

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

**Differentielle Methylierung von H3K27  
in EZH2 positiven *large cell*  
neuroendokrinen Tumoren des Thymus**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

**Ella Marie Kurzen**

aus

Berlin

Göttingen 2022

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

### **Betreuungsausschuss**

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

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. med. E. Hahn

### **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 "Differenzielle Methylierung von H3K27 in EZH2 positiven *large cell* neuroendokrinen Tumoren des Thymus" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den .....

.....  
(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Dinter H, Bohnenberger H, Beck J, Bornemann-Kolatzki K, Schütz E, Küffer S, Klein L, Franks TJ, Roden A, Emmert A, et al. (2019): Molecular Classification of Neuroendocrine Tumors of the Thymus. *J Thorac Oncol* 14, 1472–1483

# Inhaltsverzeichnis

|  |            |
|--|------------|
| <b>Abbildungsverzeichnis .....</b>                           | <b>III</b> |
| <b>Tabellenverzeichnis .....</b>                             | <b>IV</b>  |
| <b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>                           | <b>V</b>   |
| <b>1 Einleitung .....</b>                                    | <b>1</b>   |
| 1.1 Neuroendokrine Tumore .....                              | 1          |
| 1.2 Neuroendokrine Thymustumore und ihre Klassifikation..... | 1          |
| 1.3 Chromatin.....   | 2          |
| 1.4 Histone.....   | 2          |
| 1.5 Histonmodifikation.....                                  | 3          |
| 1.6 Polycomb repressive complex 2 (PRC2) .....               | 5          |
| 1.6.1 EZH2 .....   | 6          |
| 1.6.2 EED, SUZ12 und RbAp48 .....                            | 7          |
| 1.7 Demethylase KDM6A/B.....                                 | 7          |
| 1.8 Fragestellung .....                                      | 7          |
| 1.8.1 Mutation von H3K27 .....                               | 9          |
| 1.8.2 Überexpression der Demethylase KDM6A/B.....            | 10         |
| 1.8.3 Übermäßige Acetylierung von H3K27 .....                | 11         |
| 1.8.4 Mutation im <i>EED</i> -Gen.....                       | 12         |
| <b>2 Material und Methoden .....</b>                         | <b>13</b>  |
| 2.1 Material .....   | 13         |
| 2.1.1 Molekularbiologische Reagenzien.....                   | 13         |
| 2.1.2 Antikörper .....                                       | 13         |
| 2.1.3 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme.....                 | 14         |
| 2.1.4 Gebrauchsmaterialien .....                             | 14         |
| 2.1.5 Geräte.....  | 14         |
| 2.1.6 Software .....   | 15         |
| 2.1.7 Sequenzierung nach Sanger .....                        | 15         |
| 2.1.8 Synthetische Oligonukleotide.....                      | 16         |
| 2.2 Methoden.....  | 16         |
| 2.2.1 Gewebeproben .....                                     | 16         |
| 2.2.2 DNS-Isolierung .....                                   | 17         |
| 2.2.3 Sanger-Sequenzierung.....                              | 17         |
| 2.2.4 Immunhistochemische Färbung .....                      | 19         |
| <b>3 Ergebnisse .....</b>                                    | <b>20</b>  |
| 3.1 Sequenzierung des H3K27-Lokus .....                      | 20         |
| 3.2 Sequenzierung von EED .....                              | 21         |
| 3.3 Immunhistochemische Färbung von H3K27ac .....            | 23         |

---

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 3.4      | Immunhistochemische Färbung von KDM6A ..... | 25        |
| 3.5      | Immunhistochemische Färbung EZH2.....       | 26        |
| 3.6      | Immunhistochemische Färbung H3K27me3 .....  | 27        |
| 3.7      | Ergebnisübersicht.....                      | 29        |
| <b>4</b> | <b>Diskussion .....</b>                     | <b>31</b> |
| <b>5</b> | <b>Zusammenfassung.....</b>                 | <b>36</b> |
| <b>6</b> | <b>Literaturverzeichnis .....</b>           | <b>37</b> |

## Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 1: Nukleosomstruktur .....                                       | 3  |
| Abbildung 2: PRC2 methyliert H3K27 .....                                   | 8  |
| Abbildung 3: PRC2 kann mutiertes H3K27 nicht methylieren .....             | 9  |
| Abbildung 4: KDM6A/B demethyliert H3K27me3.....                            | 10 |
| Abbildung 5: Acetylase acetyliert H3K27.....                               | 11 |
| Abbildung 6: PRC2 kann H3K27ac nicht methylieren .....                     | 11 |
| Abbildung 7: PRC2 mit mutiertem EED kann H3K27 nicht methylieren.....      | 12 |
| Abbildung 8: PCR-Amplifikation .....                                       | 18 |
| Abbildung 9: Sequenzierung des <i>H3K27</i> -Gens. ....                    | 20 |
| Abbildung 10: Sequenzierung des <i>EED</i> -Gens auf Exon 3 .....          | 21 |
| Abbildung 11: Sequenzierung des <i>EED</i> -Gens auf Exon 4 .....          | 22 |
| Abbildung 12: Sequenzierung des <i>EED</i> -Gens auf Exon 5 .....          | 22 |
| Abbildung 13: Sequenzierung des <i>EED</i> -Gens auf Exon 7 .....          | 23 |
| Abbildung 14: Präparat K245/19 mit H3K27ac-Färbung.....                    | 24 |
| Abbildung 15: Präparat K654/15 = H90087/09 (TN22) mit KDM6A-Färbung .....  | 26 |
| Abbildung 16: Präparat K245/19 mit EZH2-Färbung .....                      | 27 |
| Abbildung 17: Präparat K932/17 = R739/16 (TN23) mit H3K27me3-Färbung ..... | 28 |

## Tabellenverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Tabelle 1: Molekularbiologische Reagenzien .....              | 13 |
| Tabelle 2: Antikörper .....                                   | 13 |
| Tabelle 3: Gebrauchsfertige Reaktionssysteme.....             | 14 |
| Tabelle 4: Gebrauchsmaterialien .....                         | 14 |
| Tabelle 5: Geräte.....  | 14 |
| Tabelle 6: Software .....                                     | 15 |
| Tabelle 7: Sequenzierung nach Sanger .....                    | 15 |
| Tabelle 8: Synthetische Oligonukleotide.....                  | 16 |
| Tabelle 9: PCR-Reaktionsmix und PCR-Programm .....            | 18 |
| Tabelle 10: CycleSeq-Reaktionsmix und CycleSeq-Programm ..... | 19 |
| Tabelle 11: Immunhistochemische Färbung von H3K27ac.....      | 23 |
| Tabelle 12: Immunhistochemische Färbung von KDM6A/B.....      | 25 |
| Tabelle 13: Immunhistochemische Färbung von EZH2 .....        | 26 |
| Tabelle 14: Immunhistochemische Färbung von H3K27me3 .....    | 27 |
| Tabelle 15: Ergebnisübersicht der Färbungen von LCNECs.....   | 29 |

## Abkürzungsverzeichnis

|           |   |
|-----------|---|
| AC        | Atypisches Karzinoid  |
| DNS       | Desoxyribonukleinsäure  |
| EED       | <i>embryonic ectoderm development</i>                                 |
| EZH2      | <i>enhancer zeste homolog 2</i>                                       |
| GEP-NET   | Gastrointestinaler Tumor  |
| H3        | Histon 3  |
| H3K27     | 27. Lysinrest des Histon 3  |
| H3K27me3  | Trimethylierter 27. Lysinrest des Histon 3                            |
| H4        | Histon 4  |
| HAT       | Histonacetyltransferase   |
| HDAT      | Histondeacetylase   |
| HDMT      | Histondemethylase   |
| HMT       | Histonmethyltransferase   |
| LCNEC     | <i>large cell neuroendocrine carcinoma</i>                            |
| MEN-1     | <i>multiple endocrine neoplasia-1</i>                                 |
| MLL2      | <i>mixed lineage leukemia 2</i>                                       |
| MPNST     | <i>malignant peripheral nerve sheath tumor</i>                        |
| NET       | Neuroendokriner Tumor   |
| PcG       | <i>polycomb group</i>   |
| PCR       | <i>polymerase chain reaction</i>                                      |
| PNET      | Pulmonaler neuroendokriner Tumor                                      |
| PRC1      | <i>polycomb repressive complex 1</i>                                  |
| PRC2      | <i>polycomb repressive complex 2</i>                                  |
| RbAP46/48 | <i>retinoblastoma supressor associated protein</i>                    |
| SAM       | S-adenosylmethionin   |
| SCC       | <i>small cell carcinoma</i>   |
| SUZ12     | <i>suppressor of zeste 12</i>   |
| TC        | Typisches Karzinoid   |
| TNET      | Neuroendokriner Tumor des Thymus                                      |
| UTX       | <i>ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat X chromosome</i> |

# 1 Einleitung

## 1.1 Neuroendokrine Tumore

Neuroendokrine Tumore (NETs) wurden erstmals 1972 erwähnt (Rosai und Higa 1972). Es sind Tumore, die ihren Ursprung im Neuroektoderm haben und immunhistologisch endokrinen Drüsenzellen gleichen. Durch ihre neuroendokrine Eigenschaft können NETs Hormone produzieren und sezernieren. Neuroendokrine Zellen befinden sich in den Oberflächenepithelien vieler Organe und werden zu dem diffusen neuroendokrinen System gezählt. Alle Organe, in denen neuroendokrine Zellen vorkommen, können als Ursprungsorgan neuroendokriner Tumore in Frage kommen. Hauptsächlich kommen NETs jedoch im Gastrointestinaltrakt (GEP-NET) und in der Lunge (PNET) vor. Thymus NETs (TNETs) sind, mit 0,4% aller neuroendokriner Tumore, vergleichsweise selten und stellen nur weniger als 5% aller mediastinalen Neoplasien dar (Dinter et al. 2019).

## 1.2 Neuroendokrine Thymustumore und ihre Klassifikation

Nur ein Teil der neuroendokrinen Thymustumoren manifestiert sich durch klinische Symptome. Asymptomatische TNETs werden normalerweise als Zufallsbefunde auf Röntgenbildern des Mediastinums entdeckt. Symptome, die durch TNETs hervorgerufen werden können, sind beispielsweise Atemnot oder Husten. Sie resultieren aus Kompressionen oder Invasionen thorakaler oder mediastinaler Strukturen. Weiterhin sind TNETs in 50% aller Fälle mit Endokrinopathien assoziiert. Die häufigste Endokrinopathie ist das Cushing-Syndrom, welches durch eine Überproduktion des Hormons ACTH charakterisiert ist. Weitere Endokrinopathien sind eine Akromegalie, die durch eine gesteigerte Sekretion des *releasing hormone* GHRH auftritt, sowie eine hypertrophe Osteoarthropathie oder das Karzinoid-Syndrom. Ein weiteres Syndrom, das in 19 – 25% aller TNETs auftritt ist das *multiple endocrine neoplasia-1* (MEN-1) -Syndrom (Gaude et al. 2013). Hierbei leiden die Patienten unter mehreren auftretenden neuroendokrinen Tumoren, wobei die des Thymus in den meisten Fällen die Todesursache darstellen (Phan et al. 2010).

Da TNETs ein aggressives biologisches Verhalten zeigen, ist selbst in weit fortgeschrittenen Stadien, die chirurgische Resektion der Goldstandard in der Therapie von TNETs. Um den Tumor zu verkleinern und die Chance auf eine Totalresektion zu erhöhen, wird vorangehend eine adjuvante Radio- oder Chemotherapie vorgeschlagen. Wenn nur eine Teilresektion möglich ist, sollte postoperativ eine Bestrahlung und eventuell eine ergänzende Chemotherapie gemacht werden. Insgesamt sind die Langzeitprognosen von TNET-Patienten durch häufige Rezidive und Metastasierungen jedoch schlecht (Filosso et al. 2017).

PNETs und TNETs werden nach WHO-Kriterien in *low-grade* typische Karzinoide (TCs), *intermediate-grade* atypische Karzinoide (ACs) und in zwei maligne *high-grade* Subtypen, *large cell neuroendocrine carcinoma* (LCNEC) und *small cell carcinoma* (SCC), klassifiziert. Aktuelle Studien schlagen jedoch ein morphomolekulares Grading-System vor, welches eine Stratifizierung mit prognostischer Relevanz enthält. Hierin enthalten sind auch die *low-/intermediate grade* NET-G3s, welche LCNECs ähneln, jedoch durch die histologischen Marker Chromogranin sowie *enhancer of zeste homolog 2* (EZH2) und ihrer karzinoiden Morphologie von ihnen abzugrenzen sind. LCNECs sind Chromogranin-negativ während die *low-grade* NET-G3s eine stark positive Färbung zeigen. EZH2 hingegen ist in LCNECs vorwiegend positiv und in NET-G3s negativ. Das führt zur Schlussfolgerung, dass EZH2-Positivität mit einem höheren Malignitätsgrad assoziiert werden kann. Weiterhin haben NET-G3s im Gegensatz zu LCNECs eine niedrigere Proliferationsrate gemessen am Ki-67-Index (Dinter et al. 2019).

### 1.3 Chromatin

Das humane Genom besteht aus langen Ketten von ungefähr  $3,2 \times 10^9$  Nukleotiden, die sich als Desoxyribonucleinsäure (DNS) auf 23 Chromosomen verteilen. Chromosome werden durch Chromatin gebildet, was ein Komplex aus der genomischen DNS und Proteinen ist, wobei ein Großteil der Proteine Histone sind. Durch die Bildung von Chromatin kann die DNS so eng gepackt werden, dass sie in den Nukleus einer eukaryotischen Zelle passt (Thanbichler et al. 2005). Das Chromatin kann entweder als Euchromatin oder Heterochromatin vorliegen. Euchromatin beschreibt einen dekondensierten Zustand der DNS und ist im Bereich aktiver Gene zu finden. Hier ist die DNS für nukleäre Prozesse zugänglich. Im Heterochromatin hingegen ist die DNS stark kondensiert. Hier sind hauptsächlich inaktive Gene lokalisiert und hieraus bestehen beispielsweise Zentromere oder Telomere (Bannister und Kouzarides 2011). Durch die dynamische Umwandlung von Euchromatin in Heterochromatin und die damit verbundene wechselnde Zugänglichkeit der DNS können transkriptionelle Aktivitäten moduliert werden. Deshalb ist die Chromatinstruktur ausschlaggebend für die Regulierung von beispielsweise Zellzyklusverläufen (Narlikar et al. 2002).

### 1.4 Histone

Histone sind basische nukleäre Proteine, die an negativ geladene Phosphatreste der DNS binden können. Das Core-Histon ist ein Oktamer aus den unterschiedlichen Histonen: Histon 2A (H2A), H2B, H3 und H4. Jedes der Histone liegt im Oktamer zwei Mal vor. Ein DNS-Histon-Komplex wird als Nukleosom oder auch als Core-Partikel bezeichnet. Es besteht aus der sogenannten Core-DNS, die etwa 140 Basenpaare umfasst und aus dem Core-Histon. Um das Core-Histon wickelt sich die DNS und wird durch Linker-Histone, bestehend aus H1, mit weiteren Nukleosomen zu Solenoiden verbunden. Das sind Filamente mit einem circa 30 nm Durchmesser (Audia und Campbell 2016). Durch die Bindung der

DNS an die Histone wird die DNS aufgewickelt und komprimiert. Die Nukleosomstruktur ist in Abbildung 1 zu sehen. Histonproteine haben ihre basische Eigenschaft durch ihre Seitenketten, welche viele Arginin- und Lysinreste besitzen. Die Seitenketten liegen an der Oberfläche der Nukleosome und sind leicht zugänglich für posttranslationale Modifikationen (Jenuwein 2001).

