

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

**Die Funktionsanalyse der Caspase-3  
und des *Yes-associated Proteins* in  
epithelialen Thymusneoplasien**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Vincent Otto Lahrmann

aus

Lüneburg

Göttingen 2023

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

### **Betreuungsausschuss**

Betreuer: Prof. Dr. med. P. Ströbel

Ko-Betreuer: Prof. Dr. med. V. Ellenrieder

### **Prüfungskommission**

Referent: Prof. Dr. med. P. Ströbel

Ko-Referent: Prof. Dr. med. V. Ellenrieder

Drittreferent: Prof. Dr. mult. T. Meyer

Datum der mündlichen Prüfung: 09. Februar 2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Die Funktionsanalyse der Caspase-3 und des *Yes-associated Proteins* in epithelialen Thymusneoplasien" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den .....

.....  
(Unterschrift)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Neoplastische Erkrankungen des Thymus.....	1
1.1.1 Entwicklung, Anatomie und Physiologie des Thymus.....	1
1.1.2 Epidemiologie, Klassifikationssysteme und Klinik der Thymusneoplasien .....	2
1.1.3 Übersicht über therapeutische Optionen und Prognose .....	4
1.1.4 Tumorgenetik der Thymusneoplasien .....	5
1.1.5 Etablierte Zellmodelle für Thymus-Neoplasien.....	6
1.2 Caspase-3 im zellulären und onkologischen Kontext .....	7
1.2.1 Die Molekularbiologie und kanonische Funktionen der Caspase-3.....	8
1.2.2 Neuere Implikationen kanonischer Funktionen der Caspase-3.....	9
1.2.3 Non-kanonische Funktionen der Caspase-3 und des apoptotischen Programms.....	10
1.3 YAP in der Onkologie und seine Verbindung mit Caspase-3 .....	11
1.3.1 Das <i>Yes-associated Protein</i> und seine Regulation.....	11
1.3.2 Funktionen von YAP und Beiträge zur Tumorentstehung und -progression.....	14
1.3.3 Das Caspase-3-YAP-Modul .....	16
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	17
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>19</b>
2.1 Chemikalien und Reagenzien .....	19
2.2 Biochemikalien und Enzyme.....	20
2.3 Gebrauchsmaterialien .....	20
2.4 Geräte und Zubehör.....	21
2.5 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme.....	22
2.6 Software .....	22
2.7 Lösungen/Puffer.....	22
2.8 Zellkulturmedien .....	23
2.9 Zelllinien .....	24
2.9.1 Humane Tumorzelllinien .....	24
2.9.2 Sonstige Zelllinien.....	24
2.9.3 Stabil transfizierte Zelllinien.....	25
2.10 Plasmide.....	25
2.11 Antikörper .....	26
2.11.1 Primärantikörper .....	26
2.11.2 Sekundärantikörper.....	27
2.12 Molekularbiologische Methoden .....	27

2.12.1	Gewinnung plasmidischer DNA .....	27
2.12.2	Proteinchemische Techniken .....	28
2.13	Zellbiologische Methoden .....	31
2.13.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen .....	31
2.13.2	Kryokonservierung und Revitalisierung .....	31
2.13.3	Zellkonzentrationsbestimmung .....	31
2.13.4	Viabilitätsassay .....	32
2.13.5	Klonalitätsassay in Methylcellulose .....	32
2.13.6	Transfektion eukaryotischer Zellen mit Plasmid-Vektoren.....	33
2.13.7	Lentivirale Transduktion .....	34
2.13.8	CRISPR/Cas9-vermittelter <i>Knockout</i> .....	35
2.13.9	Konfokale Immunzytofluoreszenz-Mikroskopie .....	36
2.14	Untersuchungen an Patientenmaterial .....	36
2.14.1	Kollektiv der Thymusneoplasien .....	36
2.14.2	Histologische Techniken.....	36
2.14.3	Immunreaktivitäts- <i>Scoring</i> .....	38
2.15	Statistische Analysen.....	39
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>41</b>
3.1	Etablierung geeigneter Zellmodelle.....	41
3.2	Untersuchungen im TAB-1-Modell .....	43
3.2.1	Wachstum der Zellen des TAB-1-Modells in 2D- und 3D-Zellkultur .....	43
3.2.2	YAP-Status im TAB-1-Modell.....	45
3.2.3	Aktivierung der eingebrachten Caspase-3 .....	46
3.3	Untersuchungen im 1889c-Modell.....	47
3.3.1	Wachstum der Zellen des 1889c-Modells in 2D- und 3D-Zellkultur.....	47
3.3.2	YAP-Status im 1889c-Modell.....	49
3.3.3	YAP-attributabler Effekt in der Attenuierung des 1889c-Wachstums durch Caspase-3- <i>Knockout</i> .....	50
3.4	Untersuchungen im Gewebe humaner Thymustumoren .....	51
3.4.1	Beschreibung des Kollektivs der Gewebeproben und YAP-Expression.....	51
3.4.2	Statistische Analysen hinsichtlich Verteilung, Überleben und Myasthenie.....	53
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>57</b>
4.1	Der Einfluss von Caspase-3 auf das Wuchsverhalten in Zellmodellen thymischer Neoplasien.....	57
4.1.1	TAB-1: Wachstum in Abhängigkeit von Caspase-3-Expression .....	58
4.1.2	1889c: Wachstum in Abhängigkeit von Caspase-3-Expression.....	59
4.2	Der Einfluss des Caspase-3-Status auf den YAP-Status und DNA-Schädigung.....	60
4.2.1	TAB-1: YAP-Status, DNA-Doppelstrangbrüche und Stimulationsversuche.....	60
4.2.2	1889c: YAP-Status und seine Relevanz für das Wachstum der Zelllinie .....	62
4.3	Validierung im Gewebe humaner Thymusneoplasien.....	62
4.3.1	YAP-Expression in Thymusneoplasien.....	62
4.3.2	YAP-Effekte in Thymusneoplasien .....	64
4.4	Methodologische Überlegungen .....	65

---

4.5	Synopsis und Perspektiven .....	66
4.5.1	Mögliche Beiträge zur Onkogenese durch Caspase-3 im Thymus.....	67
4.5.2	Validierung des CASP3-YAP-Moduls im onkologischen Kontext.....	68
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>69</b>
<b>6</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>70</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>71</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Pyrosequenzierung von Extrakten der Zelllinien TAB-1 und 1889c. ....	7
Abbildung 1.2: Übersicht über eine Auswahl der Funktionen des apoptotischen Programms...	8
Abbildung 1.3: Regulation der YAP-Aktivität. ....	13
Abbildung 1.4: Übersicht über die Funktionen von YAP im onkologischen Kontext.....	15
Abbildung 1.5: Graphische Darstellung der Teilbereiche der Fragestellung. ....	18
Abbildung 2.1: Klonalitätsassay in Methylcellulose. ....	33
Abbildung 2.2: Übersichtsaufnahme eines mikroskopischen Schnitts eines Stanzzylinders in einem TMA. ....	37
Abbildung 2.3: Immunreaktivitäts- <i>Scoring</i> und Einteilung nach Gruppen. ....	39
Abbildung 3.1: Etablierung geeigneter Zellmodelle.....	41
Abbildung 3.2: Untersuchung des Wachstumsverhaltens des TAB-1-Modells.....	44
Abbildung 3.3: Ermittlung des YAP-Status im TAB-1-Modell. ....	45
Abbildung 3.4: Aktivierung der Caspase-3.....	47
Abbildung 3.5: Untersuchung des Wachstumsverhaltens des 1889c-Modells. ....	48
Abbildung 3.6: YAP-Status im 1889c-Modell.....	49
Abbildung 3.7: Einfluss von YAP- <i>Knockdown</i> auf das Verhalten der 1889c-Zelllinie.....	51
Abbildung 3.8: Immunhistologische Untersuchungen zur YAP-Expression in Thymus- Neoplasien. ....	52
Abbildung 3.9: YAP-Färbung im Normalthymus.....	53
Abbildung 3.10: Statistische Analysen zu Verteilung, Gesamtüberleben und Myasthenie.....	55
Abbildung 6.1: Vergleich eines <i>Panels</i> humaner Zelllinien. ....	70

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Chemikalien und Reagenzien nach Hersteller.....	19
Tabelle 2.2: Biochemikalien und Enzyme nach Hersteller.....	20
Tabelle 2.3: Gebrauchsmaterialien nach Hersteller.....	20
Tabelle 2.4: Geräte und Zubehör nach Hersteller.....	21
Tabelle 2.5: Gebrauchsfertige Reaktionssysteme nach Hersteller.....	22
Tabelle 2.6: Software nach Hersteller.....	22
Tabelle 2.7: Zusammensetzung verwendeter Lösungen und Puffer.....	23
Tabelle 2.8: Auflistung und Zusammensetzung verwendeter Zellkulturmedien.....	23
Tabelle 2.9: Auflistung verwendeter humaner Tumorzelllinien und deren Referenzen.....	24
Tabelle 2.10: Auflistung verwendeter sonstiger und deren Referenzen.....	24
Tabelle 2.11: Stabil transfizierte Zelllinien.....	25
Tabelle 2.12: Plasmide und deren Referenzen.....	25
Tabelle 2.13: Auflistung verwendeter Antikörper und deren Konzentrationen.....	26
Tabelle 2.14: Auflistung verwendeter Sekundärantikörper für <i>Western Blot</i> und Immunfluoreszenz.....	27



## Abkürzungsverzeichnis

2D / 3D	zweidimensional / dreidimensional
ATCC	American Type Culture Collection
bp	<i>Base pair</i> (Basenpaar)
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Bovines Serum Albumin)
CAD	<i>Caspase-activated DNase</i> (Caspase-aktivierte DNase)
CASP	Caspase
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CHX	Cycloheximid
COX-2	Cyclooxygenase-2
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DTN	Digitonin
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
EV	<i>Empty vector</i> (Leervektor)
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> (fetales Kälberserum)
FOXP1	<i>Forkhead box protein N1</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
γH2A.X	γ-phosphoryliertes Histon 2A.X (= Serin-139-posphoryliertes H2A.X)
HIF1	<i>Hypoxia-inducible factor-1</i> (Hypoxie-induzierbarer Faktor-1)
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i> (G-Protein-gekoppelter Rezeptor)
GTF2I	<i>General transcription factor II-I</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HGNC	HUGO Gene Nomenclature Committee
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
HUV-EC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i> (humane Nabelvenen-Endothelzellen)
LATS1/2	<i>Large tumor suppressor kinase 1/2</i>
LB-Medium	<i>Lysogeny broth medium</i>
LMN A/C	Lamin A/C
MG	<i>Myasthenia gravis</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MTS	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium

---

-mut	Mutante
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NF2	Neurofibromin 2
NP-40	Nonyl-Phenoxypolyethoxyethanol
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PGE2	Prostaglandin E2
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RAS	<i>Rat sarcoma</i> -Gen
(m)RNA	<i>(messenger) Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute-1640 (Zellkulturmedium)
RRID	<i>Research resource identifiers</i>
RT	Raumtemperatur
scr	<i>scrambled</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumlaurylsulfat)
shRNA	<i>Small hairpin ribonucleic acid</i>
SP	Spaltprodukt
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TCR	<i>T-cell receptor</i> (T-Zell-Rezeptor)
TEAD	<i>Transcriptional enhancer factor</i>
(c/m)TEC	<i>(cortical/ medullary) Thymic epithelial cell</i> ((kortikale/ medulläre) Thymusepithelzelle)
TET	<i>Thymic epithelial tumor</i>
TMA	<i>Tissue micro array</i>
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TP53	<i>Tumor protein p53</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
WHO	World Health Organisation
wt	Wildtyp
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>
YAP	<i>Yes-associated protein</i>

# 1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit einem speziellen Teilgebiet der Onkologie. In der folgenden Einleitung wird daher in drei Teilen auf die Teilgebiete, aus denen sich die Arbeit entwickelt hat, eingegangen. Hierzu gehören die neoplastischen Erkrankungen des Thymus (Kap. 1.1), eine erweiterte Sicht auf die Rolle der Caspase-3 im onkologischen Kontext (Kap. 1.2) sowie der Co-Aktivatoren der Transkription *Yes-associated Protein* (YAP) (Kap. 1.3). Am Ende der Einleitung wird zusammenfassend dargelegt, welche Fragestellung im Kontext dieser Forschungsfelder untersucht wurde (Kap. 1.4).

## 1.1 Neoplastische Erkrankungen des Thymus

### 1.1.1 Entwicklung, Anatomie und Physiologie des Thymus

Der Thymus ist ein primär lymphatisches Organ, das retrosternal im *Mediastinum superius* und *anterius* situiert ist. Histologisch lassen sich Thymusmark und -rinde unterscheiden, deren Stroma jeweils aus retikulären Epithelzellen besteht, die einen lockeren Verband bilden. Embryologisch entwickelt sich der Thymus aus einem stratifizierten Epithel mit zweidimensionaler Polarität aus dem Endoderm der dritten Schlundtasche. Der morphologische Wandel in das lockere Netzwerk und die Untergliederung in Mark- und Rindenregion, die den reifen Thymus kennzeichnen, geschieht durch die Interaktion von T-Zell-Vorläufern mit den Epithelzellen und durch die Einwirkung des Transkriptionsfaktors FOXP1 (Nehls et al. 1996). Das Epithel weist neben morphologischen Ähnlichkeiten in der Entwicklung (stratifiziertes Epithel) molekulare Parallelen zu epidermalen Keratinozyten auf: (1) die Expression von FOXP1 (s.o.) und (2) ähnliche Expressionsprofile verschiedener Oberflächenproteine (Patel et al. 1995). Auch die im Thymus physiologisch vorkommenden Hassall-Körperchen, die phänotypische Ähnlichkeit zu Korneozyten der Epidermis aufweisen und am ehesten terminal differenzierten medullären thymischen Epithelzellen (mTECs) entsprechen (van Ewijk et al. 2000), unterstreichen diese Ähnlichkeit. Diese wird weiter durch die Beobachtung, dass *FOXP1*<sup>-/-</sup>-Mäuse weder einen Thymus noch Haare (als Derivat der Epidermis) entwickeln (Pantelouris 1968) unterstützt. Dieser Phänotyp wird ebenfalls bei Menschen mit entsprechender *FOXP1*-Defizienz beobachtet (Frank et al. 1999). Da der Thymus ein primär lymphatisches Organ ist und seine Funktion vor allem durch die Interaktion mit T-Lymphozytenvorläufern (Thymozyten) geprägt ist, stellt nicht zuletzt auch die Interaktion der Thymusepithelzellen mit den Thymozyten eine wichtige Einflussgröße in der normalen Thymusentwicklung dar (Holländer et al. 1995). In der detaillierten Betrachtung der Entwicklung und Funktion des Thymus sind über 50 weitere spezialisierte Zellpopulationen beschrieben worden, die teils nur in bestimmten Entwicklungsstufen auftreten, insgesamt aber am Aufbau des speziellen thymischen Ökosystems beteiligt sind, das in erheblichem Maße

das Repertoire der T-Zell-Rezeptoren beeinflusst und damit einen Knotenpunkt der Funktion des Immunsystems darstellt (Park et al. 2020).

Die primäre Funktion des Thymus besteht in der Wahrung einer Restriktion auf MHC-Komplex-gebundene Antigene von T-Lymphozyten bei gleichzeitiger Induktion zentraler Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen. Juvenile T-Lymphozyten treten in die Thymusrinde ein, um dort positiv auf die Expression eines T-Zell-Rezeptors (TCR) hin selektiert zu werden, der in der Lage ist, MHC-Komplexe niedrigaffin zu binden (MHC-Restriktion). Anschließend erfolgt eine Migration in das Thymus-Mark, wo eine negative Selektion durch Präsentation von Autoantigenen auf den MHC-I und -II-Komplexen der dortigen Epithelzellen erfolgt (zentrale Toleranzinduktion). Die herausselektierten T-Zellen verlassen den Thymus als reife, naive T-Zellen, die in der Peripherie zirkulieren, um ggf. auf ihr passendes Fremdantigen zu treffen und eine Reaktion des erworbenen Immunsystems zu orchestrieren.

