 3 ab. Aufgrund der Instabilität der RNS und der Tatsache, dass die RNS aus Formalin-fixiertem Gewebe isoliert wurde, sowie der Sensitivität dieser Methode, wurde für die Proben der *cut-off* Wert auf 12 von 100 positiven Zellkernen veranschlagt. Ausgehend davon verblieben drei positive Fälle für die *MAML2* Sonde und neun für die *KMT2A* Sonde. Abbildung 3.4A zeigt die Verteilung der nach Ansetzen eines *cut-off* Wertes verbliebenen Thymome nach Subtyp.

Unter den 12 Fällen, die im *Archer* analysiert wurden, zeigte sich lediglich ein positiver Fall. Es handelte sich hierbei um ein Thymom vom Typ B3. Das Präparat zeigte in der FISH-

Analyse 28 % positive Zellkerne für die *MAML2* Sonde. Die Analyse im *Archer* (Abbildung 3.4B) ergab, dass in diesem Fall das Exon 10 vom *KMT2A* mit dem Exon 2 von *MAML2* fusionierte. Das Produkt konnte mit den Primern für Exon 9 und 10 für *KMT2A* nachgewiesen werden. Bei diesem Patienten wurde in der Vergangenheit ein B2-Thymom mit pleuraler Metastasierung diagnostiziert, jetzt präsentierte er sich unbekannt Zeit später mit einem translokationspositiven B3-Thymom.

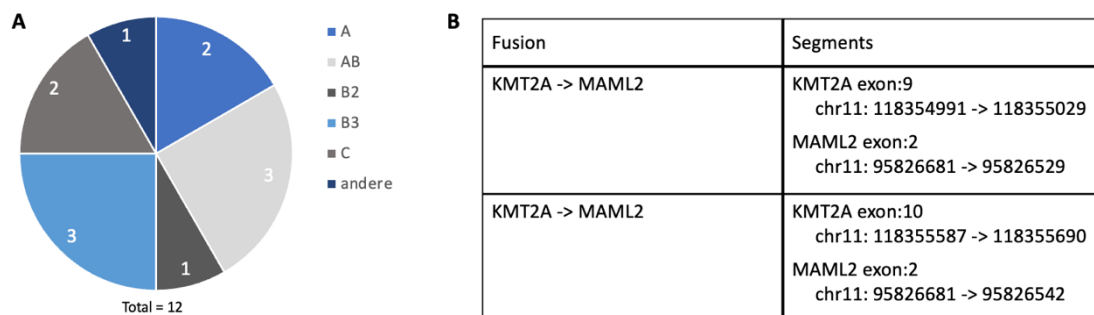


Abbildung 3.4: Validierung FISH-positiver Fälle mit Archer-NGS. Abkürzungen: chr: *chromosome*. **A** Verteilung FISH-positiver Fälle nach Subtyp nach Anlegen eines *cut-off* Wertes von 12 / 100. **B** Resultat des *Archer-NGS* für ein B3-Thymom mit der *KMT2A-MAML2* Translokation. Diese Fusion entstand zwischen Exon 10 von *KMT2A* und Exon 2 von *MAML2* und konnte mit Primern sowohl für Exon 9 als auch Exon 10 vom *KMT2A* nachgewiesen werden. *Archer* gibt zusätzlich die genaue chromosomale Lokalisation des sequenzierten PCR-Produktes als Referenz an.

3.2 In vitro Experimente zur Charakterisierung der *KMT2A-MAML2* Translokation

3.2.1 Sequenzierung des verwendeten *Sleeping Beauty* Plasmids

Um die *KMT2A-MAML2* Translokation nun funktionell untersuchen zu können, wurde ein Plasmid verwendet, mit dessen Hilfe die Fusion in geeigneten Zellmodellen exprimiert werden konnte und auf die Weise für verschiedenste Analysen zur Verfügung stand. Vor der Transfektion der Zelllinien mit diesem Plasmid und der Etablierung etwaiger Klone (Kap. 3.2.2), wurde zunächst die Sequenz des Plasmides mithilfe der Sanger-Sequenzierung (Kap. 2.15.7) identifiziert. Ziel dieser Sequenzierung war es insbesondere die Sequenz der Fusionsstelle und der dazwischen liegenden Introns zu eruieren. Dafür wurde ausgehend von der bekannten Sequenz des im Transposons vorkommenden EF1a-Promoters am N-Terminus ein *forward* Primer für diesen Promotor konstruiert. Es wurden 20 Bp lange Abschnitte der N-terminalen Promotorsequenz als Grundlage für diesen Primer verwendet, dessen Sequenz anschließend zur Gewährleistung einer Sequenzspezifität mit DNS-Sequenzen abgeglichen wurde (<https://eurofinngenomics.eu>). Im Folgendem wurde mit diesem *forward* Primer eine Sanger-Sequenzierung durchgeführt. Der anschließende Sequenzabgleich mit der Datenbank des NCBI (blast.ncbi.nlm.nih.gov) ergab, dass auf den EF1a-Promotor zunächst eine *FLAG-Tag* und dann die Exons 1 – 8 von *KMT2A* folgten

(Referenz: NM_001197104.2). Es wurde analog zum Promotor ein Primer für das Exon 8 designed und erneut eine Sanger-Sequenzierung durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass auf das Exon 8 eine kurze Intronsequenz sowohl des Intron 9 von *KMT2A* als auch des Intron 2 von *MAML2* folgte. Darauf folgten die *MAML2* Exons 3 bis 5 (NM_032427.4). In der Literatur des Plasmids ist die Fusion mit Exon 2 vom *MAML2* beschrieben. Diese Angabe bezieht sich auf eine kleinere von zwei Splice-Variante des Gens (A0A087X0G5). Die zweite Splice-Variante ist um 1626 Bp länger und folgt einer anderen Nomenklatur der Exons. Die Exon 2 Sequenz der kleineren Splice-Variante ist identisch mit der Sequenz des Exons 3 der größeren Variante. Legt man die größere Variante zu Grunde, so fehlt dem hier verwendeten Plasmid die 1626 Bp lange Sequenz des Exons 2. Da alle bisher beschriebenen Varianten der Translokation ihren Bruchpunkt zwischen Exon 1 und 2 von *MAML2* haben, bildet das Plasmid eine andere Version dieser Genfusion dar. Weiterhin kodiert das Transposon noch ein Protein, das eine Hygromycin B-Resistenz vermittelt. Dieser Sequenz sind der SV-40 Promotor und der PGK-Promotor vorgeschaltet. Eine Übersicht über das verwendete Plasmid und die darin abgebildete Fusionsstelle gibt Abbildung 3.5.

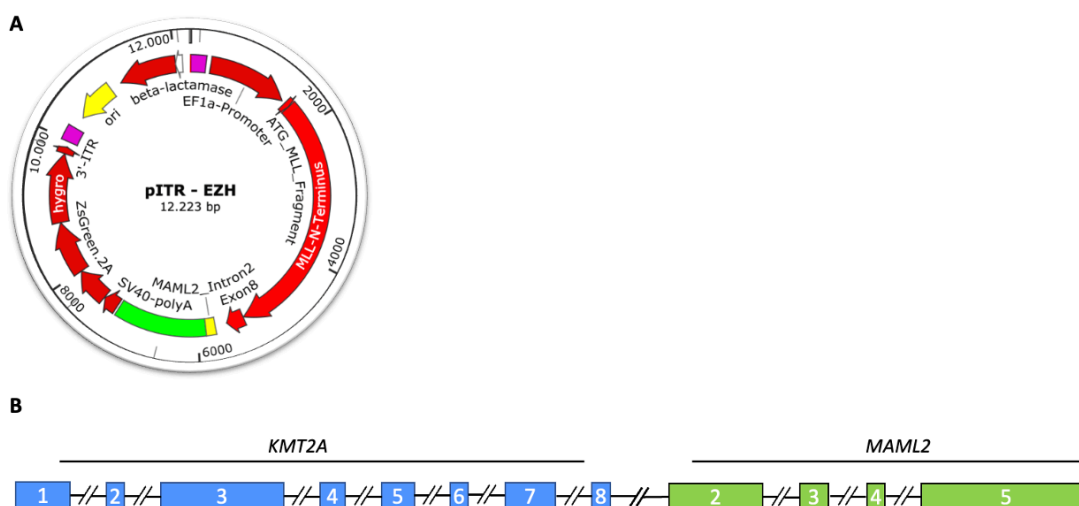


Abbildung 3.5: Übersicht über das SB-Plasmid und das Fusionskonstrukt dieses Plasmids. A Übersicht des verwendeten *Sleeping Beauty* Plasmids. In pink sind die beiden ITRs erkennbar, die die dazwischen liegende Fusionssequenz flankieren. B zeigt die im Plasmid abgebildete Fusion mit relativer Größe der beteiligten Exons zueinander.

3.2.2 Etablierung von *KMT2A-MAML2* konstitutiv exprimierenden Zellklonen für funktionelle Analysen

Um die *KMT2A-MAML2* Genfusion nun funktionell zu analysieren, wurden Zellklone generiert, die diese Translokation stabil exprimieren. Dazu wurden drei Zellmodelle verwendet. Einerseits wurde die HEK-Zelllinie als nicht-neoplastische Zelllinie verwendet, andererseits die beiden Thymuskarzinom Zelllinien 1889c und MP-57.

Nach Amplifikation und Isolierung des Plasmids (Kap. 2.15.1), wurden die Zelllinien, wie in Kapitel 2.14.8 beschrieben, mittels Lipofektion transfiziert. Dabei wurden fünf Ansätze

verwendet, darunter eine unbehandelte Kontrolle zur Beurteilung der Zellviabilität, weiterhin eine nicht-transfizierte, aber selektionierte Kontrolle, um das Ansprechen auf das Selektionsantibiotikum zu prüfen. Es wurden darüber hinaus drei transfizierte und selektionierte Ansätze verwendet. Diese drei Ansätze wurden mit dem SB-Plasmid und dem Transposase-Plasmid transfiziert und anschließend selektiert. Die zur Abtötung der Zellen notwendige Konzentration wurde in einer vorangegangenen Testreihe festgestellt. Nach dreitägiger Selektion wurde das Ansprechen lichtmikroskopisch evaluiert. Die Zellen wurden nach Transfektion 48 h inkubiert und dann für 72 h mit 400 mg/ml Hygromycin-B zwecks Selektionierung behandelt. Aufgrund einer auf dem Plasmid kodierten Hygromycin-Resistenz, wurde dieses Antibiotikum zur Selektion verwendet. Die nicht-transfizierten Zellen waren fast vollständig abgetötet und die transfizierten Zellen imponierten nach Wechseln des Mediums als einzelne, verteilt liegende Zellklone. Die Zellen wurden bis zur ausreichenden Konfluenz inkubiert und dann zur Erzeugung genetisch identischer Zellpopulationen als Einzelzellen ausgesät und für etwa 6 Wochen inkubiert. Nach Ablauf von einer Woche Inkubationsdauer wurden lediglich Einzelzellkolonien lichtmikroskopisch zur weiteren Proliferation ausgewählt. Bei ausreichender Konfluenz (75 %) wurden die Klone in die nächst größere *Well*-Platte überführt. Nach Erreichen einer ausreichend großen Zellpopulation wurde die Insertion mittels PCR nachgewiesen und die Proteinexpression auf dem *Western Blot* untersucht.

Parallel zur Transfektion wurden basierend auf der Sequenz des verwendeten Plasmids zwei Primer designed, mit deren Hilfe die Insertion der Fusion in einer PCR nachgewiesen werden sollte. Als *forward* Primer diente der in Kapitel 3.2.1 verwendete Primer für Exon 8 von *KMT2A*. Die Sequenz für den *reverse* Primer wurde analog zu seinem Partner mit der NCBI-Datenbank abgeglichen und eine 20 Bp lange Sequenz im Exon 2 von *MAML2* ausgewählt. Das entstehende Produkt würde erwartungsgemäß über eine errechnete Länge von 519 Bp verfügen. Um die Funktionstüchtigkeit der PCR und der beiden Primer zum Nachweis der Insertion zu überprüfen, wurde als Positivkontrolle zunächst eine PCR auf dem Plasmid durchgeführt. Es war dabei in der Analyse der PCR-Produkte eine deutliche Bande bei circa 520 Bp in beiden Ansätzen zu erkennen (Abbildung 3.6A). Nach ausreichender Expansion der Einzelklone wurde zunächst die Insertion des Transposons in diesen Klonen nachgewiesen. Abbildung 3.6B zeigt exemplarisch die Auswertung einer PCR, die mit sechs Klonen für die HEK-Zelllinie durchgeführt wurde. Da sich Transposons in ihrer Funktion als *jumping genes* an beliebiger Position ins Genom integrieren können, können sich für die Klone unterschiedliche Expressionsmuster ergeben. Aus diesem Grund wurde nicht nur die Insertion, sondern auch die Expression der Translokation in den Klonen analysiert. Dazu wurden Proteinlysate aller Klone und der Wildtyp-Zelllinie erstellt und mittels *Western Blot* auf die *MAML2*-, *KMT2A*-, *HES1*- und pEGFR-Expression hin untersucht. Da *HES1* in der Literatur als direktes Zielgen der *KMT2A-MAML2* Fusion beschrieben ist und durch diese Translokation in seiner Aktivierung gehemmt werden könnte, wurde dieses Gen zur Klonselktion verwendet. Aufgrund einer beschriebenen Aktivitätsänderung des EGFR-

Signalwegs durch andere *MAML2*-Fusionen diente die Aktivierung dieses Gens als weiterer Parameter, der die Auswahl der Klone erleichtern sollte.

Für den *MAML2*-Antikörper konnte zusätzlich zum endogenen *MAML2* (untere Bande) die Entstehung eines Fusionsproteins (> 250 kDa) nachgewiesen werden (obere Bande). Dieses Protein war jeweils nur in den Klonen der HEK und 1889c nachzuweisen, nicht jedoch im Wildtyp. Bei der MP-57 konnte dieses Protein nicht nachgewiesen werden (Abbildung 3.6C). Auch das endogene *MAML2* zeigte eine Reaktion, es wurde in den 1889c Klonen weniger und in der HEK vermehrt exprimiert. Eine differentielle Expression von *HES1* schien in den Klonen aller Zelllinien vorhanden zu sein, ebenso eine disparate Aktivierung von *EGFR*. Bei der Auswahl der Klone wurde auf die Expression eines Fusionsproteins geachtet, ebenso auf eine abweichende Expression von *HES1* und *pEGFR* als vermutete Zielgene der Translokation. Die Richtung dieser Expression konnte vorab nicht definiert werden. Beim *Western Blot* der zu etablierenden Klone fiel jedoch auf, dass sich zahlreiche Klone wie der Wildtyp verhielten. Bei diesen war meistens kein oder nur ein sehr schwaches Fusionsprotein erkennbar. Einige Klone wichen in ihrer Expression vom Wildtyp ab und wurden daher final ausgewählt. Auf diese Weise wurden pro Zelllinie zwei bis drei Klone etabliert, kultiviert und standen für phänotypische Analysen zur Verfügung.

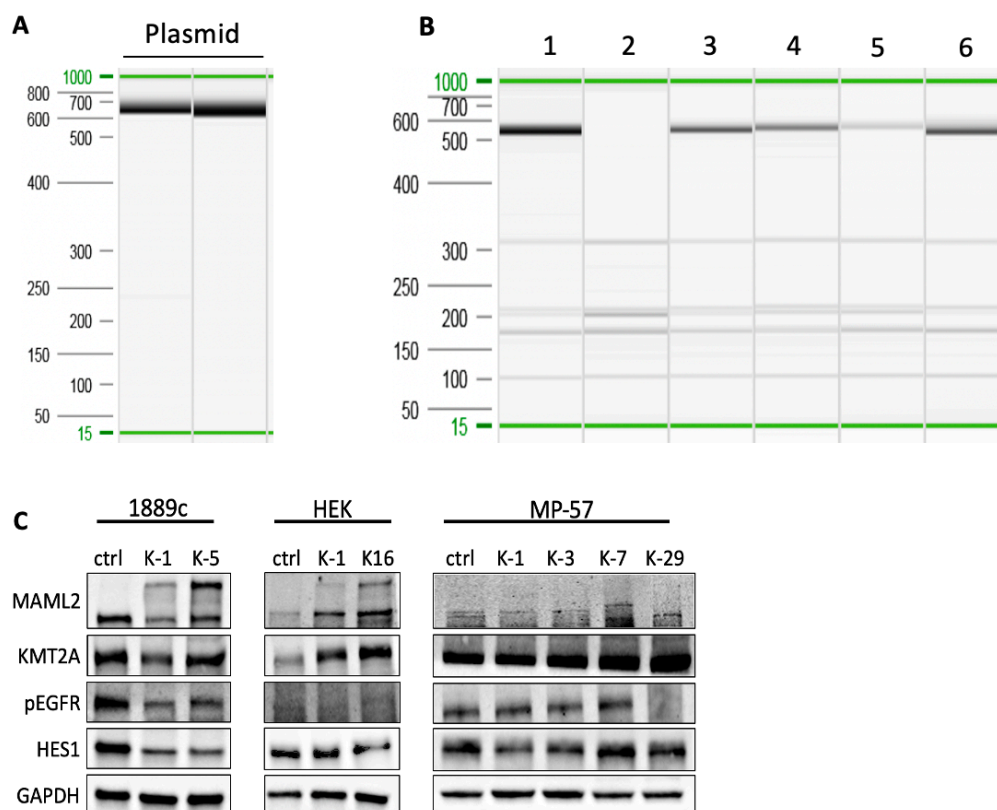


Abbildung 3.6: Etablierung geeigneter Zellklone mittels PCR und *Western Blot*. **A** Auswertung der initialen PCR des Plasmids in zwei Ansätzen mit den dafür konzipierten Primern. **B** Exemplarische Übersicht einer PCR-Auswertung für zu etablierende HEK-Klone. Die Bande 1 stellt den später etablierten HEK-Klon

1 dar. C Übersicht über die Protein-Expression vom MAML2, KMT2A, pEGFR und HES1 der final etablierten Klone aller drei verwendeten Zelllinien.

3.2.3 Phänotypische Charakterisierung der *KMT2A-MAML2* Genfusion

3.2.3.1 Effekt des Fusionsproduktes auf die Zellproliferation in 2D-Zellkultur und die Zellviabilität

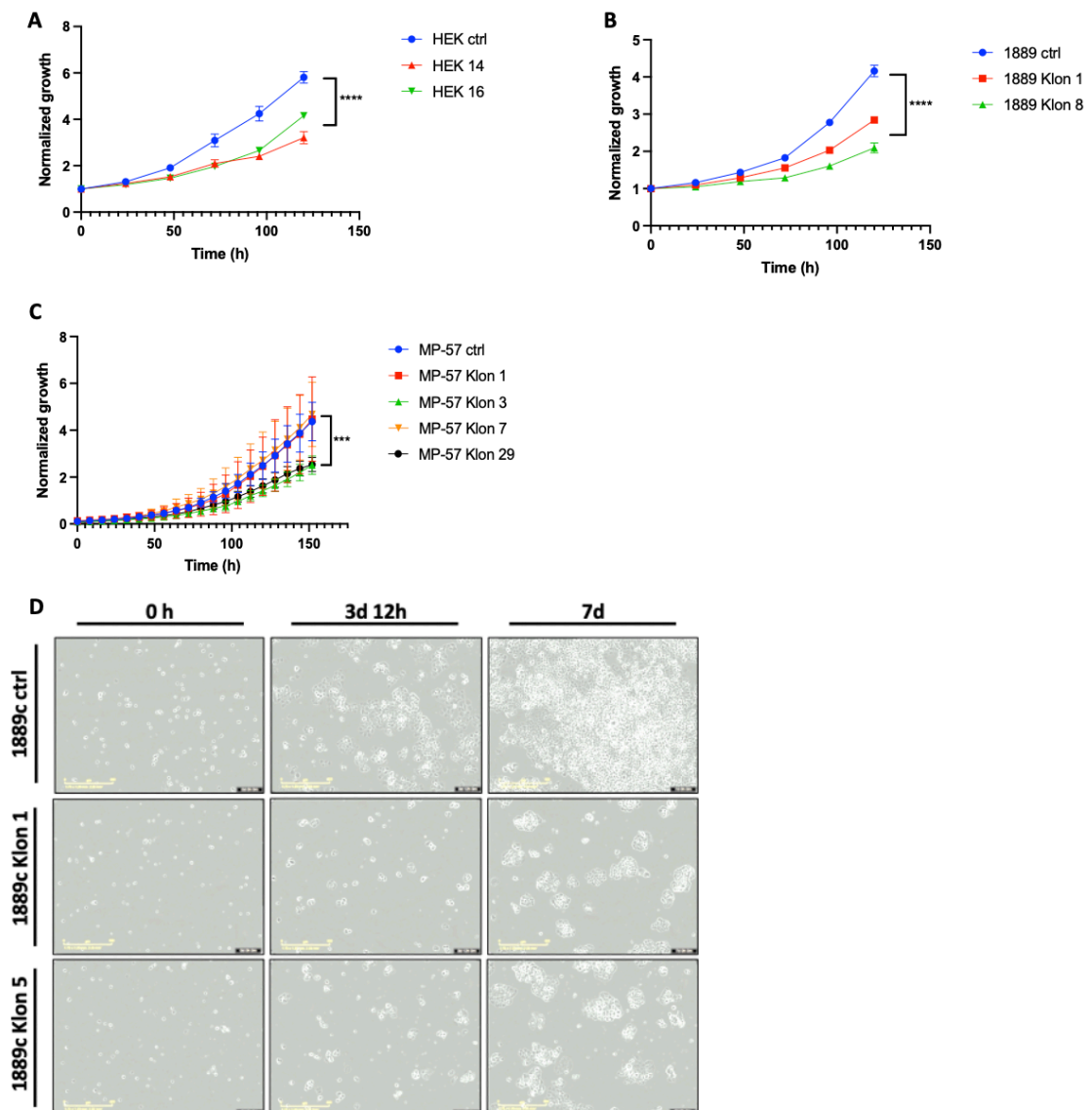


Abbildung 3.7: Einfluss der *KMT2A-MAML2* Translokation auf das Wachstum der Zellklone. Vergleich der Zellproliferation nach Überexpression des Fusionskonstruktes in den Zelllinien HEK (**A**), 1889c (**B**) und MP-57 (**C**). Die Klone der Zelllinien zeigten eine signifikante Verringerung der Proliferation. Die Graphen sind repräsentative Beispiele mit $n = 3$, die Signifikanz wurde mittels *Two-way*-ANOVA analysiert (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$). **D** Exemplarische Darstellung der Konfluenz der Wildtyp-Zelllinie und der Klone zu den Zeitpunkten 0 h, 3 d 12 h und 7 d. Diese Abbildung veranschaulicht das Resultat der Graphen (**A – C**).