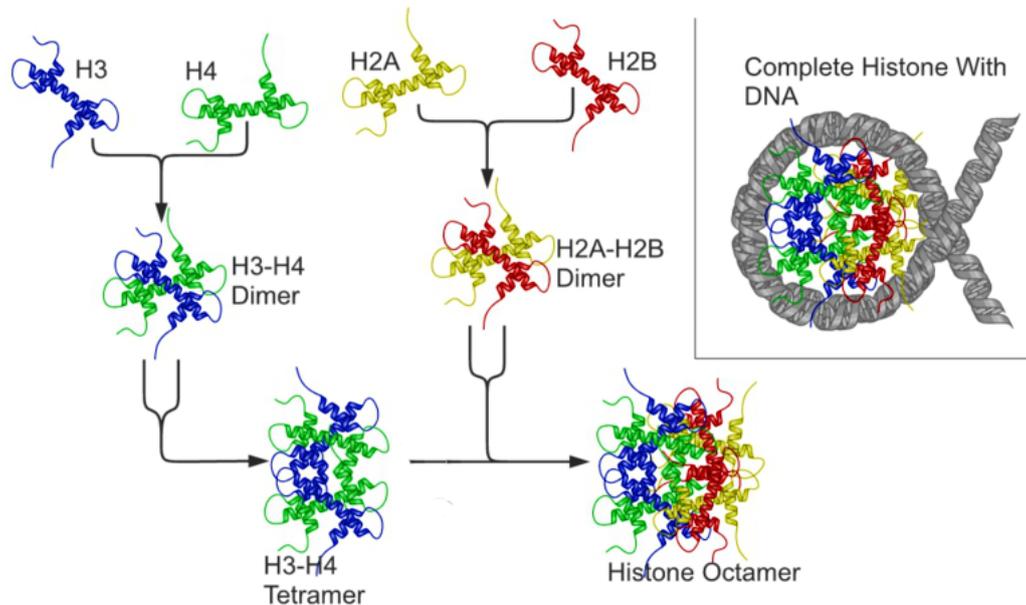


Abbildung 1: Nukleosomstruktur<sup>1</sup> CC BY-SA 3.0

## 1.5 Histonmodifikation

Die eukaryotische Genexpression steht unter strikter zeitlicher und räumlicher Kontrolle. Sie kann entweder auf einer transkriptionellen oder einer translationellen Ebene reguliert werden. Eine der transkriptionellen Regulationen ist die Epigenetik. Die Epigenetik ist eine Art und Weise die Genexpressionsaktivität ohne Veränderung der Basenabfolge der DNS zu modulieren und liegt auf einer höheren genetischen Ebene (Waddington 2012). Ein wichtiger Teil der epigenetischen Regulation sind posttranslationale Histonmodifikationen (Martin und Zhang 2007). Histonmodifikationen können die Histon-Histon-Interaktion und die DNS-Histon-Interaktion innerhalb und zwischen unterschiedlichen Nukleosomen ändern. Dadurch verändern sie die räumliche Anordnung des Chromatins, indem zum Beispiel Euchromatin zu fakultativem Heterochromatin wird. Da die DNS nur in Euchromatinkonformation für beispielsweise Transkriptionsfaktoren und Polymerasen zugänglich ist, können Histonmodifikationen so zelluläre Prozesse wie die Transkription, Replikation, DNS-Reparatur oder Zellzyklusverläufe modulieren (Ehrenhofer-Murray 2004).

<sup>1</sup> Wheeler R (2011): [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Nucleosome\\_structure.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Nucleosome_structure.png) (URL abgerufen am 10.11.2021)

Weiterhin spielen Histonmodifikationen eine wichtige Rolle in der Chromosomen-segregation und der Nukleosomstabilität (Brower-Toland et al. 2005).

Die Modifikationen finden an den N-terminalen Aminosäuren der Histone eines Oktamers statt und sind kovalent. Zu den häufigsten Histonmodifikationen gehören Acetylierungen und Methylierungen.

Acetylierungen werden von Histonacetyltransferasen (HAT) katalysiert. Man kann diese in Typ A (nukleär) und Typ B (zytoplasmatisch) unterteilen (Allfrey et al. 1964). HATs sind häufig Untereinheiten von Koaktivatorkomplexen, welche durch Transkriptionsfaktoren, die an Enhancer gebunden sind, rekrutiert werden. Eine HAT benutzt Acetyl-CoA als Kofaktor und ermöglicht so den Transfer einer Acetylgruppe an eine Aminogruppe einer Lysinseitenkette. Durch das Anhängen der negativ geladenen Acetylgruppe wird die positive Ladung des Lysins neutralisiert und somit die elektrostatische Anziehungskraft zwischen Histon und DNS geschwächt. Durch die verringerte Kondensation der DNS liegt diese nun eher als Euchromatin vor und ist deswegen leichter zugänglich für unter anderem transkriptionelle Prozesse (Davie und Chadee 1998). Vermehrte Acetylierungen rekrutieren in der Promoterregion spezifischer Gene weitere HAT-Komplexe, wodurch die Genexpression nochmals gesteigert werden kann. Es wird auch davon ausgegangen, dass eine Hyperacetylierung von Histonenden zu einer transkriptionellen Aktivierung führt (Narlikar et al. 2002).

Der Gegenspieler der HAT ist die Histondeacetylase (HDAC). Sie kann die Acetylierung von Lysinresten rückgängig machen. Anschließend liegen die positiven Ladungen der Lysinreste wieder frei, was zur erneuten Stabilisierung der Heterochromatinstruktur beiträgt. Deshalb werden HDACs auch als transkriptionelle Repressoren bezeichnet (Bannister und Kouzarides 2011). Auch hier korrelieren vermehrte Hypoacetylierungen mit der Rekrutierung weiterer HDAC-Komplexe, was eine reprimierte Transkription zur Folge hat (Narlikar et al. 2002).

Histonmethylierungen treten hauptsächlich an Lysin- und Argininresten auf. Methylierungen erfolgen durch Histonmethyltransferasen (HMTs). Sie katalysieren den Transfer einer Methylgruppe von S-adenosylmethionin (SAM) auf eine  $\epsilon$ -Aminogruppe. HMTs können Lysinreste in unterschiedlichen Graden methylieren, entweder mono-, di- oder trimethylieren (Bannister und Kouzarides 2011). Die funktionelle Domäne von HMTs wird SET-Domäne genannt und besteht aus ungefähr 130 Aminosäuren (Khorasanizadeh 2004). Wie Acetylierungen können auch Methylierungen den Kondensationsgrad des Chromatins beeinflussen. Jedoch wird durch Methylierungen, im Vergleich zu Acetylierungen, zumeist die Bildung von fakultativem Heterochromatin begünstigt (Kaneko et al. 2013). Durch die erhöhte Kondensation im Heterochromatin ist der betroffene DNS-Bereich schwerer zugänglich für transkriptionelle Prozesse, weshalb man bei Methylierungen häufig von einer transkriptionellen Repression oder einem Gensilencing spricht. Das ist zum Beispiel bei Methylierungen des neunten Lysinrests von H3 (H3K9) oder des 27. Lysinrests von H3 (H3K27) der Fall (Shilatifard 2006). Jedoch werden Methylierungen nicht ausschließlich mit

Repressionen in Verbindung gebracht. Sie können ebenso für Genaktivierungen verantwortlich sein, wie beispielsweise bei H3K4, H3K26 oder H3K79 sowie für DNS-Reparatur-Antworten, wie bei H4K20 (Shi 2007). Histonmethylierungen nehmen also eine weitverbreitete Rolle in verschiedenen Aspekten der Chromatinfunktion ein (Zhang 2001). Die unterschiedlichen Wirkungen von Methylierungen untersuchten Pollina und Brunet (2011) und entdeckten, dass mit der Dysbalance von Methylierungsmarkern ein Rückgang der Gewebefunktion einhergeht. Das lässt darauf schließen, dass die dynamische Methylierung und Demethylierung von Histonen auch eine wichtige Rolle im Altern von altersspezifischen Gewebstammzellen sowie für die Gewebsregeneration, Reparatur und Gewebserhaltung spielt.

Wie Acetylierungen sind auch Methylierungen reversibel, nämlich durch Histon-demethylasen (HDMTs). HDMTs können entweder Aminooxidasen sein, wie zum Beispiel LSD1 oder Hydroxylasen, wie beispielsweise KDM6A (Shi 2007). HMTs und HDMTs kollaborieren, um durch Platzierung und Entfernung von Methylmarkern die Genexpression, den Werdegang der Zelle und die Genomstabilität zu beeinflussen (Audia und Campbell 2016).

Es wird davon ausgegangen, dass vorherrschende Modifikationen die folgenden Modifikationen von Histonen beeinflussen und dass sie als Marker somit unterschiedliche Proteine und Proteinkomplexe rekrutieren können (Zhang 2001). Jede Modifikation allein kann also bereits die Chromatinstruktur beeinflussen, aber nur die Kombination aller Modifikationen bestimmt die Chromatinstruktur insgesamt und somit die Genaktivität (Shi 2007). Schlussfolgernd interagieren die chromatinmodifizierenden Komplexe, um eine spezifische Chromatinstruktur zu bilden, innerhalb welcher nukleäre Prozesse wie die DNS-Replikation stattfinden können (Narlikar et al. 2002).

Weiterhin wird vermutet, dass ein abnormales Profil von Histonmodifikationen oder die Dysregulation entsprechender Enzyme eine Tumorgenese begünstigen kann. Entweder durch das Ändern von Genexpressionen, welches auch die Regulation von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen betreffen kann, oder dadurch, dass Histonmodifikationen die Chromosomenteilungen und die Genomintegrität beeinflussen können (Bannister und Kouzarides 2011). Vor allem Modifikationen an den Histonen H3 und H4 sind bereits im Zusammenhang mit der Entstehung von Tumorerkrankungen identifiziert worden (Fraga et al. 2005). Über die Histonmethyltransferase von H3K27 ist bekannt, dass sie durch eine Translokation ihrer codierenden Gene oder einer Überexpression eine Rolle in onkogenem Geschehen einnimmt. (Shi 2007).

## 1.6 Polycomb repressive complex 2 (PRC2)

Polycomb-Proteine gehören zu der *polycomb group* (PcG) und sind wichtige epigenetische Regulatoren, die chromatinmodifizierende Komplexe bilden. PcGs übernehmen damit wichtige regulatorische Funktionen im Zellzyklus und möglicherweise in der Tumorgenese

(Sauvageau und Sauvageau 2010). Es gibt den *polycomb repressive complex 1* (PRC1) und den *polycomb repressive complex 2* (PRC2). PRC1 katalysiert die Monoubiquitilierung von H2AK119 und PRC2 katalysiert die Methylierung von H3K27. Das monoubiquitinierte H2AK119 rekrutiert PRC2, wohingegen PRC1 an das Produkt von PRC2 bindet. So entsteht zwischen den Polycomb-Proteinkomplexen eine Vorwärtsschleife, die zur Ausbreitung der beiden repressiven Marker führt. Die Aufgabe von PRC1 und PRC2 ist das Stilllegen (Silencing) von kritischen Zielgenen, die in fundamentale Prozesse wie Zelldifferenzierung, Zyklusregulierung, Altern und Tumorgenese involviert sind (Shi et al. 2017). PRC2 erkennt also die richtigen epigenetischen Stadien unterschiedlicher Gene und versucht diese beizubehalten. Wenn das durch beispielsweise eine Überexpression oder eine Mutation einer Untereinheit nicht gelingt, kann es fatale Auswirkungen auf die Zelle haben und häufig der Auslöser einer Tumorgenese sein (Kaneko et al. 2013). In der Tumorgenese sind vor allem die durch PRC2 herunterregulierten Tumorsuppressorgene ausschlaggebend, wie beispielsweise PAX2 (Lee et al. 2014; Shi et al. 2017). Es konnte auch nachgewiesen werden, dass PRC2 für die Unterdrückung homöotischer Transkriptionsfaktoren der *Hox*-Gene verantwortlich ist. Diese Transkriptionsfaktoren sind in *malignant peripheral nerve sheath tumors* (MPNSTs) mit PRC2-Verlust stark angereichert. Die *Hox*-Gene sind wichtig für die Entwicklung und Morphogenese eines Organismus (Lee et al. 2014). Eine weitere Möglichkeit, wie eine PRC2-Deregulation zu einer Tumorgenese beitragen kann ist, dass es zu einer abnormalen Hypermethylierung von H3K27 kommt (Hsu et al. 2020). PRC2 besteht aus verschiedenen Untereinheiten: *enhancer of zeste homologe 2* (EZH2), *embryonic ectoderm development* (EED), *suppressor of zeste 12* (SUZ12) und *retinoblastoma supressor associated protein* (RbAp46/48) (Shi et al. 2017).

### 1.6.1 EZH2

EZH2 ist die Methyltransferaseuntereinheit des PRC2. Es ist für die Übertragung einer Methylgruppe auf H3K27 verantwortlich und kann wahrscheinlich ebenfalls H3K9 methylieren (Müller et al. 2002). EZH2 kann H3K27 über seine SET-Domäne entweder mono-, di- oder trimethylieren. Für die Zellhämostase ist es wichtig, dass die H3K27me<sub>3</sub>-Level kontrolliert reguliert werden. Wenn das durch eine Überexpression von EZH2 nicht mehr möglich ist, kann die zelluläre Identität nicht mehr erhalten werden (Bannister und Kouzarides 2011). Deswegen gilt EZH2 auch als prognostischer Marker in verschiedenen Tumoren, wobei dessen Überexpression normalerweise mit einer schlechten Prognose für den Patienten einhergeht. Durch diese Schlüsselrolle in der Tumorgenese werden auch immer mehr EZH2-Inhibitoren in der Tumorthherapie verwendet (Hsu et al. 2020). Neben EZH2 gilt auch die Methylierung von H3K27 (H3K27me<sub>3</sub>) als Tumormarker. Es wurde eine auffällig starke Methylierung von H3K27 bei Karzinomen beobachtet und es wurde nachgewiesen, dass H3K27me<sub>3</sub> durch das Stilllegen spezifischer Gene die Tumorentwicklung fördern kann (Zhang et al. 2020). Um die Trimethylierung an H3K27me<sub>3</sub>

rückgängig zu machen, gibt es eine spezifische Demethylase, die KDM6A/B (Agger et al. 2007).

### 1.6.2 EED, SUZ12 und RbAp48

Es wurde gezeigt, dass der Funktionsverlust von EED, SUZ12 und RbAp48, durch spezifische Mutationen oder nicht regelrechte Expression zu einer verminderten H3K27-Trimethylierung führt. Die drei Untereinheiten des PRC2 sind daher wichtig für eine EZH2-basierte Methyltransferaseaktivität (Müller et al. 2002). EED und EZH2 interagieren über einen 30-Peptidrest. Über diesen kann EZH2 an eine untere Domäne von EED binden. Nur durch diese Interaktion ist eine katalytische Aktivität von PRC2 gegeben. Deshalb wird diese allosterische Seite auch bei Tumorthérapien mittels EZH2-Inhibitoren blockiert (Lee et al. 2014). SUZ12 hingegen ist wichtig für die Integrität von PRC2 und die Stabilität von EZH2 und somit auch ausschlaggebend für die Methylierung von H3K27. Als letzte Untereinheit gibt es noch RbAp48. Sie bindet an Histondimere aus H3 und H4, um den PRC2-Komplex zu den Nukleosomen zu rekrutieren (Shi et al. 2017).

## 1.7 Demethylase KDM6A/B

Den Gegenpart zu der Histonmethyltransferase EZH2 bildet die Histondemethylase KDM6A oder KDM6B. HDMTs sind in der Lage bestehende Methylierungen wieder zu entfernen. Sie gehören zu einer kleinen Gruppe von JmjC-Domän-Enzymen, welches die einzigen Enzyme sind, die Trimethylierungen rückgängig machen können. Des Weiteren können die Demethylasen in *ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat X chromosome* (UTX)- oder JMJD3-Gruppen eingeteilt werden (Shi 2007). KDM6A gehört der UTX-Gruppe an, wohingegen KDM6B der JMJD3-Gruppe angehört. KDM6A bildet bei der Demethylierung einen Komplex mit *mixed lineage leukemia 2* (MLL2). MLL2 agiert als spezifische Methyltransferase für H3K4. Das methylierte H3K4 wirkt aktivierend auf die Transkription (Agger et al. 2007). KDM6B hingegen ist neben der Demethylierung für eine Förderung der transkriptionellen Elongation zuständig (Estarás et al. 2013). Somit sind beide Demethylasen in die Genaktivierung involviert und wirken dem PcG-vermittelten Gensilencing von wichtigen Promotern der Entwicklung entgegen (Shi 2007).