### 1.1.2 Epidemiologie, Klassifikationssysteme und Klinik der Thymusneoplasien

Das Gewebe des Thymus kann Ursprung neoplastischer Erkrankungen sein. Tumore des Thymus sind insgesamt selten, stellen jedoch die häufigste Entität unter den Neoplasien des Mediastinums dar. Die Prävalenz der Thymome im Allgemeinen liegt bei 2,2 – 2,6/Millionen/Jahr, die entdifferenzierten Thymuskarzinome sind deutlich seltener (0,3 – 0,6/Millionen/Jahr). Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen dem 50. und 75. Lebensjahr, Geschlechterunterschiede sind nicht bekannt. Für die Klassifikation der Thymustumore nach der WHO ist neben dem neoplastischen Epithel selbst, auch der Anteil an Thymozyten relevant. Insgesamt werden in der aktuellen Auflage der WHO-Klassifikation über 30 verschiedene epitheliale Neoplasien und diverse nicht-epitheliale Neoplasien des Thymus klassifiziert (Travis et al. 2015). Letztere sind für diese Arbeit nicht relevant und werden daher nicht weiter beschrieben. Anhand einer Registerstudie der TCGA-Datenbank (*The Cancer Genome Atlas*) konnte die histologische Gruppierung der Thymome weiter validiert werden: auch molekular ließen sich Gruppen, die weitestgehend denen der histologischen Klassifikation entsprechen, nachweisen (Radovich et al. 2018). Die WHO-Klassifikation der Thymome wird im folgenden Abschnitt genauer umrissen (Kap. 1.1.2.1). Neben dieser Einteilung nach histologischen Eigenschaften der Tumorzusammensetzung existiert mit dem Masaoka-System ein weiteres *Staging*-System, das ebenfalls häufig angewandt wird, jedoch in Zukunft durch eine TNM-Klassifikation abgelöst werden soll. Im Masaoka-System wird vor allem die Infiltration des Tumors in seine Umgebung besonders berücksichtigt. Im Stadium I zeigt der Tumor weder makroskopische noch mikroskopische Infiltration, in Stadium II liegt eine geringe Invasion in die unmittelbare Umgebung des Thymus vor. Diese Infiltration ist im Stadium III stärker ausgeprägt und bezieht auch benachbarte Organe mit ein (etwa das Perikard oder größere Gefäße). In Stadium IVa liegt eine pleurale oder perikardiale Disseminierung vor, in Stadium IVb sind hämatogene oder lymphogene Metastasen nachweisbar. Die Stadien korrelieren mit dem Überleben und können daher prognostisch genutzt werden (Masaoka et al. 1981; Masaoka 2010).

### 1.1.2.1 Thymome

Thymome sind Tumoren des Thymus, die dessen Morphologie und Funktion in verschiedenen Aspekten ähneln (Ströbel et al. 2014). Nach der WHO werden die Thymome in zahlreiche Subtypen unterteilt, die sich hinsichtlich ihres histologischen Aufbaus und ihrer Molekulargenetik unterscheiden. Die wichtigsten, da am häufigsten diagnostizierten Typen, tragen die Bezeichnungen A, AB, B1, B2 und B3. Über die Ätiologie der Thymome ist nichts bekannt, im Regelfall treten sie sporadisch auf, ohne dass hervorstechende Risikofaktoren bekannt wären. Die verschiedenen Typen der Thymome weisen eine unterschiedliche Morphologie und Molekulargenetik auf, so unterscheidet sich der Gehalt an Thymozyten zwischen den einzelnen Subtypen ebenso wie die Struktur der epithelialen Anteile. Auch Mischformen kommen vor, wobei eine Koexistenz von Typ-A-Bereichen und Typ-B-Arealen so häufig ist, dass dies in der WHO-Klassifikation als Typ AB Berücksichtigung findet (Travis et al. 2015).

Bei der Klassifikation der Thymome wird vor allem die Histoarchitektur der Tumore als Grundlage verwendet: Das Typ-A-Thymom ist ein überwiegend von epithelialen Zellen dominierter Tumor, dessen lymphozytärer Anteil so gering ausgeprägt ist, dass diese sich leicht zählen lassen. Im Gegensatz hierzu enthält ein Typ-AB-Thymom Anteile, in denen die Lymphozyten deutlich zahlreicher sind und daher eher dem Typ-B-Spektrum zugeordnet werden müssen. Das Typ-B-Spektrum besteht aus unterschiedlichen Tumoren, wobei das Typ-B1-Thymom dem Normalthymus am ähnlichsten ist, während die epithelialen Anteile vom Typ B2 zum Typ B3 zunehmen und auch der Grad der Invasion des umliegenden Gewebes zunimmt (Travis et al. 2015).

Klinisch sind viele Thymome Zufallsbefunde. Es können jedoch klinische Symptome und Befunde die Diagnose eines Thymus-Tumors nahelegen. Die möglichen klinischen Befunde lassen sich dabei in zwei Gruppen einteilen: zum einen Symptome durch Masseneffekte mit raumfordernder Wirkung (bspw. obere Einflusstauung, Dysphagie, Dyspnoe, Husten), zum anderen Symptome in Folge paraneoplastischer Syndrome, die im folgenden Abschnitt kurz erläutert werden sollen (Travis et al. 2015).

Wie oben beschrieben, weisen die Thymome eine strukturelle, aber auch funktionelle Ähnlichkeit zum Thymus auf. So wurde beschrieben, dass auch neoplastische Thymomzellen mit den Thymozyten interagieren können, und dass diese Interaktion sowie die Fähigkeit des Thymoms, reife, naive CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu produzieren eng mit der Entwicklung paraneoplastischer Syndrome wie der *Myasthenia gravis* korreliert (Ströbel et al. 2002). Die vom Thymom beeinflussten T-Zellen führen dabei zu einer Verschiebung in den Subgruppen der T-Zellen in der Peripherie, was ebenfalls zur Genese von Autoimmunität beitragen könnte (Hoffacker et al. 2000). Aufgrund der generellen Ähnlichkeit der Thymome zum Normalthymus scheint, in Anbetracht der Funktion des Organs, die starke Assoziation der Tumore mit autoimmunen paraneoplastischen Syndromen gut nachvollziehbar: neben der häufig beobachteten *Myasthenia gravis*, existieren andere Autoimmunphänomene wie eine Polymyositis,

eine erworbene isolierte aplastische Anämie (*Pure red cell aplasia*), dermatologisch-autoimmunologische Phänomene, sowie Endokrinopathien (Marx et al. 2010). Auch Funktionseinschränkungen des Immunsystems, wie beispielsweise einer Hypogammaglobulinämie im Rahmen des Good-Syndroms, sind mit Thymomen assoziiert (Kelesidis und Yang 2010).

#### 1.1.2.2 Thymuskarzinome

Thymuskarzinome sind deutlich seltener als Thymome (s.o.). Während Thymome Ähnlichkeiten zum Normalthymus aufweisen (Ströbel et al. 2014), zeigen Thymuskarzinome, ähnlich Karzinomen anderer Organe, kaum organspezifische Merkmale. Die Karzinomzellen weisen daher eine deutlich geringere Interaktion mit den Thymozyten auf, wodurch diese Tumore im Gegensatz zu Thymomen nicht mit der Entstehung paraneoplastischer Syndrome assoziiert sind. Nach WHO werden die Thymuskarzinome hinsichtlich ihrer Histomorphologie klassifiziert, hierbei ist das Plattenepithelkarzinom die häufigste Entität (Travis et al. 2015). Da Thymuskarzinome eine höhere Tendenz zur Ausbildung von Lymphknoten- und Fernmetastasen aufweisen, wird die Erkrankung schneller von einem lokalen zu einem systemischen Problem, wodurch Thymuskarzinome mit einer deutlich schlechteren Prognose im Vergleich zu den eher lokal beschränkten Thymomen einhergehen (Huang J et al. 2009; Okuma et al. 2014). Auch die Neigung zu Lokalrezidiven ist in den Thymuskarzinomen erhöht, was zusätzlich zur schlechteren Prognose beiträgt (Ruffini et al. 2014). Wie bei den Thymomen ist auch die Ätiologie der Thymuskarzinome nicht geklärt, sie treten sporadisch auf und es zeigt sich keine herausragende Assoziation mit besonderen Risikofaktoren (Travis et al. 2015).

#### 1.1.3 Übersicht über therapeutische Optionen und Prognose

Es soll im Folgenden eine kurze Übersicht über die therapeutischen Prinzipien in der Therapie der Thymusneoplasien gegeben werden. In der Therapie ist insbesondere zu beachten, dass Thymusneoplasien zur Entwicklung von Spätrezidiven (noch nach 10 – 20 Jahren) neigen, weshalb eine enge Anbindung der Patient\*innen auch nach abgeschlossener Therapie empfohlen werden sollte (Detterbeck 2010).

Wie bei den meisten tumorös-neoplastischen Erkrankungen handelt es sich auch bei Thymusneoplasien zunächst um eine lokoregionär definierte Erkrankung, die im weiteren Verlauf zu einer systemischen Erkrankung evolvieren kann (in der Regel durch Metastasierung). Solange es sich bei dem Tumor um einen Lokalbefund handelt, stellt die chirurgische Resektion die effektivste Therapie dar, da bei einem R0-Resektionsbefund eine Heilung vorliegen kann und wahrscheinlicher wird. Somit stellt die operative Entfernung die Therapie der ersten Wahl dar (Kondo und Monden 2003). Postoperativ kann eine Bestrahlung die Therapieergebnisse bei unvollständiger Resektion weiter verbessern, insbesondere bei den Masaoka-Gruppen IIB und III, nicht jedoch in den weniger invasiven Gruppen (I, IIA) (Jackson et al. 2017). Bei vollständiger Resektion ist der Nutzen einer postoperativen Bestrahlung ebenso wie der Nutzen einer Bestrahlung zur Rezidivprophylaxe nicht erwiesen (Kondo und

Monden 2003). Bei einer systemischen Erkrankung oder lokal bedingter Inoperabilität stellen eine Bestrahlung sowie eine Chemotherapie mögliche Alternativen dar. Die geringe Inzidenz der Tumoren wirkt sich insbesondere hier negativ auf die Evidenzlage hinsichtlich der Therapien aus. Dennoch existieren Studien zur Wirksamkeit verschiedener chemotherapeutischer Regime mit unterschiedlicher Wirksamkeit, die jedoch zumeist nicht kontrolliert und randomisiert direkt miteinander verglichen wurden (Berardi et al. 2014). Die Chemotherapie wird in der Regel als plantinhaltige Polychemotherapie durchgeführt. Insbesondere bei Tumoren in den Masaoka-Stadien I und II ist eine zytostatische Therapie aufgrund des indolenten Verhaltens mit geringer Wachstumskinetik, die sich unter anderem in der Latenzzeit der Lokalrezidive zeigt (Detterbeck 2010), besonders problematisch, da eine hinreichende Trennschärfe zu gesunden proliferierenden Geweben kaum gewährleistet werden kann.

Für etwa die Hälfte aller Patient\*innen führt die primäre Chemotherapie nicht zu einem ausreichenden Erfolg (Ströbel et al. 2010b). Um diese Fälle zu adressieren, wurden Studien zur Wirksamkeit von *Targeted-Therapies* durchgeführt, um das Spektrum der Therapieoptionen zu erweitern. So konnten beispielsweise für den Tyrosinkinase-Hemmstoff Sunitinib (Ströbel et al. 2010a; Thomas et al. 2015), den Anti-PD-1-Antikörper Pembrolizumab (Giaccone et al. 2018) und den *Multitarget*-Hemmstoff Lenvatinib (Sato et al. 2020) in Phase-II-Studien anti-neoplastische Aktivitäten gegen fortgeschrittene Thymusneoplasien nachgewiesen werden. Die Aussagekraft aller Studien ist durch geringe Fallzahlen limitiert.

Die Prognose für Patient\*innen mit Thymusneoplasien ist entitätsabhängig: Thymuskarzinome haben im Allgemeinen eine deutlich schlechtere Prognose (s. o.) als Thymome. Auch unter den Thymomen bestehen Unterschiede: die Gruppen A, AB und B1 sind prognostisch nicht zu differenzieren, während die Typen B2 und B3 eine deutlich schlechtere Prognose aufweisen (Marchevsky et al. 2008).

#### 1.1.4 Tumorgenetik der Thymusneoplasien

Die Datenlage zur Pathogenese und Molekularbiologie der TETs (*Thymic epithelial tumor*) ist sehr begrenzt, im Folgenden soll eine Auswahl an Alterationen mit verhältnismäßig starker Evidenz dargestellt werden. Zunächst deuten die lichtmikroskopischen Befunde, die eine Einteilung wie die der WHO zulassen, darauf hin, dass es auch in der Pathogenese der Neoplasien des Thymus unterschiedliche Mechanismen geben muss. Eine groß angelegte molekulare Analyse von Daten aus der TCGA-Datenbank konnte diese Einteilung auch auf molekularer Ebene verifizieren (Radovich et al. 2018). Die Studie von Radovich et al. (2018) stellt momentan die größte Studie zur Molekularbiologie der TETs dar. Traditionell werden neoplastische Erkrankungen als primär genetische Erkrankungen verstanden, die im Wesentlichen durch die Mutation von Tumorsuppressorgenen oder Protoonkogenen verursacht werden. In Thymomen lassen sich lediglich in vier Genen signifikante Häufungen von Mutationen (= rekurrente Mutationen) beobachten: *GTF2I*, *HRAS*, *NRAS* und *TP53*, wobei die *NRAS*-, *HRAS*- und *TP53*-Mutationen bekannte aktivierende, bzw. inaktivierende (bei

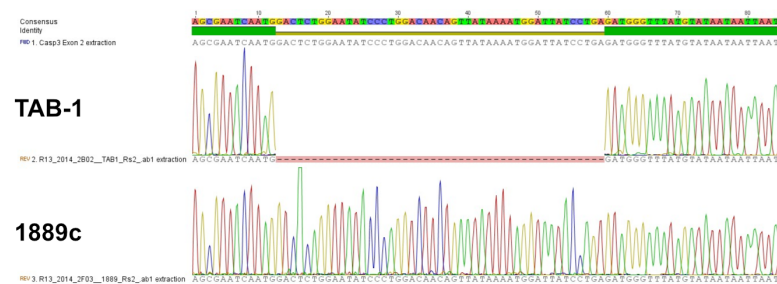
*TP53*) Mutationen darstellten, während *GTF2I*-Mutationen spezifisch für Thymome zu sein scheinen und bei anderen Tumoren bislang nicht beobachtet wurden (Radovich et al. 2018). In Thymuskarzinomen lässt sich weiterhin eine 16q-Mutation als fünfte in TETs signifikante Mutation nachweisen, wobei Thymuskarzinome insgesamt eine höhere genomische Variabilität und Instabilität aufweisen. Transkriptomanalysen ergaben für den Typ-A-Cluster eine Hochregulation tumorsuppressiver und eine Herabregulation onkogener Signaturen, in den Clustern AB, B und C war das Gegenteil der Fall (Radovich et al. 2018). In einer vergleichenden Analyse zeigte sich darüber hinaus, dass die Mutationslast von TETs im Vergleich zu einem Panel anderer Tumoren sehr gering ist: im Vergleichspanel stellten sich TETs als die Tumoren mit der geringsten Mutationslast bei erwachsenen Menschen dar, und an zweiter Stelle nach einigen pädiatrischen Tumoren (Radovich et al. 2018). Dies wirft die Frage nach anderen, z. B. epigenetischen Mechanismen in der Tumorentstehung bei TETs auf. Zusammenfassend konnte auch die Studie von Radovich et al. (2018) keine Erklärung für die Entstehung der TETs liefern, insbesondere da viele der gewonnenen Erkenntnisse bereits prinzipiell bekannt waren (bspw. (Petrini et al. 2014; Tateyama et al. 1995)). Kürzlich konnte in einer hohen Anzahl an TETs eine rekurrente Deletion im *CASP3*-Gen nachgewiesen werden, die in der TCGA-Studie nicht beschrieben wurde. Diese Deletion führt in den entsprechenden Tumoren zu einem Verlust des Caspase-3-Proteins und ist mit einem verbesserten Gesamtüberleben der Patient\*innen mit dieser Mutation assoziiert (Küffer et al., unveröffentlichte Daten, vgl. Abbildung 1.5).

### 1.1.5 Etablierte Zellmodelle für Thymus-Neoplasien

Als Modell für Thymusneoplasien existieren im Wesentlichen zwei etablierte Zellmodelle. Die Zelllinie IU-TAB-1 (im Folgenden TAB-1 genannt) wurde 2012 erstmals publiziert und entstammt einem Typ AB-Thymom (Gökmen-Polar et al. 2012). Die andere Zelllinie mit der Bezeichnung 1889c (Ehemann et al. 2008) entstammt einem Thymuskarzinom.