Um grundlegende phänotypische Effekte der Genfusion zu charakterisieren, wurde als erstes ihr Einfluss dieser auf das zweidimensionale Wachstum in der Zellkultur untersucht. Dazu

wurde die Viabilität der Zellen in Abhängigkeit der Konfluenz unter Standardbedingungen über einen Zeitraum von 0 bis 120 h untersucht. Für diese Viabilitätsassays (Kap. 2.14.4) wurden für die HEK-Zelllinie 500 Zellen/*Well* und für 1889 und MP-57 jeweils 1000 Zellen/*Well* (Kontrollzelllinie und Klone) in einer 96-*Well*-Platte ausgesät. Die Zellen wurden im Abstand von 24 h mit der Testlösung behandelt und nach zweistündiger Inkubation wurde die Zellviabilität gemessen. Die erste Messung 24 h nach Aussaat diente als Referenzwert, die Wachstumskurven stellen dabei die relative Extinktionszunahme dar. Für die Zelllinien HEK und 1889c zeigte sich eine signifikante Abnahme der Proliferation der jeweilig etablierten Klone, dieser Effekt war in den beiden Zelllinien ähnlich stark ausgeprägt (Abbildung 3.7A/B). Während sich die Klone 3 und 29 der MP-57 durch Abnahme der Proliferation ähnlich verhielten wie die der anderen beiden Zelllinien, so zeigten die Klone 1 und 7 keine signifikante Zunahme des Wachstums (Abbildung 3.7C). Abbildung 3.7D veranschaulicht diesen Sachverhalt durch Darstellung der Zellkonfluenz der 1889c-Klone und des Wildtyps zu verschiedenen Zeitpunkten.

Diese Beobachtung stimmt mit der Beobachtung im Umgang mit diesen Klonen überein: Zum Erreichen einer ausreichenden Konfluenz, insbesondere für die HEK und 1889c, wurden deutliche längere Inkubationszeiten im Vergleich zum Wildtyp benötigt.

3.2.3.2 Analyse der Migrationsfähigkeit der Knock-In Klone

Im Folgenden sollte der Einfluss der Translokation auf die Migrationsfähigkeit der Zellen untersucht werden. Dazu wurde wie in Kapitel 2.14.5 beschrieben ein *Scratch*-Assay durchgeführt. Es wurde dazu alle 24 h über einen Zeitraum von insgesamt 120 h ein Foto von der Breite des erzeugten Spaltes aufgenommen. Die Breite des Spaltes wurde unter Zuhilfenahme des Programmes ImageJ (NIH) bestimmt und anschließend ausgewertet. Dabei wurde der Mittelwert zum Zeitpunkt 0 (Referenzwert) für alle drei Replikate eines Klons bestimmt, alle Messwerte über diesen Wert normalisiert und das Ergebnis als Diagramm dargestellt. Die Steigung der Diagramme stellt dabei die relative Änderung der Migration zum Referenzwert dar (Abbildung 3.8A-C).

Während die HEK-Klone ein schnelleres Migrationsverhalten aufwiesen, war dieser Effekt in der 1889c umgekehrt, beide Klone migrierten signifikant langsamer als die Kontrolle. Ähnlich wie im Proliferationsassay verhielt sich nur Klon 29 der MP-57 anders als die Kontrolle, die übrigen Klone zeigten keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle. Klon 29 migrierte deutlich langsamer und zeigte ein analoges Verhalten zu den 1889c Klonen. Abbildung 3.8D visualisiert exemplarisch das unterschiedliche Migrationsverhalten der Klone in der HEK- und 1889c-Zelllinie.

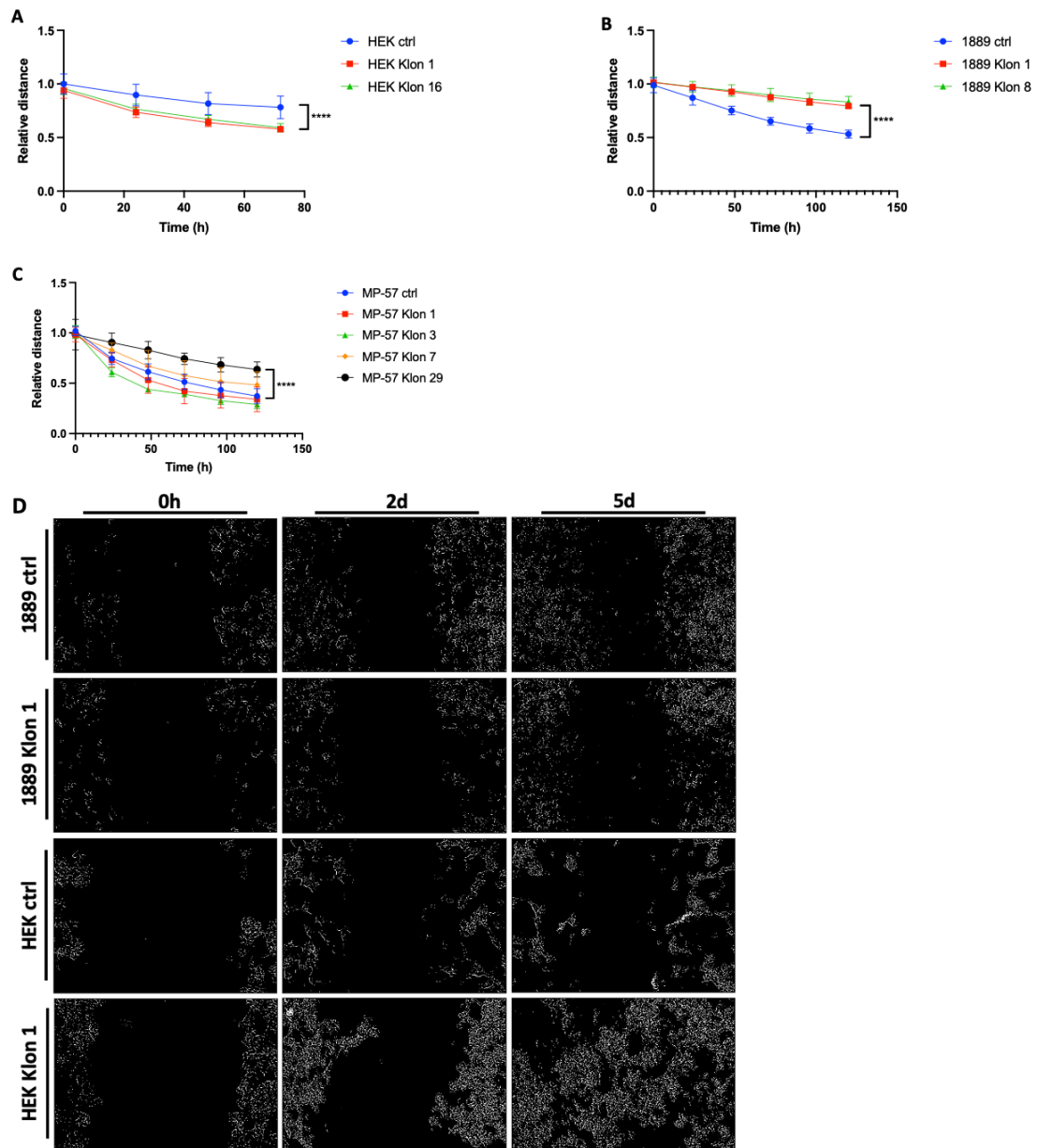


Abbildung 3.8: Untersuchung des Migrationsverhaltens fusionspositiver Klone. *Scratch*-Assay zur Analyse der Migrationsgeschwindigkeit der Klone in Abhängigkeit zum Wildtyp in den Zelllinien HEK (**A**), 1889c (**B**) und MP-57 (**C**). Die Messung erfolgt über 120 h und wurde ins Verhältnis zur Stunde 0 gesetzt. Repräsentatives Ergebnis aus $n = 5$, *Two-Way* ANOVA. **D** zeigt die Breite des gesetzten *Scratches* der 1889c- und der HEK-Zelllinie mit je einem Klon und seine Verschmälerung zu den Zeitpunkten 0 h, 2 d, 5 d.

3.2.3.3 Analyse des Effektes der *KMT2A-MAML2* Translokation auf Stammzeleigenschaften der Zellen

Um neben Proliferation (Kap. 3.2.3.1) und Migration (Kap. 3.2.3.2) etwaige Änderungen in den Stammzeleigenschaften und der Regenerationsfähigkeit der Zellklone zu ermitteln, wurde das *Side population assay* und das Klonalitätsassay in Methylcellulose durchgeführt. Das *Side population assay* wurde zur Beurteilung der Stammzeleigenschaften der Klone durchgeführt (Kap 2.14.9). Eine veränderte Klonalität erlaubt die Beurteilung eines

dreidimensionalen Wachstums der Zellen ohne Kontakt zu festen Oberflächen und gibt Aufschluss über die Kapazität zur Regeneration und Wachstum von Zellen.

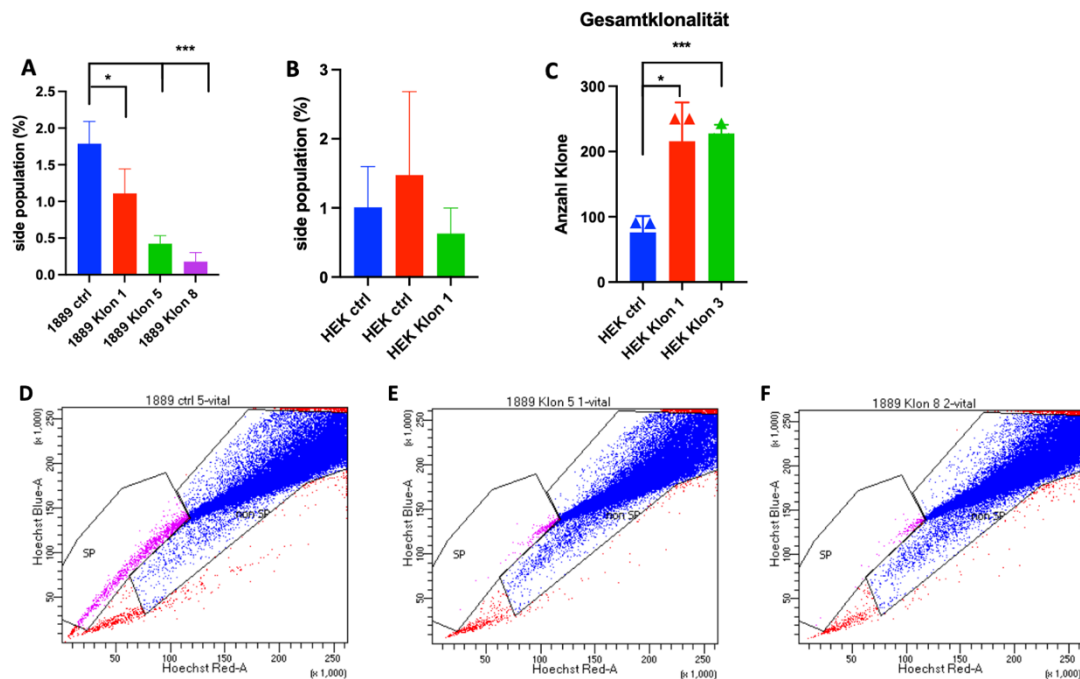


Abbildung 3.9: Untersuchungen der Stammzeleigenschaften der Klone. Relative Anteile der Hoechst-negativen Klone im *Side population assay* für die 1889c (**A**) und die HEK-Zelllinie (**B**) (repräsentative Beispiele, *t-Test*). **C** Ergebnis der Zählung mit erhöhter Gesamtklonalität der HEK-Klone (*t-Test*). **D-F** zeigen exemplarische FACS-Histogramme für den 1889c Wildtyp (**D**), den Klon 5 (**E**) und den Klon 8 (**F**). Die im SP-Feld sichtbaren violetten Plots stellen die Hoechst-negativen Zellen dar, also jene mit erhöhtem Stammzellpotenzial. Die blauen Plots im non SP-Feld zeigen die Hoechst-positiven Zellen an. Der typische Hoechst-Schweif imponiert im linken unteren Quadranten dieses Histogramms.

Nach 1 h Inkubation mit dem Hoechst-Farbstoff wurde der prozentuale Anteil der Hoechst-negativen Zellen, also derjenigen Zellen mit höheren Stammzeleigenschaften, an der Gesamtzellzahl mittels FACS bestimmt. Dabei zeigte sich für die HEK-Zelllinie kein signifikanter Unterschied zwischen den Klonen und dem Wildtyp, Klon 1 zeigte eine leicht erhöhte, Klon 8 hingegen eine leicht verringerte Positivität an Hoechst-Zellen. Bei der 1889c hingegen konnte eine signifikante Abnahme der Stammzeleigenschaften beobachtet werden, die vor allem in den Klonen 5 und 8 am stärksten ausgeprägt war (Abbildung 3.9A und B). Abbildung 3.9D-F zeigen exemplarische FACS-Histogramme für das *Side Population Assay* der 1889c. Diese Histogramme visualisieren die drastische Abnahme Hoechst-positiver Zellen für die 1889c-Klone. Das zusätzlich für die HEK durchgeführte Klonalitätsassay (Kap. 2.14.7) zeigt eine signifikante Zunahme des Regenerationspotenzials in den Klonen (Abbildung 3.9C). Klon 1 zeigte dabei in beiden Assays eine Zunahme der Stammzeleigenschaften, wenn auch dieser Effekt im Klonalitätsassay nicht signifikant war.

3.2.3.4 Evaluation des Ansprechens der Zellklone auf Chemotherapeutika

Um ein potenziell anderes Ansprechen auf zytotoxische Agentien zu überprüfen, wurden die Klone in Abhängigkeit von der Kontrolle mit verschiedenen Chemotherapeutika und Inhibitoren mit jeweils verschiedenen Konzentrationen behandelt. Tabelle 3.2 gibt eine Übersicht über die verwendeten Substanzen, deren Inkubationszeit und die zugehörigen Konzentrationen. Da sich die Therapie von Thymusneoplasien, wie in Kapitel 1.2.3 beschrieben, als schwierig erweist, wurden zunächst Cisplatin und Etoposid als populäre Chemotherapeutika für die Untersuchungen verwendet. Das Ansprechen der Klone auf Sunitinib als wichtiges Zweitlinientherapeutikum sollte ebenfalls untersucht werden. Durch Behandlung mit diesen sollten etwaige Resistenzen oder bessere Ansprechraten untersucht werden. Bei anderen *MAML2*-Translokation wurde eine Aktivitätsänderung des EGFR-Signalweges beschrieben. Aufgrund der tatsächlich beobachteten geringeren Aktivierung von EGFR in den 1889c und MP-57 Klonen (Kap. 3.2.3.5) wurde versucht diesen Signalwegs zu inhibieren. Gefitinib hemmt den EGF-Rezeptor, während Sch772984 als weiteres Gen dieses Signalwegs *ERK1/2* inhibiert.

Um das Ansprechen zu evaluieren, wurde nach Inkubation die Extinktion der Zellen mittels Viabilitätsassay (Kap. 2.14.4) gemessen. Die Werte der unbehandelten Zellen bildeten dabei den Referenzwert. Zur Auswertung wurden die Konzentrationen logarithmiert, die Werte dann normalisiert und als Diagramm dargestellt (Abbildung 3.10).

Tabelle 3.2: Verwendete zytotoxische Agentien mit Inkubationszeit und verwendeter Konzentration.

Name	Inkubationszeit	Konzentrationen zur Behandlung
Cisplatin	72 h	0; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 10; 50; 100 μM
Etoposid	72 h	0; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 10; 50; 100 μM
Sunitinib	48 h	0; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 10; 50; 100 μM
Gefitinib	48 h	0; 1; 2; 5; 10; 25; 50; 100; 500; 1000 nM
Sch772984	48 h	0; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 5; 10 μM

Sowohl die 1889c-Zelllinie wie auch die HEK sprachen gut auf Cisplatin an. Bei der 1889c wurde für die Konzentrationen von 0,2 bis 1 μM ein signifikant schlechteres Ansprechen beider Klone beobachtet ($p \leq 0,05$), diese Signifikanz bestand für den Klon 1 zusätzlich für die behandelte Konzentration von 5 μM fort. Klon 1 der HEK sprach signifikant besser an, auch Klon 16 zeigte eine ähnliche derartige Tendenz. Die Klone beider Zelllinien (HEK und 1889c) sprachen primär bei niedrigeren bis mittleren Etoposid-Konzentrationen schlechter an, dieser Effekte nihilisierte sich bei sehr hohen Konzentrationen. Bei Behandlung mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib sprachen die Klone insbesondere bei hohen Konzentrationen (2 – 10 μM) sehr gut auf die Behandlung an, dieser Effekt war in der 1889c-Zelllinie stärker ausgeprägt. Zusätzlich wurde das Ansprechen der 1889c auf den EGF-Rezeptor-Inhibitor Gefitinib evaluiert. Hierbei zeigte sich weder bei den Klonen noch bei der Kontrolle ein wesentliches Ansprechen auf dieses Chemotherapeutikum. Trotz eines

insgesamt moderaten Ansprechens auf den ERK1/2-Inhibitor Sch772984 konnte keine signifikant differentielle Reaktion der Klone auf diesen Inhibitor festgestellt werden.