## 1.8 Fragestellung

In einer Studie zu einer neuen WHO-Einteilung von TNETs wurde eine morphomolekulare Subgruppe der LCNECs die NET-G3 vorgeschlagen. Ein Merkmal der LCNECs im Gegensatz zu den NET-G3 ist eine hohe EZH2-Expression (Dinter et al. 2019). Es wurde jedoch beobachtet, dass gewisse LCNECs trotz starker EZH2-Expression keine H3K27-Methylierung aufweisen und möglicherweise eher NET-G3s ähneln. Eine erhöhte Expression von EZH2 und die Methylierung von H3K27 gehen mit einem aggressiveren

Tumor und einer schlechteren Prognose einher. Das Ziel der vorliegenden Dissertation ist es die Diskrepanz zwischen der EZH2-Expression und der Trimethylierung von H3K27 in LCNECs und NET-G3s zu untersuchen. Die Erkenntnisse daraus könnten weitere Hinweise zur Aggressivität und Prognose NET-G3 klassifizierter Tumore geben.

Folgende alternative Hypothesen, weshalb es zu einer Diskrepanz zwischen der EZH2-Expression und der Trimethylierung von H3K27 in LCNECs und NET-G3s kommt, werden angenommen und sind in Abbildung 2 bis Abbildung 7 graphisch veranschaulicht:

In Abbildung 2 wird die regelrechte Methylierung von H3K27 durch die Methyltransferase-Untereinheit von PRC2 verbildlicht dargestellt. Durch die Methylierung wird die Bildung von fakultativem Heterochromatin begünstigt, weshalb es zu einer inhibierten Genexpression kommt.

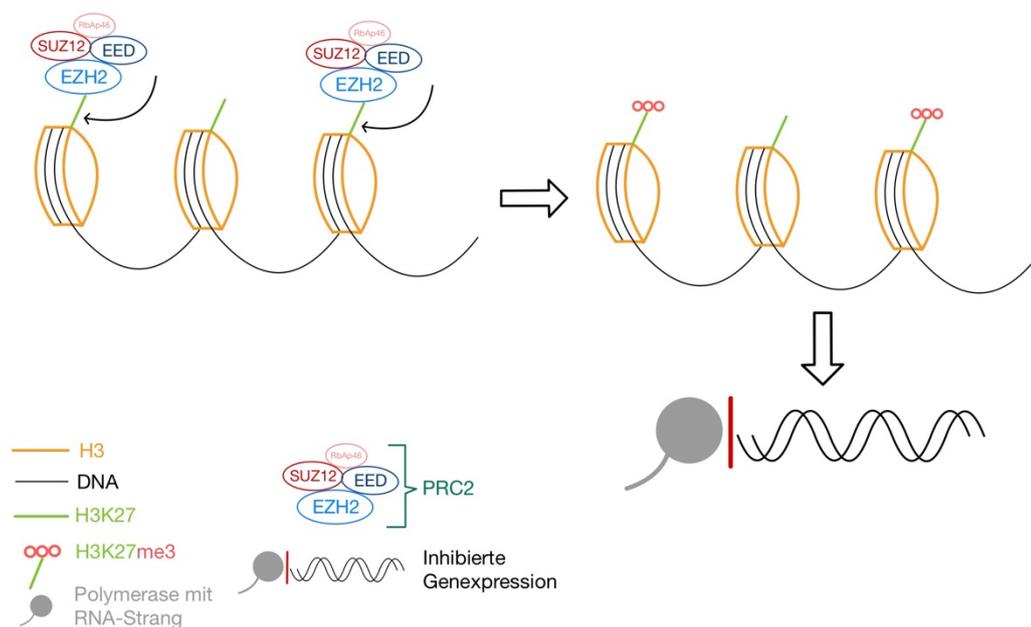


Abbildung 2: PRC2 methyliert H3K27

### 1.8.1 Mutation von H3K27

Ein denkbarer Grund für eine geringere Anzahl an methylierten H3K27 als erwartet ist eine Mutation im *H3K27*-Gen, die dafür sorgt, dass EZH2 die Methylierung von H3K27 nicht mehr katalysieren kann, siehe Abbildung 3.

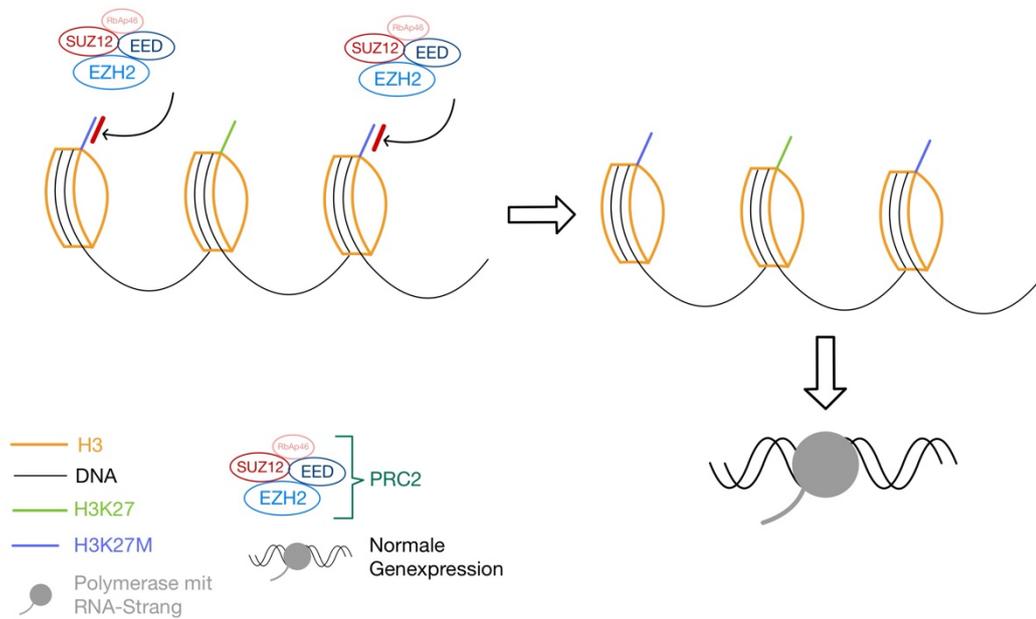


Abbildung 3: PRC2 kann mutiertes H3K27 nicht methylieren

### 1.8.2 Überexpression der Demethylase KDM6A/B

Als weitere Möglichkeit einer differentiellen Methylierung von H3K27 kann eine Überexpression der Demethylase KDM6A/B in Betracht gezogen werden. Die Demethylase macht die Methylierung von H3K27me3 rückgängig, sodass durch eine erhöhte Aktivität vermehrt unmethylierte H3K27 vorliegen können. Dieses Szenario ist in Abbildung 4 dargestellt.

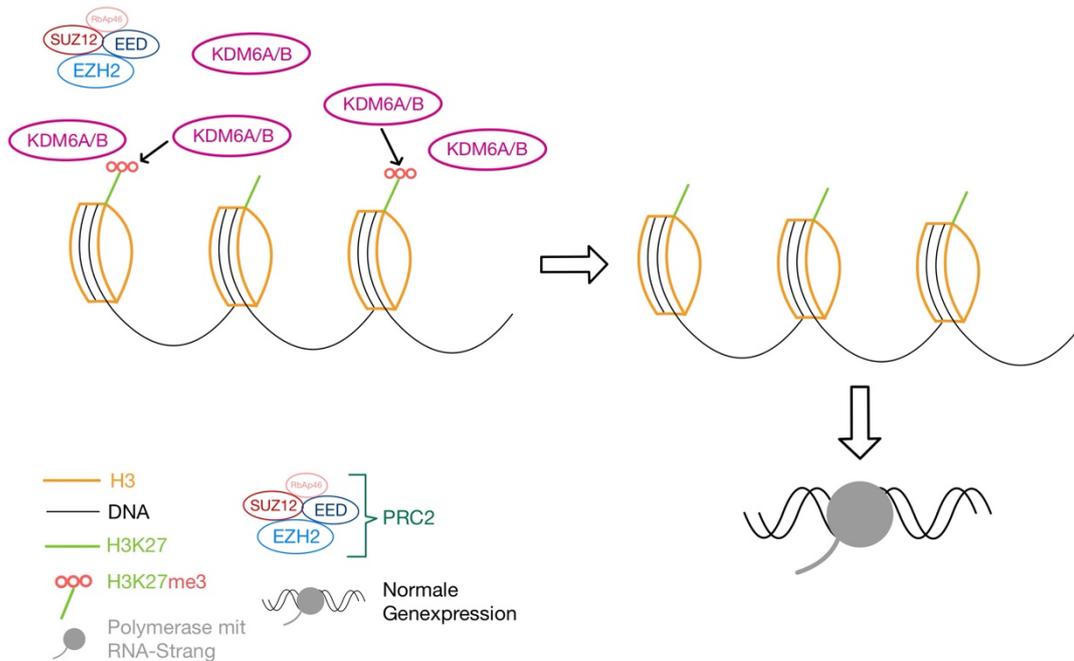


Abbildung 4: KDM6A/B demethyliert H3K27me3

### 1.8.3 Übermäßige Acetylierung von H3K27

Eine weitere Hypothese ist, dass H3K27 übermäßig acetyliert ist und somit nicht mehr methyliert werden kann. Durch die Acetylierung wird die Bildung von Euchromatin begünstigt, wodurch die Genexpression gesteigert wird. Diese Vermutung wird in Abbildung 5 und Abbildung 6 veranschaulicht.

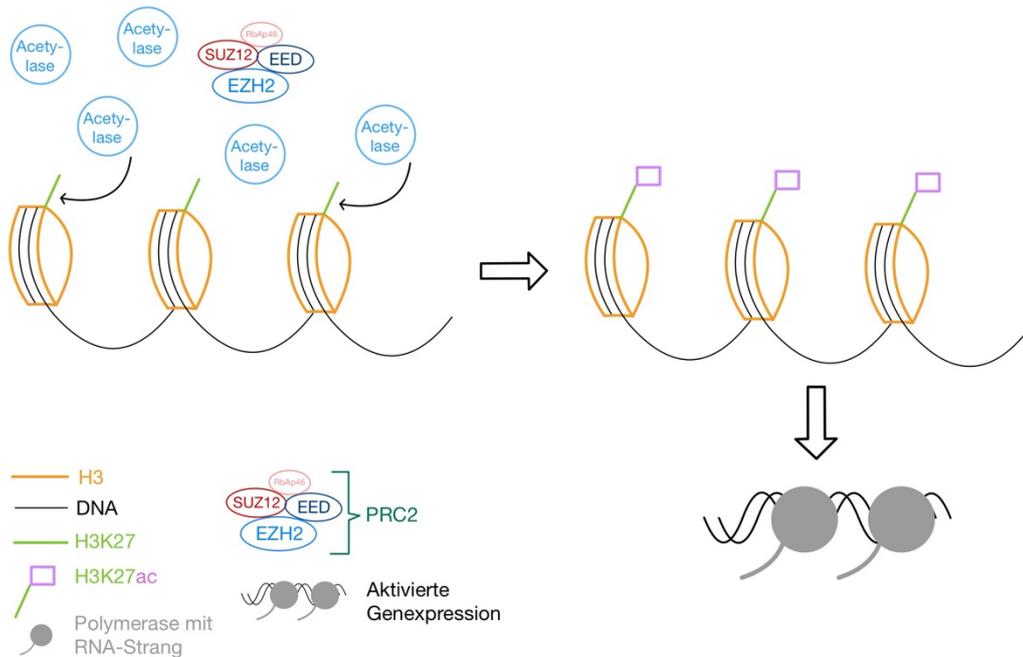


Abbildung 5: Acetylase acetyliert H3K27

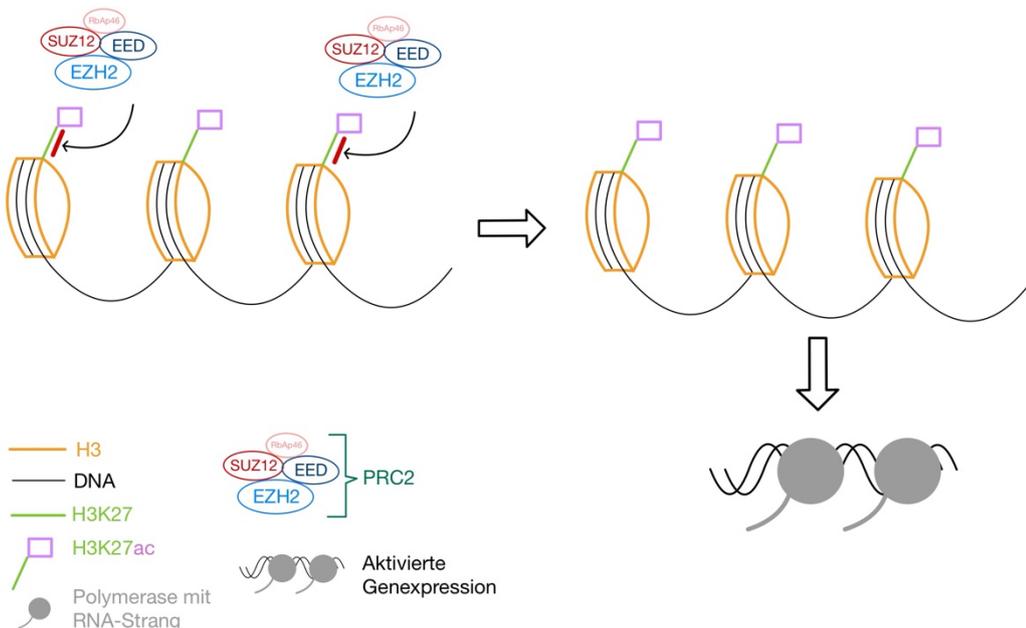
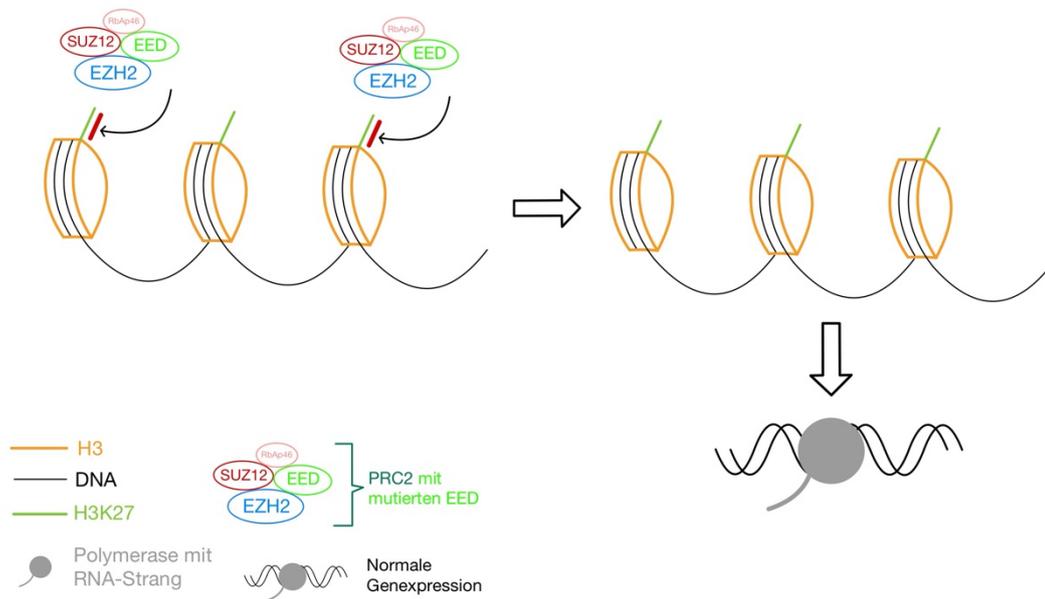


Abbildung 6: PRC2 kann H3K27<sup>ac</sup> nicht methylieren

### 1.8.4 Mutation im *EED*-Gen

Zuletzt kann auch noch eine Mutation im *EED*-Gen in Betracht gezogen werden, durch welche eine regelrechte Methylierung nicht möglich ist. Diese Annahme ist in Abbildung 7 dargestellt.