Für diese Arbeit von herausragender Bedeutung ist der Caspase-3-Status dieser Zelllinien. Während die Zelllinie 1889c den Wildtyp für *CASP3* aufweist, liegt in der Zelllinie TAB-1 eine Deletion von *CASP3* vor, die zu einem vollständigen Verlust des Proteins führt (Küffer et al., unveröffentlichte Ergebnisse). Die Ergebnisse einer Pyrosequenzierung einer Probe von TAB-1 und 1889c wurden zur Darstellung des Mutationsstatus in den Zelllinien von Herrn Dr. Küffer freundlicherweise zur Verfügung gestellt (vgl. Abbildung 1.1). Interessanterweise ist die beobachtete Mutation in TAB-1 identisch mit der in Kap. 1.1.4 erwähnten Mutation in den Geweben von Thymom-Patient\*innen.



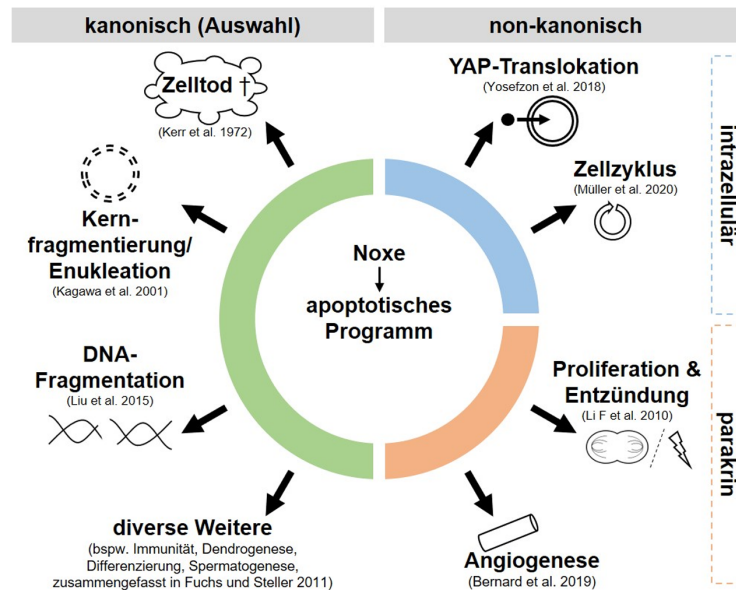


**Abbildung 1.1: Pyrosequenzierung von Extrakten der Zelllinien TAB-1 und 1889c.** Im Vergleich zeigt sich eine 47 bp messende Deletion im *CASP3*-Gen in der Zelllinie TAB-1, die in der Zelllinie 1889c nicht nachweisbar ist. Die Grafik spiegelt die Chemolumineszenz durch Pyrolyse bei Zugabe des jeweiligen Desoxyribonukleotids mit Signalverlust in TAB-1 wider. Die Deletion führt zu einem vollständigen Verlust von nachweisbarem CASP3-Protein im *Western Blot*. Unveröffentlichte Daten, die freundlicherweise von Herrn Dr. S. Küffer, Pathologie, UMG, zur Verfügung gestellt wurden.

## 1.2 Caspase-3 im zellulären und onkologischen Kontext

Das allgemeine Bild der Rolle von Apoptose und der mit ihr verknüpften Aktivierung von Caspasen ist in der Onkologie durch tumorsuppressive Wirkung geprägt. So gilt die Ausprägung von Eigenschaften, die der Überwindung von Apoptose dienen, als eine der herausragenden Eigenschaften von Tumorzellen (Hanahan und Weinberg 2011). Neben diesen tumorsuppressiven Eigenschaften zählen auch die verschiedenen Aufgaben der Apoptose in der Embryonalentwicklung zu den im Folgenden als „kanonisch“ bezeichneten Aufgaben der Caspasen und der Apoptose. Ihnen ist gemeinsam, dass sie sich auf das Schicksal der einzelnen Zelle konzentrieren, das im Wesentlichen in der Ausführung eines programmierten Zelltodes besteht.

Diese Sichtweise auf die Funktion der Caspasen und der Apoptose ist durch viele Daten belegt und entspricht der weitläufigen Wahrnehmung. In den letzten Jahren konnten jedoch weitere Funktionen nachgewiesen werden, die zunehmend auch auf „non-kanonische“ Funktionen der Caspasen hinweisen. Hierbei wird sowohl auf intrinsische Auswirkungen der Aktivierung von Caspasen als auch auf zelluläre Kommunikation und somit auf die Auswirkung auf ganze Gewebe hingewiesen. Manche dieser postulierten Effekte finden eine logische Begründung in den kanonischen Funktionen und zeigen nur andere Facetten desselben Programms, während andere gänzlich neue Zusammenhänge beschreiben. Im Folgenden sollen nach einer kurzen Einführung in die Molekularbiologie der Caspase-3 vor allem diese verhältnismäßig neu entdeckten Funktionen der Caspasen, insbesondere der Caspase-3, erläutert werden. Eine grafische Zusammenfassung der wichtigsten Funktionen des apoptotischen Programms zeigt Abbildung 1.2.



**Abbildung 1.2: Übersicht über eine Auswahl der Funktionen des apoptotischen Programms.** Es wird eine Auswahl der im Text beschriebenen Funktionen des apoptotischen Programms gezeigt. Der Begriff kanonisch bezieht sich dabei auf Funktionen, die initial im Kontext von Zelltod interpretiert wurden. Non-kanonische Funktionen erweitern das klassische Bild in jüngerer Zeit. Zu jeder Funktion ist jeweils eine maßgebliche Quelle angegeben, auf Vollständigkeit wurde zugunsten der Übersichtlichkeit verzichtet. Abbildung selbst erstellt, Quellen in der Abbildung entsprechen denen im Fließtext.

### 1.2.1 Die Molekularbiologie und kanonische Funktionen der Caspase-3

Caspasen (CASP) sind eine Familie von Enzymen, denen gemein ist, dass sie als Cysteinyln-Proteasen Peptidbindungen hinter einem Aspartyl-Rest im Zielprotein hydrolysieren. Im menschlichen Genom existieren zwölf Gene (HGNC Database 2021), die für Caspasen codieren, sechs Caspasen sind an der Initiation und Ausführung der Apoptose beteiligt und werden dementsprechend in Initiator- (Caspase-8, -9 und -10) und Effektorcaspasen (Caspase-3, -6 und -7) unterteilt. Um das zerstörerische Potenzial der Caspasen nur dosiert freisetzen zu können, werden sie als Zymogene synthetisiert, die als Procaspasen vorliegen und inaktiv sind. Erst in Folge eines Reizes auf die Zelle erfolgt die Aktivierung der Caspasen. Caspase-3 liegt als Effektorcaspase distal im Signalprozess. Ihre Aktivierung erfolgt proteolytisch durch Initiatorcaspasen (v.a. CASP8). Die Proteolyse führt dabei zur Freilegung des katalytischen Zentrums in dessen Zentrum sich der Cysteinyln-Rest befindet (bei Caspase-3 Cys-163). Während dieses Prozesses wird das Procaspase-Molekül in seine Untereinheiten gespalten, wobei zwei asymmetrische Spaltprodukte mit einer Masse von ca. 17 und 12 kDa entstehen (Gesamtmasse der Procaspase-3 bei 35 kDa). Durch Zusammenlagerung der prozessierten Spaltprodukte zweier Procaspase-Moleküle entsteht der aktive Enzymkomplex, der also ein Homodimer aus Heterodimeren darstellt (Fuentes-Prior und Salvesen 2004; Stennicke und Salvesen 1997; Walters et al. 2009).

Im Kontext der Zelle stellen Caspasen die Endglieder des apoptotischen Programms dar. Dabei handelt es sich kurz zusammengefasst um ein molekulares Signalnetzwerk, an dessen oberen Ende die Integration verschiedenster Informationen hinsichtlich endogener und exogener Stressoren steht, die bei einer Überschreitung der zellulären Kompensationsmechanismen zu einem streng choreografierten Zelluntergang führen, der entscheidend durch die katalytische Funktion der Caspasen bedingt wird (Galluzzi et al. 2018). Die biologische Funktion wird hierbei insbesondere in der Entsorgung abnormer und überflüssiger Zellen während der Entwicklung, aber auch in der Erhaltung der Gewebemöostase im adulten Organismus gesehen (Fuchs und Steller 2011). Erstmals beschrieben wurde die von einem akzidentiellen Zelltod unterscheidbare Morphologie der Apoptose durch John Kerr (Kerr 1965), der später bei der Prägung des Begriffs Apoptose entscheidenden Anteil hatte (Kerr et al. 1972). Heute wird die Apoptose als ein Modus eines regulierten Zelltodes angesehen, der meist als programmierter Zelltod auftritt und dem andere regulierte und unregulierte Zelltodmechanismen gegenüber gestellt werden (Galluzzi et al. 2018).

### 1.2.2 Neuere Implikationen kanonischer Funktionen der Caspase-3

Das vollendete apoptotische Programm führt zur Zerstörung einer Zelle, was im onkologischen Kontext lange Zeit als rein protektiver Mechanismus, der z. B. die Entstehung von Krebs verhindern soll, betrachtet wurde. Neben dieser Funktion der Apoptose und der Caspase-3, also der Zerstörung zellulärer Strukturen samt der DNA zum Zwecke des Zelltodes, ergeben sich aus dem selbstzerstörerischen Potenzial weitere Konsequenzen. So konnte gezeigt werden, dass eine subletale Aktivierung der Caspase-3 zu einer Schädigung der DNA durch Doppelstrangbrüche führt, also zu genomischer Instabilität beiträgt. Dieses Phänomen hat praktische Konsequenzen für die Gewebemöostase in Tumoren und kann erklären, weshalb *CASP3*<sup>-/-</sup>-Tumorzellen in *FOXN1*<sup>-/-</sup>-Mäusen ein vermindertes Tumorstadium *in vivo* aufweisen. Die genomische Instabilität sei hierbei nicht durch die Caspase-3 selbst, sondern bspw. durch Endonuclease G vermittelt, die Aktivität der Caspase-3 wurde vor Implantation durch radioaktive Bestrahlung induziert (Liu et al. 2015). Die Endonuclease G ist dabei neben CAD (Caspase-aktivierte DNase = DFF40, DNA-fragmentierender Faktor 40) für die im apoptotischen Kontext gewollte Zerstörung der genomischen DNA verantwortlich (Li LY et al. 2001), ist in diesem Beispiel jedoch ursächlich für genomischen Stress. Auch in der *MYC*-getriebenen Onkogenese konnte eine Rolle der Caspase-3 beschrieben werden: *MYC*-Überexpression kann zu chromosomaler Instabilität und Doppelstrangbrüchen führen (Karlsson et al. 2003; Ray et al. 2006). Diese *MYC*-vermittelten Effekte scheinen zumindest teilweise Caspase-3 (und Endonuclease G)-abhängig zu sein, da *MYC*-überexprimierende *CASP3*<sup>-/-</sup>-Mammazellen entsprechende Veränderungen nicht aufweisen. Ihre Klonalität und Tumorigenität *in vivo*, als Ausdruck von onkogenem Potenzial, sind vermindert und Zellen mit hoher *MYC*-Aktivität haben eine erhöhte Resistenz gegen Caspase-3/Endonuclease G-vermittelten Zelltod. Deren Aktivität kann dann dennoch weiterhin genomische Instabilität befördern (Cartwright et al. 2017).

Das Konzept der subletalen Caspase-3-Aktivität wird weiterhin von der Beobachtung gestützt, dass eine geringfügige Permeabilitätserhöhung der äußeren Mitochondrienmembran (mMOMP = *minority mitochondrial outer membrane permeabilization*), die im Gegensatz zu einer vollständigen Permeabilisierung nicht zu sofortiger Induktion des intrinsischen apoptotischen Zelltods führt, ebenfalls zu DNA-Schädigung und Chromosomeninstabilität führt. Dieser Prozess ist Caspase-3-abhängig (die Caspase-3-defiziente Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 zeigt diesen Mechanismus nicht), und befördert onkogene Transformation und Onkogenese im Klonalitätsassay (Ichim et al. 2015). Zusammenfassend zeigt sich also eine mögliche proonkogene Facette des apoptotischen Programms, die aus seiner normalen Funktion resultiert.

### 1.2.3 Non-kanonische Funktionen der Caspase-3 und des apoptotischen Programms

Neben den oben besprochenen kanonischen Funktionen samt ihren teils ortho- und teils paradoxen Konsequenzen ergaben sich in den letzten Jahren zunehmend Hinweise auf weitere pathophysiologisch relevante Funktionen der Caspase-3 in anderen Signalwegen. Durch oben genannte Effekte kann Bestrahlung die Aggressivität von Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* erhöhen (s. o.). Es zeigt sich darüber hinaus, dass auch bestrahlte und somit gestresste Zellen in der Lage sind, einen ähnlichen Effekt in benachbarten nicht bestrahlten Zellen auszulösen, sodass hierbei also kein intrinsischer, sondern ein parakriner Effekt vorliegen muss (Huang Q et al. 2011). Die nicht bestrahlten Zellen sind in Kombination mit bestrahlten Zellen *in vitro* und *in vivo* deutlich wachstumsaktiver. Als ursächlich für diese parakrine Wachstumsstimulation konnte das Arachidonsäurederivat Prostaglandin E2 (PGE2) ermittelt werden, welches durch die Cyclooxygenase-2 (COX-2) in den sterbenden Zellen produziert wird. Der Zusammenhang mit der Caspase-3-Aktivität konnte in der calciumunabhängigen Phospholipase A<sub>2</sub> gefunden werden, die durch Caspase-3 aktiviert wird. Durch diese Aktivierung resultiert eine Freisetzung von Arachidonsäure, die über COX-2 zu PGE2 verstoffwechselt werden kann, das dann in den benachbarten Zellen zu einer Wachstumsstimulation führt und somit zur Tumorrepopulation beiträgt. In der gleichen Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass Patient\*innen mit Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen und Mamma-Karzinomen bei Caspase-3-Positivität des Tumors verminderte Überlebensraten aufwiesen, was die Autoren mit oben genanntem parakrinen Effekt erklären (Huang Q et al. 2011). Weiter verdeutlicht wird das Konzept in einem Modell für das maligne Melanom, in dem analoge Effekte *in vitro* und *in vivo* beschrieben wurden, die durch den nichtselektiven COX-Inhibitor Indometacin reversibel waren (Donato et al. 2014). Der Mechanismus kann dem *Hallmark of cancer* der *Tumor promoting inflammation* (Hanahan und Weinberg 2011) zugeordnet werden.

Neben den pathophysiologischen Implikationen wurde dieser Signalweg auch im physiologischen Kontext validiert: bei einer Verletzung einer ansonsten gesunden Haut benötigen *CASP3*<sup>-/-</sup>-Gewebe eine deutlich längere Zeit, für ihre Regeneration (gemessen an der

Proliferation von Zellen an den Wundrändern). Dieser Zusammenhang ergibt insofern biologisch Sinn, als geschädigte, apoptotische Zellen auf diese Weise parakrin zur Wundheilung beitragen können, was als *Phoenix-rising-pathway* publiziert wurde (Li F et al. 2010).

Neben den bereits vor den Arbeiten von Huang Q et al. (2011) bekannten direkten proliferationssteigernden Effekten von PGE2 (z. B. gezeigt von Fehér und Gidáli (1974) sowie Hanson und Thomas (1983)), steigert PGE2 darüber hinaus die Angiogenese, was ebenfalls einen Beitrag zu Tumorwachstum leisten kann. Explizit wird dieser Effekt in einem Modell sterbender Gliom-Zellen adressiert, in dem *CASP3*<sup>-/-</sup>-Tumoren eine verminderte Angiogenese nach Bestrahlung aufwiesen. Es konnte eine Assoziation mit der Aktivierung von VEGF-A und PGE2 nachgewiesen werden, die bei Apoptose zu einer Angiogenesestimulation führen sollen (Cheng et al. 2019; Feng et al. 2017). Die Verbindung zwischen Angiogenese und Caspase-3 ist darüber hinaus hinsichtlich der Signalfreisetzung aus gestressten Zellen (Povero et al. 2013) und der transkriptionellen Regulation beschrieben. So wurde beobachtet, dass gespaltene Caspase-3 in den Zellkern transloziert und dort in der Lage ist an die DNA zu binden und eine von ihrer katalytischen Funktion unabhängige, proangiogene und antiapoptotische direkte transkriptionelle Reaktion auf die eigene Aktivierung hin zu orchestrieren (Bernard et al. 2019).