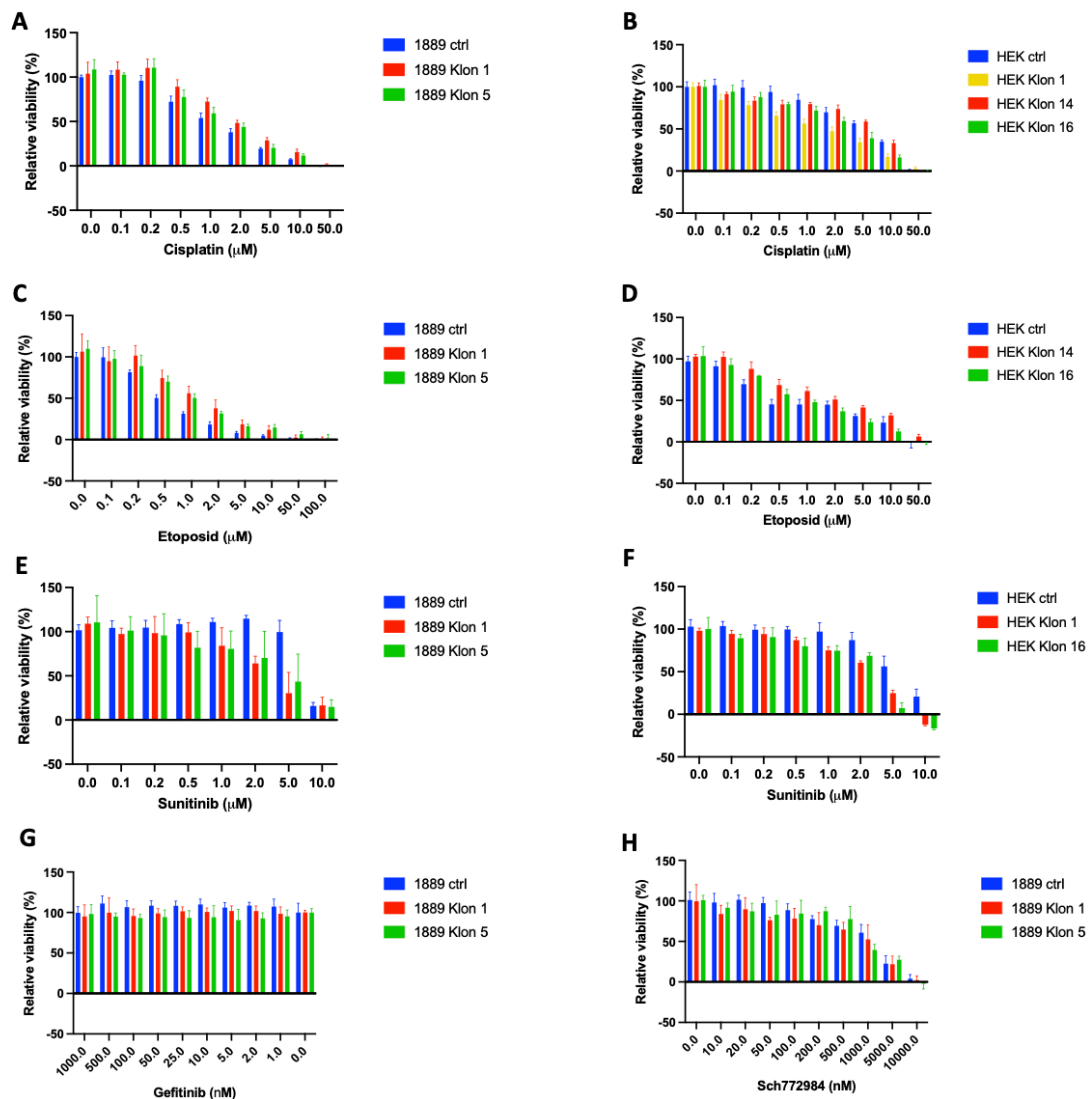


Abbildung 3.10: Graphische Darstellung des Ansprechens der Klone auf verschiedene zytotoxische Agentien. Darstellung des mittels MTS-Assay ausgewerteten Ansprechens der 1889c- und HEK-Zellklonen auf Cisplatin (**A**, **B**), auf Etoposid (**C**, **D**) sowie auf Sunitinib (**E**, **F**). Weiterhin wurde die Viabilität der 1889c- und der zugehörigen Klone nach Behandlung mit Gefitinib (**G**) und Sch772984 (**H**) evaluiert. Untersuchungen zur Proteinexpression in fusionspositiven Zellklonen

Zuletzt wurde die Proteinexpression der Zellklone untersucht, um etwaige dysregulierte *downstream* Zielgene dieses Fusionskonstruktes finden zu können. Dazu wurden *Western Blots*, wie in Kapitel 2.15.2 beschrieben, durchgeführt. Neben den initialen *Western Blots* zur Selektion der Klone mit Antikörpern gegen MAML2, HES1 und pEGFR wurden zusätzlich die Cluster EMT, Stammzellmarker, Anti-Apoptose und Autophagie sowie der EGFR-Signalweg auf ihre Expression hin untersucht. EMT-Faktoren wurde dabei aufgrund ihres Einflusses auf die zelluläre Plastizität (epithelialer vs. mesenchymaler Phänotyp) untersucht. Da *KMT2A* für die Aufrechterhaltung von Stammzeleigenschaften von Bedeutung ist, sollte versucht werden etwaige Änderung dieser durch Expressionsanalyse von Stammzellmarkern

nachzuweisen. Die bei der Klonselktion (Kapitel 3.2.2) entdeckte geringere Aktivierung von EGFR sollte durch Analyse weiterer Komponenten dieses Stoffwechselweges zu verifizieren versucht werden. Anti-Apoptose und Autophagie stellen bekannte Resistenz-Mechanismen von Thymustumoren dar und wurden ebenfalls auf etwaige Änderungen hin untersucht.

Hinsichtlich EMT zeigte sich eine stärkere Expression epithelialer Marker wie E-Cadherin in den Zelllinien MP-57 und 1889c. Während die Expression von β -Catenin in allen drei Zelllinien abnahm, konnte in der HEK- und MP-57 eine Zunahme der ZO-1 Expression festgestellt werden. Abbildung 3.11A gibt eine genau Übersicht über die Expression verschiedener EMT-Antikörper. Eine verstärkte Expression der Stammzellmarker SOX2 und Nanog konnte in der 1889c und HEK nachgewiesen werden, das zumindest für die SOX2-Expression auch in der MP-57 bestätigt werden konnte (Abbildung 3.11B).

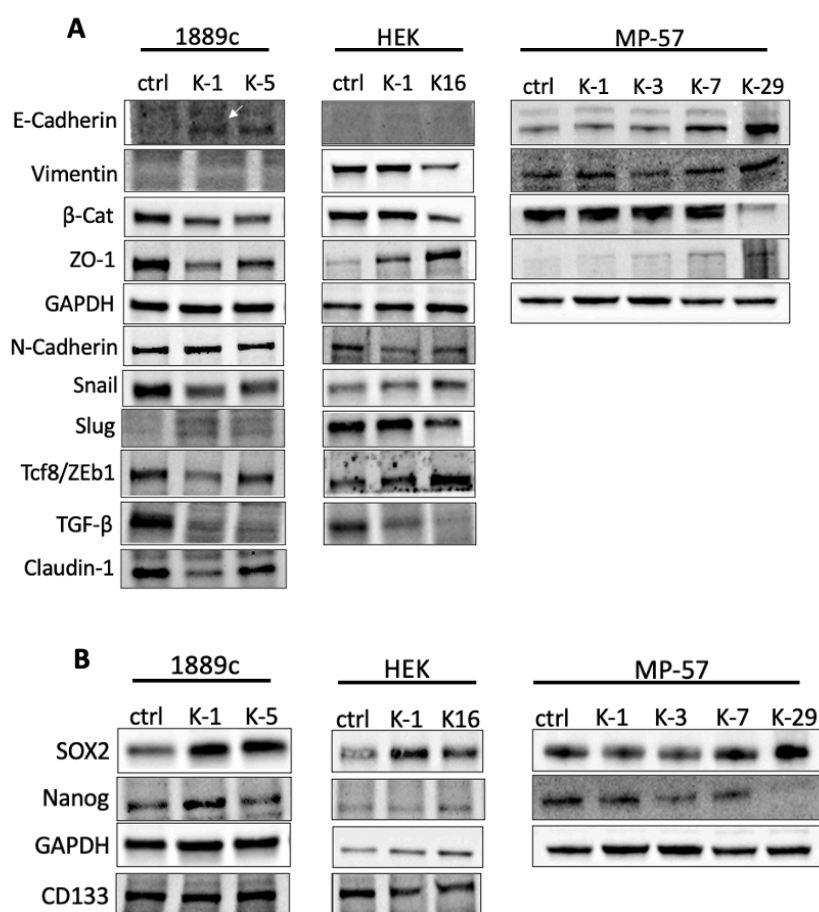


Abbildung 3.11: Analyse der Proteinexpression von EMT und Stammzellmarkern in den Zelllinien 1889c, HEK und MP-57. Abkürzungen: ctrl: Kontrolle, K-X: Klon mit zugehöriger Nummerierung. Analyse der Proteinexpression der fusionspositiven Klone dreier Zelllinien mittels Western Blot. Dabei wurden die

Cluster EMT (A) und Stammzellmarker (B) untersucht. Anti-Apoptose und Autophagie (C) sowie der EGFR-Signalweg (D) untersucht.

Hinsichtlich der Expressierung von Proteinen aus dem Bereich Anti-Apoptose und Autophagie verhielten sich die verschiedenen Zelllinien heterogen. Eine erhöhte LC3B-Expression konnte nur in der HEK nachgewiesen werden, während diese in den beiden Thymus-Karzinomzelllinien eher niedriger exprimiert war. Bei steigender BCL-XL-Expression in der 1889c, präsentierten sich die MP-57 Klone mit einer verringerten Expression dieses Proteins (Abbildung 3.11A). Während die Aktivierung der allermeisten Komponenten des EGFR-Signalwegs in den Klonen der 1889c Zellen deutlich reduziert war, zeigte sich in der HEK entweder keine differentielle Aktivierung (Klon 1) oder eine zunehmende Aktivierung (Klon 14). Bei der MP-57 schien die Aktivierung von pSTAT3 und pEGFR abzunehmen, während pERK und pAKT stärker aktiviert wurden (Abbildung 3.11B).

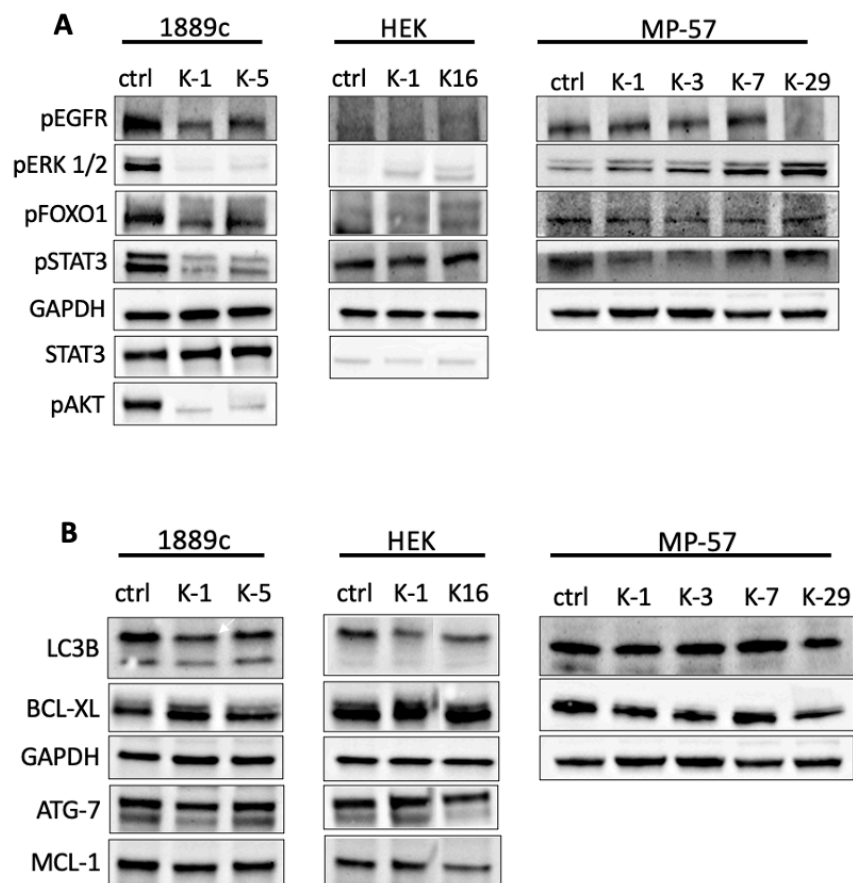


Abbildung 3.12: Analyse der Proteinexpression von Anti-Apoptose und dem EGFR-Signalweg in den Zellklonen. Abkürzungen: ctrl: Kontrolle, K-X: Klon mit zugehöriger Nummerierung. Analyse der

Proteinexpression der fusionspositiven Klone dreier Zelllinien mittels Western Blot. Es wurde die Expression der Komponenten des EGFR-Signalweges (C) sowie Anti-Apoptose und Autophagie (D) untersucht.

3.3 Etablierung der RT-PCR als *Screening*-Methode für die *KMT2A-MAML2* Translokation

Aufgrund der zeit- und kostenintensiven Durchführung des *Archer*-NGS wurde eine schnelle und einfach durchzuführende Methode zum Screenen von Thymustumoren auf die *KMT2A-MAML2* Translokation hin etabliert. Da für die Etablierung kein positiver Fall mit Frischgewebe zur Verfügung stand, wurde die Methode unter Zuhilfenahme zweier Zellklone der 1889c Zelllinie durchgeführt. Dazu wurde sowohl von der Wildtyp-Zelllinie, als auch von zwei *Knock-in* Klonen RNS isoliert. Auf Basis der RNS wurde eine RT-PCR (Kapitel 2.15.6) ausgeführt. Als Primer dienten die für die Etablierung der Zellklone verwendeten Primer (Kap. 3.2.2). Der *forward* Primer lag dabei im Exon 8 von *KMT2A*, der *reverse* Primer im Exon 2 von *MAML2*. Hierbei entstand ein PCR-Produkt mit einer Größe von circa 274 Bp, diese Größe deckt sich mit der errechneten Größe aus dem sequenzierten Plasmid (Kap 3.2.1). Abbildung 3.13A zeigt das Ergebnis der RT-PCR für den Wildtyp und die beiden Zellklone.

Nach erfolgreicher Etablierung wurde diese Methode verwendet, um weitere 15 Präparate verschiedener Thymustumoren auf die Translokation hin zu untersuchen. Dabei wurde zunächst wie in Kapitel 2.15.4.4 beschrieben RNS aus Frischgewebe isoliert. Von dem bei -80 °C gelagerten, nicht Formalin-fixierten Gewebe wurden Gefrierschnitte erstellt. Das Gewebe wurde dabei im gefrorenen Zustand mit einem Kryomikrotom in 15 µm dicke Schnitte geschnitten, sodass anschließend die RNS isoliert werden konnte. Im Folgenden wurde eine RT-PCR (vgl. Kapitel 2.15.6) durchgeführt und das Produkt dieser Reaktion mit dem QIAxcel Advanced Instrument (QIAGEN) ausgewertet. Als Primer wurden zwei *for.* Primer im Exon 7 und 8 von *KMT2A* gesetzt, sowie einen *rev.* Primer in Exon 2 von *MAML2*. Es wurden an dieser Stelle zwei *for.* Primer verwendet, um alle bisher beschriebenen Konstruktvarianten hinsichtlich ihrer Größe in der PCR abdecken zu können. Je nach Lokalisation der Fusion und Beteiligung verschiedener Exons von *KMT2A* entstehen dabei erwartungsgemäß Produkte verschiedener Größe (Abbildung 3.13B). Das Ergebnis dieser RT-PCR unter Verwendung des Primers für Exon 8 (*KMT2A*) ist in Abbildung 3.13C zu sehen. Dabei zeigen die Fälle 1, 3, 9 und 10 eine Bande, die mit der Produktgröße der Fusion Exon 8 – Exon 2 übereinstimmen könnte und die deshalb weiter analysiert und sequenziert werden sollten. Abbildung 3.13D gibt eine Übersicht über die in den untersuchten 15 Frischgewebefälle enthaltenen Subtypen.

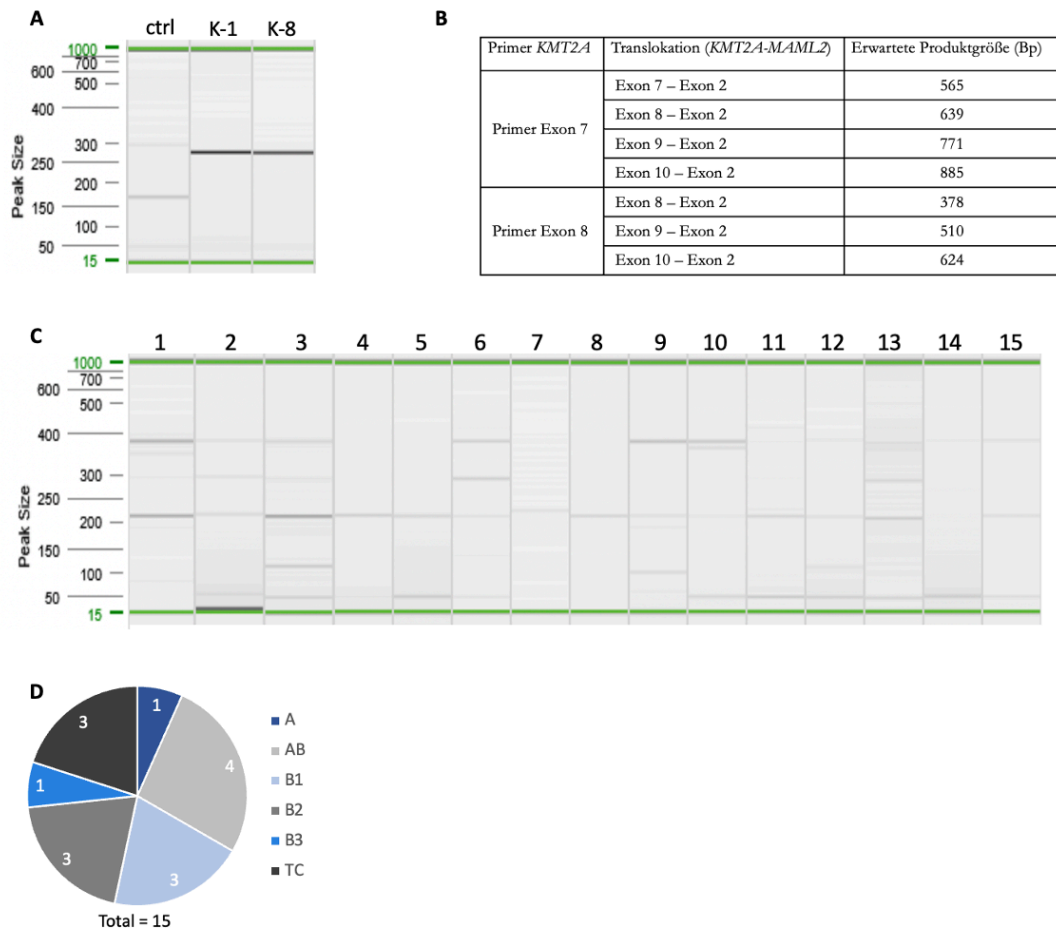


Abbildung 3.13: Etablierung und Anwendung der RT-PCR als *Screening-Methode*. **A** Initiale Etablierung der RT-PCR unter Zuhilfenahme zweier 1889c-Klone (Klon 1, 8) und des Wildtyps (ctrl). **B** zeigt die zu erwartende Produktgröße der beiden Primer für beschriebene Fusionskonstrukte. Diese berechneten Werte beziehen sich auf *in-Frame* Fusionen, die innerhalb der Introns entstehen. **C/D** Ergebnis der Analyse der 15 Frischgewebefälle mit dem Primer für Exon 8 von *KMT2A* (**C**) und deren Verteilung nach Subtyp (**D**).

4 Diskussion

Die in Thymomen auftretende *KMT2A-MAML2* Translokation ist bisher funktionell nicht untersucht worden, lediglich eine Störung des Notch-Signalweges über eine direkte Wirkung dieser Fusion auf die *HES1*-Promotoraktivität wird diskutiert (Nemoto et al. 2007). Etwaige Korrelationen zu klinischen Parametern sind unbekannt, ebenso eine grundlegende Relevanz dieser beiden translozierten Gene in Thymomen und Thymuskarzinomen. Weiterhin existieren keine spezifischen Erklärungsansätze, welche die Entstehung dieser Translokation erklären könnten. Im Rahmen dieser Arbeit sollte dazu zunächst die Prävalenz der Fusion in einem Kollektiv von 165 Patientenproben untersucht werden. Es sollten funktionelle Analysen zu u. a. Proliferation, Migration und Stammzelleigenschaften mit den generierten Zellklonen folgen. Die beschriebene Auswirkung der Translokation auf *HES1* sollte untersucht und zu verifizieren versucht werden. Zuletzt sollte eine *Screening*-Methode für diese spezifische Genfusion entwickelt werden.