**Abbildung 7: PRC2 mit mutiertem EED kann H3K27 nicht methylieren**

Ziel dieser Arbeit ist es also, die molekularen Ursachen der Diskrepanz zwischen der Methylierung von H3K27 und der Expression *EZH2* bei *large cell* neuroendokrinen Tumoren und NET-G3s des Thymus zu erörtern. Die Untersuchungen werden teilweise nicht allein an TNETs, sondern um Vergleichswerte zu bekommen auch an den durch die WHO gleich klassifizierten PNETs überprüft. Auch wenn die WHO-Klassifikation eine wichtige klinische Relevanz vorzuweisen hat, unterscheiden sich PNETs und TNETs in vielen Gesichtspunkten, wie beispielsweise in der Häufigkeit der unterschiedlichen Subtypen oder der Korrelation von Geno- und Phänotypen bei MEN-1 (Dinter et al. 2019). Deswegen könnten die Ergebnisse unter anderem die Einteilung von TNETs, vor allem bezüglich der Unterscheidung von NET-G3s und LCNECs, voranbringen und somit eine bessere Vorhersage der Prognosen ermöglichen. Außerdem könnte eine Grundlage für neue hilfreiche Erkenntnisse in der Tumorthherapie von Thymuskarzinomen geschaffen werden, insbesondere in Hinsicht auf *EZH2*-Inhibitoren. Weiterhin steht fest, dass irreguläre Histonmodifikationen mit einer Tumorgenese in Verbindung gebracht werden können. Deshalb ist es wichtig ein besonderes Augenmerk auf Histonmodifikationen zu legen, da sie im Gegensatz zu Genmutationen reversibel sind und somit eventuell therapiert werden können.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Molekularbiologische Reagenzien

Tabelle 1: Molekularbiologische Reagenzien

| Produkt                                 | Hersteller                                 |
|---|--|
| EnVision Flex Target Retrieval Solution | Dako, Agilent, Santa Clara, California USA |
| EnVision Flex+                          | Dako, Agilent, Santa Clara, California USA |
| Ethanol 70%                             | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland          |
| Isopropanol 100%                        | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland          |
| Lysis Solution                          | Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland           |
| Phosphatgepufferte Salzlösung           | Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland         |
| Protein Precipitation Solution          | Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland           |
| Puregene® Proteinase K                  | Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland           |
| RNase A Solution                        | Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland           |
| RNase free water                        | Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland           |

#### 2.1.2 Antikörper

Tabelle 2: Antikörper

| Antikörper | Produkt               | Hersteller                              |
|------------|-----------------------|---|
| EZH2       | PA0575 (ready to use) | Leica, Wetzlar, Deutschland             |
| H3K27ac    | 8173                  | Cell Signaling Technology, Danvers, USA |
| H3K27me3   | 39055                 | Active Motif, Regensburg, Deutschland   |
| KDM6A      | HPA001165             | Merck, Darmstadt, Deutschland           |

### 2.1.3 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Tabelle 3: Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

| Produkt                          | Hersteller                       |
|----------------------------------|----------------------------------|
| QIAxcel® DNA Screening Cartridge | Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland |

### 2.1.4 Gebrauchsmaterialien

Tabelle 4: Gebrauchsmaterialien

| Produkt   | Hersteller                                   |
|---|--|
| Pipettenspitzen Biosphere Quality Tips (0,1 – 20 µl, 2 – 200 µl, 100 – 1000 µl) | Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland |
| Standard-Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)   | Eppendorf, Hamburg, Deutschland              |

### 2.1.5 Geräte

Tabelle 5: Geräte

| Produkt                              | Hersteller  |
|--------------------------------------|---|
| Microtom HM550                       | Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland  |
| mLINE Pipetten (20, 200 und 1000 µl) | Sartorius, Göttingen, Deutschland                 |
| NanoDrop ND-1000 Spectrophometer     | Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA |
| peqSTAR Thermocycler                 | VWR International, Radnor, USA                    |
| QIAxcel® Advanced Instrument         | Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland                  |
| Thermomixer 5436                     | Eppendorf, Hamburg, Deutschland                   |
| Thermomixer comfort                  | Eppendorf, Hamburg, Deutschland                   |
| Vortex-Genie 2                       | Scientific Industries, New York, USA              |
| Zentrifuge Perfect Spin Mini         | PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland |

## 2.1.6 Software

**Tabelle 6: Software**

| <b>Software</b>  | <b>Hersteller</b>                       |
|------------------|---|
| Geneious® 11.0.4 | Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand  |
| Microsoft Excel  | Microsoft Corporation, Redmond, USA     |
| NanoDrop 2000    | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA  |
| GoodNotes 5      | Time Base Technology Limited, Hong Kong |

## 2.1.7 Sequenzierung nach Sanger

**Tabelle 7: Sequenzierung nach Sanger**

| <b>Produkt</b>                               | <b>Hersteller</b>                                 |
|--|---|
| 3500 Genetic Analyzer                        | Applied Biosystems Inc., California, USA          |
| Anode Buffer Container (ABC) 3500 Series     | Applied Biosystems Inc., California, USA          |
| BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit | Applied Biosystems Inc., California, USA          |
| BigDye® XTerminator™ Purification Kit        | Applied Biosystems Inc., California, USA          |
| Cathode Buffer Container (CBC) 3500 Series   | Applied Biosystems Inc., California, USA          |
| Conditioning Reagent 3500 Series             | Applied Biosystems Inc., California, USA          |
| ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup               | Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA |
| MyTaq™ HS Mix                                | Bioline GmbH, Luckenwalde, Deutschland            |
| Polymer 3500 Dx Series                       | Applied Biosystems Inc., California, USA          |
| POP-7™ (384) Performance Optimized           | Applied Biosystems Inc., California, USA          |
| QIAxcel® Advanced Instrument                 | Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland                  |
| Retainer and Base Set (96well)               | Applied Biosystems Inc., California, USA          |

## 2.1.8 Synthetische Oligonukleotide

Tabelle 8: Synthetische Oligonukleotide

| Primer                 | Sequenz                        | Hersteller                                   |
|------------------------|--------------------------------|--|
| H3.3 Primer 1<br>(for) | 5'- TAAAGCACCCAGGAAGCAAC -3'   | Eurofins Genomics,<br>Ebersberg, Deutschland |
| H3.3 Primer 2<br>(rev) | 5'- AACCTCATCGTTACAGGCCT -3'   | Eurofins Genomics,<br>Ebersberg, Deutschland |
| H3.3 Primer 3<br>(for) | 5'- TGGATAGCACACAGGTGGT -3'    | Eurofins Genomics,<br>Ebersberg, Deutschland |
| H3.3 Primer 4<br>(rev) | 5'- GCGTGCTACTGGAATGTCTT -3'   | Eurofins Genomics,<br>Ebersberg, Deutschland |
| H3.3 K27 (for)         | 5'- ATCGTGGCAGGAAAAGTTGT -3'   | Eurofins Genomics,<br>Ebersberg, Deutschland |
| H3.3 K27 (rev)         | 5'- CCTGTAACGATGAGGTTTCTTA -3' | Eurofins Genomics,<br>Ebersberg, Deutschland |

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Gewebeproben

Für die Studie wurden formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte oder -blöcke verwendet, die aus einer Studie von Frau Dr. med. Dinter et al. (2019) an der Universität Göttingen stammen. Für das Verwenden der Präparate wurde ein Ethikantrag von der Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen genehmigt (no. Dok\_7\_2016). Es wurden 107 TNETs, die von 103 Patienten stammen und zwischen 1996 und 2016 gesammelt wurden, näher betrachtet. Das mediane Alter aller Patienten war zur Zeit der Diagnosestellung 54 Jahre. Von den 107 Fällen wurden 22 als TCs, 61 als ACs, 28 als LCNECs und 6 als SCCs klassifiziert. Diese Fälle wurden jedoch auch nach der ENT-/WHO-Klassifikation für GEP-NETs eingeteilt in NET G1, NET G2, LCNEC, SCC und nach der PNET-Klassifikation von Pelosi et al. in G1, G2, G3. Von den TNET-Präparaten waren in 34 Fällen Paraffinblöcke vorrätig. Die Paraffinblöcke wurden mit dem Microtom HM55 (Microm International) in feine 2 µm dünne Schnitte geschnitten. Von den PNET-Präparaten waren in 30 Fällen Paraffinblöcke vorrätig.

### 2.2.2 DNS-Isolierung

Die für die DNS-Isolierung verwendeten Reagenzien und Geräte sind in Tabelle 1 und Tabelle 5 aufgeführt. Vom Objektträger wurden gewünschte Bereiche mit einem Skalpell gekratzt. Das Gewebe wurde in eine Suspension aus 30 µl Lysis Solution (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) und 40 µl Proteinase K (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) gegeben und 25-mal invertiert. Anschließend wurde das Gemisch für mindestens drei Stunden auf 56°C inkubiert, bis das Gewebe vollständig lysiert war. Daraufhin wurde zum Lysat 1,5 µl RNase A Solution (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) hinzugeben. Das Gemisch wurde bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Danach wurde es für mindestens eine Minute auf Eis gelegt, bevor 100 µl Protein Precipitation Solution (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) hinzugeben wurden. Das Gemisch wurde daraufhin für 20 Sekunden gevortext. Anschließend wurde das Lysat drei Minuten bei 14000 rpm/RT zentrifugiert, bis sich ein festes, dichtes, randbildendes Pellet aus Proteinen gebildet hat. Der Überstand wurde in ein neues Tube pipettiert und es wurden 300 µl 100%-iges Isopropanol hinzugeben. Nach 50-maligem invertieren wurde ein fadenähnliches Pellet sichtbar. Darauf folgte ein erneutes Zentrifugieren für circa 5 Minuten bei 14000 rpm/RT. Der entstehende Überstand wurde verworfen. Das entstandene Pellet wurde mit 300 µl 70%-igem Ethanol durch wiederholtes Invertieren gewaschen. Anschließend wurde der Zentrifugiervorgang und das Abpipetieren des Überstandes wiederholt. Das Pellet mit der DNS musste danach circa zehn Minuten trocknen, bevor 40 µl RNase freies Wasser hinzugegeben wurde. Zuletzt musste das Pellet noch für eine Stunde bei 65°C inkubieren, bevor es bei circa -60°C eingefroren wurde.

### 2.2.3 Sanger-Sequenzierung

Die Sanger-Sequenzierung wurde durchgeführt, um das *H3K27*-Gen und das *EED*-Gen genauer zu analysieren und eventuelle Mutationen aufzudecken. Die verwendeten Geräte und Reagenzien sind in Tabelle 7 aufgeführt. Für die Sequenzierung musste zuerst der gewünschte Genabschnitt mithilfe einer *polymerase chain reaction* (PCR) amplifiziert werden. Bei einer PCR wird ein Zyklus aus drei Phasen mehrfach wiederholt, die Denaturierung, Anlagerung und Elongation. Die verschiedenen Phasen kommen durch variierende Temperaturen zustande. Die benötigte Dosierung der Reagenzien sowie die benötigten Temperaturen sind in Tabelle 9 aufgelistet. Synthetisch hergestellte Oligonukleotide, auch Primer genannt, binden an die zu untersuchende Region an beiden Strängen der denaturierten DNS. Anschließend werden die Primer durch eine hitzestabile Taq-Polymerase (MyTaq™ HS Mix, Bionline) verlängert. Hierfür werden Desoxynukleotidphosphate, die in dem Reaktionsmix enthalten sind, angehängt.

**Tabelle 9: PCR-Reaktionsmix und PCR-Programm**

| PCR-Reaktionsmix             | PCR-Programm |
|------------------------------|--------------|
| 2 µl DNS (5ng/µl)            | 95°C 5 min   |
| 0,5 µl Primer forward (10µM) | 95°C 30 sek  |
| 0,5 µl Primer reverse (10µM) | 60°C 30 sek  |
| 12,5 µl MyTaq™ HS Mix        | 72°C 30 sek  |
| 9,5 µl RNase freies Wasser   | 72°C 5 min   |
|                              | 8°C ∞        |

35 Zyklen

Ob die PCR-Amplifikation erfolgreich war, wurde mithilfe von QIAxcel® Advanced Instrument (Qiagen) überprüft. Die automatisierte Kapillargelelektrophorese wurde durch die QIAxcel ScreenGel-Software analysiert. Wie eine Kontrolle durch QIAxcel aussieht, ist in Abbildung 8 zu sehen.

**Abbildung 8: PCR-Amplifikation**

Danach wurden die PCR-Produkte mittels ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup (Applied Biosystems) aufgereinigt. Das Exosap-Gemisch wurde 1:1 mit RNase freiem Wasser verdünnt und jeweils 4 µl mit 10 µl PCR-Produkt gemischt. Die Samples wurden bei 37°C für 15 Minuten inkubiert, um übrige Primer und Nukleotide auszusortieren. Daraufhin wurden sie bei 80°C für 15 Minuten inkubiert, um das ExoSAP-IT™-Reagens zu inaktivieren. Im Anschluss daran wurde der sogenannte „CycleSeq“ durchgeführt. Hierbei wird durch eine thermostabile Polymerase, Didesoxynukleotide und fluoreszenzmarkierte Didesoxy-nukleotide eine Abbruchreaktion herbeigeführt. Die entstehenden Produkte haben unterschiedliche Längen wegen verschiedener Unterbrechungsstellen der DNS-Elongation, durch die unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide. In dem BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) war der Reaktionsmix bereits vorbereitet. Er wurde mit dem dazugehörigen Buffer und RNase freiem Wasser angereichert und mit der aufgereinigten DNS und den Primern vermischt. Im Gegensatz zu der PCR gibt man beim CycleSeq jeweils nur einen Primer, *forward* oder *reverse* hinzu. Die Primer sind die gleichen wie bei der PCR. Den CycleSeq-Reaktionsmix und das -Programm sind Tabelle 10 zu entnehmen.

**Tabelle 10: CycleSeq-Reaktionsmix und CycleSeq-Programm**

| CycleSeq-Reaktionsmix              | CycleSeq-Programm       |
|------------------------------------|-------------------------|
| 2 µl aufgereinigtes PCR-Produkt    | 96°C 1 min              |
| 3,2 µl Primer forward oder reverse | 96°C 10 sek             |
| 4,8 µl BigDyeMix                   | 60°C 10 sek } 25 Zyklen |
|                                    | 8°C ∞                   |

Nach dem CycleSeq-Programm wurden die Produkte aufgereinigt durch das BigDye® XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems). Hierfür wurden in jedes Sample 10 µl xTerminator™ Solution und 4 µl SAM™ Solution gegeben. Anschließend wurden die Samples bei 1400 rpm für 30 Minuten lichtdicht auf den Rüttler gelegt. Nachdem das Gemisch abzentrifugiert wurde, wurde von jedem Sample 15 µl pro *well* in die 96well-Platte hinein pipettiert. Die Platte gehört zu der automatisierten Kapillarelektrophorese, dem 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Der Genetic Analyzer trennt die CycleSeq-Produkte nach ihrer Länge auf und detektiert die fluoreszenzmarkierten endständigen Didesoxynukleotide über einen Laser. Die sequenzierten DNS-Fragmente konnten anschließend über die Software Geneious® 11.0.4 (Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand) analysiert werden.