Neben der umfassenden Evidenz zu den non-kanonischen Funktionen der Caspase-3 im Speziellen wurden in jüngster Zeit auch die Apoptose im Allgemeinen und Caspase-8 in ähnlicher Weise beschrieben. So können apoptotische Zellen durch einen veränderten Metabolismus (z. B. im Polyamin-Stoffwechsel) und caspasevermittelte Freisetzung bestimmter Metabolite antiinflammatorische Signale in ihre Umgebung aussenden (Medina et al. 2020), welche als „*ghostly metabolic massages* [...]“ bezeichnet wurden (Green 2020). Für andere Elemente des apoptotischen Programms, wie bspw. die Initiatorcaspase CASP8, konnten ebenfalls proliferationsfördernde Effekte nachgewiesen werden (Müller I et al. 2020).

## 1.3 YAP in der Onkologie und seine Verbindung mit Caspase-3

### 1.3.1 Das *Yes-associated Protein* und seine Regulation

Im Jahr 1994 wurde ein Protein entdeckt, das an die Proteinkinase Yes binden kann und über eine Masse von 65 kDa verfügt, was zur ursprünglichen Namensgebung *Yes-associated Protein of 65 kDa* (YAP65) führte (Sudol 1994). Mittlerweile wird das Protein zumeist als YAP bezeichnet. Gelegentlich wird zwischen YAP1 und YAP2 differenziert, wobei es sich um zwei unterschiedliche Spleiß-Varianten handelt (Zhao et al. 2007), über die keine wesentlichen funktionellen Unterschiede publiziert sind. Eine immer wieder als bedeutsam bezeichnete Funktion besteht in der Regulation der Größe von Organen (Piccolo et al. 2014), was gleichzeitig beleuchtet, weshalb das Forschungsfeld von großer Komplexität geprägt ist. Die Organgröße hängt von zahlreichen Faktoren ab, von denen Stammzeleigenschaften, das Gleichgewicht von Zelltod und Proliferation im Sinne eines Zellumsatzes sowie der

Zellmetabolismus nur einige sind. Für die Entstehung neoplastischer Erkrankungen sind diese Faktoren essenziell, weshalb eine Rolle von YAP im Kontext neoplastischer Erkrankungen bereits früh diskutiert und nachgewiesen wurde (Overholtzer et al. 2006), worauf in Kap. 1.3.2 genauer eingegangen wird. Seine pleiotropen Effekte vermittelt YAP als Co-Aktivatoren der Transkription durch Bindung an Transkriptionsfaktoren, wobei insbesondere die TEAD-Familie als Zielstruktur zu nennen ist, die entscheidend an der Vermittlung der YAP-Effekte beteiligt ist (Zhao et al. 2008).

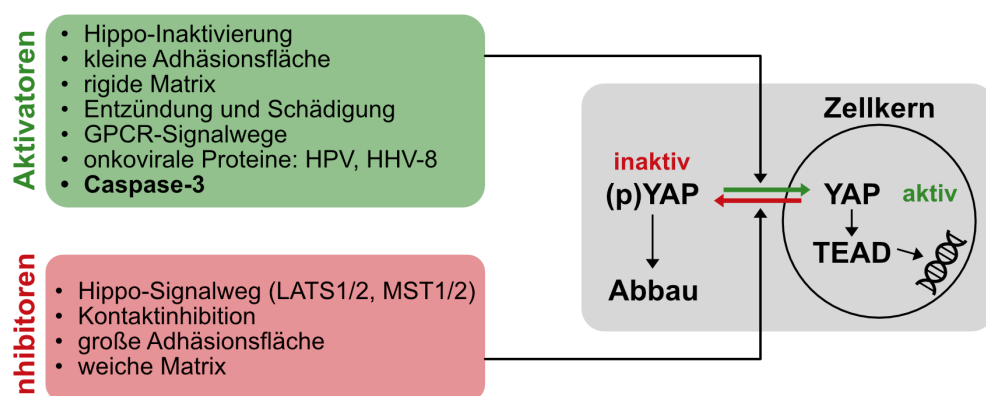
Wesentlich für die Analyse der Funktionen des YAP-Proteins war seine enge Verbindung mit dem Hippo-Signalweg, dessen Wichtigkeit jedoch mittlerweile von weiteren Regulationsmechanismen (Abbildung 1.3) relativiert wurde (Yu et al. 2015). Seinen Namen erhielt der Hippo-Signalweg durch die in *Drosophila* exprimierte Hippo-Kinase (Hpo), die in der Lage ist die Kinase Warts (Wts) zu aktivieren, welche ihrerseits das YAP-Ortholog Yorkie (Yki) phosphoryliert. Der Signalweg ist in humanen Zellen durch MST1/2 ( $\approx$  Hpo) und LATS1/2 ( $\approx$  Wts) evolutionär konserviert (Piccolo et al. 2014). Die Phosphorylierung von YAP erfolgt an fünf verschiedenen Serin-Resten, wobei sich die relevanteste Phosphorylierungsstelle mit der höchsten inhibitorischen Potenz an Serin-127 (S127) befindet, da insbesondere diese zur zytosolischen Retention und Degradation von YAP führt und so eine Interaktion mit Transkriptionsfaktoren unterbindet (Zhao et al. 2007). Eine Aktivierung kann bspw. über die Proteinphosphatase 2A (PP2A) durch Dephosphorylierung vermittelt werden (Schlegelmilch et al. 2011).

Neben dem Hippo-Signalweg wurden zahlreiche andere Mechanismen beschrieben, die eine Regulation von YAP bewirken können. Eine Übersicht gibt Abbildung 1.3. Auf die Verbindung von YAP und Caspase-3 wird in Kap. 1.3.3 genauer eingegangen. Die verschiedenen Einflussgrößen auf die YAP-Aktivität lassen sich vier Gruppen zuordnen, von denen einige im Hippo-Signalweg konvergieren, andere jedoch eigenständig wirken:

1. **Mechanotransduktion und Matrix-Interaktion:** Eine große Kontaktfläche zu umgebender Matrix führt zu einer Aktivierung von YAP mit konsekutiver Stimulation der Proliferation und Inhibierung der Differenzierung, eine geringe Kontaktfläche hat das Gegenteil zur Folge (Dupont et al. 2011). Fehlender Kontakt führt zu einer Induktion des Hippo-Signalwegs, wodurch YAP supprimiert wird, was zu Induktion von Anoikis beiträgt (Zhao et al. 2012). Auch mechanische Kräfte, die auf das Zytoskelett wirken, haben wesentliche Effekte auf YAP: in Zellen mit geringer mechanischer Beanspruchung wird YAP zytosolisch gebunden und damit inaktiviert, unter Spannung ist Gegenteiliges beobachtet worden (Aragona et al. 2013).
2. **Zellkontakte und Zellpolarität:** Phosphoryliertes YAP (pYAP) wird von 14-3-3-Protein gebunden und an  $\alpha$ -Catenin sequestriert, wodurch die Dephosphorylierung blockiert wird. Bei geringer Anzahl an Zellkontakten ist dieser hemmende Mechanismus weniger aktiv, was die YAP-Aktivität erhöht und Proliferation begünstigt (Schlegelmilch et al. 2011). Weitere Beispiele sind die Interaktion mit Angiomotin (AMOT) (Zhao et al. 2011) und Neurofibromin 2 (NF2) (Zhang et al. 2010), die zur LATS1/2-YAP-Interaktion und

damit Inhibition von YAP an Zellkontakten beitragen sollen. Somit spielt YAP eine Rolle in der Kontaktinhibition (*Contact inhibition of proliferation*, CIP).

3. **Metabolischer Status:** Ein Beispiel für die Integration des Energiestoffwechsels in die YAP-Hemmung bei energetischer Depletion (Mo et al. 2015; Wang W et al. 2015). Diese Kopplung wird von einigen Autoren als *Checkpoint* für YAP-vermittelte Proliferation und Wachstum interpretiert (Yu et al. 2015). Ein weiteres Beispiel ist die Interaktion mit dem *Hypoxia-inducible factor-1* (HIF1), die zu einer Verstärkung der HIF1-Wirkung führen soll, während YAP umgekehrt von HIF1 induziert wird (Ma et al. 2015).
4. **Rezeptorvermittelte Regulation:** Zwischen wachstumsfördernden G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und YAP sind zahlreiche Verknüpfungen beschrieben. Über GPCRs konvergieren diverse parakrine Signale, die sowohl eine Hemmung, als auch eine Stimulation von YAP vermitteln können. Des Weiteren konnte eine Vernetzung des WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs und YAP gezeigt werden: YAP wird dabei analog zu  $\beta$ -Catenin über dessen Regulationskomplex gesteuert (Azzolin et al. 2014). Weitere Mechanismen hinsichtlich der WNT/YAP-Interaktion werden diskutiert (zusammengefasst in Yu et al. (2015)).



**Abbildung 1.3: Regulation der YAP-Aktivität.** Die Regulation von YAP erfolgt über die subzelluläre Lokalisation. Eine Phosphorylierung von YAP führt zur Translokation in das Zytoplasma mit konsekutiver Ubiquitinierung und proteasomaler Proteolyse. Umgekehrt kann eine Dephosphorylierung die nukleäre Translokation bahnen. Im Zellkern kann YAP als Co-Aktivatoren der Transkription, insbesondere mit Transkriptionsfaktoren der TEAD-Familie, pleiotrope Effekte auf genomischer Ebene vermitteln. Über die posttranslationale Modifikation zur Regulation hinausgehend sind zahlreiche Effekte beschrieben (Abb. nach Piccolo et al. (2014)).

Die Regulationsmechanismen von YAP erlauben indirekt Aufschluss über die Funktion des Proteins. Zunächst zeichnet sich ab, dass mechanische Signale auf die Zelle der potenteste Regulator der YAP-Aktivität sein könnten und von einigen Autoren als übergeordnete *Master-Regulatoren* gewertet werden (Aragona et al. 2013). Neben diesen bestehen jedoch zahlreiche weitere Mechanismen, durch die sich ein übergeordnetes Funktionsprinzip zieht: YAP scheint ein Konvergenzpunkt zahlreicher Signalwege zu sein, deren integrierte Information einen Allgemeinzustand der Zelle widerspiegeln kann. Die Integration dieser Informationen ist wichtig für die Entscheidung, ob Wachstum durch Zellwachstum und -teilung stattfinden

soll. Sie trägt damit zur Regulation von Organ- und Gewebegröße bei und ist von entscheidender Wichtigkeit (Einbettung in ein Gewebe, Energie- und Sauerstoffhaushalt, parakrine Signale und zellkontaktvermittelte Kommunikation). Wie im folgenden Abschnitt erläutert wird, ist YAP dabei nicht nur Knotenpunkt und Integrator zahlreicher Signalwege, sondern auch Effektor in der Adaptation der Zelle an veränderte Bedingungen wie bspw. oxidativem Stress.

### 1.3.2 Funktionen von YAP und Beiträge zur Tumorentstehung und -progression

Wie in Kap. 1.3.1 beschrieben, vermittelt YAP der Zelle Signale, die auf einen guten Energiestatus, geringe Anzahl an Zellkontakten und eine große Oberfläche zu eher rigider Matrix hinweisen. Wird YAP pathologisch aktiviert, vermittelt dies einer Tumorzelle ein verzerrtes Bild von ihrer Umgebung und stimuliert die Zelle in verschiedener Weise, wie im Folgenden beschrieben wird.

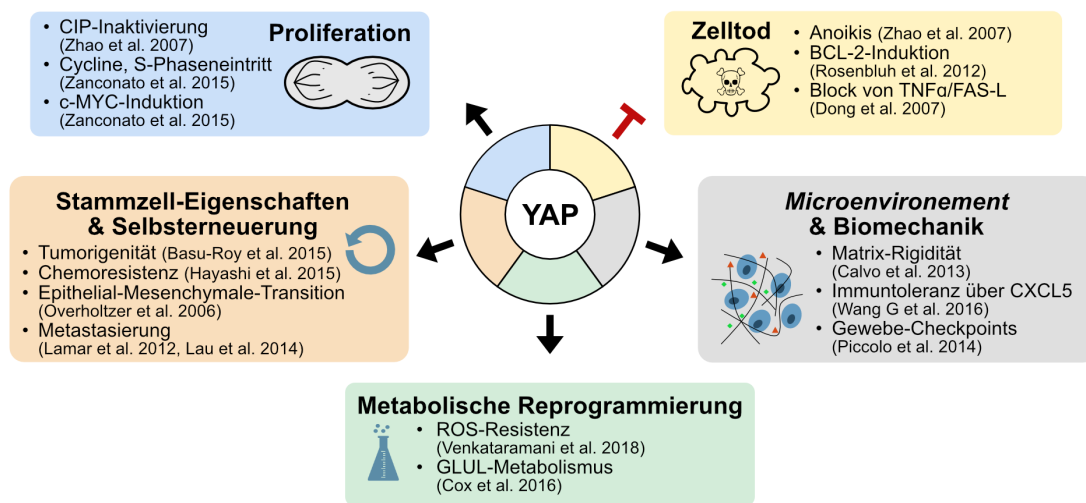
Im Jahr 2006 wurde das *YAP*-Gen als potenzielles Onkogen beschrieben, dessen Aktivierung mechanistisch eine Amplifikation zugrunde lag, die zu einer transformierenden Wirkung auf die Zellen führte (Overholtzer et al. 2006). Eine solche Aktivierung von *YAP* im Sinne eines klassischen Onkogens, ebenso wie genetische Veränderung der anderen Anteile des Hippo-Signalwegs, stellt nach neueren Erkenntnissen aber eher eine Ausnahme dar (Yu et al. 2015). Dennoch trägt eine Aktivierung von YAP, die epigenetisch in zahlreichen Tumorentitäten vorliegt, zu einer onkogenen Transformation bei (Zanconato et al. 2016). Eine Übersicht über die verschiedenen Beiträge, die YAP zur Tumorentstehung leistet, zeigt Abbildung 1.4. Damit trägt YAP zur Ausprägung zahlreicher Kennzeichen von Krebs bei (Hanahan und Weinberg 2011).

In Neoplasien ist das Gleichgewicht von Proliferation und Zelltod im Sinne einer positiven Bilanz gestört. Dieses Gleichgewicht wird direkt von YAP beeinflusst. YAP kann auf verschiedenen Wegen zu einer enthemmten Proliferation beitragen: direkt (Camargo et al. 2007; Zhao et al. 2007) oder indirekt über die Induktion von Onkogenen wie etwa *c-MYC* (Zanconato et al. 2015). Über diese Mechanismen realisiert YAP seine Rolle in der Kontrolle der Organgröße, was im Kontext von Neoplasien zur Onkogenese beitragen kann (Dong et al. 2007). Auch der Zellverlust wird durch YAP reduziert, was die Bilanzstörung in Tumoren weiter begünstigen kann: regulierter Zelltod wird durch YAP reduziert. Die intrinsische Apoptose wird durch eine Induktion von Mitgliedern der antiapoptotischen BCL-2-Familie (bei gleichzeitiger Bahnung von  $\beta$ -Catenin-Effekten) (Rosenbluh et al. 2012) und die extrinsische Apoptose durch Inhibition der Wirkung von TNF $\alpha$ /FAS-L vermindert (Dong et al. 2007). Außerdem vermindert YAP den Zelltod in einem Gewebe durch die Inhibition von Anoikis (gr. „ohne Haus“), eine Zelltod-Art, die durch einen Verlust der Verankerung in der Matrix induziert wird (Yu et al. 2015; Zhao et al. 2012).