4.1 Validierung der Prävalenz der Genfusion und ihres Effekts auf die Genexpression im Gewebe humaner Thymusneoplasien

4.1.1 Genexpression in Thymusneoplasien

Die Gene *KMT2A* und *MAML2* wurden in Thymustumoren auf Expressionsebene bislang nicht untersucht, was die Frage nach einer - bisher unbekannten - Relevanz dieser Gene für die Onkogenese dieser Krebsart aufwirft. *KMT2A* ist für die Tumorentstehung und Aufrechterhaltung von Stammzelleigenschaften intestinaler Tumoren von Bedeutung (Grinat et al. 2020). Eine ähnliche Rolle bei der Tumorgenese wird auch für *MAML2* vermutet (Wu J et al. 2021). In den in dieser Arbeit untersuchten häufigsten Thymusneoplasien zeigt sich für beide Gene eine deutliche Abnahme der Expression in B1- und B2-Thymomen, sowie zusätzlich in den B3-Thymomen (Kap. 3.1.1). Diese Beobachtungen entsprechen nicht den üblichen Beobachtungen hinsichtlich der Expressionsstärke. Bei tatsächlicher Korrelation zu Metastasierungsraten und Invasivität wären tendenziell höhere Expressionen in den aggressiveren Subtypen B2, B3 und den Karzinomen zu erwarten. Eine starke Expression von *MAML2* scheint den AB-Thymomen vorbehalten zu sein. Prinzipiell wurde die Expression bisher nur in einem Kollektiv untersucht. Aufgrund der geringen Prävalenz dieser Tumoren wäre eine zusätzliche Untersuchung weiterer Proben zur Generierung größerer Fallzahlen auch in Hinblick auf statistische Analysen sinnvoll. Sollte sich dabei die Restriktion hoher *MAML2*-Spiegel zu den AB-Thymomen bestätigen, wäre ein diagnostischer Nutzen dieses Gens denkbar.

Die Einteilung von Thymustumoren in Masaoka-Stadien berücksichtigt die lokale Ausdehnung und der Metastasierung und korreliert mit dem Gesamtüberleben der Patienten (Detterbeck et al. 2011; Masaoka 2010). Eine Korrelation zwischen der *KMT2A*- bzw.

MAML2-Expression mit den Tumorstadien konnte hier nicht gezeigt werden. Diese Observation deckt sich mit den niedrigen Expressionslevels der Gene, die für die B2- und B3-Thymome und die Thymuskarzinome beobachtet wurden. Eine signifikante Korrelation der Genexpression zum Auftreten paraneoplastischer Myasthenie konnte nicht gefunden werden, es sei allerdings erwähnt, dass sich hohe *MAML2*-Spiegel eher bei Patienten ohne Myasthenie nachweisbar waren ($p = 0,052$).

Die niedrige Prävalenz dieser Entitäten stellt beim Versuch einer signifikanten Korrelation zu klinischen Parametern eine Limitation mit Blick auf ausreichende Fallzahlen dar, weshalb diese Ergebnisse mit Vorsicht betrachtet werden sollte und einer weiteren Validierung bedürfen. Es war für lediglich 19 Patienten der *high-grade* Gruppe das Gesamtüberleben bekannt, was eine Korrelation zur *MAML2*- und *KMT2A*-Expression aufgrund zu geringer Patientenzahlen unmöglich machte. Die zusätzliche Analyse weiterer Fälle und Erhebung klinischer Daten könnte die Signifikanz verbessern. Dementsprechend können bisher keine Aussagen zur Relevanz der Gene in der Pathophysiologie der Thymustumoren getroffen werden. Es sollte vergleichend der Expressionsstatus normaler Thymusgewebe erhoben werden. Signifikante Expressionsunterschiede zwischen Normalgewebe und neoplastischem Gewebe könnten auf eine etwaige Relevanz in diesen Tumoren hindeuten. Zusätzlich könnte die Expression dieser Gene bei translokations-positiven Fällen in Relation zum erhobenen *Status quo* gesetzt werden.

4.1.2 Methodologische Überlegungen zu FISH- und Archer-Analysen

Bei der FISH, die auch in der Routinediagnostik Anwendung findet, handelt es sich um eine valide Methode zur Identifizierung chromosomaler Anomalien wie Deletionen oder Translokationen. Um das institutsinterne Kollektiv auf die *KMT2A-MAML2* Translokation hin zu untersuchen, wurde die FISH als Methode gewählt. Mit zwei verwendeten Sonden für je *KMT2A* und *MAML2* wurden auf diese Weise 162 Präparate analysiert. Es wurden dabei, ohne Festlegung eines *cut-off* Wertes, 20 potenziell positive Fälle identifiziert, bei denen zunächst bis auf B1-Thymomen alle Subtypen vertreten waren (vgl. Tabelle 3.1). Aus diesen Fällen wurde auf Basis eines *cut-off* Wertes von 12 / 100 positiven Zellkernen zum Nachweis der Fusion ein *Archer-NGS* durchgeführt. Hierbei wurde jedoch lediglich ein positiver Fall mit dieser Translokation in einem B3-Thymom gefunden.

Die verhältnismäßig hohe Zahl FISH-positiver Fälle und die Aufdeckung nur eines positiven Falls lassen auf einen zu niedrigen *cut-off* Wert dieser Methode schließen. Der hier gefundene positive Fall wies 28 / 100 positive Zellkerne auf. Ein beschriebener Fall derselben Translokation bei akuter lymphatischer Leukämie präsentierte sich mit 58 % positiven Zellkernen in der FISH (Menu et al. 2017). Prinzipiell ist ein solcher Wert für diese Translokation (noch) nicht definiert. Zwar wird der Wert in der Routinediagnostik meist auf 20 % veranschlagt, es gibt aber Anomalien, die eine spezifische Definition dieses Wertes erfordern. Eine *Threshold* von 5 % für Kopienzahlvariationen bei 1q21 für Multiple Myelome

konnte als ungünstiger prognostischer Faktor etabliert werden (Gao et al. 2022). Die geringe Prävalenz dieser Fusion mit bisher nur einem identifizierten Fall erschwert die Festlegung eines solchen *cut-off* Wertes. Nach initialer Auswertung der FISH ohne einen solchen definierten Wert zur möglichst umfassenden Identifizierung dieser Translokation sollte für zukünftige Auswertungen eine 10 %-Schwelle für negative Fälle festgelegt werden. Die Festlegung eines Grenzwertes für positive Fälle (z.B. 20 %) erfordert die Analyse mehrerer positiver Fälle. Die Beobachtung, dass sich positive Fälle in A-, AB- und B1-Thymomen mit tendenziell weniger positiven Zellkernen präsentieren als B2- und B3-Thymome, unterstreicht diesen Zusammenhang, da die Translokation bisher nur für letztere beschrieben wurde (Massoth et al. 2020). Weiterhin ist zu erwähnen, dass sich die FISH grundlegend zur Identifizierung von Translokationen eignet, aber insbesondere für intrachromosomale *Rearrangements*, wie es diese Fusion darstellt, deswegen suboptimal ist, weil geringe Abstände zwischen den Fusionssequenzen die mikroskopische Auswertung deutlich erschweren. Stattdessen werden alternativ PCR-basierte Methoden vorgeschlagen (Cheng et al. 2017).

Das dem *Archer-NGS* zugrundeliegende Prinzip der verankerten Multiplex-PCR weist eine Sensitivität und Spezifität von je über 95 % auf und eignet sich zur Identifizierung zahlreicher chromosomaler Anomalien wie Translokationen, Einzelnukleotid-Variationen oder Insertionen (Zheng et al. 2014). Durch Verwendung großer Primer-*Panels* können dabei eine Vielzahl möglicher genetischer Auffälligkeiten detektiert werden. Neben dem hier verwendeten *Solid Tumor Panel* mit Primern für *MAML2* könnte alternativ die Verwendung eines *Lymphoma Panels* mit Primern für *KMT2A* in Erwägung gezogen werden. Die Translokation sollte biologisch mit beiden *Panels* detektierbar sein. Ein grundsätzliches Problem bei den durchgeführten Untersuchungen besteht im Alter und der Lagerungsart der RNS. Diese wurde aus Formalin-fixierten Gewebeschnitten isoliert, die teilweise mehrere Jahre alt waren. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Dauer als auch Temperatur der Lagerung erheblichen Einfluss auf die Qualität der RNS haben. Bei Lagerung der RNS bei RT, zum Beispiel in Form von FFPE-Gewebe (Formalin-fixiertes, Paraffin-eingebettetes), waren nach einem Jahr keine ribosomalen RNS-Banden mehr erkennbar, die durchschnittliche Fragmentlänge lag dabei zwischen 2000 und 100 Nukleotide (von Ahlfen et al. 2007). Weiterhin ist die jeweilige Stanze eines TMA-Präparates nicht unbedingt repräsentativ für den gesamten Tumor. Diese Tatsachen könnten die ausbleibende Aufdeckung weiterer positiver Fälle erklären. Eine Analyse mit RNS aus Frischgewebe wäre hinsichtlich der RNS-Qualität empfehlenswerter, jedoch stand für die in der FISH gefundenen Fälle kein Frischgewebe zur Verfügung. Eine ausweichende Durchführung einer PCR auf DNS-Ebene kommt deshalb nicht in Frage, da aufgrund der großen Intron-Sequenzen kein PCR-Produkt entstehen könnte, das eine etwaige Fusionsstelle beinhalten könnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zur Identifizierung intrachromosomaler Inversionen FISH nicht die Methode der Wahl sein sollte, sondern PCR-basierte Methoden mit spezifischen Primern. Zur Validierung der FISH eignet sich das *Archer-NGS* sehr gut und

stellt trotz Alter und Qualität der RNS eine einfache Methode zum Nachweis dieser Translokation dar. Alternativ kann eine *long-distance* PCR in Erwägung gezogen werden, die es ermöglicht mehr als 15 kb zu amplifizieren und mittels NGS auszuwerten (Jia et al. 2014).

4.2 Validierung der RT-PCR als *Screening*-Methode für epitheliale Thymustumoren.

Aufgrund der kosten- und zeitintensiven Durchführung des *Archer*-NGS zur Identifizierung möglicher positiver Fälle wurde eine Methode etabliert, die ein einfaches Untersuchen von Thymusneoplasien auf die *KMT2A-MAML2* Translokation hin ermöglicht. Die RT-PCR wird routinemäßig als Methode zur Identifizierung von Translokationen eingesetzt (Meyer et al. 2005). Sie eignet sich zur spezifischen Suche chromosomaler Anomalien und ist in Abgrenzung zu NGS-Methoden nicht zum Screenen auf mehrere Mutationen hin geeignet, stellt aber im Rahmen dieser spezifischen Suche eine schnelle und wirkungsvolle Methode dar. Durch Analyse auf cDNS-Ebene können durch das Fehlen der Introns Translokationen detektiert werden. Sie umgeht weiterhin die Problematik der Detektion intrachromosomaler Inversionen in der FISH und der *de-novo* Definition eines *cut-off* Wertes (vgl. Kap. 4.1.2). Zu erwähnen ist, dass auch diese Methode stark von der Qualität der RNS abhängt, weshalb hier aus Frischgewebe isolierte RNS-Präparate Anwendung finden sollten (Fleige und Pfaffl 2006).

Diese Methode ist dabei nicht als Alternative zur Validierung positiver FFPE-FISH-Proben zu betrachten, sondern stellt eine separate Methode dar, um beispielsweise von anderen Kliniken zugesandte Thymom-Präparate mit Frischgewebe zu analysieren. Zur Etablierung stand kein positiver Frischgewebsfall als Referenz zur Verfügung, daher wurde die grundlegende Funktionstüchtigkeit der Methode zunächst mit zwei etablierten Zellklonen der 1889c-Zelllinie überprüft (Kap. 3.3). Die im QIAxcel sichtbaren Banden im Elektropherogramm bei etwa 274 Bp beider Klone und die ausbleibende Bande im Wildtyp deuten auf eine funktionsfähige Methode hin. Davon ausgehend wurden 15 Frischgewebsfälle, die nicht aus dem Kollektiv stammen, zusätzlich mit dieser Methode untersucht. Die zur Analyse der Frischgewebsfälle verwendeten Primersequenzen lagen in Exon 7 und Exon 8 vom *KMT2A* (*for.* Primer) und Exon 2 von *MAML2* (*rev.* Primer) und sollten hinsichtlich der Größe der zu entstehenden PCR-Produkte alle bisher beschriebenen Fusionskonstrukte in Thymomen und Thymuskarzinomen abdecken (Massoth et al. 2020; Menu et al. 2017). Bei der Analyse der Frischgewebsfälle wurden vier Fälle gefunden, deren Bandengröße mit der errechneten Größe für das Produkt aus dem Exon 8 Primer (*KMT2A*) und dem für Exon 2 von *MAML2* übereinstimmen könnte. Die Intensität der Bande ist nicht so hoch, wie bei der initial durchgeführten RT-PCR für die 1889c Klone, was jedoch in Abgrenzung zu einem Klon, der diese Fusion in allen Zellen exprimiert, auch nicht zu erwarten wäre. Erwartungsgemäß müsste für dieses Fusionsprodukt auch eine Bande mit dem Primer in Exon 7 bei circa 639 Bp entstehen, eine solches Produkt konnte nicht

nachgewiesen werden. Dennoch sollten diese vier Fälle mittels Sanger-Sequenzierung oder *Archer-NGS* validiert werden. Da bisher kein positiver Fall als Referenz zur Verfügung stand, sollte die RT-PCR zur finalen Etablierung mit einem Präparat durchgeführt werden, das nachweislich die Fusion exprimiert, um die Methode so mit einer anderen, bereits etablierten Methode auf ihre Funktionstüchtigkeit überprüfen und vergleichen zu können.

Mit der hier vorgestellten RT-PCR konnte eine Methode etabliert werden, die eine schnelle und spezifische Analyse von Präparaten auf diese Genfusion hin ermöglicht. Aufgrund fehlender Referenzfälle sollte die Methode für einen bekannten positiven Fall mit bisher etablierten Methoden wie *Archer-NGS* final verglichen werden. Eine mögliche Aufdeckung neuer Fusionskonstrukte in der Zukunft erfordert eine Anpassung dieser Methode, das durch Hinzufügen eines weiteren Primers leicht realisierbar sein sollte.

Zusammengenommen konnte die in der Literatur beschriebene Prävalenz dieser Translokation in 6 % der B2- und B3-Thymome (Massoth et al. 2020) mit den hier verwendeten Methoden nicht nachgewiesen werden. Von insgesamt untersuchten knapp 180 Präparaten diverser Thymusneoplasien, mit insgesamt 63 B2- und B3-Thymomen, konnte bisher nur ein positiver Fall identifiziert werden, was einer Prävalenz von etwa 1,6 % entspräche (Kap. 3.1.3 und 3.3). Ein anderer translokationspositiver Subtyp, bis auf die beschriebenen Entitäten, konnte ebenfalls nicht gefunden werden. Auf eine mögliche Ursache der Restriktion dieser Fusion zu den B2- und B3-Thymomen wird in einem späteren Kapitel eingegangen (Kap. 4.4). Die hier gefundene Prävalenz von 1,6 % ist aufgrund der Wahl der Detektionsmethode (FISH), dem Alter und dem Fixierungszustand der Präparate und schließlich der nicht unbeträchtlichen Rate nicht-auswertbarer Fälle von 26 % in der FISH - mit immerhin 14 B2- und drei B3-Thymomen - als nicht unbedingt realistisches Abbild zu betrachten.

4.3 *In-vitro* Effekte fusionspositiver Zellklone auf die zelluläre Plastizität

Eine mögliche Onkogenese bei Translokationen scheint vom jeweiligen Partnergen abzuhängen (Winters und Bernt 2017). Beschriebene Fusionsproteine scheinen sich funktionell von den Elternproteinen zu unterscheiden (Zheng 2013). Die Funktion und phänotypische Auswirkungen der *KMT2A-MAML2* Translokation sind unbekannt. Diese Tatsachen erschweren bislang die Definition eines *Read-outs* für durchzuführende Experimente. Die Ergebnisse dieser Experimente sollen daher molekularbiologisch zu erklären versucht und in den Kontext anderer *KMT2A*- bzw. *MAML2*-Translokationen gesetzt werden.

4.3.1 Bedeutung von *HES1* für die Klonselktion

Zur Selektion geeigneter Klone für modellhafte Untersuchungen der *KMT2A-MAML2* Translokation wurden diese auf ihre Expression von *MAML2*, *KMT2A*, *HES1* und *pEGFR* hin untersucht. Wie bereits erwähnt wurde die Expression von *HES1* als beschriebenes mögliches Zielgen der Fusion zur Selektion von Zellklonen verwendet. Die Analyse der Aktivierung von EGFR-Komponenten sollte zusätzlich diese Auswahl geeigneter Klone erleichtern. Ein Fusionsprotein konnte in allen Klonen der HEK- und 1889c-Zelllinie nachgewiesen werden. Die Expressierung des endogenen *KMT2A* nahm in den HEK- und MP-57-Klonen zu. Das endogene *MAML2* wurde in den Klonen 1889c schwächer und in der HEK stärker exprimiert als im jeweiligen Wildtyp. Die *HES1* Expression der Klone korrelierte dabei mit der Stärke der Expression des Fusionsproteins. Eine starke Expression des Fusionskonstruktes in den Klonen korrelierte mit einer deutlich verminderten Expression des möglichen Zielgens *HES1*.

Aus vermutlich technischen Gründen ließ sich kein Fusionsprotein bei der MP-57 nachweisen. Die erfolgreiche Insertion des Transposons in diese Klone konnte jedoch mittels PCR nachgewiesen werden (Kap. 3.2.2). In dem zur Etablierung durchgeführten *Western Blot* schien sich nur Klon 29 von der Kontrolle abzugrenzen. Hinsichtlich der Expression von *HES1* und *pEGFR* verhielt er sich ähnlich wie die 1889c-Klone. Aufgrund des fehlenden Nachweises eines Fusionsproteins wurden zunächst alle vier Klone (1, 3, 7, 29) für weitere Analysen beibehalten. Der Fokus wurde aber dabei auf den Klon 29 gelegt.

Um vorab die Bildung eines Fusionsproteins vorhersagen zu können, wurde die DNS-Sequenz der Fusion auf dem Plasmid in die zugehörige Proteinsequenz translatiert. Dabei konnten keine vorzeitigen Stopcodons nicht nachgewiesen werden, was auf die Entstehung eines solchen Fusionsproteins hindeutete. Die Expression des Fusionskonstruktes *in-vitro* unterscheidet sich dabei von den Vorgängen *in-vivo*: Während es *in-vivo* entweder zum Austausch eines Chromosomenstückes innerhalb eines Chromosoms oder zur Fusion zweier nicht-homologer Chromosomen kommt (Nambiar et al. 2008), wurde im Zellmodell zusätzlich zu den zwei homologen *MAML2*- und *KMT2A*-Genen das Fusionsprodukt inseriert. Somit kodieren die Klone zumindest anteilig dreimal für ein *MAML2*- bzw. *KMT2A*-Protein. Diese Tatsache könnte eine Reaktion der Zelle auf die Insertion und die damit verbundene differentielle Expression der endogenen Proteine hervorrufen. Fraglich ist in diesem Zusammenhang, ob die abweichenden *HES1*-Spiegel durch das Fusionskonstrukt zu erklären sind, oder Folge einer veränderten Expression des endogenen *MAML2* sind. Zumindest scheint die Expression des Fusionsproteins mit der von *HES1* in den Klonen der HEK und 1889c zu korrelieren. Die beschriebene Unterdrückung der *HES1*-Aktivität durch diese Fusion (Nemoto et al. 2007) deckt sich mit den hier gefundenen Proteinspiegeln der Klone. Da *MAML2* direkt an der Entstehung eines DNS-Bindungskomplexes beteiligt ist und am *HES1*-Promotor bindet, würde eine verminderte Expression von *MAML2* eine ebenfalls niedrigere Expression von *HES1* erklären (Kovall

2008; Lin et al. 2002). Unabhängig davon könnte auch das Fusionsprotein durch Störung der Ausbildung dieses DNS-Bindungskomplexes einen solchen Effekt hervorrufen. Ein direkter Einfluss auf den Notch-Signalweg konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Es wurde beschrieben, dass bei der Fusion durch Fehlen der N-terminalen Domäne von *MAML2* die Bindestelle für die intrazelluläre Domäne von Notch deletiert wurde (Nemoto et al. 2007). Eine daher fehlende Interaktion von *MAML2* mit der Notch-Domäne würde in einer fehlenden Ausbildung eines DNS-Bindungskomplexes resultieren, wodurch der Promotor von *HES1* nicht mehr aktiviert werden könnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass neben erfolgreicher Etablierung von Zellklonen der Nachweis eines Fusionsproteins gelungen ist und die beschriebene Unterdrückung von *HES1* durch diese Fusion bestätigt werden konnten. Die Störung der Notch-Übertragung könnte durch fehlende Domänen im Fusionsprotein erklärt werden. Um die Beteiligung des endogenen *MAML2* auszuschließen, könnten Klone generiert werden, die über einen homo- und heterozygoten Knockout von *MAML2* verfügen, zusätzlich aber die Fusion exprimieren. Dadurch könnten die *in-vivo* Bedingungen realistischer *in-vitro* abgebildet werden. Mittels ChIP-Analyse (Chromatin Immunopräzipitation) könnte der *HES1* Promoter als mögliches direktes Ziel der Translokation identifiziert werden. Auf die aberrante Aktivierung des EGFR-Signalwegs soll zu einem späteren Zeitpunkt eingegangen werden (Kap. 4.3.6).