#### 2.2.4 Immunhistochemische Färbung

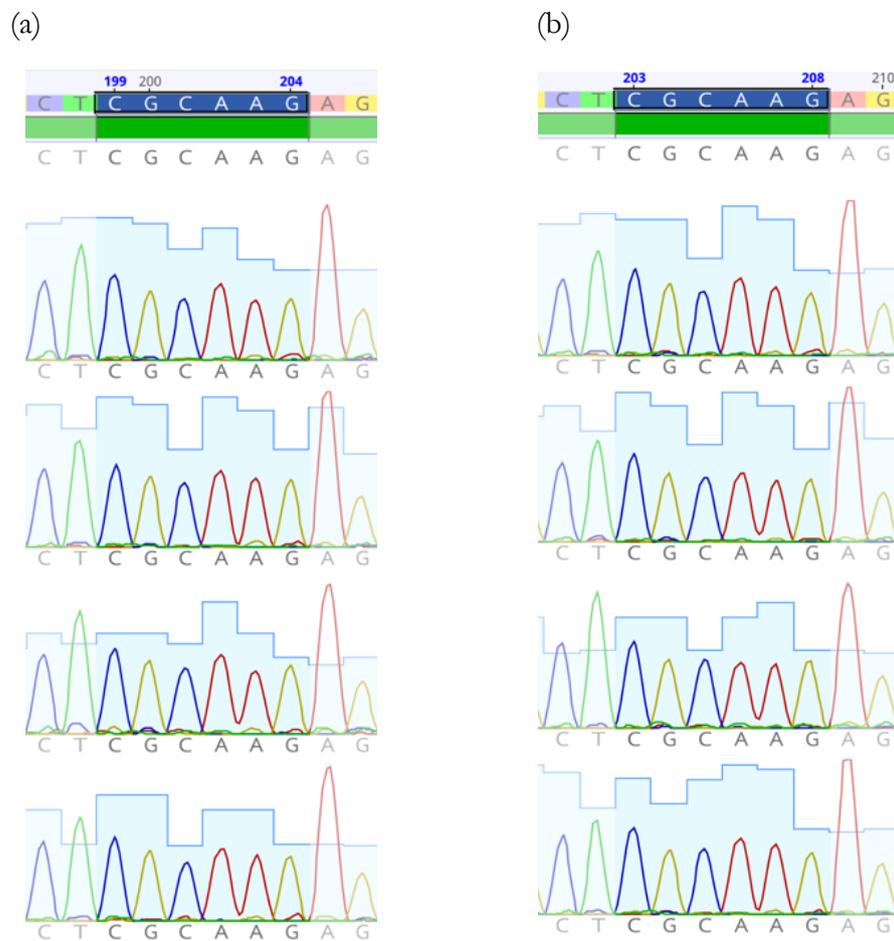
Zunächst wurden *tissue microarrays* (TMAs), die alle Gewebeproben abbildeten, angefärbt. Hierfür wurden je 2µm Sektionen in der EnVision Flex Target Retrieval Solution (Dako, Agilent, Santa Clara, California USA) bei einem pH-Wert von sechs oder neun und einer Temperatur von 95°C inkubiert. Anschließend wurden sie mit den primären Antikörpern, die in Tabelle 2 aufgeführt sind, für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben mit phosphatgepufferter Salzlösung gewaschen und mit einem passenden sekundären Antikörper (EnVision Flex+, Dako, Agilent, Santa Clara, California USA) für 30 Minuten inkubiert. Um die Färbungen der TMAs mit einem Lichtmikroskop auswerten zu können, wurde eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin vorgenommen. Nach erfolgreicher immunhistochemischer Färbung der TMAs wurden entsprechende Präparate nach der gleichen Vorgehensweise angefärbt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Sequenzierung des H3K27-Lokus

Es wurden insgesamt 63 Proben, wie in 2.2.3 beschrieben., sequenziert. Hiervon waren 30 PNETs und 33 TNETs. Bei den PNETs waren es 6 TCs, 16 ACs, 1 SCCs und 7 LCNECs. Bei den TNETs waren es 6 TCs, 18 ACs, 2 SCCs und 8 LCNECs.

In Abbildung 9 sind beispielhaft Sequenzierungen von TNETs und PNETs gezeigt, die mit der Software Geneious® 11.0.4 (Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand) ausgewertet wurden. Die markierte Sequenz „CGCAAG“ kodiert für das gesuchte *H3K27*-Gen. In Abbildung 9 (a) und (b) sind TNETs und PNETs verschiedener Klassifikationen zu sehen in folgender Reihenfolge von oben nach unten: AC, TC, SCC und LCNEC. Keines der sequenzierten Präparate wies eine Mutation im H3K27-Lokus auf.



**Abbildung 9: Sequenzierung des *H3K27*-Gens.** Das *H3K27*-Gen hat die Basenabfolge „CGCAAG“ und wurde in mehreren TNETs (a) und PNETs (b) durch eine Sanger-Sequenzierung sequenziert. Eine Mutation in dem untersuchten Gen konnte in keinem der untersuchten Präparate nachgewiesen werden.

### 3.2 Sequenzierung von EED

Die Sequenzierung von vier relevanten Exonen des *EED*-Gens wurde an fünf Präparaten, die auch alle in 3.1 sequenziert wurden, durchgeführt: K115/15 II+10687/09 (TN21), K654/15 = H90087/09 (TN22), K932/17 = R739/16 (TN23), K929/17 = R50078/11 (TN24) und K930/17 = R191/07 (TN25). Hierfür wurde vorgegangen wie in 2.2.3 beschrieben. Die Auswertung der sequenzierten Präparate wurde ebenfalls mit Hilfe der Software Geneious® 11.0.4 (Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand) vorgenommen und ist in der Abbildung 10 bis Abbildung 13 zu sehen. Keines der sequenzierten Präparate wies am EED-Lokus eine Mutation auf.

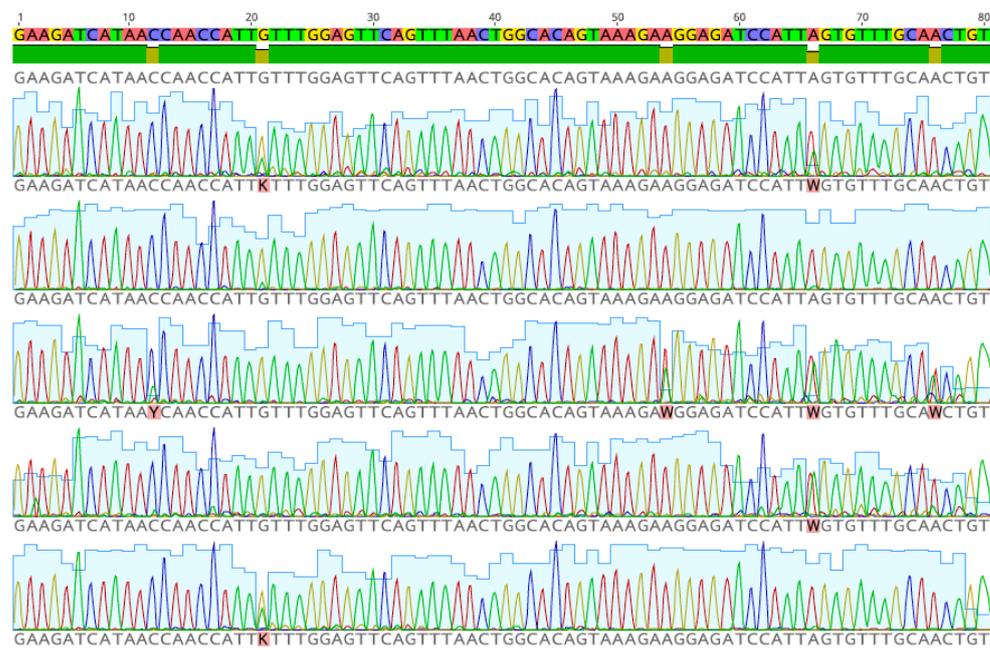


Abbildung 10: Sequenzierung des *EED*-Gens auf Exon 3

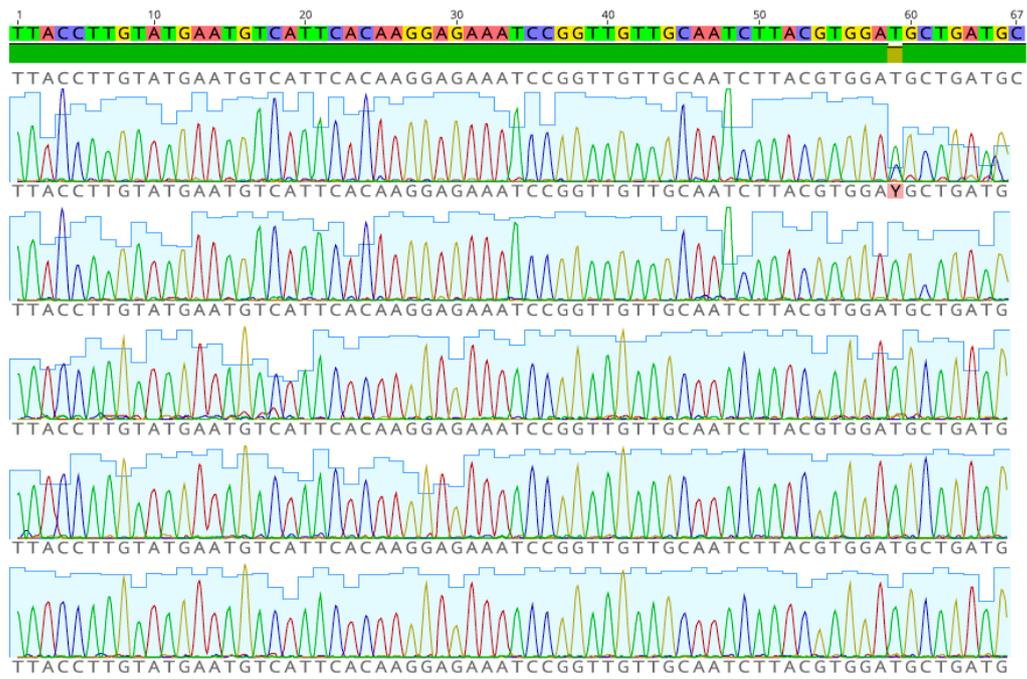


Abbildung 11: Sequenzierung des *EED*-Gens auf Exon 4

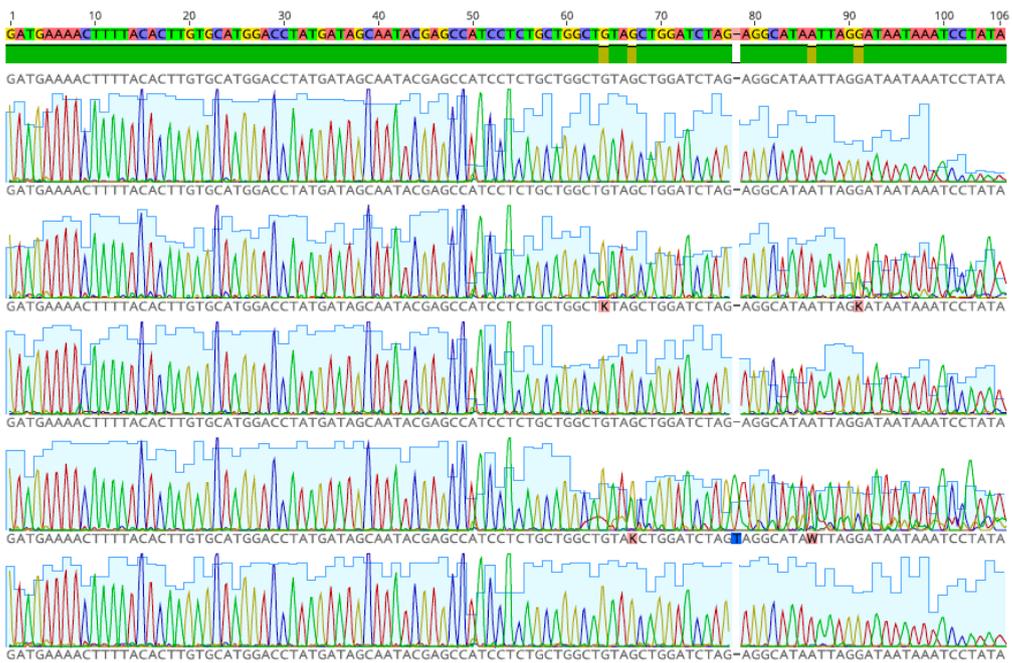


Abbildung 12: Sequenzierung des *EED*-Gens auf Exon 5

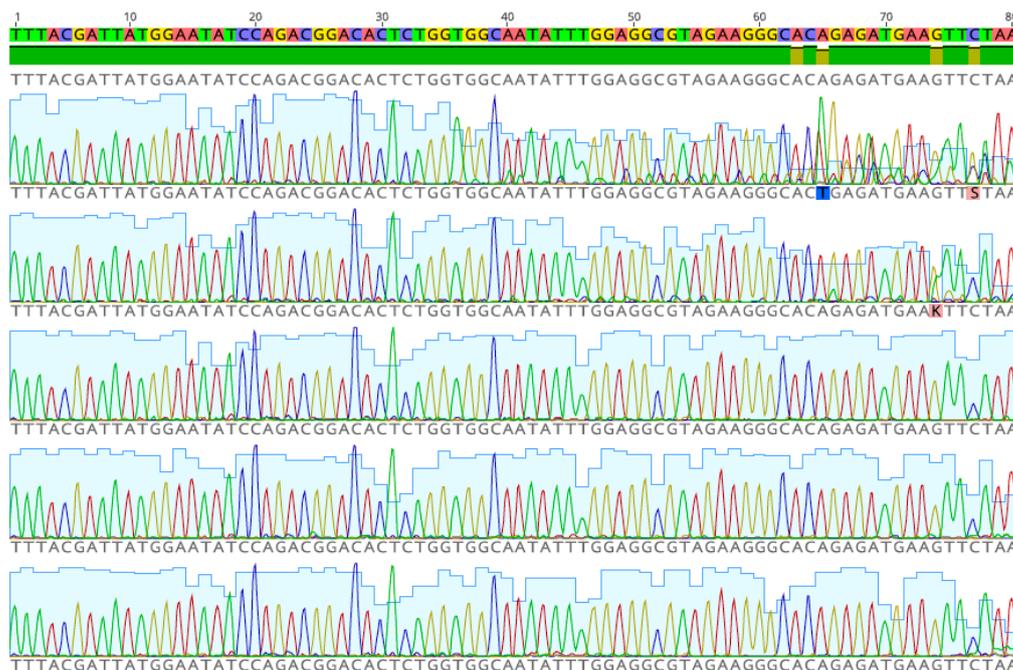


Abbildung 13: Sequenzierung des *EED*-Gens auf Exon 7

### 3.3 Immunhistochemische Färbung von H3K27ac

Bei allen vier Antikörpern konnten die TMA's der entsprechenden Präparate angefärbt werden. Die immunhistochemische Färbung von H3K27ac, wie in 2.2.4 beschrieben, wurde an acht LCNEC-Präparaten vorgenommen und unter dem Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung ausgewertet. Die Färbungen wurden in zytoplasmatisch oder nukleär eingeteilt und die Stärke der Färbung in Prozentzahlen zwischen 0 und 100%. Die Einteilung ist der Tabelle 11 zu entnehmen.

Tabelle 11: Immunhistochemische Färbung von H3K27ac

| Präparat                   | H3K27ac-Färbung                    |
|----------------------------|------------------------------------|
| K115/15 II+10687/09 (TN21) | 0% zytoplasmatisch<br>100% nukleär |
| K654/15 = H90087/09 (TN22) | 0% zytoplasmatisch<br>100% nukleär |
| K932/17 = R739/16 (TN23)   | 0% zytoplasmatisch<br>100% nukleär |
| K929/17 = R50078/11 (TN24) | 0% zytoplasmatisch<br>100% nukleär |

| Präparat                 | H3K27ac-Färbung                    |
|--------------------------|------------------------------------|
| K930/17 = R191/07 (TN25) | 0% zytoplasmatisch<br>80% nukleär  |
| K245/19                  | 0% zytoplasmatisch<br>100% nukleär |
| K345/19                  | 0% zytoplasmatisch<br>100% nukleär |
| K558/19                  | 0% zytoplasmatisch<br>100% nukleär |

Beispielhaft ist die H3K27ac-Färbung des Präparates K245/19 in Abbildung 14 dargestellt.

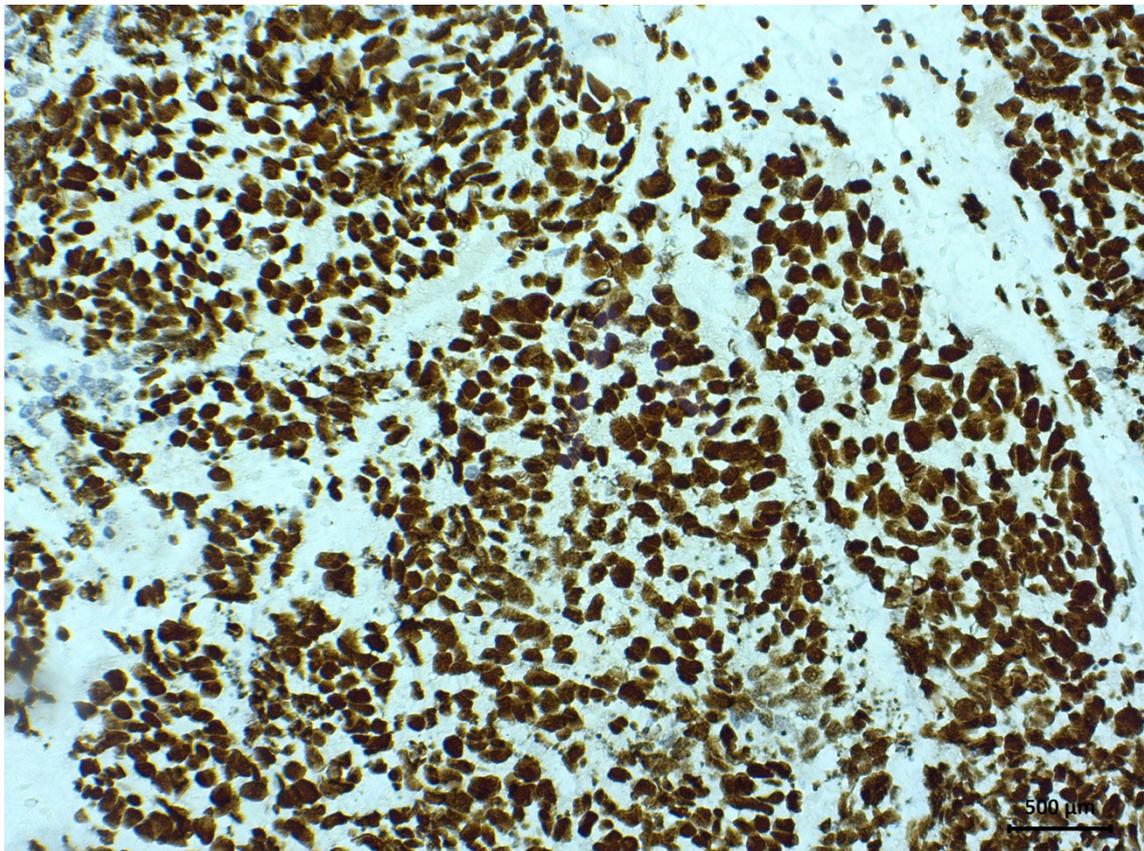


Abbildung 14: Präparat K245/19 mit H3K27ac-Färbung

### 3.4 Immunhistochemische Färbung von KDM6A

Die immunhistochemische Färbung von KDM6A, wie in 2.2.4 erläutert, wurde an denselben acht Präparaten durchgeführt wie die Färbung von H3K27ac, siehe 3.3. Auch hier erfolgte die Einteilung in zytoplasmatisch oder nukleär angefärbt und die Stärke der Färbung in Prozentzahlen von 0 bis 100%. Die Ergebnisse der Färbung sind in Tabelle 12 dargestellt.