Im Verständnis der Biologie von Tumoren sind Krebsstammzellen als Ausdruck der verzerrten Gewebearchitektur von entscheidender Wichtigkeit (Hanahan und Weinberg 2011),



wofür hier ausgewählte Beispiele erwähnt werden sollen. Für einige Entitäten konnte gezeigt werden, dass YAP in derartigen Zellen stark exprimiert ist und seine Blockade zum Verlust von Stammzellfunktionen führt (Basu-Roy et al. 2015). Auch eine erhöhte Resistenz gegenüber Chemotherapie von Krebsstammzellen mit hoher YAP-Expression wurde beschrieben (Hayashi et al. 2015; Venkataramani et al. 2018). Eine Überexpression begünstigt darüber hinaus die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) und die Klonalität in *Soft-Agar* (Overholtzer et al. 2006). Da die EMT häufig mit dem Prozess der Metastasierung in Verbindung gebracht wird, erscheint nachvollziehbar, dass eine YAP-Aktivierung *in vivo* zu einer erhöhten Ausbildung von Metastasen beitragen kann (Lamar et al. 2012; Lau et al. 2014).



**Abbildung 1.4: Übersicht über die Funktionen von YAP im onkologischen Kontext.** Die Abbildung gibt eine Übersicht über die pleiotropen Effekte von YAP im Kontext der Onkogenese. Nähere Erläuterungen zu den einzelnen Effekten finden sich im Text. Abbildung selbst zusammengestellt nach Piccolo et al. (2014), Yu et al. (2015) und Zanconato et al. (2016) zzgl. eigener Ergänzungen. Abkürzungen: BCL-2 = *B-Cell-Lymphoma-2*-Protein, CIP = *Contact inhibition of proliferation*, CXCL-5 = *C-X-C motif chemokine 5*, FAS-L = *FAS ligand*, GLUL = *Glutamin-Synthetase*, ROS = *Reactive oxygen species*.

Auch das Tumorstroma und YAP beeinflussen sich wechselseitig. In Tumorfibroblasten (*Cancer associated fibroblasts*, CAFs) induziert YAP-Aktivität die Bildung von Matrix mit hoher Rigidität, die selbst wiederum die Induktion von YAP im Sinne eines positiven Verstärkerkreises begünstigt (Calvo et al. 2013). Im Prostatakarzinom konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass YAP-Aktivität zum Erwerb von Immuntoleranz beiträgt, indem myeloische immunsuppressive Zellen über CXCL5-Sekretion in das Tumorgewebe gelockt werden (Wang G et al. 2016). Insgesamt zeigen diese Beispiele, dass YAP zur Tumorprogression durch die Überwindung von *Checkpoints* auf Gewebeebene beitragen könnte (Piccolo et al. 2014).

Schließlich konnte gezeigt werden, dass YAP auch auf den Zellstoffwechsel im Sinne einer metabolischen Reprogrammierung Einfluss nimmt. Zum einen erhöht YAP die Resistenz der Zelle gegen oxidativen Stress durch Induktion von Katalase und Superoxid-Dismutase-2 (SOD2), was im Angiosarkom zu verbessertem Wachstum, Resistenz gegen Chemotherapie und Verminderung von DNA-Schädigung führt (Venkataramani et al. 2018). Außerdem

konnte gezeigt werden, dass YAP eine Induktion der Glutamin-Synthetase (GLUL) bewirkt, sodass mehr Glutamin zur Verfügung steht, das dann zur Purin- und Pyrimidinsynthese und konsekutiv zur DNA-Synthese genutzt werden kann (Cox et al. 2016).

Auch prognostisch sind eine Expression von YAP und seine nukleäre Lokalisation ungünstig. Sie korrelieren in zahlreichen Tumorentitäten mit höherem Tumorstadium und vermindertem Gesamtüberleben. Gezeigt werden konnte dies unter anderem für Mammakarzinome, kolorektale Karzinome, Magenkarzinome, hepatozelluläre Karzinome, nicht-kleinzellige Lungenkarzinome (NSCLC) und Ovarialkarzinome. Daneben sind weitere molekulare Effekte beschrieben, die die Prognose beeinträchtigen könnten. Eine Übersicht findet sich in Piccolo et al. (2014) und Zanconato et al. (2016). In diesen beiden Übersichten zeigt sich noch einmal deutlich, dass nur selten eine direkte genetische Alteration von YAP, seinem Effektor TEAD oder Komponenten des Hippo-Signalwegs ausschlaggebend sind.

Wichtig scheint insbesondere, dass sich YAP der Einordnung in klassische Kategorien wie dem „Protoonkogen“ und „Tumorsuppressorgen“ (für seine negativen Regulatoren) entzieht. Die YAP-Aktivierung stellt sich eher als eine Plattform dar, auf deren Fundament die weitere Onkogenese deutlich vereinfacht wird. Dies wird durch die Seltenheit von YAP-aktivierenden Mutationen oder Amplifikationen unterstrichen. YAP scheint daher eher ein „Kooperationsonkogen“ (*Non-oncogenic dependency*) zu sein, was in der Vergangenheit bereits zur Titulierung als „*Jack of all Trades but Master of None [...]*“ (Zanconato et al. 2016) führte.

### 1.3.3 Das Caspase-3-YAP-Modul

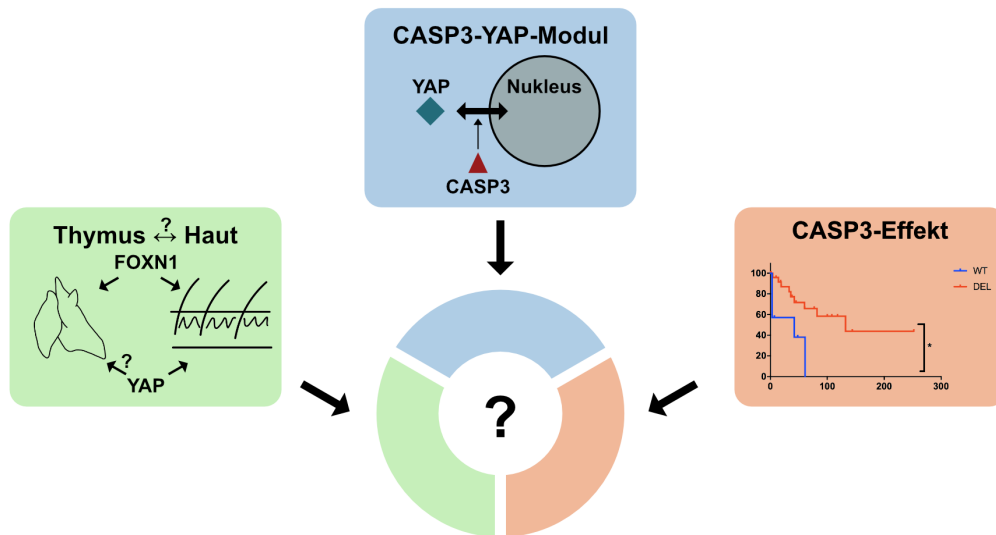
In der Epidermis führt eine Caspase-3-Deletion zu trophischen Störungen (Li F et al. 2010). Bei näheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass diese Störungen zum Großteil auf einer verminderten Expression von YAP in den Stammzellen der Epidermis basieren (Yosefzon et al. 2018). Dass YAP eine relevante Rolle in der Gewebemöostase der Epidermis spielt, war dabei bereits zuvor bekannt, wobei gezeigt wurde, dass YAP von  $\alpha$ -Catenin im Zytoplasma bei Vorhandensein von Zellkontakten sequestriert wird (Schlegelmilch et al. 2011). Von Yosefzon et al. (2018) konnte nun gezeigt werden, dass eine Aktivierung von Caspase-3, die nicht zum Zelltod führt (= subletale Caspase-3-Aktivierung), zu einer Spaltung von  $\alpha$ -Catenin führt, was zu einer Relokalisation von YAP in den Zellkern führt, wo YAP seine oben beschriebenen pleiotropen Effekte vermitteln kann. Des Weiteren führte diese Translokation zu einer erhöhten Expression von XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis*), das seinerseits als Multi-Caspase-Inhibitor die Aktivität der Caspase-3 in engen Grenzen im Sinne eines negativen *Feedback*-Mechanismus reguliert. Fehlt Caspase-3 in diesem Gefüge, kommt es zu trophischen Störungen der Epidermis durch eine kompromittierte Stammzellnische, was zu einer verminderten Größe der Talgdrüsen (in denen die Stammzellen zum größten Teil sitzen) führt.

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Vorliegende Arbeit geht von vier wesentlichen Prämissen aus, deren Synthese die Fragestellung ergibt.

1. In Thymomen existiert eine rekurrente *CASP3*-Mutation, die zu einer Inaktivierung des Genproduktes führt und mit verbessertem Überleben assoziiert ist (Küffer et al., unveröffentlichte Daten), was mit Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen in anderen Entitäten übereinstimmt (Cartwright et al. 2017; Huang Q et al. 2011; Liu et al. 2015).
2. YAP ist ein potenter pleiotroper Regulator diverser zellulärer Funktionen (Venkataramani et al. 2018; Yu et al. 2015), der in Tumorzellen alteriert ist. Eine Aktivierung von YAP kann somit auch epigenetisch zur Onkogenese beitragen (Zanconato et al. 2016) und ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Piccolo et al. 2014; Zanconato et al. 2016).
3. In der murinen Epidermis ist das Zusammenspiel von CASP3 und YAP ein potentes Modul zur Regulation der Trophik, Organgröße und Gewebemöostase (Schlegelmilch et al. 2011; Yosefzon et al. 2018).
4. Der Thymus und die Haut sind eng verwandte Organe (Nehls et al. 1996; Patel et al. 1995; van Ewijk et al. 2000), die Tumoren des Thymus weisen eine geringe Mutationslast auf und ihre molekulare Genese ist schlecht verstanden (Radovich et al. 2018; Travis et al. 2015).

Hieraus ergibt sich die Frage, inwieweit die Verbesserung des Gesamtüberlebens der Patient\*innen mit epithelialen Thymusneoplasien, die eine Deletion der proapoptotischen Caspase-3 aufweisen, durch eine YAP-Inaktivierung erklärt werden kann. Ziel der Arbeit ist es, anhand zweier etablierter Zelllinien zunächst modellhaft durch Veränderung des CASP3-Status dieser Zellen, direkte Effekte auf das Wachstum derselben zu untersuchen. Hierbei soll untersucht werden, inwieweit sich die in Patient\*innen beobachteten Effekte durch *in vitro*-Beobachtungen (etwa erhöhtes Wachstum) reproduzieren lassen. Ferner soll untersucht werden inwieweit sich die Alteration des CASP3-Status auf den YAP-Status der Zellen auswirkt. Sollte eine Änderung festgestellt werden, soll überprüft werden, inwieweit YAP selbst eine Rolle in der Biologie der Zellmodelle spielt. Außerdem soll in einem Kollektiv von über 100 Tumorgewebeproben die YAP-Expression in epithelialen Thymusneoplasien erstmals untersucht werden, um die Einordnung der *in vitro* generierten Daten in den medizinisch-pathologischen Kontext zu ermöglichen und ihre Relevanz im Tumorgewebe so zu validieren. Eine Übersicht gibt Abbildung 1.5.



**Abbildung 1.5: Graphische Darstellung der Teilbereiche der Fragestellung.** Die drei wesentlichen Prämissen sind (1) die Ähnlichkeit von Haut und Thymus (vgl. Kap. 1.1.1), (2) das in der Haut nachgewiesene CASP3-YAP-Modul (Yosefzon et al. 2018), (3) sowie der CASP3-Effekt auf das Überleben von Patient\*innen mit Thymusneoplasien (Kaplan-Meyer-Kurve freundlicherweise von Dr. S. Küffer zur Verfügung gestellt, unpublizierte Daten).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2.1: Chemikalien und Reagenzien nach Hersteller.

Chemikalie / Reagenz	Hersteller	
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland	
HEPES Pufferlösung 1 M pH 7,5		
Aqua ad iniectabilia Braun, Mini-Plasco® connect	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland	
PBS Dulbecco	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland	
10x TGS	BioRad Laboratories, Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten	
2x Laemmli Sample Buffer		
4x Laemmli Sample Buffer		
DC™ Protein Assay Reagent A, B und S		
Trans-Blot® Turbo™ 5x Transfer Puffer		
Agar-Agar, bakteriologisch		Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin Natriumsalz		
LB-Medium (Luria/Miller)		
Milchpulver		
Mowiol 4-88		
Natriumchlorid		
Natriumhypochloritlösung 12%		
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)		
Ponceau S		
TRIS Pufferan®		
TRIS-hydrochlorid Pufferan®		
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Honeywell International, Inc., Morristown, Vereinigte Staaten	
G418 (Geneticin)	InvivoGen, San Diego, Kalifornien, Vereinigte Staaten	
Wasserbad-Schutzmittel Aqua Stabil	Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland	
StemMACS HSC-CFU basic, human	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland	
FuGENE® HD Transfection Reagent	Promega Corp., Madison, Wisconsin, Vereinigte Staaten	
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten	
cOmplete™ (Protease-Inhibitor)		
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)		
Essigsäure, 100 %		
Ethanol, reinst		
IGEPAL® CA-630 (NP-40)		
Natriumdesoxycholat		
Natriumorthovanadat		
Paraformaldehyd		
Octoxinol 9 (Triton™ X-100)		
Trypanblau Lösung 0,4 %		
Tween® 20		

X-tremeGENE™ HP DNA Transfection Reagent	
2-Propanol, reinst	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
Ethanol 99 % (vergällt)	
5 % Digitonin (D'TN)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
L-Glutamin 200 mM (100X)	
Pen Strep (Penicillin, Streptomycin)	
Puromycin (20 mg/ml)	
Surfact-Amps® NP-40, 10 % Lösung	
Zellkulturmedien	
DMEM (1X) (ohne L-Glutamin und Pyruvat, mit 4,5 g/l D-Glucose) RPMI Medium 1640 (1X) (ohne L-Glutamin) Opti-MEM™ (1X) (ohne Phenolrot, mit Glutamin)	

## 2.2 Biochemikalien und Enzyme

Tabelle 2.2: Biochemikalien und Enzyme nach Hersteller.

Biochemikalie / Enzym	Hersteller
Albumin Fraktion V aus bovinem Serum (BSA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DH5 $\alpha$ Chemisch Kompetente Zellen ( <i>E. coli</i> )	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Heat Inactivated FBS ( <i>Fetal bovine serum</i> )	
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	
pcDNA3.1(+) Expressionsvektor	
Trypsin-EDTA 0,05 % (1X)	
gRNA-CASP3-Plasmide Zielstruktur: Start-Codon von Exon 3 CASP3-No1: 5'-TCCATGGAGAACAACACT-GAAAACCTCAG-3' CASP3-No2: 5'-CCCTCTAATCCTATAG-AGCGATT-3' eSpCas9-2A- <i>Backbone</i> mit Puromycin-Resistenz (eSpCas9-2A-Puro (PX459) V2.0) (vgl. Tabelle 2.12)	GenScript Biotech, New Jersey, Vereinigte Staaten

## 2.3 Gebrauchsmaterialien

Tabelle 2.3: Gebrauchsmaterialien nach Hersteller.

Material	Hersteller
BD Discardit™ II, sterile Spritze 10 ml	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten
3M Comply™ Indicator Tape	3M, Saint Paul, Minnesota, Vereinigte Staaten
Durapore™ Kunstseidenpflaster, 2,5 cm	BioRad Laboratories, Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels	
Trans-Blot® Turbo™ Mini-size Nitrocellulose	

Mini-size Transfer Stacks	
Combitips advanced® (1,0 ml, 5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Cellstar Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturplatte (6 Well, 12 Well, 96 Well)	
Millicell EZ SLIDE 4-Well Chamber Slides	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, Vereinigte Staaten
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 (0,1 – 20 µl, 2 – 200 µl, 100 – 1000 µl)	
Pipettenspitzen Biosphere® Quality Tips (0,1 – 20 µl, 2 – 200 µl, 100 – 1000 µl)	
Reagiergefäß (1,5 ml, 2 ml)	
Röhre, 13 ml, 100x16 mm	
Serologische Pipette (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	
TC-Schale 35, 60, 100	
TC-Flasche (T25, T75, T175)	
Zellschaber 25 cm	
Untersuchungshandschuh Sempercare nitrile skin <sup>2</sup>	Semperit Technische Produkte Gesellschaft m.b.H., Wien, Österreich
Labsoulute® Pasteurpipetten, Kalk-Soda-Glas, 230 mm	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
Objektträger: Menzel-Gläser Superfrost® Plus	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten

## 2.4 Geräte und Zubehör

Tabelle 2.4: Geräte und Zubehör nach Hersteller.