4.3.2 Fusionspositive Zellen zeigen signifikant verminderte Proliferationsraten

Initial wurde versucht die Überexpression der Translokation in den Klonen mit einem veränderten Zellwachstum zu korrelieren. Zu diesem Zweck wurde das Wachstum der Klone in Abhängigkeit zur Kontrolle mittels MTS-Assay untersucht. Für die Zelllinien HEK und 1889c konnte ein signifikant langsames Wachstum der Klone festgestellt werden. Auch die Klone 3 und 29 der MP-57 zeigten einen derartigen Effekt.

Die einheitliche Minderung der Proliferationsrate in den Klonen kann sowohl auf *KMT2A* als auch auf *MAML2*, also auf beide Translokationspartner, zurückgeführt werden. Wie in Kap 1.3.2 beschrieben, wird das *KMT2A*-Protein innerhalb weniger Stunden nach Translation in zwei Fragmente gespalten. Dabei enthält das C-terminale Fragment die SET-Domäne, welche die H3-K4-Methyltransferaseaktivität besitzt (Zheng 2013). Bei Translokationen mit *KMT2A*-Beteiligung bleibt nur die N-terminale Domäne mit unterdrückenden Transkriptionseigenschaften erhalten. Weil die Prozessierungsstelle bei Fusionsproteinen fehlt, ist eine Interaktion mit der C-terminalen Domäne nicht mehr möglich, sodass sich der Komplex aus beiden Fragmenten nicht ausbilden kann und posttranslationale Modifikationen ausbleiben (Yokoyama et al. 2002). Der Verlust der Methyltransferase-Aktivität und der weiterer Domänen, wie der *Tritborax*-Domäne, kann in Dysregulation der gesamten genomischen Expression resultieren (Zheng 2013). Eine funktionelle Relevanz der SET-Domäne konnte bei zahlreichen *KMT2A*-Fusionen

nachgewiesen werden, ein Verlust dieser Domäne ist mit einer signifikant niedrigeren Proliferationsrate korreliert (Skucha et al. 2018). Weiterhin kann der Verlust der *Trithorax*-Domäne, die für korrekte Expression der *HOX*-Gene wichtig ist, zu einer verminderten Proliferationsrate führen, da die Expression zahlreicher *HOX*-Gene mit der Proliferation korreliert (Francis et al. 2021; Katsani et al. 2001). Die wahrscheinlich auf *MAML2* zurückzuführende verminderte Expression von *HES1* könnte ebenfalls diese Proliferationsrate erklären: ein Knockdown von *HES1* konnte ursächlich mit verminderter Aktivierung von AKT, der Inhibition von EMT und darüber hinaus einer verringerten Wachstumsrate in Verbindung gebracht werden (Li et al. 2018). Diese Daten decken sich mit den hier beobachteten verminderten *HES1*-Spiegeln, der geringeren Aktivierung des EGFR-Signalweges (Kap. 4.3.6), und nicht zuletzt dem Wachstumsverhalten der Klone.

Zusammengenommen konnte ein signifikant langsames Wachstum der fusionspositiven Klone festgestellt werden. Eine definitive Ursache dafür konnte bisher nicht gefunden werden. Diese Beobachtung ist vermutlich weniger auf eines der beiden Gene allein, sondern vielmehr auf das Zusammenspiel beider in Form eines Fusionsproteins zurückzuführen. In jedem Fall sollte die vermutete niedrigere Expression der *HOX*-Gene in den Klonen mittels *Western Blot* bestätigt werden. Die weitestgehend unbekanntenen Mechanismen die derartigen Translokationen zugrunde liegen und die unbekanntenen molekularen Ziele von Fusionsproteinen verdeutlichen in diesem Zusammenhang die Komplexität von Translokationen.

4.3.3 Effekt der Translokation auf die Zellmigration

Neben dem Wachstum wurde auch der Einfluss der Translokation auf die Migrationsfähigkeit der Klone untersucht. Zu diesem Zweck wurde die Migrationsrate im *Scratch*-Assay für die Klone analysiert. Zusätzlich wurde die Proteinexpression von EMT-Markern in den Klonen ausgewertet. Wie in Abbildung 3.8 erkennbar, konnte im *Scratch*-Assay ein signifikant langsames Migrationsverhalten für die 1889c und den Klon 29 der MP-57 festgestellt werden, während die HEK-Klone schneller als der Wildtyp migrierten. Im *Western Blot* (Abbildung 3.11) zeigten 1889c und MP-57 eine erhöhte Expression von E-Cadherin. Obwohl sich die HEK und 1889c hinsichtlich der Expression von EMT-Markern gegensätzlich verhielten (Snail, ZO-1, TCF-8), zeigten beide Zelllinien deutlich schwächere Proteinbanden bei TGF- β . Die verminderte Expression von β -Catenin in den Klonen konnte jedoch Zelllinien-übergreifend festgestellt werden.

Die HEK-Zelllinie exprimiert als embryonale Nieren-Zelllinie vor allem mesenchymale Marker wie N-Cadherin und Vimentin, eine E-Cadherin Expression ist nur sehr schwach nachweisbar (Inada et al. 2016). Die beiden Thymuskarzinom Zelllinien 1889c und MP-57 sind hingegen epitheliale Zelllinien. Diese morphologischen Unterschiede könnten das differentielle Verhalten zwischen HEK und Thymuskarzinom-Zelllinie erklären und würden auf Zelllinien-spezifische Effekte hindeuten. Der EMT-Prozess wurde für drei verschiedene biologische Funktionen beschrieben (Kalluri und Weinberg 2009): einerseits spielt EMT eine

wichtige Rolle bei der Embryogenese und ermöglicht es den Zellen verschiedene mesenchymale Zelltypen hervorzubringen, ohne dabei eine erhöhte Invasivität zu induzieren (Typ 1). Andererseits ist der Prozess für Geweberegeneration und Wundheilung von Bedeutung (Typ 2). Weiterhin tritt EMT in neoplastischen Zellen mit genetischen oder epigenetischen Anomalien auf und könnte den Zellen einen gewissen Selektionsvorteil verleihen (Typ 3). Letzterer EMT-Typ unterscheidet sich dabei stark von den anderen. Dieser Typ kann den Zellen ein gesteigertes Metastasierungspotenzial und eine erhöhte Invasivität verleihen. Die Ausbildung von EMT in Krebszellen kann sehr unterschiedlich ausfallen. Das Spektrum reicht von einer Aufrechterhaltung eines epithelialen Phänotyps bis hin zum Wandel zu einem mesenchymalen Phänotyp (Kalluri und Weinberg 2009). Diese funktionellen Unterschiede im EMT-Prozess könnten vor dem Hintergrund des jeweiligen Zelltyps (embryonale Zelle vs. Krebszelle) ein unterschiedliches Verhalten der HEK in Abgrenzung zu den beiden Karzinom-Zelllinien erklären. Im Folgenden soll der Fokus daher auf die 1889c und die MP-57 gelegt werden.

β-Catenin als Komponente des Wnt-Signalwegs induziert die epithelial-mesenchymale Transition und ist an der Ausbildung eines mesenchymalen Phänotyps beteiligt (Kim WK et al. 2019). Bei der hier nachgewiesenen geringeren Expression dieses Proteins wäre demnach eine Inhibition von EMT mit Ausprägung eines eher epithelialen Phänotyps zu erwarten. Die Degradierung von *β-Catenin* wird bei Aktivierung des Wnt-Stoffwechselweg gehemmt, sodass das Protein in den Zellkern verlagert wird und mit den TCF/LEF-Proteinen an der Expression der Wnt-Zielgene beteiligt ist (Schmalhofer et al. 2009). Die hier beobachtete geringere Expression von *β-Catenin* und von TCF-8 deutet auf eine Inaktivität des Wnt-*pathways* hin, mit resultierender geringerer Expression von EMT-Molekülen. *Snail* stellt neben TCF-8 einen weiteren Repressor von *E-Cadherin* dar (Battle et al. 2000), die verminderte Expression dieses Proteins und die erhöhte Expression von *E-Cadherin* als starken epithelialen Marker (Schmalhofer et al. 2009) stimmen mit der erwarteten Inhibition von EMT überein. EMT führt über Verlust apikal-basaler Zellpolarität und Schwächung von Zell-Zell-Verbindungen zur Ausbildung eines mesenchymalen Zelltyps, der den Zellen eine erhöhte Migrationsfähigkeit und potenzielle Invasivität verleiht (Yang et al. 2020). Die vermutete Inhibition von EMT und stärkere Expression von *E-Cadherin* könnte die verminderte Migrationsrate der 1889c und MP-57 erklären. Es konnte nur eine schwache Expression von E-Cadherin nachgewiesen werden, doch institutsinternen Daten zufolge ist die 1889c-Zelllinie E-Cadherin negativ, weshalb die Expression hier *de-novo* zu entstehen scheint (Küffer et al., unpublizierte Daten). Dieser Sachverhalt spiegelt sich in den hier durchgeführten *Western Blots* der Wildtyp-1889c wider (Abbildung 3.11). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch TGF- β EMT durch Aktivierung mesenchymaler Marker fördert (Kim BN et al. 2020). Die verringerte Expression dieses Proteins ergänzt die für *β-Catenin* beschriebene Erklärung der Migrationsrate in den Klonen.

Einen möglichen Erklärungsansatz für die Regulation von EMT könnte *HES1* liefern: es konnte gezeigt werden, dass *HES1* die Expression epithelialer Marker inhibiert und die mesenchymaler Marker fördert (Wang et al. 2015). Da die Expression von *HES1* in den Zellklonen abnahm, könnte *HES1* eine mögliche Schnittstelle sein, über welche die Translokation sich auf EMT auswirkt. Zusätzlich konnte eine Dysregulation einiger *HOX*-Gene, wie z.B. *HOXB9*, bei Leukämien mit *KMT2A*-Dysregulation nachgewiesen werden (Hinaï et al. 2019). *HOXB9* induziert EMT durch Expression von TGF- β (Chiba et al. 2012). Die vermutete niedrigere Expression von *HOX*-Genen (vgl Kap. 4.3.2) könnte einen weiteren Erklärungsansatz der verminderten EMT in den Zellklonen liefern.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Translokation *in-vitro* einen Effekt auf die zelluläre Plastizität zu haben scheint. Die verminderten Migrationsraten im *Scratch*-Assay bei zeitgleich erhöhter Expression epithelialer Marker deuten auf eine Störung der Migrationsfähigkeit in diesen Klonen hin. Die Ursache für das differentielle Verhalten der HEK-Klone lässt sich nicht final erklären, könnte aber dem Ursprung der Zelllinie und der Abhängigkeit von anderen EMT-regulierenden Stoffwechselwegen geschuldet sein. Für die Thymuskarzinom-Zelllinien lässt sich der beobachtete Effekt mit der verminderten Expression von *HES1* und einer vermuteten niedrigeren Expression von *HOX*-Genen erklären. Die tatsächliche Expression dieser *HOX*-Gene sollte noch auf Proteinebene validiert werden.

4.3.4 Validierung der Analyse zu Stammzelleneigenschaften der Zellklone

HES1 spielt eine Rolle beim Erhalt von Stammzeleigenschaften (Liu et al. 2015); dies wurde in drei Experimenten näher untersucht. Dazu wurde die Proteinexpression von SOX2, Nanog und CD133 gemessen (Kap. 3.2.3.5). Die Klone von HEK, 1889c und Klon 29 der MP-57 zeigten eine deutliche Zunahme in der SOX2-Expression. Auch eine erhöhte Nanog-Expression konnte in den HEK- und 1889c-Klonen identifiziert werden. Während der Anteil Hoechst-negativer Zellen im *Side Population Assay* für die 1889c signifikant abnahm, zeigte die HEK hier keinen erkennbaren Unterschied (Kap. 3.2.3.3). Im zusätzlich für die HEK durchgeführten Klonalitätsassay konnte eine deutlich erhöhte Klonalität der HEK-Klone gezeigt werden.

SOX2 (*sex determining region Y-box2*) ist ein zellulärer Stammzellmarker. Eine Überexpression dieses Markers führt zur Differenzierung von Stammzellen (Schaefer und Lengerke 2020). Abweichende *SOX2* Spiegel konnten speziell mit epithelialen Neoplasien in Verbindung gebracht werden (Maier et al. 2011). Die Expression dieses Markers korreliert sowohl mit Aggressivität und Chemoresistenz, als auch mit einer erhöhten Klonogenität der Tumorzellen (Bareiss et al. 2013; Schaefer et al. 2015). Diese beschriebene Korrelation zwischen Klonogenität und der *SOX2*-Expression deckt sich mit der für die HEK-Klone detektierten erhöhten Klonogenität. *Nanog* stellt einen essentiellen Krebsstammzellmarker dar, dessen mRNA nur in Stammzellen, nicht jedoch in differenzierten Zellen gefunden

werden konnte (Chambers et al. 2003; Vasefifar et al. 2022). Ergebnisse aus Knockdown-Versuchen von Zhang und Kollegen konnten die Regulation von *SOX2*, *Nanog* und *Oct-4* durch *KMT2A* nachweisen, was auf eine mögliche Beteiligung dieses Gens bei der Aufrechterhaltung von Stammzeleigenschaften hindeutet (Zhang et al. 2017). In diesem Zusammenhang konnte für andere Fusionen gezeigt werden, dass *KMT2A*-Fusionsproteine die Transkription von *HMG A2* (*high-mobility group AT-hook 2*) direkt über den Promotor erhöhen. *HMG A2* spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung von Stammzeleigenschaften und der Differenzierung (Parisi et al. 2020; Wu Z et al. 2015). Die gesteigerte Expression dieser beiden Stammzellmarker (*SOX2* und *Nanog*) und die erhöhte Klonogenität der HEK-Klone deuten auf erhöhte Stammzeleigenschaften fusionspositiver Zellklone hin und decken sich mit den Ergebnissen anderer beschriebener *KMT2A*-Translokationen.

Die Grundlage des *Side Population Assays* (kurz SP-Assay) beruht auf dem aktiven Efflux der Hoechst-Substanz durch ABC-Transporter in der Zellmembran. Dieser Efflux ist allerdings nicht nur auf Stammzellen begrenzt, sondern kann auch in differenzierten Zellen vorkommen. Weiterhin unterscheiden sich Stammzellen hinsichtlich ihrer Organdistribution und den SP-Eigenschaften. Der Efflux der Hoechst-Substanz scheint außerdem nicht in allen Stammzellpopulationen vorzukommen, weshalb dieser Assay nur bestimmte Populationen erfassen könnte (Golebiewska et al. 2011; Terunuma et al. 2003; Triel et al. 2004). Die verminderte Anzahl Hoechst-negativer Zellen in der 1889c und der fehlende Unterschied in der HEK könnte diesen Tatsachen geschuldet sein. *HES1* wird weiterhin eine Rolle bei der Transkriptionsinduktion einiger ABC-Transportergene zugeschrieben (Sun et al. 2017). Die beobachtete geringere Expression dieses Proteins könnte in einer verminderten Expression dieser Transporter resultieren. Dem zufolge wäre eine verminderte Anzahl Hoechst-positiver Zellen zu erwarten, wodurch das Ergebnis der 1889c in diesem Experiment zumindest teilweise erklärt werden könnte.

Insgesamt konnte in den durchgeführten Experimenten eine Erhöhung der Stammzeleigenschaften der Klone beobachtet werden. Der Fokus soll dabei aufgrund der jeweiligen Aussagekraft besonders auf die Ergebnisse des *Western Blots* und des Klonalitätsassays gelegt werden. Weiterhin sollte der Klonalitätsassay zur Überprüfung der Ergebnisse für die 1889c- und die MP-57-Klone wiederholt werden.

4.3.5 Beurteilung des Ansprechens der Klone auf verschiedene Zytostatika

Zur Analyse der Reaktion der Klone auf verschiedene Zytostatika wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen dieser Substanzen behandelt und für den vom Hersteller vorgegebenen Zeitraum damit inkubiert. Das Ansprechen wurde mittels Viabilitätsassay evaluiert. Ziel dieses Experimentes war es, abweichende Ansprechraten, die durch die Translokation hervorgerufen werden und die von therapeutischer Relevanz sein könnten, zu ermitteln. Es wurden die beiden Standardtherapeutika Cisplatin und Etoposid sowie das Zweitlinientherapeutikum Sunitinib für die zytotoxische Behandlung der Zellen ausgewählt.

Aufgrund der beobachteten geringeren Aktivierung des EGFR-Signalwegs sollte versucht werden, eine zusätzliche Hemmung vom EGF-Rezeptor durch Gefitinib oder von ERK1/2 durch Sch772984 zu untersuchen.

Bei Cisplatin konnte ein schlechteres Ansprechen der 1889c-Klone und eine bessere *Response* der HEK-Klone aufgezeigt werden. Cisplatin wurde aufgrund seiner Verwendung als Chemotherapeutikum bei Thymomen und Thymuskarzinomen für die *In-vitro*-Behandlung ausgewählt (Girard et al. 2015). Neben Induktion der Apoptose führt die Cisplatin-Behandlung zu Quervernetzungen von Purin-Basen der DNS, wodurch der Replikationsapparat in seiner Funktion gehemmt wird (Dasari und Tchounwou 2014). Cisplatin wirkt dadurch vornehmlich auf proliferationsaktive Zellen. Die für die 1889c-Klone gezeigte niedrigere Proliferationsrate (Kap. 3.2.3.1) könnte das schlechtere Ansprechen auf diesen Inhibitor erklären. Die HEK-Klone sprechen jedoch trotz langsameren Wachstums besser auf eine derartige Behandlung an. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass zwar für die 1889c eine erhöhte Apoptose-Resistenz beschrieben ist (Müller et al. 2021), der Effekt der Translokation auf das Ansprechen der Klone zelllinienübergreifend jedoch ähnlich sein sollte. Cisplatin entfaltet seine antitumorale Wirkung auch durch Erhöhung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und durch Induktion der Apoptose (Florea und Büsselberg 2011). Dabei bewirkt Cisplatin die Apoptose-Induktion über Tumornekrosefaktoren primär in Krebszellen und kaum in normalen Zellen (Shamimi-Noori et al. 2008; Wenger et al. 2006), Tumorzellen sind durch erhöhte Expression antioxidativer Signalwege weniger anfällig gegenüber ROS. Denkbar wäre, dass die Translokation durch bisher unbekannte Mechanismen die Apoptose oder ROS-Produktion affiziert und daher zellspezifische Effekte verstärkt. Um dabei etwaige Zelllinien-spezifische Effekte auszuschließen, sollte noch eine vergleichende Behandlung der MP-57 Klone mit Cisplatin erfolgen.

Zusätzlich wurde Etoposid als etabliertes Therapeutikum bei epithelialen Thymusneoplasien (Girard et al. 2015) zur Behandlung der Klone eingesetzt. Die Klone sprachen schlechter auf eine Etoposid-Behandlung an. Etoposid stört durch Komplexierung der Topoisomerase II die DNS-Synthese (Montecucco et al. 2015). Die dadurch hervorgerufene proliferationshemmende Wirkung von Etoposid und das schlechtere Ansprechen der Klone auf Etoposid könnten durch die verminderte Proliferationsrate erklärt werden. Diese Beobachtung deutet auf eher proliferationsunabhängige Effekte beim Ansprechen auf Cisplatin hin (s.o.). Darüber hinaus wurden die Klone mit verschiedenen Konzentrationen des Tyrosinkinase-Hemmstoffes Sunitinib behandelt. Sunitinib fungiert als Zweitlinien-Therapeutikum bei Thymusneoplasien (Girard et al. 2015) und hemmt die Rezeptoren von VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) und PDGF (*Platelet-derived growth factor*) sowie KIT (Abrams et al. 2003; Mendel et al. 2003). Die Klone sprachen signifikant besser auf Sunitinib an als die Kontrolle. Zwar wurde die Expression dieser Proteine in den Klonen bisher nicht untersucht, es konnte aber ein erhöhtes Ansprechen von *KMT2A*-translozierten Leukämien auf den Foretinib-Inhibitor, der ebenfalls auf oben beschriebene Proteine abzielt, gezeigt werden (Lopes et al. 2022). Ein isolierter *KMT2A*-Knockdown konnte mit herunter-regulierten Wachstums- und

Angiogenesefaktoren, wie VEGF, in Verbindung gebracht werden (Ansari et al. 2013). Diesen Daten zufolge könnten oben genannte Tyrosinkinase zumindest teilweise ein Ziel der *KMT2A-MAML2* Fusion darstellen. Weitere Analysen der Proteinexpression dieser Kinasen vor und nach Behandlung mit Sunitinib könnten diese Hypothese untermauern.