**Tabelle 12: Immunhistochemische Färbung von KDM6A/B**

| Präparat                   | KDM6A/B-Färbung                     |
|----------------------------|-------------------------------------|
| K115/15 II+10687/09 (TN21) | 100% zytoplasmatisch<br>0% nukleär  |
| K654/15 = H90087/09 (TN22) | 100% zytoplasmatisch<br>0% nukleär  |
| K932/17 = R739/16 (TN23)   | 100% zytoplasmatisch<br>0% nukleär  |
| K929/17 = R50078/11 (TN24) | 50% zytoplasmatisch<br>5% nukleär   |
| K930/17 = R191/07 (TN25)   | 100% zytoplasmatisch<br>50% nukleär |
| K245/19                    | 100% zytoplasmatisch<br>50% nukleär |
| K345/19                    | 100% zytoplasmatisch<br>0% nukleär  |
| K558/19                    | 100% zytoplasmatisch<br>30% nukleär |

Als Beispiel für die Färbung von KDM6A ist das Präparat K654/15 = H90087/09 (TN22) in Abbildung 15 zu sehen.

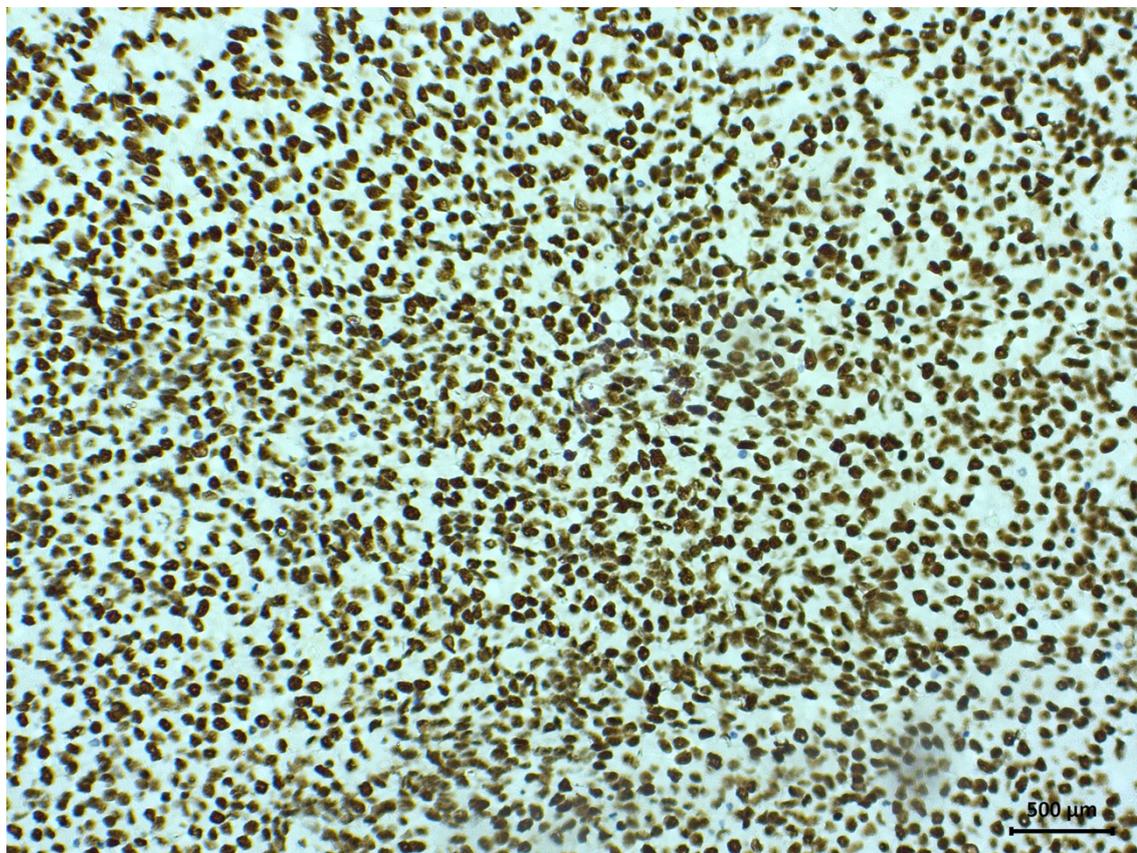


Abbildung 15: Präparat K654/15 = H90087/09 (TN22) mit KDM6A-Färbung

### 3.5 Immunhistochemische Färbung EZH2

Für die Immunhistochemische Färbung von EZH2 wurden ebenso acht LCNEC-Präparate angefärbt. Die Vorgehensweise ist in 2.2.4 beschrieben. Die Einteilung der Auswertung erfolgte auf einer Skala von eins bis drei, die sich auf die Intensität der Färbung bezieht und in Prozente von 0 bis 100%, die sich auf den Anteil der angefärbten Zellen bezieht. Die Ergebnisse könne der Tabelle 13 entnommen werden.

Tabelle 13: Immunhistochemische Färbung von EZH2

| Präparat                   | EZH2-Färbung |
|----------------------------|--------------|
| 11/1239 (TN20)             | 2 : 25       |
| K115/15 II+10687/09 (TN21) | 1 : 50       |
| K654/15 = H90087/09 (TN22) | 2 : 25       |
| K932/17 = R739/16 (TN23)   | 2 : 25       |
| K929/17 = R50078/11 (TN24) | 1 : 10       |

| Präparat                 | EZH2-Färbung |
|--------------------------|--------------|
| K930/17 = R191/07 (TN25) | 2 : 30       |
| K245/19                  | 3 : 100      |
| K345/19                  | 2 : 90       |

In Abbildung 16 kann man beispielhaft die Färbung des Präparates K245/19 sehen.

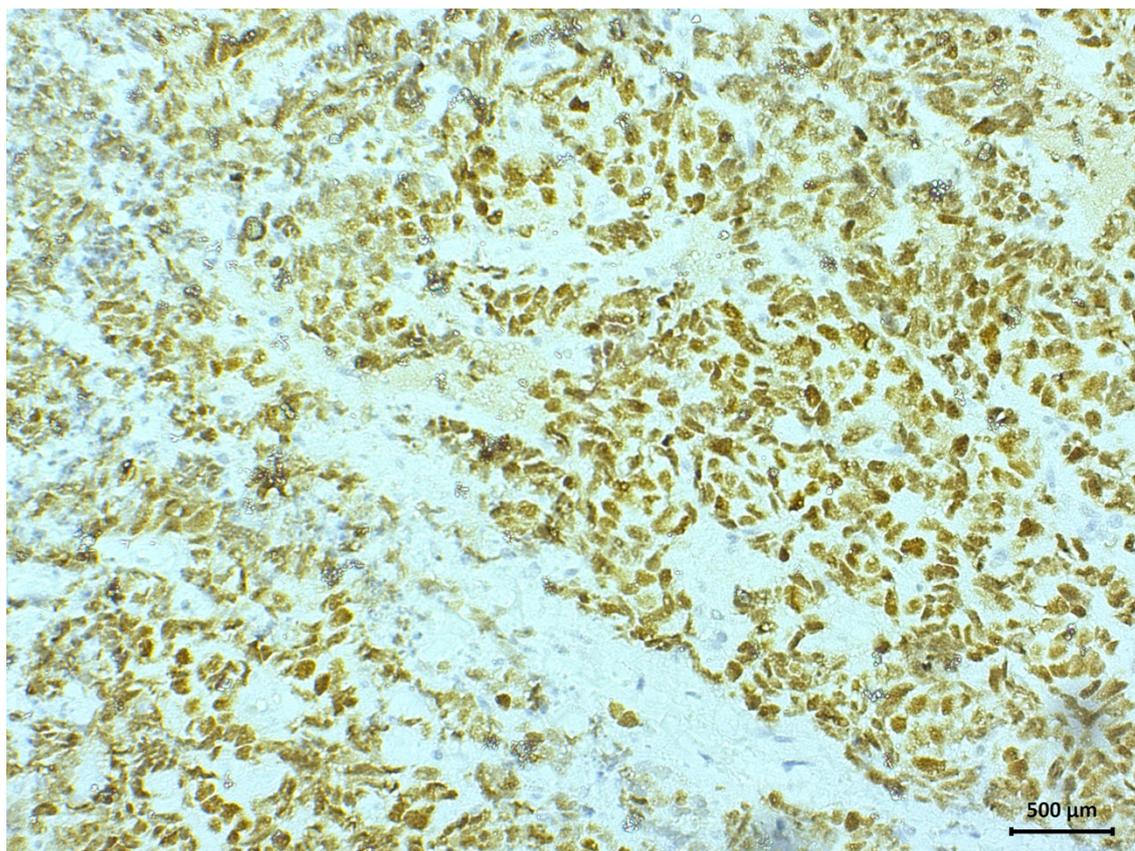


Abbildung 16: Präparat K245/19 mit EZH2-Färbung

### 3.6 Immunhistochemische Färbung H3K27me3

Die Einteilung sowie die Präparate der Färbung von H3K27me3 entsprechen denen der Färbung von EZH2, die in 3.5 beschrieben sind. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 aufgezeigt.

Tabelle 14: Immunhistochemische Färbung von H3K27me3

| Präparat                   | H3K27me3-Färbung |
|----------------------------|------------------|
| 11/1239 (TN20)             | 1 : 50           |
| K115/15 II+10687/09 (TN21) | 1 : 50           |
| K654/15 = H90087/09 (TN22) | 0                |

| Präparat                   | H3K27me3-Färbung |
|----------------------------|------------------|
| K932/17 = R739/16 (TN23)   | 3 : 100          |
| K929/17 = R50078/11 (TN24) | 3 : 80           |
| K930/17 = R191/07 (TN25)   | 3 : 100          |
| K245/19                    | 3 : 100          |
| K345/19                    | 3 : 100          |

Zur Veranschaulichung sieht man in Abbildung 17 die Färbung von H3K27me3 beim Präparat K932/17 = R739/16 (TN23).

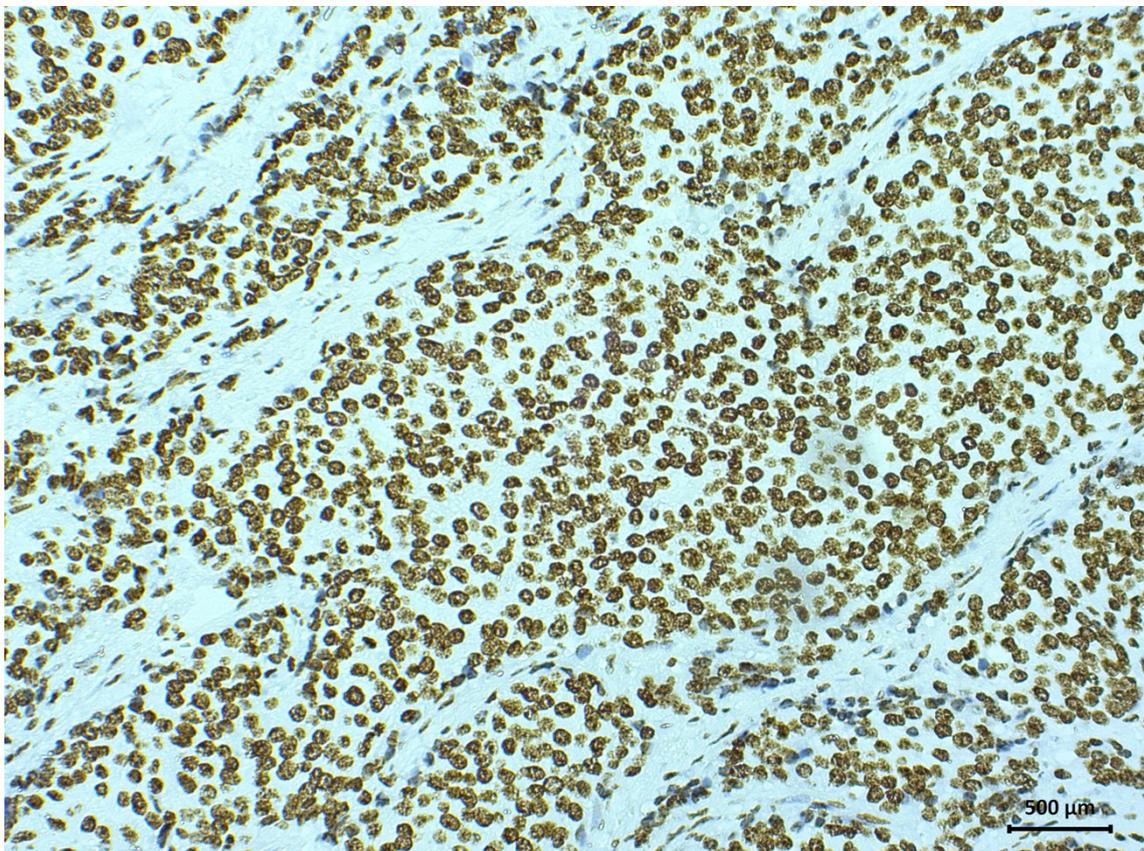


Abbildung 17: Präparat K932/17 = R739/16 (TN23) mit H3K27me3-Färbung

### 3.7 Ergebnisübersicht

Um die Färbungen in einen Kontext setzen zu können, sind sie alle in Tabelle 15 zusammengefasst.

**Tabelle 15: Ergebnisübersicht der Färbungen von LCNECs**

| Präparat                   | NET-G3 | EZH2    | H3K27me3 | KDM6A nukleär | KDM6A zytoplasmatisch | H3K27ac nukleär | H3K27ac zytoplasmatisch |
|----------------------------|--------|---------|----------|---------------|-----------------------|-----------------|-------------------------|
| 11/1239 (TN20)             | ja     | 2 : 25  | 1 : 50   | *             | *                     | *               | *                       |
| K115/15 II+10687/09 (TN21) | nein   | 1 : 50  | 1 : 50   | 0%            | 100%                  | 100%            | 0%                      |
| K654/15 = H90087/09 (TN22) | ja     | 2 : 25  | 0        | 0%            | 100%                  | 100%            | 0%                      |
| K932/17 = R739/16 (TN23)   | ja     | 2 : 25  | 3 : 100  | 0%            | 100%                  | 100%            | 0%                      |
| K929/17 = R50078/11 (TN24) | ja     | 1 : 10  | 3 : 80   | 5%            | 50%                   | 100%            | 0%                      |
| K930/17 = R191/07 (TN25)   | nein   | 2 : 30  | 3 : 100  | 50%           | 100%                  | 80%             | 0%                      |
| K245/19                    | *      | 3 : 100 | 3 : 100  | 50%           | 100%                  | 100%            | 0%                      |
| K345/19                    | *      | 2 : 90  | 3 : 100  | 0%            | 100%                  | 100%            | 0%                      |
| K558/19                    | *      | *       | *        | 30%           | 100%                  | 100%            | 0%                      |

\*nicht genügend Material verfügbar

Wie in Tabelle 15 gezeigt, korrelierte EZH2 in den meisten Fällen nicht mit H3K27me3, vor allem nicht bei den als NET-G3 klassifizierten Präparaten. Eine Korrelation war lediglich bei den Präparaten K115/15 II+10687/09 (TN21), K245/19 und K345/19 zu sehen, von denen keines als NET-G3 klassifiziert wurde. Eine Erklärung für diese Diskrepanz von EZH2 und der Trimethylierung von H3K27 bei NET-G3s konnten leider weder die Gen-

sequenzierungen noch die KDM6A-Färbungen oder die H3K27ac-Färbungen geben.