Gerät / Zubehör	Hersteller
Mini-PROTEAN® Tetra System	BioRad Laboratories, Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten
PowerPac™ 300 Basic Power Supply	
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	
Accu-Jet® pro	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Neubauer-improved Zählkammer	
Canon EOS 650D	Canon Inc., Ōta, Tokyo, Japan
Axiovert 25 Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Axio Scope.A1 Mikroskop	
Stemi SV 11 Mikroskop	
Immersol™ 518 F (Immersionöl für Fluoreszenzmikroskopie)	
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)	
Thermomixer comfort	
Zentrifugen: Eppendorf 5417R, 5424, 5430R, 5804	
LAS-4000 Luminescence Imager	Fujifilm, Minato, Präfektur Tokyo, Japan
Wasserbad 1002	GFL mbH, Burgwedel, Deutschland

Megafuge 1.0, Zentrifuge	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank HERAsafe HS 12	
Schlittenmikrotom Leica SM2000R	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Muse™ Cell Analyzer Guava ICF® Instrument Cleaning Fluid Muse® Count & Viability Lösung	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Spektrales konfokales Laserscanning Mikroskop IX81	Olympus, Tokio, Japan
CO <sub>2</sub> -Inkubator MCO-17AI	Sanyo Electric Co., Ltd., Osaka, Japan
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Inc., New York, Vereinigte Staaten
Autoklav Systec VX-100	Systec GmbH, Linden, Deutschland
Plattenleser Infinite® M200 Pro	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
Fusion Fx Vilber Lauromat	VWR International LLC, Radnor, Pennsylvania, Vereinigte Staaten
Incubating Orbital Shaker Modell 3500I	

## 2.5 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

**Tabelle 2.5: Gebrauchsfertige Reaktionssysteme nach Hersteller.**

Reaktionssystem	Hersteller
EnVision FLEX+, Mouse, High pH (Link)	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)	Promega Corp., Madison, Wisconsin, Vereinigte Staaten
Plasmid Midi Kit	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
Western-Lightning® Plus-ECL	PerkinElmer Inc., Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten

## 2.6 Software

**Tabelle 2.6: Software nach Hersteller.**

Software	Hersteller
Affinity Photo V 1.10.4 für Mac	Serif (Europe) Ltd., Nottingham, Vereinigtes Königreich
EndNote X9	Clarivate Analytics, Jersey, Vereinigte Staaten
Prism® 9 for Mac	GraphPad Software, Inc., La Jolla, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Microsoft® Excel für Mac	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, Vereinigte Staaten
Microsoft Word® für Mac	
Microsoft PowerPoint® für Mac	
Magellan™ V 7.1	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
Tecan i-control™ V 3.6	

## 2.7 Lösungen/Puffer

Die zur Herstellung benötigten Chemikalien wurden gemäß den Anweisungen des Herstellers gelagert und falls erforderlich in bidestilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) gelöst. Werte in Klammern beziehen sich auf die finalen Konzentrationen im Puffer bzw. der Lösung.



Tabelle 2.7: Zusammensetzung verwendeter Lösungen und Puffer.

Lösung/Puffer	Zusammensetzung (finale Konzentrationen in Klammern)
Lyse-Puffer für Gesamt-Protein	100 ml PBS (pH 7,4) 0,5 g Natriumdesoxycholat (0,5 %) 1 ml NP-40 (1 %) <u>+ Inhibitoren</u> (immer frisch zu 1 ml Lysepuffer hinzugefügt) 10 µl 100 mM PMSF (1 mM) 10 µl 100 mM Orthovanadat (1 mM) 40 µl cComplete™ (4 %Vol.)
Lyse-Puffer für Zell-Fraktionierung	<u>Hypotoner Grundpuffer</u> 5 ml ddH <sub>2</sub> O 100 µl HEPES (20 mM, pH 7,5) 18,7 µl 4 M NaCl (15 mM) 5 µl 1 M DTT (1 mM) <u>Zusätze für Einzelschritte</u> Zytosol: DTN (0,05 %) Membran: NP-40 (0,5 %) Für die Lyse der Zellkerne wurde Gesamt-Protein-Puffer (s.o.) verwendet. Alle Puffer wurden mit obigen Inhibitoren versetzt.
PBS ( <i>Phosphate-buffered saline</i> )	1 l ddH <sub>2</sub> O 9,55 g PBS Dulbecco
Ponceau S	495 ml ddH <sub>2</sub> O 5 ml 100 % Essigsäure 0,5 g Ponceau S
TBS-Stammlösung	1 l ddH <sub>2</sub> O 292,7 g NaCl (5 M) 4,24 g TRIS (0,035 M) 26 g TRIS-HCl (0,165 M)
TBS-T Waschlösung für Western Blot	9 l ddH <sub>2</sub> O 1 l TBS-Stammlösung 10 ml Tween®-20 (0,1 %)

## 2.8 Zellkulturmedien

Tabelle 2.8: Auflistung und Zusammensetzung verwendeter Zellkulturmedien.

Zelllinien	Zusammensetzung
Medium für IU-TAB-1, 1889c, DLD-1, AsPC-1 und deren transgene Derivate	RPMI + 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin + 1 % Glutamin + 10 % FBS
Medium für Hs 67, MCF-7, PC-3, BJ	DMEM + 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin + 10 % FBS
Medium für HUV-EC	Advanced Endothelial Growth Medium + 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin + 1 % Glutamin + 20 % FBS
Medium für transformierte DH5α	LB-Medium (Luria/Miller)

(prokaryotische Zellen)	+ Ampicillin 100 µg/ml (zur Selektion)
-------------------------	--

## 2.9 Zelllinien

Alle aufgeführten Zelllinien stammen aus dem Labor von Prof. Dr. P. Ströbel (Institut für Pathologie, UMG) und wurden freundlicherweise von PD Dr. V. Venkataramani und Dr. Stefan Küffer zur Verfügung gestellt. Einzig die HEK-293T Zellen wurden vom Labor von Prof. Dr. G. Wulf freundlicher Weise zur Verfügung gestellt (Klinik für Hämatologie und Medizinische Onkologie, UMG).

### 2.9.1 Humane Tumorzelllinien

**Tabelle 2.9: Auflistung verwendeter humaner Tumorzelllinien und deren Referenzen.**

Tumorentität	Bezeichnung	Beschreibung und Referenz
Kolonkarzinom	DLD-1	Zelllinie aus humanem kolorektalen Adenokarzinom, ATCC, Manassas, Vereinigte Staaten von Amerika (Dexter et al. 1979)
Mammakarzinom	MCF-7	Humane Mammakarzinom-Zelllinie, gewonnen aus Pleuraerguss, ATCC, Manassas, Vereinigte Staaten von Amerika (Soule et al. 1973)
Pankreaskarzinom	AsPC-1	Humane Pankreasadenokarzinom Zelllinie, gewonnen aus Aszites-Punktat, ATCC, Manassas, Vereinigte Staaten von Amerika (Chen WH et al. 1982; Tan et al. 1981)
Prostatakarzinom	PC-3	Humane Prostataadenokarzinom-Zelllinie, ATCC, Manassas, Vereinigte Staaten von Amerika (Kaighn et al. 1979).
Thymuskarzinom	1889c	Humane Karzinomzelllinie aus einem undifferenzierten Thymuskarzinom (Ehemann et al. 2008).
Thymom	IU-TAB-1, nachfolgend TAB-1	Humane Typ AB-Thymom Zelllinie (Gökmen-Polar et al. 2012).

### 2.9.2 Sonstige Zelllinien

**Tabelle 2.10: Auflistung verwendeter sonstiger und deren Referenzen.**

Entität	Bezeichnung	Beschreibung und Referenz
Embryonale Niere	HEK-293T	Humane Zelllinie aus einer embryonalen Niere, die mit dem <i>Large-T</i> -Antigen aus dem SV40 Virus immortalisiert ist. Ideal zur Transfektion geeignet. ATCC, Manassas, Vereinigte Staaten von Amerika. (DuBridge et al. 1987; Pear et al. 1993)
Endothelzelle	HUV-EC	Humane primäre Endothelzellen gewonnen aus Umbilicalvene. Lebensdauer begrenzt. ATCC, Manassas, Vereinigte Staaten von Amerika. (Jaffe et al. 1973)
Fibroblast	BJ	Normale Humane Fibroblasten aus der Vorhaut eines Neugeborenen. Begrenzte Lebensdauer. ATCC, Manassas, Vereinigte Staaten von Amerika.

Thymusfibroblasten (Anmerkung: Klassifikation beruht auf Morphologie)	Hs 67 (ATCC® HTB-163™)	Gesunde Thymusfibroblastenzelllinie, die 1969 am <i>Naval Biosciences Laboratory</i> von R. Owens aus dem Thymus eines kaukasischen, männlichen Neugeborenen generiert wurde. ATCC, Manassas, Vereinigte Staaten von Amerika. Genaue Entität unklar, laut ATCC morphologisch fibroblastisch, einmalig publiziert (Rothe et al. 1998), keine genaue Typisierung vorhanden.
--	------------------------	---

### 2.9.3 Stabil transfizierte Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien wurden durch Lipofektion (vgl. Kap. 2.13.6) oder lentivirale Transduktion (Kap. 2.13.7) selbstständig erzeugt. Die notwendigen Konzentrationen für die Selektion wurden durch Behandlung unveränderter Ausgangszellen, die auch als Positivkontrolle verwendet wurden, ermittelt. Vollständige Auflistung aller verwendeten Plasmide vgl. Kap. 2.10.

**Tabelle 2.11: Stabil transfizierte Zelllinien.**

Zelllinien-Bezeichnung / Plasmid	Beschreibung
TAB-1 EV Plasmid: pcDNA3.1(+)-Leervektor	Leerer pcDNA3.1(+)-Plasmidvektor als Negativkontrolle Selektionsantibiotikum: G418 800 µg/ml
TAB-1 CASP3wt Plasmid: pcDNA3-Casp3-myc	Humane Caspase 3 in pcDNA3.1(+)-Plasmidvektor Selektionsantibiotikum: G418 800 µg/ml
TAB-1 CASP3mut Plasmid: pcDNA3-Casp3 C163A-myc	Humane Caspase 3 mit inaktivierender Mutation (C163A) im katalytischen Zentrum in pcDNA3.1(+)-Plasmidvektor Selektionsantibiotikum: G418 800 µg/ml
1889c 36e CASP3 <sup>-/-</sup> Nachfolgend: 1889c CASP3 <sup>-/-</sup> Plasmid: von GenScript (siehe Tabelle 2.2)	Klon 36e, mittels CRISPR/Cas9 ausgeknockte Caspase-3, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Dr. rer. nat. Denise Müller.
1889c pLKO.1 scr	Leerer lentiviraler Vektor („scrambled“) als Negativkontrolle Selektionsantibiotikum: Puromycin 6 µg/ml
1889c shYAP#1 1889c shYAP#2	Stabile <i>knock-down</i> -Zelllinien mit verminderter YAP-Expression mit zwei unterschiedlichen Sequenzen Selektionsantibiotikum: Puromycin 6 µg/ml

## 2.10 Plasmide

**Tabelle 2.12: Plasmide und deren Referenzen.**

Plasmid	Beschreibung	Backbone <i>Resistenz</i>	Referenz
pcDNA3.1(+)	Leervektor	pcDNA3.1(+) <i>G418</i>	vgl. Kap. 2.2 Thermo Fisher Scientific
pcDNA3-Casp3-myc	Humane Caspase-3 mit MYC-Tag	pcDNA3.1(+) <i>G418</i>	(Stennicke und Salvesen 1997)
pcDNA3-Casp3 C163A-myc	Humane Caspase-3 mit MYC-Tag, katalytische Mutante		

sgRNA-CASP3	CRISPR/Cas Konstrukt mit CASP3-Spezifität vor und nach dem Start-Codon	eSpCas9-2A-Puro (PX459) V2.0 <i>Puromycin</i>	vgl. Tabelle 2.2, <i>Backbone</i> : (Ran et al. 2013)
pMD2.G	VSV-G Hüllplasmid (Lentivirus)		von Didier Trono, bisher nicht publiziert, RRID: Addgene_12259
pCMV-ΔR8.91	leeres <i>Backbone</i> (Lentivirus)		(Venkataramani et al. 2018)
scramble shRNA	Kontroll-shRNA (nicht-codierende Zielsequenz)	pLKO.1 <i>Puromycin</i>	(Sarbasov et al. 2005)
shYAP1 #1	shRNA gegen YAP, verschiedene Sequenzen		(Rosenbluh et al. 2012)
shYAP1 #2			

Alle Plasmide wurden von Addgene (Watertown, Massachusetts, Vereinigte Staaten) erworben.

## 2.11 Antikörper

### 2.11.1 Primärantikörper

**Tabelle 2.13: Auflistung verwendeter Antikörper und deren Konzentrationen.**

Monoklonaler Antikörper	Herkunft	Hersteller	Verdünnung	Katalognummer
β-Aktin (BA3R)	Maus	TFS	1:1000	MA5-15739
Caspase-3	Kaninchen	CST	1:1000	9662S
Caspase-7 (D2Q3L)	Kaninchen	CST	1:1000	12827S
DLL-4	Kaninchen	CST	1:1000	2589S
E-Cadherin (24E10)	Kaninchen	CST	1:1000	3195S
EpCAM (D48KR)	Kaninchen	CST	1:1000	36746S
FOXP1	Kaninchen	Abc	1:1000	ab113235
GAPDH (D16H11)	Kaninchen	CST	1:5000	5174S
Histon H3 (D1H2)	Kaninchen	CST	1:1000	4499S
Lamin A/C (4C11)	Maus	CST	1:1000	4777S
N-Cadherin (D4R1H)	Kaninchen	CST	1:1000	13116S
PARP (46D11)	Kaninchen	CST	1:1000	9532S
Phospho-Histon H2A.X (Ser139)	Kaninchen	CST	1:1000	9718S
Phospho-YAP (Ser127)	Kaninchen	CST	1:1000	4911S
Vimentin (D21H3)	Kaninchen	CST	1:1000	5741S
XIAP (D2Z8W)	Kaninchen	CST	1:1000	14334S
YAP (D8H1X)	Kaninchen	CST	1:5000 (WB) 1:400 (IHC) 1:100 (IF)	14074S

Abkürzungen: Abc: Abcam plc., Cambridge, Vereinigtes Königreich; CST: Cell Signaling Technologies, Danvers, Massachusetts, Vereinigte Staaten; TFS: Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten. Sonstige Abkürzungen: IF: Immunfluoreszenz, IHC: Immunhistochemie, WB: *Western Blot*. Verdünnung jeweils für *Western Blotting*, sonst entsprechend markiert. Die Katalognummern beziehen sich auf die Nummer im Katalog des jeweiligen Herstellers im November 2021.

## 2.11.2 Sekundärantikörper

Tabelle 2.14: Auflistung verwendeter Sekundärantikörper für *Western Blot* und Immunfluoreszenz.

Antikörper	Herkunft	Hersteller	Verdünnung
Alexa Fluor 488 (fluoreszierender Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper)	Ziege	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Ver- einigte Staaten	1:1000
Anti-Kaninchen-Antikörper	Ziege	Dako Denmark A/S, Lostrup, Dänemark	1:1000
Anti-Maus-Antikörper	Kaninchen		1:1000

## 2.12 Molekularbiologische Methoden

### 2.12.1 Gewinnung plasmidischer DNA

Zur Erzeugung stabil transfizierter eukaryotischer Zelllinien wurden mit der gewünschten plasmidischen DNA *E.-coli*-Zellen des Stammes DH5 $\alpha$  (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, Vereinigte Staaten) transformiert. Die so entstandenen Zellen wurden zur Amplifikation der Plasmide genutzt, anschließend konnte aus adäquaten Mengen der Zellen die DNA isoliert werden. Die Plasmide wurden freundlicherweise von PD Dr. V. Venkataramani zur Verfügung gestellt oder käuflich über Addgene (Watertown, MA, Vereinigte Staaten) erworben.