Es konnte kein signifikantes Ansprechen auf Gefitinib gezeigt werden, weder beim Wildtyp noch bei den Klonen. Bei insgesamt moderatem Ansprechen auf den ERK1/2-Inhibitor Sch772984 konnte für die Klone kein Unterschied im Ansprechen festgestellt werden (Kap. 3.2.3.4). Trotz hoher EGFR-Expression in Thymomen und Thymuskarzinomen erbrachte die gezielte Hemmung von EGFR mittels Gefitinib keine Wirkung (Küffer et al. 2022; Kurup et al. 2005; Yoh et al. 2008). Aufgrund der niedrigeren Expression von EGFR und seiner *downstream* Proteine (Kap. 3.2.3.5) sollte der Effekt einer zusätzlichen Hemmung durch den EGFR-Inhibitor Gefitinib und dem ERK1/2-Inhibitor Sch772984 untersucht werden. Mutationen sind als Ursache des ausbleibenden Ansprechens auf Gefitinib und des unveränderten Ansprechens der Klone auf Sch772984 deshalb unwahrscheinlich, da sie in Thymomen und Thymuskarzinomen eine absolute Rarität darstellen (Yoh et al. 2008). Die nachgewiesene fehlende Korrelation zwischen EGFR-Expression und dem Ansprechen auf eine EGFR-Inhibition bei nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (Pérez-Soler et al. 2004) trifft offenbar auch auf Thymome und Thymuskarzinome zu (Küffer et al. 2022). Weiterhin ist denkbar, dass eine isolierte Inhibition einzelner EGFR-Komponenten nicht ausreicht, um das Überleben der Zellen signifikant zu beeinflussen und dass daher eine kombinierte Behandlung erforderlich sein könnten. Eine derartige Kombination von Inhibitoren der EGFR-Tyrosinkinase mit anderen Chemotherapeutika konnte mit einem verbesserten Gesamtüberleben und progressionsfreien Überleben in einer Analyse mehrerer randomisierter Studien verschiedenster Entitäten korreliert werden (Xu et al. 2019).

Zusammenfassend konnte kein differentielles Ansprechen auf Gefitinib und Sch772984 festgestellt werden. Die Translokation könnte den Daten zufolge ein schlechteres Ansprechen auf Etoposid und auf Cisplatin (für 1889c) bewirken. Die Klone beider Zelllinien sprachen signifikant besser auf Sunitinib an. Diese Experimente sollten zur Validierung der Ergebnisse und Erhebung einer Statistik mit der MP-57 Zelllinie wiederholt werden. Die Inhibition von VEGFR, PDGFR und KIT durch Sunitinib könnte sich im Rahmen einer *targeted therapy* als Therapieziel eignen, was teilweise durch *In-vivo*-Experimente und zusätzliche Analysen bekräftigt worden ist (Küffer et al. 2022).

4.3.6 Apoptose, Autophagie und Aktivierung EGFR-Signalwegs im Kontext der Translokation

Dem EGFR-Signalweg wird aufgrund seiner hohen Expression in Thymomen und seiner Korrelation zu Invasion und fortgeschrittenen klinischen Stadien eine mögliche Rolle bei der Pathogenese dieser Neoplasien zugeschrieben (Ionescu et al. 2005). Er wurde als einer der am häufigsten dysregulierten Stoffwechselwege bei Krebserkrankungen beschrieben (Han

und Lo 2012). Aufgrund der funktionellen Bedeutung und der erhöhten Expression dieses *pathways* bei Krebserkrankungen soll vor allem die Korrelation der beobachteten Aktivierungsänderung zu den Karzinom-Zelllinien erörtert werden. Es wurde dazu die Expression von Anti-Apoptose- und Autophagie-Markern sowie die Aktivierung des EGFR-Signalweges auf eine Änderung hin überprüft. Während die HEK-Klone keinen Unterschied hinsichtlich der Aktivierung von EGFR-Komponenten zeigten, konnte vor allem in der 1889c eine deutliche Abnahme der Aktivierung zahlreicher Komponenten dieses Stoffwechselweges (*pEGFR*, *pSTAT3*, *pERK*, *pAKT*) beobachtet werden. Eine verminderte Aktivierung von *pEGFR* und *pSTAT3* konnte ebenfalls für die MP-57 Klone beobachtet werden. Für die Expression von Anti-Apoptose- und Autophagie-Proteinen konnte kein Unterschied festgestellt werden (Abbildung 3.11).

Der ausbleibende Unterschied der HEK-Klone könnte durch fehlende Abhängigkeit dieses Zelltyps vom EGFR-Signalweg zu erklären sein, da auch der Wildtyp keine Aktivierung von EGFR-Komponenten zeigt. Auch hier könnte *HES1* von Bedeutung sein. Eine verminderte Expression von *HES1* konnte mit konsekutiv erhöhten PTEN-Spiegeln (*Phosphatase and Tensin homolog*) in Verbindung gebracht werden, *HES1* scheint dabei die Expression von *PTEN* direkt zu beeinflussen (Wang et al. 2015). Außerdem wirkt *PTEN* durch Kontrolle der endosomalen Reifung negativ regulierend auf den EGFR-Signalweg (Shinde und Maddika 2016). Die Schnittstelle *HES1-PTEN-EGFR* könnte die beobachtete Aktivierungsminderung in den *Knock-in* Klonen erklären. Die in Mukoepidermoid-Karzinomen beschriebene *CRTC1-MAML2* Translokation konnte ebenfalls mit aberranter Aktivierung des EGFR-Signalweges in Verbindung gebracht werden (Chen et al. 2014).

Für die Expression der Autophagie- und Anti-Apoptose-Marker konnte keine differentielle Expression nachgewiesen werden. Ein isolierter Knockdown von *KMT2A* konnte mit verminderten Proliferationsraten und Induktion der Apoptose ursächlich in Verbindung gebracht werden, weshalb *KMT2A* eine Rolle in der Apoptose zu spielen scheint (Zhang et al. 2020). Ein derartiger Effekt konnte für diese Translokation nicht beobachtet werden und könnte auf eine geänderte Funktion des Fusionsproteins gegenüber den Elternproteinen zurückzuführen sein. Zusätzlich zu den anti-apoptotischen Faktoren, sollte die Expression apoptotischer Marker untersucht werden.

Zusammengenommen deuten die Daten auf eine wahrscheinlich über *HES1* dysregulierte Aktivierung des EGFR-Signalweges durch die *KMT2A-MAML2* Fusion hin. Eine zusätzliche Inhibition dieses Signalweges durch Chemotherapeutika zeigte allerdings keinen signifikanten Effekt auf das Zellüberleben (Kap. 3.2.3.4), weshalb diese aberrante Aktivierung kein therapeutisches Ziel darzustellen scheint. Die ausbleibende Expressionsänderung der Klone für die Cluster Anti-Apoptose und Autophagie deuten an, dass diese Zellfunktionen kein Ziel der Translokation zu sein scheinen.

4.4 Überlegungen zur Entstehung dieser chromosomalen Aberration

Im Folgenden soll kurz ein möglicher Entstehungsansatz dieser Translokation erörtert werden. Der Entstehungsmechanismus von Translokationen ist bislang unklar. Wie in Kap 1.3.1 beschrieben werden u.a. Hormone (Bastus et al. 2010) und Immunrezeptornukleasen (Marculescu et al. 2002) als endogene und Chemotherapeutika und ionisierende Strahlung (Byrne et al. 2014) als exogene Ursachen diskutiert. In jedem Fall scheint die Existenz von Doppelstrangbrüchen essentiell für die Entstehung von Translokationen zu sein (Zheng 2013). Auffälligerweise wurden alle bisher beschriebenen neun Fälle mit *KMT2A-MAML2* Translokation in Rahmen einer vorhergehenden Krebserkrankung mit Topoisomerase-II Hemmern (z.B. Etoposid und Doxorubicin) behandelt, ausgenommen ein Fall mit myelodysplastischem Syndrom (Menu et al. 2017; Metzler et al. 2008; Nemoto et al. 2007; Obama et al. 1998; Tang et al. 2014). Therapiebedingte Leukämien mit Translokationen von *KMT2A* werden mit Topoisomerase-II Inhibitoren in Verbindung gebracht (Felix 2001). In einer durchgeführten Studie des Memorial Sloan-Kettering Cancer Centers wurde das Auftreten von Leukämien nach multizyklischer Chemotherapie mit Topoisomerase-II Hemmern untersucht. Von 380 Patienten entwickelten 7 % eine Leukämie, davon 40 % mit *KMT2A*-Translokationen (Felix et al. 2022; Kushner et al. 1998). Die Latenz dieser therapiebedingten Leukämien lag meistens zwischen 1,5 und 3 Jahren (Hijiya et al. 2009). Da fast alle empfohlenen Therapieschemata für Thymusneoplasien die Behandlung mit Etoposid oder Doxorubicin vorsehen (Girard et al. 2015), könnte dieser statistische Zusammenhang einen Erklärungsansatz für diese in Thymomen vorkommende Translokation bieten. Da chemotherapeutische Ansätze meist den aggressiven B2- und B3-Thymomen vorbehalten sind, könnte sich dadurch die Restriktion der Translokation für diese Subtypen erklären. Es konnte experimentell gezeigt werden, dass die Topoisomerase-II in Gegenwart von Etoposid spezifische 5'-TATTA-3' Sequenzen spaltet und sich die beiden Bruchpunkte ohne Verarbeitung wieder zusammenfügen. Diese Sequenz findet sich unter anderem im Intron 8 vom *KMT2A* (Whitmarsh et al. 2003). Genau diese Sequenz wurde auch bei einer akuten Leukämie mit der *KMT2A-MAML2* Translokation beschrieben (Metzler et al. 2008). Zusätzlich konnte für *MAML2* eine Topoisomerase-II Spaltung in Gegenwart von Etoposid im Intron 1 nachgewiesen werden (Felix et al. 2022). Die mit Etoposid in Zusammenhang stehenden Bruchpunkte beider Gene korrelieren präzise mit den Exons, die für diese Funktion beschrieben sind. Ein derartiger Zusammenhang mit möglicher therapeutischer Relevanz erfordert zur Abklärung weitere Experimente. Die DNS-Spaltungen durch die Topoisomerase-II scheinen bei Etoposid zeit- und dosisabhängig aufzutreten (Aplan et al. 1996). Es könnte daher versucht werden die beiden Thymuskarzinom-Zelllinien mit verschiedenen Etoposid-Konzentrationen über variable Zeitintervalle zu behandeln. Sollte dabei eine *De-novo*-Entstehung dieser Translokation nur durch Etoposid/Doxorubicin-Therapie nachweisbar sein, wäre das ein kritischer Hinweis auf einen molekularbiologischen Zusammenhang zwischen Therapie und Entstehung dieser Fusion.

4.5 Validierung des *KMT2A-MAML2*-Modells im onkologischen Kontext

Wie in der Einleitung beschrieben (Kap. 1.3.4), wird der *KMT2A-MAML2* Translokation eine mögliche onkogene Funktion bei der Entstehung von Thymomen und Thymuskarzinomen zugeschrieben. Um zunächst eine funktionelle Relevanz dieser Fusion zu untersuchen, wurden diverse phänotypische Analysen mit fusionspositiven Zellklonen durchgeführt. Das für diesen Zweck gewählte *Sleeping beauty* Transposon System hat sich hinsichtlich seiner einfachen Händlichkeit und stabilen Expression der Translokation bewährt. Aufgrund des genomweiten Insertionsprofils bei der Transposition (Kebriaei et al. 2017) müssen allerdings auch etwaige *off-Target* Effekte berücksichtigt werden. Dabei handelt es sich um unerwünschte Veränderungen durch Genom-Editierung. Um die Auswirkungen derartiger Effekte möglichst gering zu halten, wurden mindestens zwei Klone für die Analysen verwendet. Zwar wurde eine funktionstüchtige Transposase auch in humanen Zellen gefunden (Henssen et al. 2015), eine Interaktion mit der aus Fischgenomen isolierten Transposase-Sequenz scheint jedoch unwahrscheinlich. Um dennoch einen Verlust der Expression der Translokation auszuschließen, wurde die anhaltende Insertion zu zwei verschiedenen Zeitpunkten nach erfolgreicher Etablierung des jeweiligen Klons mittels PCR untersucht und bestätigt. Auch in Hinblick auf die Größe der zu transfizierenden DNS eignet sich die hier benutzte Methode sehr gut für ein experimentelles *Setting*. Im experimentellen Umgang mit den Zellklonen hat sich die Wichtigkeit der spezifischen Auswahl der Klone bei der Etablierung gezeigt. Dieser Zusammenhang wird anhand der MP-57 Klone verdeutlicht: der fehlende Nachweis eines Fusionsproteins und das gegensätzliche Verhalten der MP-57 Klone zu den 1889c-Klonen hinsichtlich der Aktivierung des EGFR-Signalweges haben eine initiale Auswahl definierter Klone erschwert. Erst bei den durchgeführten weiteren Analysen zeigte sich eine deutliche Abgrenzung des Klon 29 von den übrigen. Zur weiteren Validierung der Ergebnisse sollte mindestens ein weiterer Klon für die MP-57 gefunden werden, der ein ähnliches Verhalten wie der Klon 29 zeigt.

Diese Translokation scheint sich von anderen *KMT2A*-Translokationen hinsichtlich ihrer Onkogenität abzuheben. In einer Übersichtsarbeit wurde das Gesamtüberleben von insgesamt knapp 700 Patienten mit akuter Leukämie untersucht, darunter 172 Patienten mit *KMT2A*-translozierter Leukämie. Diese Patienten wiesen unabhängig vom Translokationspartner ein schlechteres *Outcome* auf (Issa et al. 2021). Hinsichtlich der *Hallmarks of Cancer* konnten abgesehen von genomischer Instabilität und Mutationen, die diese Translokation *per se* darstellt, keine aggressive Veränderung wie erhöhte Proliferation oder Invasivität durch Migration festgestellt werden (Hanahan 2022). Einzig erhöhte Stammzeleigenschaften der Klone konnten identifiziert werden, dabei bedarf es jedoch der zusätzlichen Durchführung des Klonalitätsassay für die 1889c und MP-57, um abschließende Aussagen darüber treffen zu können. Die Daten deuten zum jetzigen Zeitpunkt eher auf eine Abnahme der Onkogenität durch diese Translokation und damit auf das Vorliegen einer *Passenger-*

Mutation hin. Um die Translokation als Marker nutzen zu können, sollte versucht werden sie mit klinischen Parametern wie Gesamtüberleben oder Therapieansprechen zu korrelieren. Sollte sich diese Tatsache bestätigen, wäre ein Nutzen der Translokation als positiver prognostischer Marker, ähnlich wie bei den mit besserer Prognose korrelierenden *GTF2I* Mutationen in Thymusneoplasien (Feng et al. 2017) denkbar. Weiterhin sollte zusätzlich zur Überexpression der Translokation ein heterozygoter Knockout des endogenen *MAML2* und *KMT2A* erfolgen, um die *In-vivo*-Vorgänge möglichst realistisch abzubilden und um etwaige zelluläre Gegenregulationen dieser Gene zu minimieren. Ein klinischer Nutzen kann bisher (noch) nicht aus dieser Translokation gezogen werden, das beobachtete Ansprechen auf Sunitinib sollte jedoch weiter validiert werden, da es ein mögliches, attraktives Therapeutikum darstellen könnte. Zuletzt sollte die mögliche Korrelation zur Etoposid- und Doxorubicin-Behandlung weiter untersucht werden. Sollte eine alleinige Behandlung der Zellen mit Etoposid oder Doxorubicin eine derartige Translokation induzieren können, wäre dies ein entscheidender Hinweis auf den zugrundeliegenden Entstehungsmechanismus. Derartige Zellen könnten dann denselben Experimenten unterzogen und vergleichend mit den Klonen betrachtet werden.

Wie eingangs erwähnt (Kap. 1.3.1) besteht die Vermutung, dass Translokationen in der Regel alleine nicht zur Krebsentstehung ausreichen (Rowley 2001). Die im Rahmen dieser Arbeit gesammelten Daten deuten aufgrund der Abnahme der mit Aggressivität korrelierten Phänotypen auf einen ähnlichen Zusammenhang hin. Die Translokation könnte jedoch auf andere, bisher unbekannter Signalwege einwirken oder den Zellen zu einem Selektionsvorteil verhelfen und auf die Weise weitere Mutationen begünstigen. Derartige bisher unbekannte Auswirkungen auf andere Signalwege oder Gene könnten in weiterführenden Analysen aufgedeckt werden. Für diese Zwecke würde die Sequenzierung des Transkriptom (RNA-Seq) Unterschiede in der Genexpression enthüllen. Die direkte Interaktion zwischen dem Fusionsprotein und der DNS könnte mittels ChIP-Analyse (Chromatin Immunopräzipitation) bestimmt werden. Sollte sich diese Translokation als Therapie-bedingt erweisen, so gilt die Rolle der Translokation bei der Entstehung sekundärer Thymusneoplasien zu klären. Die Genfusion könnte dabei einen Begleiteffekt ohne ursächliche Relevanz darstellen, oder aber an der Entstehung derartiger sekundärer Malignitäten kausal beteiligt sein.

5 Zusammenfassung

Diese Arbeit beschäftigte sich mit der funktionellen Relevanz der *KMT2A-MAML2* Translokation in Thymomen und Thymuskarzinomen. Diese Neoplasien sind sehr seltene epitheliale Neubildungen des Thymus. Über die Pathogenese dieser Tumore ist wenig bekannt. Zielgerichtete Therapieansätze sind bislang kaum etabliert, die Rezidivraten sowie der Anteil an Patienten, die für Zweitlinientherapien in Frage kommen, sind hoch. Epitheliale Thymustumore zählen zu den adulten Malignomen mit der geringsten Mutationsrate. Jüngst wurde in zwei Subtypen dieser Tumore die *KMT2A-MAML2* Translokation gefunden, die in 6 % der B2- und B3-Thymome aufzutreten scheint. Hinsichtlich der Funktion und Relevanz ist bis auf eine mögliche Störung des Notch-Signalweges wenig bekannt. Zu Beginn wurde versucht, die generelle Relevanz dieser beiden Translokationspartner durch immunhistochemische Analysen von 162 Gewebeproben zu bestimmen. Es zeigte sich dabei eine Abnahme der Expression in den B1 – B3-Subtypen, sowie eine tendenziell höhere *MAML2* Expression bei Patienten ohne paraneoplastische Myasthenie. Weiterhin wurde unter Verwendung der FISH das Patientenkollektiv bestehend aus den oben beschriebenen 162 Fällen auf die Prävalenz der Fusion im Sinne eines Screening hin untersucht. Es konnte jedoch lediglich ein positiver Fall eines B3-Thymoms mit NGS bestätigt werden. Um die Fusion funktionell untersuchen zu können, wurden drei Zellmodelle verwendet, bei denen die Translokation mittels *Sleeping Beauty* Transposition stabil überexprimiert wurde. Zellklone wurden für phänotypische Analysen wie Proliferation oder Migration verwendet. Es zeigte sich in allen Zellklonen ein wachstumshemmender Effekt. Eine zusätzlich verminderte Migrationsrate konnte in der 1889c und MP-57 nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich zusätzlich eine Beeinflussung der zellulären Plastizität. Es konnten erhöhte Stammzeleigenschaften der Klone im Klonalitätsassay und bei der Expression von Stammzellmarkern im *Western Blot* gezeigt werden. Für die 1889c konnte eine verminderte Zahl Hoechst-positiver Zellen im *Side Population Assay* gefunden werden, während sich für die HEK-Klone kein Unterschied zeigte. Bei der Behandlung der Klone mit Chemotherapeutika stellte sich ein schlechteres Ansprechen der HEK- und 1889c-Klone auf Cisplatin und Etoposid dar, während ein signifikant besseres Ansprechen auf Sunitinib beobachtet werden konnte. Für den EGFR-Inhibitor Gefitinib konnte kein Ansprechen evaluiert werden. Bei zusätzlicher Analyse der Proteinexpression war keine differentielle Expression von anti-apoptotischen oder mit Autophagie assoziierten Markern festzustellen. Eine aberrante Aktivierung des EGFR-Signalwegs wurde für die 1889c- und die MP-57 Klone gezeigt. Die Ergebnisse deuten auf eine funktionelle Relevanz dieser Translokation hin, bei der *HES1* ein realistisches *Target* darstellt. Weiterhin konnten tendenziell abnehmende onkogene Eigenschaften beobachtet werden, die durch zusätzliche Analysen weiter validiert werden müssen. Die beschriebene Prävalenz von 6 % konnte nicht bestätigt werden. Die Rolle dieser Genfusion in der Tumorgenese muss daher weiter analysiert werden. Die Aufdeckung weiterer Zielgene (z.B. mittels ChIP-Analyse) könnte eine Fragestellung für weitere Untersuchungen sein.