Die Präparate K115/15 II+10687/09 (TN21), K654/15 = H90087/09 (TN22), K932/17 = R739/16 (TN23), K929/17 = R50078/11 (TN24) und K930/17 = R191/07 (TN25) wurden alle negativ auf Mutationen im H3K27me<sub>3</sub>- und EED-Lokus sequenziert, wie bereits in 3.1 und 3.2 erwähnt. Die Diskrepanz zwischen der EZH2-Expression und der Trimethylierung von H3K27 ist demnach nicht mutationsbedingt.

Die Färbungen von KDM6A waren nukleär nur selten positiv, dafür aber zytoplasmatisch ausschließlich positiv, siehe Tabelle 15. Ausschlaggebend sind jedoch nur die nukleären Färbungen, da KDM6A seine Demethylierungsfunktion im Nukleus ausübt. Grundsätzlich konnte die angenommene Korrelation zwischen den KDM6A- und H3K27me<sub>3</sub>-Färbungen nicht nachgewiesen werden. Denn einerseits war die H3K27me<sub>3</sub>-Färbung der Präparate K932/17 = R739/16 (TN23) und K345/19 stark positiv und die KDM6A-Färbung negativ, was die Hypothese einer direkten Wechselwirkung der KDM6A-Aktivität und der Trimethylierung noch nicht ausschließt. Andererseits waren jedoch die Präparate K930/17 = R191/07 (TN25) und K245/19 sowohl KDM6A-, als auch H3K27me<sub>3</sub>-positiv. Deshalb kann geschlossen werden, dass die Demethylase KDM6A keinen signifikanten Einfluss auf den Trimethylierungsprozess von H3K27 hat.

Die H3K27ac-Färbungen waren bei allen Präparaten nukleär stark positiv und zytoplasmatisch negativ, siehe Tabelle 15. Der hohe Anteil an H3K27me<sub>3</sub>-positiv und gleichzeitig H3K27ac-positiv gefärbten Zellen, wie zum Beispiel bei dem Präparat K932/17 = R739/16 (TN23) widerspricht der Erwartung, dass Histonenden entweder methyliert oder acetyliert sein können. Deshalb kann auch die vermehrte Acetylierung von H3K27 als Grund für die Diskrepanz zwischen EZH2 und der Trimethylierung von H3K27 ausgeschlossen werden.

## 4 Diskussion

Die Seltenheit von neuroendokrinen Thymustumoren macht klinische Studien, die zu präziseren Klassifikationen oder zur Erklärung der Entstehung beitragen, fast unmöglich. Dinter et al. (2019) konnten jedoch in einer Studie zeigen, dass die WHO-Klassifikation von TNETs, die sich stark an der Klassifikation von PNETs orientiert, einige Lücken aufweist. Die bis dahin geltende Klassifikation unterteilte TNETs in *low-grade* TCs, *intermediate-grade* ACs und in *high-grade* LCNECs oder SCCs. Vor allem bei der Einteilung der LCNECs war es durch Unstimmigkeiten schwierig die Einordnung mancher Tumore vorzunehmen. Es wurde daher vorgeschlagen, einen *low-/intermediate-grade* NET-G3 Subtyp einzuführen. NET-G3s weisen im Vergleich zu LCNECs eine karzinoide Morphologie auf, zeigen histologisch eine Positivität für Chromogranin und eine negative Färbung von EZH2. EZH2 ist eine Histonmethyltransferase, die eine epigenetisch wichtige Histonmodifikation, nämlich die Methylierung von H3K27, katalysiert. EZH2 ist bei LCNECs normalerweise überexprimiert und lässt eine gleichzeitige Methylierung von H3K27 erwarten. Interessanterweise traf das nicht in allen Fällen zu und die H3K27-Methylierung korrelierte nicht mit der EZH2-Expression.

Zur Erklärung der beobachteten differentiellen Methylierung von H3K27 können mehrere Hypothesen in Betracht gezogen werden. Die naheliegendste wäre eine Mutation im *H3K27*-Gen. Es wurde 2013 bereits bei *pediatric high-grade gliomas* (pHGGs) die H3K27M-Mutation detektiert. Bei dieser Mutation wird der Lysinrest von H3 durch einen Methioninrest ausgetauscht. Die K27M-Mutante von H3 führt zu einer veränderten Bindung an den PRC2-Komplex und inhibiert die enzymatische Aktivität von EZH2. Deshalb ist trotz einer hohen EZH2-Expression nur eine niedrige oder gar keine H3K27-Methylierung nachweisbar (Bender et al. 2013). Im Rahmen dieser Dissertation wurde das *H3K27*-Gen von PNET- und TNET-Präparaten auf die H3K27M-Mutation mittels Sanger-Sequenzierung untersucht, es wurde jedoch in keinem der Präparate eine Mutation nachgewiesen. Nicht nur die TNET-, sondern auch die PNET-Präparate auf die H3K27M-Mutation zu untersuchen hatte neben dem Erzielen von Vergleichswerten auch noch einen anderen Hintergrund. Denn etwa 50% der pHGG-Tumorgenese beruhen auf einer H3.3-Mutante (Bender et al. 2013). Bei TNETs sowie bei PNETs wurde bisher noch kein eindeutiger Grund für die Entstehung der Tumore gefunden, außer bei Patienten, die unter dem MEN-1-Syndrom leiden. Deshalb war es interessant die Möglichkeit auszuschließen, dass nicht nur bei pHGGs, sondern auch bei TNETs und PNETs eine Mutation von H3K27 ausschlaggebend für die Tumorgenese sein kann.

Eine weitere Hypothese zur Erklärung der Diskrepanz zwischen der EZH2-Aktivität und dem Level methylierter H3K27 ist die Regulation der Demethylase KDM6A/B. Bei einer erhöhten Aktivität der HDMT kommt es zu niedrigen H3K27me<sub>3</sub>-Spiegeln und bei einer verminderten Aktivität zu erhöhter H3K27-Methylierung. Die Aktivität der Demethylase wurde in dieser Dissertation über eine immunhistochemische Färbung bestimmt. KDM6A

konnte in jedem untersuchten LCNEC-Präparat zytoplasmatisch nachgewiesen werden, jedoch nur in einigen nukleär (Tabelle 12). Gewertet wurden nur die Kernfärbungen, da Histonmodifikationen, wie die Demethylierung von H3K27, ausschließlich im Zellkern stattfinden. Deshalb stellte sich die Frage, wieso das Protein sowohl zytoplasmatisch als auch nukleär angefärbt werden konnte. Erklärungsansätze hierfür könnten sein, dass entweder der Transport von KDM6A in den Nukleus oder die Färbung nicht einwandfrei funktionierten.

Weiterhin war zu sehen, dass die nukleäre KDM6A-Färbung in Tabelle 12 sehr stark variierte und häufig bei 0% lag. Eine Erklärung für das Nicht-Anfärben von KDM6A in einigen Präparaten könnte auch wieder auf eine Mutation zurückzuführen sein. In einer Studie von van Haften et al. (2009) versuchte man den Mechanismus der H3K27me<sub>3</sub>-Markerentfernung und der damit verbundenen Genaktivierung besser zu verstehen. Dabei stieß man während Untersuchungen von UTX und JMJD3 bereits auf Mutationen in UTX, beziehungsweise KDM6A. In verschiedenen Tumorarten, wie zum Beispiel in multiplen Myelomen oder Nierentumoren, wurden somatische Mutationen von UTX entdeckt. In den entsprechenden Tumorzellen stieg die Methylierung von H3K27 durch das nicht funktionsfähige UTX stark an, was eine erhöhte Zellproliferation zur Folge hatte. Nach dem Zuführen von funktionsfähigem UTX konnte ein sinkender H3K27me<sub>3</sub>-Spiegel und eine damit verbundene reduzierte Zellproliferation der Krebszellen beobachtet werden. Stark erhöhte H3K27me<sub>3</sub>-Expressionen bei einer Nicht-Färbung von KDM6A waren bei Präparat K932/17 = R739/16 (TN23) und K345/19 (Tabelle 12) zu sehen. Bei Präparat K932/17 = R739/16 (TN23) sogar trotz relativ niedriger EZH2-Aktivität. Hier kann vermutet werden, dass trotz der geringen EZH2-Aktivität der hohe H3K27me<sub>3</sub>-Spiegel durch den fehlenden Antagonisten, nämlich KDM6A, zustande kam. Um abschließend zu klären, ob die fehlende Positivität von KDM6A tatsächlich auf einer Mutation beruht, könnte eine Gensequenzierung der Demethylase vorgenommen werden.

In diffus-großzelligen-B-Zell-Lymphomen wurden aktivierende Mutationen in EZH2 beschrieben, die einen erhöhten H3K27me<sub>3</sub>-Spiegel zur Folge hatte. Durch den erhöhten H3K27me<sub>3</sub>-Spiegel wurden vermehrt Tumorsuppressorgene sowie Gene, die in der B-Zell-Differenzierung involviert sind, reprimiert (Hsu et al. 2020). Präparat K930 fiel durch eine 100%-ige H3K27me<sub>3</sub>-Positivität trotz einer 30%-igen EZH2-Aktivität auf. Weiterhin lag die KDM6A-Aktivität sogar bei 50%, weshalb eigentlich eine deutlich geringere Prozentzahl der angefärbten H3K27me<sub>3</sub> zu erwarten war. In diesem Präparat könnte solch eine aktivierende Mutation in EZH2 vorliegen. Mutierte EZH2 können durch immunhistochemische Färbungen standardmäßig nicht erfasst werden, wodurch eine Dunkelziffer entsteht, die den hohen H3K27me<sub>3</sub>-Spiegel erklären könnte. Dasselbe galt auch für das Präparat 11/1239 (TN20), bei welchem der H3K27me<sub>3</sub>-Spiegel doppelt so hoch wie der von EZH2 war. Um abschließend zu klären, ob eine aktivierende Mutation im *EZH2*-Gen vorhanden ist, könnte auch hier eine Gensequenzierung in Betracht gezogen werden.

Immunhistologische Färbungen von H3K27me3 und EZH2 waren notwendig, da nur einige der untersuchten Präparate bereits in Experimenten von Dinter et al. (2019) auf H3K27me3 und EZH2 angefärbt wurden. Hierzu gehörten die Präparate 11/1239 (TN20), K115/15 (TN21) und K654/15 (TN22). Für H3K27me3 und EZH2 wurden in der Studie von Dinter et al. (2019) fast gleiche Werte erzielt wie in dieser Dissertation. Vor allem auffällig war in beiden Studien das Präparat K654/15 (TN22), da hier eine EZH2-Aktivität von 25%, jedoch überhaupt kein H3K27me3 nachgewiesen werden konnte (Tabelle 15). Leider konnte zur Erklärung dieses Ergebnisses keine der untersuchten Hypothesen eine Antwort geben. Eine H3K27M Mutation konnte nicht bestätigt werden, weshalb eine Mutation in einer anderen Untereinheit als EZH2 des PRC2 vermutet wurde. Deswegen wurde vier Exone der Untereinheit EED, in denen bereits Mutationen gefunden wurden, sequenziert (Ueda et al. 2012). Jedoch wies auch hier keines der untersuchten Präparate eine Mutation auf. Bei der KDM6A-Färbung war das Präparat TN22 ebenso aus der Reihe gefallen, da hier keine Färbung möglich war. Ergänzend zu dem Nichtvorkommen von methylierten H3K27 passt jedoch, dass H3K27ac zu 100% angefärbt werden konnte.

Insgesamt waren die H3K27ac-Färbungen jedoch zunächst verwunderlich, da fast alle Färbungen bei 100% lagen. In einer Studie von Narlikar et al. (2002) konnte gezeigt werden, dass normalerweise 13 von 30 Lysinenden in einem Histonoktamer acetyliert sind, was im Widerspruch zu den vorgenommenen Färbungen steht. Weiterhin erstaunlich war, dass in einigen Präparaten sowohl der H3K27ac- als auch der H3K27me3-Spiegel hoch war. Normalerweise ist ein H3K27me3-Verlust automatisch mit einem reziproken H3K27ac Anstieg in Verbindung zu bringen und umgekehrt (Lavarone et al. 2019). Jedoch ließen die Ergebnisse zu der Annahme führen, dass eine Histonmodifikation nicht automatisch eine andere ausschließt.

In einigen Präparaten konnte die erwartete Diskrepanz zwischen EZH2 und H3K27me3 gezeigt werden, in anderen nicht. In den Präparaten, in denen die Diskrepanz gezeigt werden konnte, waren die anderen untersuchten Parameter unterschiedlich ausgeprägt und ließen keine gemeinsame Schlussfolgerung zu. Deshalb kann spekuliert werden, dass es eventuell eine weitere Variable gibt, die in der Methylierung von H3K27 eine wichtige Rolle spielt, jedoch bis jetzt noch nicht ausreichend beleuchtet wurde.

Es ist zum Beispiel bekannt, dass die Aktivität von EZH2 maßgeblich durch den Metabolismus beeinflusst wird. EZH2 benötigt S-Adenosyl-Methionin (SAM), um eine Methioningruppe auf H3K27 zu übertragen. Die SAM-Levels werden stark beeinflusst durch die Ernährung. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Methylierungen abhängig sind von der Verfügbarkeit, beziehungsweise der Aufnahme verschiedener Nährstoffe (Serefidou et al. 2019). Beispielsweise resultiert eine verringerte Nahrungsaufnahme von Folsäure in einer gesteigerten EZH2-Expression (Yang et al. 2018). Jedoch kann auch der Metabolismus der einzelnen Zelle ausschlaggebend sein. Es wurde beispielsweise in einer Studie von Serresi et al. (2018) gezeigt, dass bei *kras-driven non-small-cell lung cancers* durch einen erhöhten Metabolismus der Zellen EZH2 überexprimiert ist.

Die aufgetretenen Unstimmigkeiten in den Ergebnissen können weiterhin auf das kleine Patientenkollektiv zurückzuführen sein. Da TNETs jedoch sehr selten sind ist es schwierig größere Patientenkollektive zu untersuchen.

Zu beachten ist auch, dass ein Großteil der untersuchten LCNECs in der Studie von Dinter et al. (2019) als NET-G3s klassifiziert wurden (Tabelle 15). NET-G3s können eine hohe Ähnlichkeit mit TCs aufweisen, weshalb hier abweichende Werte für die untersuchten Parameter zu erwarten sind. Darüber hinaus ist die LCNEC-Einteilung auch die schwierigste aller vier Subtypen und häufig nicht eindeutig zu treffen, da LCNECs in vielen Bereichen Überschneidungen mit sowohl ACs, als auch SCCs aufweisen (Dinter et al. 2019). In einer weiteren Studie wurde davon ausgegangen, dass LCNECs sich aus ACs entwickeln können (Fabbri et al. 2017). Die Grenzen der WHO-Klassifikation sprechen dafür, dass LCNECs ein Spektrum heterogener Tumoren mit verschiedenen Prognosen darstellen, weshalb es umso wichtiger erscheint molekulare Parameter zu untersuchen, um eine genauere Klassifikation zu ermöglichen (Ströbel et al. 2014).