#### 2.12.1.1 Transformation und Kultivierung von DH5 $\alpha$ -Zellen

Als Ausgangsmaterial für die Amplifikation der Plasmide wurde jeweils eine geringe Menge des jeweiligen Plasmids verwendet (200 – 400 ng). 50  $\mu$ l Zellsuspension DH5 $\alpha$ -Zellen von Thermo Fisher Scientific wurden auf Eis aufgetaut und nach Zugabe der DNA für 30 min auf Eis inkubiert, um danach für 45 s bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt zu werden. Hiernach erfolgte eine rapide Abkühlung auf Eis für 2 min und eine anschließende Inkubation in LB-Medium bei 37 °C und 750 rpm im Schüttler. Die so entstandenen Zellen wurden auf Nähragar mit Ampicillin (100  $\mu$ g/ml) selektiert (alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide tragen dieses Resistenz-Gen). Einzelne Kolonien, die über Nacht bei 37 °C wuchsen, wurden anschließend in einer Vorkultur (3 ml LB-Medium mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin) angezogen, um abends (in 100 ml des gleichen Mediums) in einen Erlenmeyerkolben überführt zu werden. Die Zellen inkubierten jeweils bei 37 °C und 220 rpm im Schüttler über Nacht. Aus der entstandenen Zellsuspension konnten 750  $\mu$ l entnommen werden, um, mit 250  $\mu$ l Glycerin versetzt, bei -80 °C langfristig gelagert zu werden. Gekaufte Plasmide von Addgene wurden bereits als Bakterienkultur geliefert, sodass der Schritt der Transformation entfiel.

#### 2.12.1.2 Plasmidextraktion und Konzentrationsbestimmung

100 ml mit über 16 Stunden inkubierten transformierten DH5 $\alpha$ -Zellen wurden mit dem QIAGEN® Plasmid Midi Kit gemäß den Anweisungen des Herstellers behandelt. Das Kit bedient sich der alkalischen Lyse der Bakterienzellen mit anschließender Präzipitation der

chromosomalen DNA in angesäuertem Milieu und führt am Ende zu einem DNA-Pellet, das aus reiner Plasmid-DNA besteht. Das Pellet wurde in ca. 50 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und für eine Stunde bei 65 °C inkubiert, um den Lösungsprozess zu beschleunigen. Anschließend wurden die Probengefäße über Nacht bei 4 °C gelagert, wonach sämtliche DNA gelöst war. Eine spektrometrische Konzentrationsbestimmung erfolgte jeweils am nächsten Tag. Die Ausbeute lag in der Regel bei Konzentrationen um 2 µg/µl. Zur längerfristigen Aufbewahrung wurde die DNA-Lösung bei -20 °C gelagert.

## 2.12.2 Proteinchemische Techniken

### 2.12.2.1 Isolierung von Gesamtprotein aus kultivierten Zellen

Zur Gewinnung von zellulärem Protein für die molekulare Analyse wurden die Zellen nach Entnahme des Mediums zwei Mal mit eisgekühltem PBS gewaschen, um Verunreinigungen, bspw. durch Zelldetritus, zu entfernen. Die adhärenenten Zellen wurden sodann mit einem sterilen Zellschaber oder Trypsin-EDTA geerntet und die gewünschte Menge der so entstandenen Zellsuspension zentrifugiert (1200 rpm, 5 min). Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet je nach Größe in 100 – 300 µl Lysepuffer resuspendiert und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die auf Eis gelagerte Suspension wurde für 30 min regelmäßig gevortext und anschließend bei 4 °C und 10.000 rpm für 15 min zentrifugiert. Der so entstehende Überstand, der die gelösten Zellproteine enthielt, wurde in ein sauberes Eppendorf-Gefäß überführt, beschriftet und zur weiteren Lagerung bei -80 °C tiefgefroren.

### 2.12.2.2 Isolierung aufgereinigter Protein-Fractionen aus Zytosol und Zellkern

Es wurden zunächst ca. 1 Millionen Zellen in eine 100 mm Zellkulturschale ausgesät. Die Zellen wurden zwei Tage mit ausreichend Medium inkubiert und bei gewünschter vergleichbarer Zelldichte zunächst mit eiskaltem PBS zwei Mal gewaschen. Danach wurde der Zellrasen mit einem Zellschaber in 120 µl hypotonen Puffer (vgl. Kap. 2.7), versetzt mit cComplete™ (Sigma Aldrich, Vereinigte Staaten) und Orthovanadat, in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die so entstandene Suspension wurde für 15 min auf Eis inkubiert. Im Folgenden wurde 1 % Digitonin (DTN) im Verhältnis 1:20 zur Perforation der Zellplasmamembranen hinzugegeben und das Probengefäß vorsichtig für 10 min bei 4 °C rotiert. Nach 1 min Zentrifugation bei 12.000 rpm und 4 °C konnte der Überstand als zytosolische Fraktion entnommen und in ein frisches Probengefäß überführt werden. Das verbliebene Pellet wurde zwei Mal mit je 500 µl hypotonem Puffer vorsichtig gewaschen und dann mit 0,5 % NP-40 resuspendiert, für 10 s auf höchster Stufe gevortext um anschließend erneut zentrifugiert zu werden. Der Überstand enthielt nun die Membranproteine, das Pellet die intakten Zellkerne. Der Überstand wurde dementsprechend wieder in ein sauberes Probengefäß überführt und das Pellet nach einem weiteren Waschschriff mit RIPA-Lysepuffer (wie unter 2.12.2.1 beschrieben) lysiert. Das Protokoll wurde freundlicherweise von Yan Feng, Memorial Sloan

Kettering Cancer Center (MSKCC, New York, Vereinigte Staaten) und PD Dr. med. Vivek Venkataramani (UMG) zur Verfügung gestellt.

### 2.12.2.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Proteinkonzentration in Gesamt- und Fraktionslysaten wurde mit dem DC™ Protein Assay Kit (BioRad Laboratories) nach Anweisungen des Herstellers bestimmt. Das Kit bedient sich der kolorimetrischen Proteinbestimmung (Lowry et al. 1951). Grundsätzlich beruht die Detektion der Proteine auf einer zweiseitigen Reaktion. Im ersten Reaktionsschritt reagiert Kupfertartrat mit dem gelösten Protein in alkalischem Milieu, wobei die Peptidbindungen mit dem Kupfer einen zweiwertigen Komplex bilden. Die Bildung dieses Komplexes erleichtert den Elektronentransfer auf das Folin-Ciocalteu-Reagenz. Die Reduktion dieses Reagenz hat die Entstehung verschiedener Produkte zur Folge, die ein optisches Absorptionsmaximum bei ~750 nm (blau) aufweisen (Peterson 1979).

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 20 µl eines Gemisches der Lösungen A und S (50:1) in 96-Well Mikrotiterplatten ausgebracht. Hierzu wurden 2 µl des Proteinlysates gegeben und im Folgenden 200 µl Lösung B hinzugefügt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur (RT) erfolgte die Messung der Extinktion bei 560 nm mit einem Plattenleser Infinite® M200 Pro (Tecan Group AG). Die Auswertung erfolgte mit der Software Magellan™ V 7.1 (Tecan Group AG). Alle Proben wurden in Triplikaten gemessen und der Mittelwert der drei Proben für die weitere Arbeit verwendet, als Kontrolle diente die jeweils durchgeführte Messung des verwendeten Lysepuffers (2 µl, Triplikat). Die Bestimmung der Proteinwerte erfolgte anhand einer laborinternen Standard-Eichkurve und wurde nicht eigens für jede Messung neu bestimmt. Da alle Proben auf einer 96-Well-Platte den gleichen Bedingungen ausgesetzt waren, war letztlich das Verhältnis zwischen den einzelnen Proben entscheidend für die korrekte Beladung der Gel-Kammern und nicht der absolute Messwert.

### 2.12.2.4 Separation der Proteine nach Molekulargewicht mittels SDS-PAGE

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) ermöglicht es Proteingemische, wie Zellysate sie darstellen, nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Durch ein elektrisches Feld werden die Proteine durch eine Gelmatrix aus Polyacrylamid bewegt, wobei ihre unterschiedliche Trägheit und Größe bewirken, dass sie sich mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch die Gelmaschen bewegen. Die eindimensionale SDS-PAGE nach Laemmli (1970) garantiert eine Trennung der Proteine einzig basierend auf ihrer Masse durch den Ausgleich der Eigenladung des Proteins durch die Zugabe des Detergens Natriumlaurylsulfat (SDS) (Laemmli 1970). Die Bildung eines Protein-SDS-Komplexes bewirkt die Maskierung der Eigenladung der Proteine und eine Zerstörung der dreidimensionalen Proteinstruktur (Tertiär-, Quartär-, weniger Sekundärstruktur), wobei SDS im Überschuss vorhanden sein muss (Laemmli-(SDS)-Probenpuffer). Um dies zu gewährleisten wurden die Proben im Verhältnis 3:1 mit 4x Laemmli-Probenpuffer (BioRad Laboratories) versetzt, für 5 min auf 95 °C erhitzt und anschließend kurz herunterzentrifugiert (1 min, 3000 rpm). Danach wurden die

Geltaschen mit äquivalenten Mengen Protein (8 – 15 µg) beladen (Volumen also abhängig von der Proteinmessung, wobei größere Abweichungen mit 1x Laemmli-Probenpuffer ausgeglichen wurden). Verwendet wurden gebrauchsfertige Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels von BioRad Laboratories. Die Elektrophorese wurde in TGS-Laufpuffer (BioRad Laboratories) durchgeführt. Das standardisierte System soll eine hohe Trennschärfe und eine niedrige Nachweisgrenze für Proteingemische gewährleisten. Als Proteinstandard wurde der PageRuler™ Plus Marker (Thermo Fisher Scientific) aufgetragen.

#### 2.12.2.5 Immunoblotting (*Western Blot*)

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden im Anschluss durch ein *Semi-Dry*-Verfahren auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen (*Blotting* i.e.S.). Bei dieser Übertragung bleibt das Trennungsmuster aus der SDS-PAGE erhalten, sodass die einzelnen Proteine als leiterartiges Muster auf der Membran erscheinen. Zum *Blotting* auf die Membran wurde das Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (BioRad Laboratories) verwendet. In die Transferkassette wurden auf einen saugfähigen Transfer-*Stack* zunächst die Nitrocellulose-Membran und dann das Gel gegeben, gefolgt von einem weiteren Transfer-*Stack*. Dieses sogenannte *Blot-Sandwich* wurde in Transferpuffer getränkt und die Kassette geschlossen. (Alle benötigten Komponenten stammten von BioRad Laboratories.) Nach Einsatz der Kassette in das Transfer-Gerät, sorgte elektrische Spannung innerhalb von drei Minuten für eine Übertragung der Proteine auf die Membran. Zur Kontrolle des Transfers wurde die Membran mit Ponceau-S-Lösung (vgl. Kap. 2.7) gefärbt. Dieser Farbstoff bindet unspezifisch an Proteine und erlaubt eine grobe Beurteilung der Transferqualität und der Ladungsmenge (äquivalente Proteinmengen). Zur Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen wurde die Membran für eine Stunde in TBS-T mit 5 % (w/V) Magermilchpulver bei RT inkubiert. Die Inkubation mit Primärantikörpern erfolgte jeweils über Nacht unter stetigem Schwenken bei 4 °C.

#### 2.12.2.6 Proteindetektion

Nach der Konjugation des Primärantikörpers wurde dieser entfernt und nach 15- bis 30-minütigem Waschen (mehrfacher Wechsel des Waschpuffers) wurde der passende Sekundärantikörper (1:1000 gelöst in TBS-T, verknüpft mit HRP = *horseradish peroxidase*) auf die Membran gegeben. Eine Inkubation von einer Stunde unter stetigem Schwenken bei RT folgte. Nach erneutem Waschen der Membran wurde diese mit einer frisch angesetzten ECL-Testlösung (vgl. Kap. 2.5) für ca. 5 min behandelt. Das HRP-Enzym, das an den Sekundärantikörper konjugiert ist, setzt die ECL-Lösung in ein Produkt um, dessen Lumineszenz detektierbar ist. Durch die spezifische Interaktion der Antikörper ist die Spezifität der Proteindetektion gewährleistet. Die Detektion erfolgte mit einer Fusion Fx Analysekamera (VWR International) und der zugehörigen Software.



## 2.13 Zellbiologische Methoden

### 2.13.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die unter Kap. 2.9 aufgeführten Zelllinien wurden für die normale Propagation in T-75 Flaschen der Firma Sarstedt bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und wasserdampfgesättigter Atmosphäre in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator MCO-17AI (Sanyo Electric Co., Ltd.) kultiviert. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt, wobei alle Medien auf 37 °C vorgewärmt wurden. Je nach Teilungsgeschwindigkeit der jeweiligen Zelllinie wurden die Zellen ein bis zwei Mal pro Woche geteilt, wobei der Zellrasen (alle oben genannten Zelllinien wachsen adhärent), mit 5 ml autoklaviertem PBS gewaschen wurde und anschließend mit Trypsin-EDTA benetzt wurde (4 ml). Nach einer Inkubationszeit von ca. 5 min im Inkubator bei 37 °C wurde nach mikroskopischer Kontrolle der Ablösung der Zellen, die Enzymaktivität über die Zugabe von frischem Medium (1:1) gestoppt und bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Medium aufgenommen und die so entstehende Suspension konnte für die weitere Kultivierung (i. d. R. 1:3 bis 1:5) oder Versuche eingesetzt werden.

### 2.13.2 Kryokonservierung und Revitalisierung

Zur Kryokonservierung der Zellen wurden dieselben trypsiniert und die abgelösten Zellen nach mikroskopischer Kontrolle in Medium aufgenommen. Nachdem die Zellen für 5 min bei 1200 rpm herunterzentrifugiert wurden, konnte das Pellet in 1 ml FBS, versetzt mit 10 % DMSO, aufgenommen werden, um in Kryoröhrchen (Firma Sarstedt) überführt zu werden. Eine Lagerung erfolgte bei -80 °C. Wurden im Zeitverlauf frische Zellen benötigt, konnten die konservierten Zellen bei Raumtemperatur aufgetaut, in Medium aufgenommen, herunterzentrifugiert (5 min, 1000 rpm), resuspendiert und in Kulturgefäße überführt werden. Nach 48 h erfolgte eine mikroskopische Kontrolle und ein Wechsel des Kulturmediums, womit die Revitalisierung beendet war. Durch regelmäßige Kryokonservierung und Asservierung wurde eine übermäßige Zellalterung vermieden.

### 2.13.3 Zellkonzentrationsbestimmung

Wurden für Versuche definierte Zellmengen benötigt, wurden die Zellkonzentration in einer Suspension durch eine von zwei folgenden Methoden bestimmt. Innerhalb eines Versuchs wurde zwecks Vergleichbarkeit die gleiche Methode angewendet.

Method 1: apparative Bestimmung mittels Muse™ Cell Analyzer

20 µl der Zellsuspension wurden mit 380 µl (1:20) Muse® Count & Viability Lösung versetzt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Gerät gemäß den Anweisungen des Herstellers (Merck Millipore) kalibriert, worauf die Messung erfolgte. Das Gerät analysiert durchflusszytometrisch die Zellkonzentration, aber auch die Viabilität der Zellen durch

Einsatz zweier Farbstoffe in der Testlösung (Nukleinsäurefärbung und Membranpermeabilität) sowie Berücksichtigung zellmorphologischer Kriterien (Größe).

#### Methode 2: manuelle Bestimmung mittels Neubauer-Zählkammer

Nach Färbung mit Trypanblau wurden die Zellen in die Neubauer-*improved* Zählkammer (Brand GmbH) eingebracht, die Zählung erfolgte unter dem Lichtmikroskop. Anschließend kann die Konzentration rechnerisch ermittelt werden (Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren).

### 2.13.4 Viabilitätsassay

Für den Viabilitätsassay wurde CellTiter 96®-Aqueous-One-Solution Zellproliferationsassay (Promega) verwendet. Der Assay ist eine photometrisch basierte Methode und lässt Rückschlüsse auf die Viabilität und deren Änderung unter variablen Konditionen zu. In der Testlösung befinden sich als Nachweisreagenz ein Mono-Tetrazolium-Salz (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium; MTS). Durch mitochondriales NADH/H<sup>+</sup> kann MTS in ein Formazan-Produkt reduziert werden, was einen Farbumschlag der Testlösung, der photometrisch bei 490 nm messbar ist, bewirkt. Um eine messbare Menge des MTS zu reduzieren, müssen intakte Mitochondrien vorhanden sein, die Reduktionsmittel in Form von NADH/H<sup>+</sup> nachliefern, sodass die Menge des umgesetzten MTS direkt proportional zur Menge der lebenden Zellen im Kulturgefäß ist. Änderungen der Absorption lassen somit direkte Rückschlüsse auf Viabilitätsänderungen zu. Proliferation und Zelltod können nicht nachgewiesen werden, nur indirekte Rückschlüsse hierzu sind möglich.