6 Literaturverzeichnis

- Abrams TJ, Lee LB, Murray LJ, Pryer NK, Cherrington JM (2003): SU11248 inhibits KIT and platelet-derived growth factor receptor beta in preclinical models of human small cell lung cancer. *Mol Cancer Ther* 2, 471-478
- Alberobello AT, Wang Y, Beerkens FJ, Conforti F, McCutcheon JN, Rao G, Raffeld M, Liu J, Rahhal R, Zhang YW, et al. (2016): PI3K as a Potential Therapeutic Target in Thymic Epithelial Tumors. *J Thorac Oncol* 11, 1345-1356
- Alves-Guerra MC, Ronchini C, Capobianco AJ (2007): Mastermind-like 1 Is a specific coactivator of beta-catenin transcription activation and is essential for colon carcinoma cell survival. *Cancer Res* 67, 8690-8698
- Andersson ER, Sandberg R, Lendahl U (2011): Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Development* 138, 3593-3612
- Ansari KI, Kasiri S, Mandal SS (2013): Histone methylase MLL1 has critical roles in tumor growth and angiogenesis and its knockdown suppresses tumor growth in vivo. *Oncogene* 32, 3359-3370
- Aplan PD, Chervinsky DS, Stanulla M, Burhans WC (1996): Site-specific DNA cleavage within the MLL breakpoint cluster region induced by topoisomerase II inhibitors. *Blood* 87, 2649-2658
- Aw D, Palmer DB (2011): The origin and implication of thymic involution. *Aging Dis* 2, 437-443
- Bareiss PM, Paczulla A, Wang H, Schairer R, Wiehr S, Kohlhofer U, Rothfuss OC, Fischer A, Perner S, Staebler A, et al. (2013): SOX2 expression associates with stem cell state in human ovarian carcinoma. *Cancer Res* 73, 5544-5555
- Bastus NC, Boyd LK, Mao X, Stankiewicz E, Kudahetti SC, Oliver RT, Berney DM, Lu YJ (2010): Androgen-induced TMPRSS2:ERG fusion in nonmalignant prostate epithelial cells. *Cancer Res* 70, 9544-9548
- Battle E, Sancho E, Francí C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J, García De Herreros A (2000): The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2, 84-89
- Bernstein BE, Humphrey EL, Erlich RL, Schneider R, Bouman P, Liu JS, Kouzarides T, Schreiber SL (2002): Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8695-8700
- Blais A, Dynlacht BD (2004): Hitting their targets: an emerging picture of E2F and cell cycle control. *Curr Opin Genet Dev* 14, 527-532
- Bleul CC, Corbeaux T, Reuter A, Fisch P, Mönting JS, Boehm T (2006): Formation of a functional thymus initiated by a postnatal epithelial progenitor cell. *Nature* 441, 992-996
- Bloomfield CD, Goldman A, Hassfeld D, de la Chapelle A (1984): Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia 1982: Clinical significance of chromosomal abnormalities in acute nonlymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 11, 332-350
- Borowicz S, Van Scoyk M, Avasarala S, Karuppusamy Rathinam MK, Tauler J, Bikkavilli RK, Winn RA (2014): The soft agar colony formation assay. *J Vis Exp*, e51998

- Brown RB, Audet J (2008): Current techniques for single-cell lysis. *J R Soc Interface* **5**, S131-138
- Byrne M, Wray J, Reinert B, Wu Y, Nickoloff J, Lee SH, Hromas R, Williamson E (2014): Mechanisms of oncogenic chromosomal translocations. *Ann N Y Acad Sci* **1310**, 89-97
- Camp RL, Neumeister V, Rimm DL (2008): A decade of tissue microarrays: progress in the discovery and validation of cancer biomarkers. *J Clin Oncol* **26**, 5630-5637
- Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A (2003): Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* **113**, 643-655
- Chen L, Xiao S, Manley NR (2009): Foxn1 is required to maintain the postnatal thymic microenvironment in a dosage-sensitive manner. *Blood* **113**, 567-574
- Chen Z, Chen J, Gu Y, Hu C, Li JL, Lin S, Shen H, Cao C, Gao R, Li J, et al. (2014): Aberrantly activated AREG-EGFR signaling is required for the growth and survival of CRTC1-MAML2 fusion-positive mucoepidermoid carcinoma cells. *Oncogene* **33**, 3869-3877
- Cheng L, Zhang S, Wang L, MacLennan GT, Davidson DD (2017): Fluorescence in situ hybridization in surgical pathology: principles and applications. *J Pathol Clin Res* **3**, 73-99
- Chiarle R, Zhang Y, Frock RL, Lewis SM, Molinie B, Ho YJ, Myers DR, Choi VW, Compagno M, Malkin DJ, et al. (2011): Genome-wide translocation sequencing reveals mechanisms of chromosome breaks and rearrangements in B cells. *Cell* **147**, 107-119
- Chiba N, Comaills V, Shiotani B, Takahashi F, Shimada T, Tajima K, Winokur D, Hayashida T, Willers H, Brachtel E, et al. (2012): Homeobox B9 induces epithelial-to-mesenchymal transition-associated radioresistance by accelerating DNA damage responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 2760-2765
- Chomczynski P, Sacchi N (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-159
- Christodoulou C, Murray S, Dahabreh J, Petraki K, Nikolakopoulou A, Mavri A, Skarlos D (2008): Response of malignant thymoma to erlotinib. *Ann Oncol* **19**, 1361-1362
- Cifone MA, Fidler IJ (1980): Correlation of patterns of anchorage-independent growth with in vivo behavior of cells from a murine fibrosarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 1039-1043
- Dailey DD, Anfinsen KP, Pfaff LE, Ehrhart EJ, Charles JB, Bønsdorff TB, Thamm DH, Powers BE, Jonasdottir TJ, Duval DL (2013): HES1, a target of Notch signaling, is elevated in canine osteosarcoma, but reduced in the most aggressive tumors. *BMC Vet Res* **9**, 130
- Dasari S, Tchounwou PB (2014): Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* **740**, 364-378
- Deftos ML, He YW, Ojala EW, Bevan MJ (1998): Correlating notch signaling with thymocyte maturation. *Immunity* **9**, 777-786
- Detterbeck FC, Nicholson AG, Kondo K, Van Schil P, Moran C (2011): The Masaoka-Koga stage classification for thymic malignancies: clarification and definition of terms. *J Thorac Oncol* **6**, S1710-1716

- Ehemann V, Kern MA, Breinig M, Schnabel PA, Gunawan B, Schulten HJ, Schlaeger C, Radlwimmer B, Steger CM, Dienemann H, et al. (2008): Establishment, characterization and drug sensitivity testing in primary cultures of human thymoma and thymic carcinoma. *Int J Cancer* 122, 2719-2725
- Ernst P, Fisher JK, Avery W, Wade S, Foy D, Korsmeyer SJ (2004): Definitive hematopoiesis requires the mixed-lineage leukemia gene. *Dev Cell* 6, 437-443
- Felix CA (2001): Leukemias related to treatment with DNA topoisomerase II inhibitors. *Med Pediatr Oncol* 36, 525-535
- Felix CA, Slater DJ, Davenport JW, Yu X, Gregory BD, Li MM, Rappaport EF, Cheung NV (2022): KMT2A-MAML2 rearrangement emerged and regressed during neuroblastoma therapy without leukemia after 12.8-year follow-up. *Pediatr Blood Cancer* 69, e29344
- Feng Y, Lei Y, Wu X, Huang Y, Rao H, Zhang Y, Wang F (2017): GTF2I mutation frequently occurs in more indolent thymic epithelial tumors and predicts better prognosis. *Lung Cancer* 110, 48-52
- Fleige S, Pfaffl MW (2006): RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med* 27, 126-139
- Florea AM, Büsselberg D (2011): Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers (Basel)* 3, 1351-1371
- Francis JC, Gardiner JR, Renaud Y, Chauhan R, Weinstein Y, Gomez-Sanchez C, Lefrançois-Martinez AM, Bertherat J, Val P, Swain A (2021): HOX genes promote cell proliferation and are potential therapeutic targets in adrenocortical tumours. *Br J Cancer* 124, 805-816
- Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C (2006): Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* 1, 2315-2319
- Gao L, Liu Y, Li Y, Feng L, Wang Z, Wen L, Wang F, Huang X, Lu J, Lai Y (2022): The Importance of FISH Signal Cut-off Value and Copy Number Variation for 1q21 in Newly Diagnosed Multiple Myeloma: Is it Underestimated? *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 22, 535-544
- Garfin PM, Min D, Bryson JL, Serwold T, Edris B, Blackburn CC, Richie ER, Weinberg KI, Manley NR, Sage J, et al. (2013): Inactivation of the RB family prevents thymus involution and promotes thymic function by direct control of Foxn1 expression. *J Exp Med* 210, 1087-1097
- Giorgetti OB, Nusser A, Boehm T (2022): Human thymoma-associated mutation of the GTF2I transcription factor impairs thymic epithelial progenitor differentiation in mice. *Commun Biol* 5, 1037
- Girard N, Ruffini E, Marx A, Faivre-Finn C, Peters S (2015): Thymic epithelial tumours: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 26, v40-55
- Golebiewska A, Brons NH, Bjerkgvig R, Niclou SP (2011): Critical appraisal of the side population assay in stem cell and cancer stem cell research. *Cell Stem Cell* 8, 136-147
- Grinat J, Heuberger J, Vidal RO, Goveas N, Kosel F, Berenguer-Llergo A, Kranz A, Wulf-Goldenberg A, Behrens D, Melcher B, et al. (2020): The epigenetic regulator Mll1 is required for Wnt-driven intestinal tumorigenesis and cancer stemness. *Nat Commun* 11, 6422

- Guenther MG, Jenner RG, Chevalier B, Nakamura T, Croce CM, Canaani E, Young RA (2005): Global and Hox-specific roles for the MLL1 methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8603-8608
- Guevara-Hoyer K, Fuentes-Antrás J, Calatayud Gastardi J, Sánchez-Ramón S (2021): Immunodeficiency and thymoma in Good syndrome: Two sides of the same coin. *Immunol Lett* 231, 11-17
- Han W, Lo HW (2012): Landscape of EGFR signaling network in human cancers: biology and therapeutic response in relation to receptor subcellular locations. *Cancer Lett* 318, 124-134
- Hanahan D (2022): Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* 12, 31-46
- Henssen AG, Henaff E, Jiang E, Eisenberg AR, Carson JR, Villasante CM, Ray M, Still E, Burns M, Gandara J, et al. (2015): Genomic DNA transposition induced by human PGBD5. *Elife* 4
- Hijiya N, Ness KK, Ribeiro RC, Hudson MM (2009): Acute leukemia as a secondary malignancy in children and adolescents: current findings and issues. *Cancer* 115, 23-35
- Hinai A, Pratcorona M, Grob T, Kavelaars FG, Bussaglia E, Sanders MA, Nomdedeu J, Valk PJM (2019): The Landscape of KMT2A-PTD AML: Concurrent Mutations, Gene Expression Signatures, and Clinical Outcome. *Hemasphere* 3, e181
- Inada M, Izawa G, Kobayashi W, Ozawa M (2016): 293 cells express both epithelial as well as mesenchymal cell adhesion molecules. *Int J Mol Med* 37, 1521-1527
- Ionescu DN, Sasatomi E, Cieply K, Nola M, Dacic S (2005): Protein expression and gene amplification of epidermal growth factor receptor in thymomas. *Cancer* 103, 630-636
- Iranzo J, Martincorena I, Koonin EV (2018): Cancer-mutation network and the number and specificity of driver mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, E6010-e6019
- Iso T, Kedes L, Hamamori Y (2003): HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J Cell Physiol* 194, 237-255
- Issa GC, Zarka J, Sasaki K, Qiao W, Pak D, Ning J, Short NJ, Haddad F, Tang Z, Patel KP, et al. (2021): Predictors of outcomes in adults with acute myeloid leukemia and KMT2A rearrangements. *Blood Cancer J* 11, 162
- Ivics Z, Izsvák Z (2015): Sleeping Beauty Transposition. *Microbiol Spectr* 3, Mdna3-0042-2014
- Ivics Z, Hackett PB, Plasterk RH, Izsvák Z (1997): Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell* 91, 501-510
- Izsvák Z, Khare D, Behlke J, Heinemann U, Plasterk RH, Ivics Z (2002): Involvement of a bifunctional, paired-like DNA-binding domain and a transpositional enhancer in Sleeping Beauty transposition. *J Biol Chem* 277, 34581-34588
- Jackson MW, Palma DA, Camidge DR, Jones BL, Robin TP, Sher DJ, Koshy M, Kavanagh BD, Gaspar LE, Rusthoven CG (2017): The Impact of Postoperative Radiotherapy for Thymoma and Thymic Carcinoma. *J Thorac Oncol* 12, 734-744
- Jia H, Guo Y, Zhao W, Wang K (2014): Long-range PCR in next-generation sequencing: comparison of six enzymes and evaluation on the MiSeq sequencer. *Sci Rep* 4, 5737

- Kageyama R, Ohtsuka T, Kobayashi T (2008): Roles of Hes genes in neural development. *Dev Growth Differ* 50, S97-103
- Kalluri R, Weinberg RA (2009): The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119, 1420-1428
- Katsani KR, Arredondo JJ, Kal AJ, Verrijzer CP (2001): A homeotic mutation in the trithorax SET domain impedes histone binding. *Genes Dev* 15, 2197-2202
- Kebriaei P, Izsvák Z, Narayanavari SA, Singh H, Ivics Z (2017): Gene Therapy with the Sleeping Beauty Transposon System. *Trends Genet* 33, 852-870
- Kim BN, Ahn DH, Kang N, Yeo CD, Kim YK, Lee KY, Kim TJ, Lee SH, Park MS, Yim HW, et al. (2020): TGF- β induced EMT and stemness characteristics are associated with epigenetic regulation in lung cancer. *Sci Rep* 10, 10597
- Kim WK, Kwon Y, Jang M, Park M, Kim J, Cho S, Jang DG, Lee WB, Jung SH, Choi HJ, et al. (2019): β -catenin activation down-regulates cell-cell junction-related genes and induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancers. *Sci Rep* 9, 18440
- Kimble J, Crittenden SL (2007): Controls of germline stem cells, entry into meiosis, and the sperm/oocyte decision in *Caenorhabditis elegans*. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23, 405-433
- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP (1998): Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 4, 844-847
- Kopan R (2012): Notch signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4
- Kopan R, Ilagan MX (2009): The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 137, 216-233
- Kovall RA (2008): More complicated than it looks: assembly of Notch pathway transcription complexes. *Oncogene* 27, 5099-5109
- Kowarz E, Löscher D, Marschalek R (2015): Optimized Sleeping Beauty transposons rapidly generate stable transgenic cell lines. *Biotechnol J* 10, 647-653
- Krebs LT, Xue Y, Norton CR, Shutter JR, Maguire M, Sundberg JP, Gallahan D, Closson V, Kitajewski J, Callahan R, et al. (2000): Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes Dev* 14, 1343-1352
- Küffer S, Grabowski J, Okada S, Sojka N, Welter S, von Hammerstein-Equord A, Hinterthaler M, Cordes L, von Hahn X, Müller D, et al. (2022): Phosphoproteomic Analysis Identifies TYRO3 as a Mediator of Sunitinib Resistance in Metastatic Thymomas. *Cancers (Basel)* 14
- Kurup A, Burns M, Dropcho S, Pao W, Loehrer PJ (2005): Phase II study of gefitinib treatment in advanced thymic malignancies. *Journal of Clinical Oncology* 23, 7068-7068
- Kushner BH, Cheung NK, Kramer K, Heller G, Jhanwar SC (1998): Neuroblastoma and treatment-related myelodysplasia/leukemia: the Memorial Sloan-Kettering experience and a literature review. *J Clin Oncol* 16, 3880-3889

- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Li X, Cao Y, Li M, Jin F (2018): Upregulation of HES1 Promotes Cell Proliferation and Invasion in Breast Cancer as a Prognosis Marker and Therapy Target via the AKT Pathway and EMT Process. *J Cancer* 9, 757-766
- Liang CC, Park AY, Guan JL (2007): In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* 2, 329-333
- Lin SE, Oyama T, Nagase T, Harigaya K, Kitagawa M (2002): Identification of new human mastermind proteins defines a family that consists of positive regulators for notch signaling. *J Biol Chem* 277, 50612-50620
- Litvak AM, Woo K, Hayes S, Huang J, Rimner A, Sima CS, Moreira AL, Tsukazan M, Riely GJ (2014): Clinical characteristics and outcomes for patients with thymic carcinoma: evaluation of Masaoka staging. *J Thorac Oncol* 9, 1810-1815
- Liu ZH, Dai XM, Du B (2015): Hes1: a key role in stemness, metastasis and multidrug resistance. *Cancer Biol Ther* 16, 353-359
- Lopes BA, Poubel CP, Teixeira CE, Caye-Eude A, Cavé H, Meyer C, Marschalek R, Boroni M, Emerenciano M (2022): Novel Diagnostic and Therapeutic Options for KMT2A-Rearranged Acute Leukemias. *Front Pharmacol* 13, 749472
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275
- Macchiarini P, Ostertag H (2004): Uncommon primary mediastinal tumours. *Lancet Oncol* 5, 107-118
- Mahmood T, Yang PC (2012): Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci* 4, 429-434
- Maier S, Wilbertz T, Braun M, Scheble V, Reischl M, Mikut R, Menon R, Nikolov P, Petersen K, Beschorner C, et al. (2011): SOX2 amplification is a common event in squamous cell carcinomas of different organ sites. *Hum Pathol* 42, 1078-1088
- Marculescu R, Le T, Simon P, Jaeger U, Nadel B (2002): V(D)J-mediated translocations in lymphoid neoplasms: a functional assessment of genomic instability by cryptic sites. *J Exp Med* 195, 85-98
- Mariani RA, Silva M, Caparelli E, Jennings LJ, Yap KL, Leuer KM, Weinstein J, Gong S (2020): Inv(11)(q21q23); KMT2A-MAML2, a Recurrent Genetic Abnormality in T-Cell Therapy-related Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 42, e258-e261
- Marx A, Weis CA (2015): Sunitinib in thymic carcinoma: enigmas still unresolved. *Lancet Oncol* 16, 124-125
- Marx A, Willcox N, Leite MI, Chuang WY, Schalke B, Nix W, Ströbel P (2010): Thymoma and paraneoplastic myasthenia gravis. *Autoimmunity* 43, 413-427

- Marx A, Belharazem D, Lee DH, Popovic ZV, Reißfelder C, Schalke B, Schölch S, Ströbel P, Weis CA, Yamada Y (2021): Molecular pathology of thymomas: implications for diagnosis and therapy. *Virchows Arch* 478, 101-110
- Marx A, Chan JK, Coindre JM, Detterbeck F, Girard N, Harris NL, Jaffe ES, Kurrer MO, Marom EM, Moreira AL, et al. (2015): The 2015 World Health Organization Classification of Tumors of the Thymus: Continuity and Changes. *J Thorac Oncol* 10, 1383-1395
- Masaoka A (2010): Staging system of thymoma. *J Thorac Oncol* 5, S304-312
- Masaoka A, Monden Y, Nakahara K, Tanioka T (1981): Follow-up study of thymomas with special reference to their clinical stages. *Cancer* 48, 2485-2492
- Massoth LR, Hung YP, Dias-Santagata D, Onozato M, Shah N, Severson E, Duncan D, Gillespie BJ, Williams NF, Ross JS, et al. (2020): Pan-Cancer Landscape Analysis Reveals Recurrent KMT2A-MAML2 Gene Fusion in Aggressive Histologic Subtypes of Thymoma. *JCO Precis Oncol* 4
- Mathas S, Kreher S, Meaburn KJ, Jöhrens K, Lamprecht B, Assaf C, Sterry W, Kadin ME, Daibata M, Joos S, et al. (2009): Gene deregulation and spatial genome reorganization near breakpoints prior to formation of translocations in anaplastic large cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 5831-5836
- McElhinny AS, Li JL, Wu L (2008): Mastermind-like transcriptional co-activators: emerging roles in regulating cross talk among multiple signaling pathways. *Oncogene* 27, 5138-5147
- McFarland CD, Korolev KS, Kryukov GV, Sunyaev SR, Mirny LA (2013): Impact of deleterious passenger mutations on cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 2910-2915
- Meaburn KJ, Misteli T, Soutoglou E (2007): Spatial genome organization in the formation of chromosomal translocations. *Semin Cancer Biol* 17, 80-90
- Mendel DB, Laird AD, Xin X, Louie SG, Christensen JG, Li G, Schreck RE, Abrams TJ, Ngai TJ, Lee LB, et al. (2003): In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res* 9, 327-337
- Menu E, Beaufile N, Usseglio F, Balducci E, Lafage Pochitaloff M, Costello R, Gabert J (2017): First case of B ALL with KMT2A-MAML2 rearrangement: a case report. *BMC Cancer* 17, 363
- Metzler M, Staeger MS, Harder L, Mendelova D, Zuna J, Fronkova E, Meyer C, Flohr T, Bednarova D, Harbott J, et al. (2008): Inv(11)(q21q23) fuses MLL to the Notch co-activator mastermind-like 2 in secondary T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 22, 1807-1811
- Meyer C, Schneider B, Reichel M, Angermueller S, Strehl S, Schnittger S, Schoch C, Jansen MW, van Dongen JJ, Pieters R, et al. (2005): Diagnostic tool for the identification of MLL rearrangements including unknown partner genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 449-454
- Miragaia RJ, Zhang X, Gomes T, Svensson V, Ilicic T, Henriksson J, Kar G, Lönnberg T (2018): Single-cell RNA-sequencing resolves self-antigen expression during mTEC development. *Sci Rep* 8, 685