Vor allem molekulare Parameter wie Histonmodifikationen weiterhin zu beleuchten, erscheint sinnvoll, da die Methylierung und Acetylierung von Histonen in der Medizin an Relevanz gewinnen und im Zusammenhang mit der Epigenetik von sich entwickelnden und progressierenden Tumoren immer mehr in den Vordergrund rücken. Inzwischen wird ein Modell vorgeschlagen, in dem die Gesamtheit der Histonmodifikationen eine interaktive Oberfläche für andere Proteine bildet. Die interagierenden Proteine übersetzen dann den „Histoncode“ in ein Genexpressionsmuster. Diese Genexpressionsmuster sind für unterschiedliche Tumorarten spezifisch und könnten das Ziel einer Tumorthherapie darstellen (Ehrenhofer-Murray 2004). Zur Untersuchung der spezifischen Genexpressionsmuster werden verschiedene Biomarker detektiert, die anschließend in Korrelation mit Eigenschaften des Tumors gesetzt werden. Ein relevanter Biomarker ist unter anderem EZH2, da eine EZH2-Überexprimierung bereits mit einer erhöhten Aggressivität verschiedener Tumorarten in Verbindung gebracht werden konnte. Nicht nur bei TNETs, sondern beispielsweise auch bei malignen Melanomen und multiformen Glioblastomen (Bachmann et al. 2006; Zhang et al. 2015). Ebenso ist EZH2 in Tumorzellen besonders aggressiver Brustkrebsformen stark erhöht und wird zur Früherkennung verwendet, wodurch die Prognose und die Überlebenschance eines Patienten besser getroffen werden kann. Außerdem wurde herausgefunden, dass niedrige EZH2-Spiegel zu einer verminderten Proliferation von Brustkrebszellen führt (Gonzalez et al. 2009; Kleer et al. 2003). Dieses Erkenntnis ist dahingehend entscheidend, dass in der Tumorthherapie EZH2-Inhibitoren angewendet werden können. Es gibt beispielsweise PRC2-Inhibitoren, die an die allosterische Seite von EED binden, welche für die Rekrutierung zum Histon und die Aktivierung von EZH2 zuständig ist (Hsu et al. 2020). Weiterhin ist EED auch dafür zuständig bereits vorhandene H3K27me3 zu identifizieren und eine positive Feedback-Schleife aufrecht zu erhalten (Kaneko et al. 2013). Durch eine Tumorthherapie, in welcher

PRC2 inhibiert wird, kann also die Proliferation von Krebszellen mancher Tumorarten vermindert werden. Dieses Vorgehen könnte auch für LCNECs interessant sein.

Zusammenfassend haben wir in einem kleinen Kollektiv von LCNECs, beziehungsweise NET-G3s zeigen können, dass die Diskrepanz zwischen erhöhter EZH2-Expression und differentieller H3K27-Methylierung weder auf einer Mutation in Histon H3 (H3K27M) oder EED, noch auf einer verstärkten Expression von KDM6A oder übermäßigen Acetylierung von H3K27 basiert. Da die Methylierung von H3K27 mit einer schlechteren Prognose einhergeht, wäre es zukünftig wichtig den molekularen Hintergrund besser zu verstehen, um klinisch und therapeutisch spezifischer Aussagen treffen zu können.

## 5 Zusammenfassung

Neuroendokrine Thymustumore stellen nur 0,4% aller neuroendokriner Tumoren und sind somit sehr selten. Es werden von der WHO vier Subtypen klassifiziert. Ein *high-grade* Subtyp ist das *large cell neuroendocrine carcinoma*, das sich durch seine hohe Expression von *enhancer zeste homolog 2* hervorhebt. *Enhancer zeste homolog 2* ist ein Enzym, das die Methylierung des 27. Lysinrests des Histons drei katalysieren kann. In vorherigen Forschungen zu einer neuen morphomolekularen Einteilung neuroendokriner Thymustumore ist aufgefallen, dass es Diskrepanzen zwischen den *enhancer zeste homolog 2* und dem methylierten Histon bei *large cell neuroendocrine carcinoma* gab. Für dieses Phänomen sollte in der Dissertation eine Erklärung gefunden werden. Weiterhin wurde in der neuen morphomolekularen Einteilung ein weiterer Subtyp klassifiziert, nämlich NET-G3. NET-G3s ähneln morphologisch stark den *large cell neuroendocrine carcinoma*, haben jedoch keinen *enhancer zeste homolog 2* Marker und sind nicht rein maligne. Durch die erhaltenen Ergebnisse sollte unter anderem eine bessere Einteilung in NET-G3 oder *large cell neuroendocrine carcinoma* möglich sein.

Um die differentielle Methylierung von H3K27 zu erklären, wurden verschiedene Parameter untersucht, die die Methylierung beeinflussen können. Hierfür wurden Sanger-Sequenzierungen der Gene, die für den 27. Lysinrest des Histons drei und für eine Untereinheit von *polycomb repressive complex 2*, *embryonic ectoderm development*, codiert, sequenziert, um mögliche Mutationen aufzudecken. Bei keinem der untersuchten Präparate von neuroendokrinen Lungen- und Thymustumoren war eine Mutation nachweisbar. Weiterhin wurden immunhistochemische Färbungen von H3K27ac, der Demethylase KDM6A, *enhancer zeste homolog 2* und H3K27me3 vorgenommen. Die Färbungen ließen leider keine Korrelation der unterschiedlichen untersuchten Parameter zu, die die Diskrepanz zwischen den vorkommenden Leveln von *enhancer zeste homolog 2* und H3K27me3 erklären oder eine bessere Einteilung von NET-G3s ermöglichen.

Vermutlich liegen die Unstimmigkeiten zum einem an dem kleinen Patientenkollektiv, das durch die Seltenheit neuroendokriner Thymustumoren bedingt ist. Zum anderen spielt wohl eine weitere Variable, die in den Untersuchungen nicht berücksichtigt wurde, eine wichtige Rolle. Der Metabolismus kann beispielsweise für variierende Aktivitäten von *enhancer zeste homolog 2* verantwortlich gemacht werden.

Es ist jedoch weiterhin relevant *enhancer zeste homolog 2* zu erforschen, da es in unterschiedlichen Tumorarten stark erhöht ist und in manchen Fällen eine Tumorthherapie in Form von *enhancer zeste homolog 2*-Inhibitoren geeignet ist.

## 6 Literaturverzeichnis

Agger K, Cloos PAC, Christensen J, Pasini D, Rose S, Rappsilber J, Issaeva I, Canaani E, Salcini AE, Helin K (2007): UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. *Nature* 449, 731–734

Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE (1964): Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc Natl Acad* 51, 786–794

Audia JE, Campbell RM (2016): Histone Modifications and Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8, a019521

Bachmann IM, Halvorsen OJ, Collett K, Stefansson IM, Straume O, Haukaas SA, Salvesen HB, Otte AP, Akslen LA (2006): EZH2 Expression Is Associated With High Proliferation Rate and Aggressive Tumor Subgroups in Cutaneous Melanoma and Cancers of the Endometrium, Prostate, and Breast. *J Clin Oncol* 24, 268–273

Bannister AJ, Kouzarides T (2011): Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* 21, 381–395

Bender S, Tang Y, Lindroth AM, Hovestadt V, Jones DTW, Kool M, Zapatka M, Northcott PA, Sturm D, Wang W, et al. (2013): Reduced H3K27me3 and DNA Hypomethylation Are Major Drivers of Gene Expression in K27M Mutant Pediatric High-Grade Gliomas. *Cancer Cell* 24, 660–672

Brower-Toland B, Wacker DA, Fulbright RM, Lis JT, Kraus WL, Wang MD (2005): Specific Contributions of Histone Tails and their Acetylation to the Mechanical Stability of Nucleosomes. *J Mol Biol* 346, 135–146

Davie JR, Chadee DN (1998): Regulation and regulatory parameters of histone modifications. *J Cell Biochem Suppl* 30–31, 203–213

Dinter H, Bohnenberger H, Beck J, Bornemann-Kolatzki K, Schütz E, Küffer S, Klein L, Franks TJ, Roden A, Emmert A, et al. (2019): Molecular Classification of Neuroendocrine Tumors of the Thymus. *J Thorac Oncol* 14, 1472–1483

Ehrenhofer-Murray AE (2004): Chromatin dynamics at DNA replication, transcription and repair. *Eur J Biochem* 271, 2335–2349

Estarás C, Fueyo R, Akizu N, Beltrán S, Martínez-Balbás MA (2013): RNA polymerase II progression through H3K27me3-enriched gene bodies requires JMJD3 histone demethylase. *Mol Biol Cell* 24, 351–360

Fabbri A, Cossa M, Sonzogni A, Bidoli P, Canova S, Cortinvis D, Abbate MI, Calabrese F, Nannini N, Lunardi F, et al. (2017): Thymus neuroendocrine tumors with CTNNB1 gene mutations, disarrayed  $\beta$ -catenin expression, and dual intra-tumor Ki-67 labeling index compartmentalization challenge the concept of secondary high-grade neuroendocrine tumor: a paradigm shift. *Virchows Arch* 471, 31–47

- Filosso PL, Ruffini E, Solidoro P, Roffinella M, Lausi PO, Lyberis P, Oliaro A, Guerrera F (2017): Neuroendocrine tumors of the thymus. *J Thorac Dis* 9, S1484–S1490
- Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K, et al. (2005): Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet* 37, 391–400
- Gaude G, Hattiholi V, Hattiholi J, Malur P (2013): Primary neuroendocrine carcinoma of the thymus. *Niger Med J* 54, 68
- Gonzalez ME, Li X, Toy K, DuPrie M, Ventura AC, Banerjee M, Ljungman M, Merajver SD, Kler CG (2009): Downregulation of EZH2 decreases growth of estrogen receptor-negative invasive breast carcinoma and requires BRCA1. *Oncogene* 28, 843–853
- Hsu JHR, Rasmuson T, Robinson J, Pacht F, Read J, Kawatkar S, O' Donovan DH, Bagal S, Code E, Rawlins P, et al. (2020): EED-Targeted PROTACs Degrade EED, EZH2, and SUZ12 in the PRC2 Complex. *Cell Chem Biol* 27, 41-46.e17
- Jenuwein T (2001): Translating the Histone Code. *Science* 293, 1074–1080
- Kaneko S, Son J, Shen SS, Reinberg D, Bonasio R (2013): PRC2 binds active promoters and contacts nascent RNAs in embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol* 20, 1258–1264
- Khorasanizadeh S (2004): The Nucleosome. *Cell* 116, 259–272
- Kler CG, Cao Q, Varambally S, Shen R, Ota I, Tomlins SA, Ghosh D, Sewalt RGAB, Otte AP, Hayes DF, et al. (2003): EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci* 100, 11606–11611
- Lavarone E, Barbieri CM, Pasini D (2019): Dissecting the role of H3K27 acetylation and methylation in PRC2 mediated control of cellular identity. *Nat Commun* 10, 1679
- Lee W, Teckie S, Wiesner T, Ran L, Prieto Granada CN, Lin M, Zhu S, Cao Z, Liang Y, Sboner A, et al. (2014): PRC2 is recurrently inactivated through EED or SUZ12 loss in malignant peripheral nerve sheath tumors. *Nat Genet* 46, 1227–1232
- Martin C, Zhang Y (2007): Mechanisms of epigenetic inheritance. *Curr Opin Cell Biol* 19, 266–272
- Müller J, Hart CM, Francis NJ, Vargas ML, Sengupta A, Wild B, Miller EL, O'Connor MB, Kingston RE, Simon JA (2002): Histone Methyltransferase Activity of a Drosophila Polycomb Group Repressor Complex. *Cell* 111, 197–208
- Narlikar GJ, Fan H-Y, Kingston RE (2002): Cooperation between Complexes that Regulate Chromatin Structure and Transcription. *Cell* 108, 475–487
- Phan AT, Öberg K, Choi J, Harrison LH, Hassan MM, Strosberg JR, Krenning EP, Kocha W, Woltering EA, Maples WJ (2010): NANETS Consensus Guideline for the Diagnosis and Management of Neuroendocrine Tumors: Well-Differentiated Neuroendocrine Tumors of

- the Thorax (Includes Lung and Thymus). *Pancreas* 39, 784–798
- Pollina EA, Brunet A (2011): Epigenetic regulation of aging stem cells. *Oncogene* 30, 3105–3126
- Rosai J, Higa E (1972): Mediastinal endocrine neoplasm, of probable thymic origin, related to carcinoid tumor. Clinicopathologic study of 8 cases. *Cancer* 29, 1061–1074
- Sauvageau M, Sauvageau G (2010): Polycomb Group Proteins: Multi-Faceted Regulators of Somatic Stem Cells and Cancer. *Cell Stem Cell* 7, 299–313
- Serefidou M, Venkatasubramani AV, Imhof A (2019): The Impact of One Carbon Metabolism on Histone Methylation. *Front Genet* 10, 764
- Serresi M, Siteur B, Hulsman D, Company C, Schmitt MJ, Liefink C, Morris B, Cesaroni M, Proost N, Beijersbergen RL, et al. (2018): Ezh2 inhibition in Kras-driven lung cancer amplifies inflammation and associated vulnerabilities. *J Exp Med* 215, 3115–3135
- Shi Y (2007): Histone lysine demethylases: emerging roles in development, physiology and disease. *Nat Rev Genet* 8, 829–833
- Shi Y, Wang X, Zhuang Y, Jiang Y, Melcher K, Xu HE (2017): Structure of the PRC2 complex and application to drug discovery. *Acta Pharmacol Sin* 38, 963–976
- Shilatifard A (2006): Chromatin Modifications by Methylation and Ubiquitination: Implications in the Regulation of Gene Expression. *Annu Rev Biochem* 75, 243–269
- Ströbel P, Zettl A, Shilo K, Chuang W-Y, Nicholson AG, Matsuno Y, Gal A, Laeng RH, Engel P, Capella C, et al. (2014): Tumor genetics and survival of thymic neuroendocrine neoplasms: A multi-institutional clinicopathologic study: Genetics of Thymic Neuroendocrine Neoplasms. *Genes Chromosomes Cancer* 53, 738–749
- Thanbichler M, Wang SC, Shapiro L (2005): The bacterial nucleoid: A highly organized and dynamic structure. *J Cell Biochem* 96, 506–521
- Ueda T, Sanada M, Matsui H, Yamasaki N, Honda Z, Shih L-Y, Mori H, Inaba T, Ogawa S, Honda H (2012): EED mutants impair polycomb repressive complex 2 in myelodysplastic syndrome and related neoplasms. *Leukemia* 26, 2557–2560
- van Haften G, Dalglish GL, Davies H, Chen L, Bignell G, Greenman C, Edkins S, Hardy C, O'Meara S, Teague J, et al. (2009): Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase gene *UTX* in human cancer. *Nat Genet* 41, 521–523
- Waddington CH (2012): The Epigenotype. *Int J Epidemiol* 41, 10–13
- Yang A, Jiao Y, Yang S, Deng M, Yang X, Mao C, Sun Y, Ding N, Li N, Zhang M, et al. (2018): Homocysteine activates autophagy by inhibition of CFTR expression via interaction between DNA methylation and H3K27me3 in mouse liver. *Cell Death Dis* 9, 169
- Zhang Junxia, Chen L, Han L, Shi Z, Zhang Jianning, Pu P, Kang C (2015): EZH2 is a

negative prognostic factor and exhibits pro-oncogenic activity in glioblastoma. *Cancer Lett* 356, 929–936

Zhang T, Yang L, Ke Y, Lei J, Shen S, Shao S, Zhang C, Zhu Z, Dang E, Wang G (2020): EZH2-dependent epigenetic modulation of histone H3 lysine-27 contributes to psoriasis by promoting keratinocyte proliferation. *Cell Death Dis* 11, 826

Zhang Y (2001): Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* 15, 2343–2360

## **Danksagung**

Besonders danken möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Philipp Ströbel für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Möglichkeit Einblicke in die Forschung und Laborarbeit zu erhalten. Außerdem gilt mein Dank Stefan Küffer, der mich bei der Erarbeitung meiner Dissertation jederzeit unterstützt hat.

## **Lebenslauf**

Am 25.08.199 kam ich als zweite Tochter von Dr. Dagmar und Dr. Frank-Stephan Kurzen in Berlin auf die Welt. Ich besuchte die Grundschule Niestetal/Kassel und anschließend die Südstadtschule Pforzheim zwischen 2005-2009. Meine Hochschulreife mit einem Englisch-Bilingual-Zertifikat erlangte ich am Reuchlin-Gymnasium Pforzheim von 2009 bis 2017.

Im Jahr 2017 begann ich mein Studium der Zahnmedizin an der Georg-August-Universität-Göttingen aufzunehmen. Das Vorphysikum bestand ich 2018 und die Zahnärztliche Vorprüfung 2020. Voraussichtlich werde ich bis Dezember 2022 meine Zahnärztliche Prüfung ablegen.

Die Dissertation begann ich im Frühjahr 2021 studienbegleitend.