- Montecucco A, Zanetta F, Biamonti G (2015): Molecular mechanisms of etoposide. *Excli j* **14**, 95-108
- Moreira AL, Won HH, McMillan R, Huang J, Riely GJ, Ladanyi M, Berger MF (2015): Massively parallel sequencing identifies recurrent mutations in TP53 in thymic carcinoma associated with poor prognosis. *J Thorac Oncol* **10**, 373-380
- Müller D, Mazzeo P, Koch R, Bösherz MS, Welter S, von Hammerstein-Equord A, Hinterthaler M, Cordes L, Belharazem D, Marx A, et al. (2021): Functional apoptosis profiling identifies MCL-1 and BCL-xL as prognostic markers and therapeutic targets in advanced thymomas and thymic carcinomas. *BMC Med* **19**, 300
- Nambiar M, Raghavan SC (2013): Chromosomal translocations among the healthy human population: implications in oncogenesis. *Cell Mol Life Sci* **70**, 1381-1392
- Nambiar M, Kari V, Raghavan SC (2008): Chromosomal translocations in cancer. *Biochim Biophys Acta* **1786**, 139-152
- Nemoto N, Suzukawa K, Shimizu S, Shinagawa A, Takei N, Taki T, Hayashi Y, Kojima H, Kawakami Y, Nagasawa T (2007): Identification of a novel fusion gene MLL-MAML2 in secondary acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome with inv(11)(q21q23). *Genes Chromosomes Cancer* **46**, 813-819
- Obama K, Furukawa Y, Tara M, Niina K (1998): Secondary monocytic leukemia with rearrangement of the MLL gene occurring during the course of adult T-cell leukemia. *Int J Hematol* **68**, 323-326
- Parisi S, Piscitelli S, Passaro F, Russo T (2020): HMGA Proteins in Stemness and Differentiation of Embryonic and Adult Stem Cells. *Int J Mol Sci* **21**
- Patel M, Simon JM, Iglesia MD, Wu SB, McFadden AW, Lieb JD, Davis IJ (2012): Tumor-specific retargeting of an oncogenic transcription factor chimera results in dysregulation of chromatin and transcription. *Genome Res* **22**, 259-270
- Pérez-Soler R, Chachoua A, Hammond LA, Rowinsky EK, Huberman M, Karp D, Rigas J, Clark GM, Santabárbara P, Bonomi P (2004): Determinants of tumor response and survival with erlotinib in patients with non--small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **22**, 3238-3247
- Peterson GL (1979): Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal Biochem* **100**, 201-220
- Petrini I, Meltzer PS, Kim IK, Lucchi M, Park KS, Fontanini G, Gao J, Zucali PA, Calabrese F, Favaretto A, et al. (2014): A specific missense mutation in GTF2I occurs at high frequency in thymic epithelial tumors. *Nat Genet* **46**, 844-849
- Radovich M, Pickering CR, Felau I, Ha G, Zhang H, Jo H, Hoadley KA, Anur P, Zhang J, McLellan M, et al. (2018): The Integrated Genomic Landscape of Thymic Epithelial Tumors. *Cancer Cell* **33**, 244-258.e210
- Rangarajan A, Talora C, Okuyama R, Nicolas M, Mammucari C, Oh H, Aster JC, Krishna S, Metzger D, Chambon P, et al. (2001): Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *Embo j* **20**, 3427-3436

- Ronchini C, Capobianco AJ (2001): Induction of cyclin D1 transcription and CDK2 activity by Notch(ic): implication for cell cycle disruption in transformation by Notch(ic). *Mol Cell Biol* **21**, 5925-5934
- Rostovskaya M, Fu J, Obst M, Baer I, Weidlich S, Wang H, Smith AJ, Anastassiadis K, Stewart AF (2012): Transposon-mediated BAC transgenesis in human ES cells. *Nucleic Acids Res* **40**, e150
- Rowley JD (2001): Chromosome translocations: dangerous liaisons revisited. *Nat Rev Cancer* **1**, 245-250
- Sang L, Roberts JM, Collier HA (2010): Hijacking HES1: how tumors co-opt the anti-differentiation strategies of quiescent cells. *Trends Mol Med* **16**, 17-26
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467
- Sato J, Satouchi M, Itoh S, Okuma Y, Niho S, Mizugaki H, Murakami H, Fujisaka Y, Kozuki T, Nakamura K, et al. (2020): Lenvatinib in patients with advanced or metastatic thymic carcinoma (REMORA): a multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol* **21**, 843-850
- Schaefer T, Lengerke C (2020): SOX2 protein biochemistry in stemness, reprogramming, and cancer: the PI3K/AKT/SOX2 axis and beyond. *Oncogene* **39**, 278-292
- Schaefer T, Wang H, Mir P, Konantz M, Pereboom TC, Paczulla AM, Merz B, Fehm T, Perner S, Rothfuss OC, et al. (2015): Molecular and functional interactions between AKT and SOX2 in breast carcinoma. *Oncotarget* **6**, 43540-43556
- Schmalhofer O, Brabletz S, Brabletz T (2009): E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev* **28**, 151-166
- Shamimi-Noori S, Yeow WS, Ziauddin MF, Xin H, Tran TL, Xie J, Loehfelm A, Patel P, Yang J, Schrupp DS, et al. (2008): Cisplatin enhances the antitumor effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand gene therapy via recruitment of the mitochondria-dependent death signaling pathway. *Cancer Gene Ther* **15**, 356-370
- Shen H, McElhinny AS, Cao Y, Gao P, Liu J, Bronson R, Griffin JD, Wu L (2006): The Notch coactivator, MAML1, functions as a novel coactivator for MEF2C-mediated transcription and is required for normal myogenesis. *Genes Dev* **20**, 675-688
- Shinde SR, Maddika S (2016): PTEN modulates EGFR late endocytic trafficking and degradation by dephosphorylating Rab7. *Nat Commun* **7**, 10689
- Skucha A, Ebner J, Schmöllerl J, Roth M, Eder T, César-Razquin A, Stukalov A, Vittori S, Muhar M, Lu B, et al. (2018): MLL-fusion-driven leukemia requires SETD2 to safeguard genomic integrity. *Nat Commun* **9**, 1983
- St-Pierre C, Brochu S, Vanegas JR, Dumont-Lagacé M, Lemieux S, Perreault C (2013): Transcriptome sequencing of neonatal thymic epithelial cells. *Sci Rep* **3**, 1860
- Stein MK, Pandey M, Xiu J, Tae H, Swensen J, Mittal S, Brenner AJ, Korn WM, Heimberger AB, Martin MG (2019): Tumor Mutational Burden Is Site Specific in Non-Small-Cell Lung Cancer and Is Highest in Lung Adenocarcinoma Brain Metastases. *JCO Precis Oncol* **3**, 1-13

- Stern C (1950): Boveri and the early days of genetics. *Nature* 166, 446
- Ströbel P, Hohenberger P, Marx A (2010a): Thymoma and thymic carcinoma: molecular pathology and targeted therapy. *J Thorac Oncol* 5, S286-290
- Ströbel P, Weis CA, Marx A (2016): [Thymic carcinomas]. *Pathologe* 37, 425-433
- Ströbel P, Knop S, Einsele H, Müller-Hermelink HK, Marx A (2007): [Therapy-relevant mutations of receptor tyrosine kinases in malignant thymomas and thymic carcinomas: a therapeutic perspective]. *Verh Dtsch Ges Pathol* 91, 177-186
- Ströbel P, Hartmann M, Jakob A, Mikesch K, Brink I, Dirnhofer S, Marx A (2004): Thymic carcinoma with overexpression of mutated KIT and the response to imatinib. *N Engl J Med* 350, 2625-2626
- Ströbel P, Hartmann E, Rosenwald A, Kalla J, Ott G, Friedel G, Schalke B, Kasahara M, Tomaru U, Marx A (2014): Corticomedullary differentiation and maturational arrest in thymomas. *Histopathology* 64, 557-566
- Ströbel P, Bargou R, Wolff A, Spitzer D, Manegold C, Dimitrakopoulou-Strauss A, Strauss L, Sauer C, Mayer F, Hohenberger P, et al. (2010b): Sunitinib in metastatic thymic carcinomas: laboratory findings and initial clinical experience. *Br J Cancer* 103, 196-200
- Ströbel P, Helmreich M, Menioudakis G, Lewin SR, Rüdiger T, Bauer A, Hoffacker V, Gold R, Nix W, Schalke B, et al. (2002): Paraneoplastic myasthenia gravis correlates with generation of mature naive CD4(+) T cells in thymomas. *Blood* 100, 159-166
- Sumual S, Saad S, Tang O, Yong R, McGinn S, Chen XM, Pollock CA (2010): Differential regulation of Snail by hypoxia and hyperglycemia in human proximal tubule cells. *Int J Biochem Cell Biol* 42, 1689-1697
- Sun L, Ke J, He Z, Chen Z, Huang Q, Ai W, Wang G, Wei Y, Zou X, Zhang S, et al. (2017): HES1 Promotes Colorectal Cancer Cell Resistance To 5-Fu by Inducing Of EMT and ABC Transporter Proteins. *J Cancer* 8, 2802-2808
- Swerdlow SH CE, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J (2017): WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, WHO Classification of Tumours.
- Takahashi Y, Terui K, Chinen Y, Tandai S, Kudo K, Sasaki S, Tono C, Taki T, Ito E (2020): A pediatric case of secondary T-cell acute lymphoblastic leukemia with KMT2A-MAML2 developing after hepatoblastoma treatment. *Pediatr Blood Cancer* 67, e28033
- Takeda S, Chen DY, Westergard TD, Fisher JK, Rubens JA, Sasagawa S, Kan JT, Korsmeyer SJ, Cheng EH, Hsieh JJ (2006): Proteolysis of MLL family proteins is essential for taspase1-orchestrated cell cycle progression. *Genes Dev* 20, 2397-2409
- Tang G, Lu X, Wang SA, Roney EK, Zhang L, Hu S, Lu G, Medeiros LJ, Patel A (2014): Homozygous inv(11)(q21q23) and MLL gene rearrangement in two patients with myeloid neoplasms. *Int J Clin Exp Pathol* 7, 3196-320
- Terunuma A, Jackson KL, Kapoor V, Telford WG, Vogel JC (2003): Side population keratinocytes resembling bone marrow side population stem cells are distinct from label-retaining keratinocyte stem cells. *J Invest Dermatol* 121, 1095-1103

- Thapa P, Farber DL (2019): The Role of the Thymus in the Immune Response. *Thorac Surg Clin* 29, 123-131
- Tiseo M, Rajan A, Thomas A, Giaccone G (2013): "Pseudocavitation" in thymic carcinoma during treatment with sunitinib. *J Thorac Oncol* 8, 511-512
- Travis WD, Brambilla P, Burke AP, Marx A, Nicholson AG (2021): WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart (WHO Classification of Tumours).
- Triel C, Vestergaard ME, Bolund L, Jensen TG, Jensen UB (2004): Side population cells in human and mouse epidermis lack stem cell characteristics. *Exp Cell Res* 295, 79-90
- Uckun FM, Herman-Hatten K, Crotty ML, Sensel MG, Sather HN, Tuel-Ahlgren L, Sarquis MB, Bostrom B, Nachman JB, Steinherz PG, et al. (1998): Clinical significance of MLL-AF4 fusion transcript expression in the absence of a cytogenetically detectable t(4;11)(q21;q23) chromosomal translocation. *Blood* 92, 810-821
- Vasefifar P, Motafakkerazad R, Maleki LA, Najafi S, Ghrobaninezhad F, Najafzadeh B, Alemohammad H, Amini M, Baghbanzadeh A, Baradaran B (2022): Nanog, as a key cancer stem cell marker in tumor progression. *Gene* 827, 146448
- Verdorfer I, Fehr A, Bullerdiek J, Scholz N, Brunner A, Krugmann J, Hager M, Haufe H, Mikuz G, Scholtz A (2009): Chromosomal imbalances, 11q21 rearrangement and MECT1-MAML2 fusion transcript in mucoepidermoid carcinomas of the salivary gland. *Oncol Rep* 22, 305-311
- Vivero M, Davineni P, Nardi V, Chan JKC, Sholl LM (2020): Metaplastic thymoma: a distinctive thymic neoplasm characterized by YAP1-MAML2 gene fusions. *Mod Pathol* 33, 560-565
- von Ahlfen S, Missel A, Bendrat K, Schlumpberger M (2007): Determinants of RNA quality from FFPE samples. *PLoS One* 2, e1261
- Vos JC, Plasterk RH (1994): Tc1 transposase of *Caenorhabditis elegans* is an endonuclease with a bipartite DNA binding domain. *Embo j* 13, 6125-6132
- Wächter K, Kowarz E, Marschalek R (2014): Functional characterisation of different MLL fusion proteins by using inducible Sleeping Beauty vectors. *Cancer Lett* 352, 196-202
- Wan WH, Fortuna MB, Furmanski P (1987): A rapid and efficient method for testing immunohistochemical reactivity of monoclonal antibodies against multiple tissue samples simultaneously. *J Immunol Methods* 103, 121-129
- Wang SC, Lin XL, Wang HY, Qin YJ, Chen L, Li J, Jia JS, Shen HF, Yang S, Xie RY, et al. (2015): Hes1 triggers epithelial-mesenchymal transition (EMT)-like cellular marker alterations and promotes invasion and metastasis of nasopharyngeal carcinoma by activating the PTEN/AKT pathway. *Oncotarget* 6, 36713-36730
- Weng AP, Millholland JM, Yashiro-Ohtani Y, Arcangeli ML, Lau A, Wai C, Del Bianco C, Rodriguez CG, Sai H, Tobias J, et al. (2006): c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes Dev* 20, 2096-2109
- Wenger T, Mattern J, Penzel R, Gassler N, Haas TL, Sprick MR, Walczak H, Krammer PH, Debatin KM, Herr I (2006): Specific resistance upon lentiviral TRAIL transfer by intracellular retention of TRAIL receptors. *Cell Death Differ* 13, 1740-1751

- Whitmarsh RJ, Saginario C, Zhuo Y, Hilgenfeld E, Rappaport EF, Megonigal MD, Carroll M, Liu M, Osheroff N, Cheung NK, et al. (2003): Reciprocal DNA topoisomerase II cleavage events at 5'-TATTA-3' sequences in MLL and AF-9 create homologous single-stranded overhangs that anneal to form der(11) and der(9) genomic breakpoint junctions in treatment-related AML without further processing. *Oncogene* 22, 8448-8459
- Winters AC, Bernt KM (2017): MLL-Rearranged Leukemias-An Update on Science and Clinical Approaches. *Front Pediatr* 5, 4
- Wu J, Wang N, Yang Y, Jiang G, Zhan H, Li F (2021): LINC01152 upregulates MAML2 expression to modulate the progression of glioblastoma multiforme via Notch signaling pathway. *Cell Death Dis* 12, 115
- Wu Z, Eguchi-Ishimae M, Yagi C, Iwabuki H, Gao W, Tauchi H, Inukai T, Sugita K, Ishii E, Eguchi M (2015): HMGA2 as a potential molecular target in KMT2A-AFF1-positive infant acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 171, 818-829
- Xu R, Shao H, Zhu J, Ju Q, Shi H (2019): Combination strategies based on epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors for cancer patients: Pooled analysis and subgroup analysis of efficacy and safety. *Medicine (Baltimore)* 98, e14135
- Yang J, Antin P, Berx G, Blanpain C, Brabletz T, Bronner M, Campbell K, Cano A, Casanova J, Christofori G, et al. (2020): Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 341-352
- Yant SR, Meuse L, Chiu W, Ivics Z, Izsvak Z, Kay MA (2000): Somatic integration and long-term transgene expression in normal and haemophilic mice using a DNA transposon system. *Nat Genet* 25, 35-41
- Yao J, Lai E, Stifani S (2001): The winged-helix protein brain factor 1 interacts with groucho and hes proteins to repress transcription. *Mol Cell Biol* 21, 1962-1972
- Yoh K, Nishiwaki Y, Ishii G, Goto K, Kubota K, Ohmatsu H, Niho S, Nagai K, Saijo N (2008): Mutational status of EGFR and KIT in thymoma and thymic carcinoma. *Lung Cancer* 62, 316-320
- Yokoyama A, Kitabayashi I, Ayton PM, Cleary ML, Ohki M (2002): Leukemia proto-oncoprotein MLL is proteolytically processed into 2 fragments with opposite transcriptional properties. *Blood* 100, 3710-3718
- Zettl A, Ströbel P, Wagner K, Katzenberger T, Ott G, Rosenwald A, Peters K, Krein A, Semik M, Müller-Hermelink HK, et al. (2000): Recurrent genetic aberrations in thymoma and thymic carcinoma. *Am J Pathol* 157, 257-266
- Zhang C, Hua Y, Qiu H, Liu T, Long Q, Liao W, Qiu J, Wang N, Chen M, Shi D, et al. (2020): KMT2A regulates cervical cancer cell growth through targeting VDAC1. *Aging (Albany NY)* 12, 9604-9620
- Zhang C, Song C, Liu T, Tang R, Chen M, Gao F, Xiao B, Qin G, Shi F, Li W, et al. (2017): KMT2A promotes melanoma cell growth by targeting hTERT signaling pathway. *Cell Death Dis* 8, e2940

- Zhao J, Zhao R, Xiang C, Shao J, Guo L, Han Y (2021): YAP1-MAML2 Fusion as a Diagnostic Biomarker for Metaplastic Thymoma. *Front Oncol* 11, 692283
- Zhao Y, Katzman RB, Delmolino LM, Bhat I, Zhang Y, Gurumurthy CB, Germaniuk-Kurowska A, Reddi HV, Solomon A, Zeng MS, et al. (2007): The notch regulator MAML1 interacts with p53 and functions as a coactivator. *J Biol Chem* 282, 11969-11981
- Zheng J (2013): Oncogenic chromosomal translocations and human cancer (review). *Oncol Rep* 30, 2011-2019
- Zheng Z, Liebers M, Zhelyazkova B, Cao Y, Panditi D, Lynch KD, Chen J, Robinson HE, Shim HS, Chmielecki J, et al. (2014): Anchored multiplex PCR for targeted next-generation sequencing. *Nat Med* 20, 1479-1484
- Zoller AL, Kersh GJ (2006): Estrogen induces thymic atrophy by eliminating early thymic progenitors and inhibiting proliferation of beta-selected thymocytes. *J Immunol* 176, 7371-7378
- Zook EC, Krishack PA, Zhang S, Zeleznik-Le NJ, Firulli AB, Witte PL, Le PT (2011): Overexpression of Foxn1 attenuates age-associated thymic involution and prevents the expansion of peripheral CD4 memory T cells. *Blood* 118, 5723-5731

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Philipp Ströbel für die Möglichkeit an seinem Institut zu promovieren bedanken. Insbesondere möchte ich mich dabei für die Unterstützung während des gesamten Prozesses, die unentwegte Kontaktierbarkeit, die schnellen Antworten auf Anliegen aller Art und nicht zuletzt die Gelegenheit dieses Thema auf der Jahrestagung der DGP präsentieren zu dürfen, herzlich bedanken.

Weiterer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Alexander von Hammerstein-Equord für die Übernahme der Zweitbegutachtung.

Besonders danken möchte Herrn Dr. sc. hum. Stefan Küffer für seine wertvollen Ratschläge, seine konstruktive Kritik und die Einarbeitung meiner Person in die experimentelle Forschung. Ich möchte mich auch für seine Unterstützung in vielerlei Hinsicht, das Einbringen seiner großen Erfahrung aus dem Bereich Forschung und *inter alia* seiner Geduld bedanken.

Darüber hinaus möchte ich dem Team des Forschungslabors für ihre Hilfe und der Ermöglichung einer experimentellen Forschung danken. Weiterer Dank richtet sich an Frau Dr. rer. nat. Denise Müller für ihre Ratschläge und Hilfe bei technischen Fragestellung.