Für Proliferationsversuche wurden Zellen gezählt und die gewünschte Zellzahl in 100 µl Medium in je ein *Well* einer 96-*Well*-Platte ausgesät (Triplikate für jede Kondition/Zelldichte). Anschließend wurden die Zellen für den jeweiligen Beobachtungszeitraum bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Ablauf des Untersuchungszeitraums wurden zu jedem *Well* 20 µl MTS-Testlösung gegeben und die Zellen für weitere zwei Stunden in den Inkubator gegeben. Anschließend erfolgte die photometrische Absorptionsbestimmung bei 490 nm und 650 nm (Bereinigung vom Hintergrund) mit einem Plattenleser Infinite® M200 Pro (Tecan Group AG) gemessen. Die Gerätesteuerung erfolgte mit der Software Tecan i-control™ V 3.6 des gleichen Herstellers. Alle gezeigten Versuche wurden mindestens drei Mal durchgeführt, ein repräsentatives Ergebnis wurde in der Arbeit abgebildet.

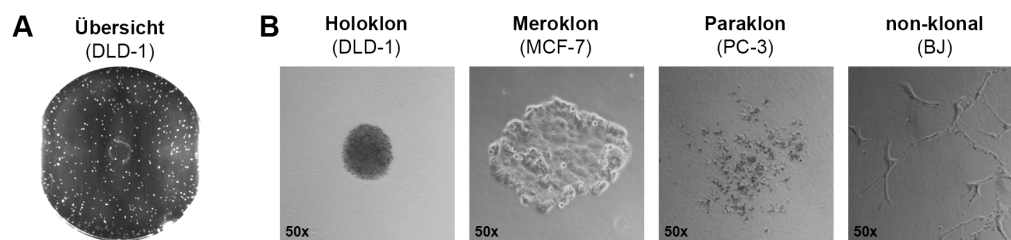
### 2.13.5 Klonalitätsassay in Methylcellulose

Der Klonalitätsassay in Methylcellulose dient der längerfristigen Untersuchung zellulären Wachstums in Abhängigkeit von der zellulären Verankerung. In der normalen 2D-Zellkultur stehen die Zellen in Verbindung mit der Oberfläche des Kulturgefäßes. Zur Untersuchung der Fähigkeit ohne Verbindung zu einer Oberfläche wachsen und proliferieren zu können (*Anchorage independent growth*), werden die Zellen in ein zähflüssiges Medium eingebracht. Im

Unterschied zur normalen Klonalitätsanalyse in *Soft-Agar*, einem etablierten Verfahren zur Testung der onkogenen Transformation (Cifone und Fidler 1980; Overholtzer et al. 2006), wurde in dieser Arbeit ein Medium verwendet, das normalerweise zur Testung des Proliferations- und Differenzierungspotenzials von hämatopoietischen Stammzellen in der Hämatologie dient (StemMACS HSC-CFU basic, Miltenyi Biotech). Hierdurch wird die Notwendigkeit eines zweischichtigen Assaysystems mit zwei Lagen unterschiedlicher Agar-Konzentration umgangen. Neben 1 % Methylcellulose in IMDM-Medium enthält das Medium außerdem 30 % FBS, Bovines Serum Albumin, L-Glutamin und 2-Mercaptoethanol.

Nach Erstellung einer Zellsuspension der gewünschten Konzentration wurden 800  $\mu$ l der Suspension (Zellen in jeweiligem Kulturmedium) mit 3,2 ml Methylcellulose versetzt und durch vorsichtiges Pipettieren homogenisiert. Je ein Milliliter wurde im Folgenden in 35 mm Petrischalen gegeben und durch Schwenken gleichmäßig verteilt. Ein Milliliter wurde jeweils verworfen, da die zähflüssige Suspension schlecht pipettierbar ist. Die Petrischalen (Triplikate) wurden bei 37 °C für 7 – 14 Tage in einer feuchten Kammer inkubiert, anschließend folgte die Zählung der Klone unter dem Stereomikroskop. Es wurden außerdem Übersichtsaufnahmen von der gesamten Petrischale, sowie exemplarische Aufnahmen von repräsentativen Einzelklonen bei 40-facher Vergrößerung im Auflichtmikroskop gemacht (vgl. Abbildung 2.1).

In Analogie zu kultivierten Keratinozyten, können Zellen in Methylcellulose drei verschiedene Arten von Klonen bilden: sphärische Holoklone, platte Meroklone und unzusammenhängende Paraklone. Den Holoklonen wird das höchste Stammzellpotenzial zugeschrieben (Barrandon und Green 1987).



**Abbildung 2.1: Klonalitätsassay in Methylcellulose.** **A** Beispielhafte Übersichtsaufnahme der 35 mm Petrischale mit deutlich sichtbaren, großen Holoklonen (weiße Punkte). **B** Vergrößerte Darstellung einzelner Klone unterschiedlicher Morphologie bei verschiedenen gut etablierten Zelllinien (DLD-1: Kolonkarzinom, MCF-7: Mammakarzinom, PC-3: androgenabhängiges Prostatakarzinom, BJ: humane Fibroblasten).

### 2.13.6 Transfektion eukaryotischer Zellen mit Plasmid-Vektoren

Für die Erstellung stabiler transgener Zelllinien wurden Plasmidvektoren (siehe Kap. 2.10) durch Transfektion in die Zellen eingebracht. Bei der hier durchgeführten Lipofektion wird die Plasmid-DNA in Liposomen verpackt, die als *Carrier* fungieren, um eine Passage durch die Zellplasmamembran zu ermöglichen. Der Transfektionserfolg wird (hier) durch Antibiotikaresistenzen, die im gleichen Vektor vorhanden sind, gewährleistet.

Zu diesem Zweck wurde die gewünschte Menge Plasmid-DNA ( $\mu\text{g}$ ) pro Ansatz in  $100\ \mu\text{l}$  Opti-MEM™-Medium (Thermo Fisher Scientific) ohne Zusätze gegeben. Danach wurde XtremeGENE™ HP DNA Transfektions-Reagenz (Sigma-Aldrich) im Verhältnis 1:1 ( $m_{\text{DNA}}:V_{\text{Reagenz}}$ ) in das Medium gegeben, worauf der Ansatz für 30 min bei RT inkubiert wurde, damit sich die Transfektionskomplexe bilden konnten. Die Transfektion geschah in *Wells* auf 6-*Well*-Platten, in die direkt vor der Transfektion 300.000 Zellen/*Well* gegeben wurden, sodass diese nicht adhären waren (= reverse Transfektion). Die Zugabe des Transfektionskomplexes erfolgte tröpfchenweise unter stetigem Schwenken des Zellkulturgefäßes. Die Zellen wurden anschließend für 24 h inkubiert, bevor das Medium mit dem zytotoxischen Transfektionskomplex entfernt wurde. Eine Selektion mittels G418-Resistenz erfolgte ab 48 h nach Transfektion mit Konzentrationen, die zuvor anhand des lichtmikroskopisch evaluierten Sterbeverhaltens ermittelt wurden. Eine Negativkontrolle zum Ausschluss endogener Resistenz wurde immer mit ausplattiert. Die Herstellung, Lagerung und Vernichtung der genetisch veränderten Organismen (GVO) wurde fachgerecht durchgeführt.

### 2.13.7 Lentivirale Transduktion

Bei der lentiviralen Transduktion wird genetische Information mittels eines Lentivirus in eine Zielzelle eingebracht. Lentiviren gehören zu den Retroviren und verfügen über eine Integrase, die für eine stabile Expression der eingebrachten Information sorgt. Für die Herstellung der Viren wurden in dieser Arbeit je  $3 \times 10^5$  HEK-293T-Zellen in sechs *Wells* einer 6-*Well*-Platte ausplattiert und für 24 h bei Standardbedingungen inkubiert. Am Folgetag wurde das Medium für die Transfektion gegen antibiotikafreies DMEM-Medium ausgetauscht. Für die Transfektion wurde in  $500\ \mu\text{l}$  FBS-freies Opti-MEM™-Medium  $18\ \mu\text{l}$  FuGENE®-HD-Transfektionsreagenz gegeben und der Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Anschließend wurde für jede 6-*Well*-Platte je ein Ansatz mit  $500\ \mu\text{l}$  FBS-freiem Opti-MEM™-Medium und den Plasmid-Vektoren erstellt. Es wurden die Plasmide pMD2.G ( $3\ \mu\text{g}$ ), pCMV- $\Delta$ R8.91 ( $300\ \text{ng}$ ) und eines der Zielplasmide (shRNA scr, shYAP#1, shYAP#1, jeweils  $3\ \mu\text{g}$ ) zum Ansatz hinzugegeben (Plasmide mit Referenzen vgl. Tabelle 2.12). Danach wurde der Ansatz mit dem Transfektionsreagenz vorsichtig in den Ansatz mit den Plasmiden getropft und anschließend für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde je 1/6 des entstandenen Transfektionskomplexes unter stetigem Schwenken in jedes *Well* auf die HEK-293T-Zellen gegeben. Der Ansatz wurde über Nacht unter Standardbedingungen inkubiert, anschließend wurden das Medium entfernt und gegen ein BSA-haltiges Medium ausgetauscht (DMEM mit 10 % FBS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % Glutamin, 1 % BSA). Nach weiteren 24 h erfolgte die erste, nach 36 h die zweite Ernte des virushaltigen Überstandes. Dieser wurde durch Filtration ( $0,45\ \mu\text{m}$  Poren) von eukaryotischen Zellen befreit. Eine Lagerung erfolgte bei  $-150\ ^\circ\text{C}$ .

Für die Transduktion wurden Zielzellen in T75-Zellkulturflaschen in antibiotikafreiem Medium ausgesät. Nach 24 h wurden das Zellkulturmedium gegen ein zu gleichen Teilen aus Frischmedium und Virusüberstand bestehenden Ansatz ausgetauscht, der Prozess wurde

nach 24 h nochmals wiederholt. Anschließend begann die Selektion mit Puromycin (6 µg/ml), die in der Regel über 48 h erfolgte, wonach mitbeobachtete Kontrollzellen komplett abgestorben waren. Der Gesamte Prozess erfolgte in einem Labor der Sicherheitsstufe 2. Der Transfektionserfolg wurde anschließend mittels *Western Blot* überprüft.

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide enthalten *small-hairpin* RNAs (shRNAs) gegen YAP. Das Prinzip der Herunterregulation der Proteine beruht dabei auf der RNA-Interferenz. Die lentiviral stabil exprimierte RNA bildet dabei eine Haarnadelstruktur, die ihr den Namen verleiht. Die transkribierte shRNA wird von den Enzym Drosha und Dicer prozessiert, wonach eine Bindung an den RNA-induced silencing-complex (RISC) folgt. Dieser Komplex kann nach Bindung der shRNA-Matrix an eine komplementäre mRNA eine Spaltung derselben durch Hydrolyse bewirken, wodurch eine Translation der RNA unterbunden wird. Dabei bietet die lentiviral vermittelte Expression den Vorteil einer stabilen Expression mit geringerer *ad-hoc* Dosierung der RNA im Vergleich zu siRNA, die nur transiente Effekte aufweist und durch höhere Dosierung eine stärkere Tendenz zu *Off-target*-Interaktionen aufweist. Die Einbringung lentiviraler RNA ist bei shRNAs als mögliches Problem zu sehen, da hierdurch eine stärkere Stimulation zellulärer Abwehrmechanismen befürchtet werden muss (Rao et al. 2009). Die in dieser Arbeit verwendeten shRNAs sind komplementär zur YAP-mRNA, sodass ihre Expression zu einer Verminderung der YAP-Expression führt (Rosenbluh et al. 2012). Um unspezifische Effekte bestmöglich auszuschließen, wurde eine shRNA ohne Komplementarität zu exomischer RNA („scrambled“) verwendet.

### 2.13.8 CRISPR/Cas9-vermittelter *Knockout*

Der Caspase-3-*Knockout* in der Zelllinie 1889c wurde mittels eines CRISPR/Cas-Plasmids (Tabelle 2.12) herbeigeführt. Die Erstellung der Zelllinie erfolgte durch Dr. rer. nat. Denise Müller (UMG, Institut für Pathologie), die die Zelllinie freundlicherweise zur Verfügung stellte. Im Folgenden soll kurz auf das Prinzip hinter dieser Technik eingegangen werden.

Die Methode dient der Editierung genomischer DNA und bedient sich eines prokaryotischen Immunmechanismus, den *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR), der zum Schutz der bakteriellen Zellen vor Fremdplasmiden und Phageninfektionen dient. Zur Entfernung fremder DNA aus einer Zelle wird die Endonuklease Cas9 aktiviert, die einen Doppelstrangbruch in der Ziel-DNA induziert. Um eine Ziel-DNA zu erkennen, wird eine crRNA (CRISPR-RNA) benötigt, die einerseits komplementär zur Zielsequenz ist (sog. *Spacer*), andererseits die nötige Bindungssequenz enthält an der Cas9 binden kann (sog. *Repeat*). Des Weiteren benötigt der Komplex eine tracrRNA (*trans-activating* CRISPR-RNA), die komplementär an die *Repeat*-Sequenz der crRNA bindet. Molekularbiologisch werden die tracrRNA und crRNA in einem Molekül fusioniert, wodurch sgRNA (*single-guide* RNA) entsteht, die Cas9 an eine spezifische Bindungsstelle navigiert (Jinek et al. 2012). In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene sgRNAs verwendet, die *upstream* und *downstream* vom Start-Codon des Exons 3 der Caspase-3 gerichtet waren, entsprechend der Deletion in TAB-1.

### 2.13.9 Konfokale Immunzytofluoreszenz-Mikroskopie

Die konfokale Immunzytofluoreszenz-Mikroskopie kombiniert lichtmikroskopische Verfahren mit dem Prinzip des Immunoassays. Es kann die subzelluläre Lokalisation von Proteinen in Zellen nachgewiesen werden und hochauflösend dargestellt werden.

Zur Herstellung entsprechender Präparate wurden ca.  $2 \times 10^4$  Zellen in Chamber-Slides (Merck Millipore) ausgesät und für 48 h inkubiert. Nach anschließender Behandlung in gewünschten Konditionen wurde das Medium entfernt, mit PBS gewaschen, die Zellen für 10 min in 4 % Paraformaldehyd fixiert, und anschließend erneut in PBS gewaschen. Um die Zellen für Antikörper permeabel zu machen, folgte eine Behandlung mit 0,3 % Octoxinol 9 (Triton™ X-100, Sigma Aldrich), einem Tensid, das die Integrität der Zellmembranen beeinträchtigt, für 10 min. Nach anschließender Waschung mit PBS wurden unspezifische Bindungsstellen mit in 1 % BSA (in PBS) für 60 min bei Raumtemperatur geblockt und der Primärantikörper anschließend in gewünschter Verdünnung (gelöst in 1 % BSA) hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4 °C. Am Folgetag wurde der Primärantikörper entfernt und nach dreimaliger Waschung in PBS folgte eine Inkubation (60 min bei RT) mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (bspw. Alexa Fluor 488) und 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI bindet an DNA zur Darstellung der Zellkerne, 1:1000), beides gelöst in 1% BSA. Nach anschließender dreimaliger Waschung in PBS wurden die Kammern abgetrennt und der Objektträger mit Polyvinylalkohol (Mowiol 4-88, Carl Roth) benetzt und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die Analyse der gefärbten Zellen erfolgte mit einem spektralen konfokalen Laserscanning-Mikroskop IX81 der Firma Olympus (Tokio, Japan).

## 2.14 Untersuchungen an Patientenmaterial

### 2.14.1 Kollektiv der Thymusneoplasien

An einem über viele Jahre von Prof. Dr. Ströbel (Göttingen) und Prof. Dr. Marx (Mannheim) zusammengestellten Kollektiv aus Gewebeproben humaner Thymusneoplasien wurden immunhistochemische Analysen durchgeführt. Diese Neoplasien wurden von beiden Pathologen unabhängig nach dem aktuellen System der WHO (Travis et al. 2015) klassifiziert. Die Verteilungsanalysen stützen sich auf diese Klassifikation. Für die Analysen der in dieser Arbeit verwendeten Gewebeproben liegt ein positives Votum des Ethikkomitees der UMG vor (Antragsnummer 9/2/15).

### 2.14.2 Histologische Techniken

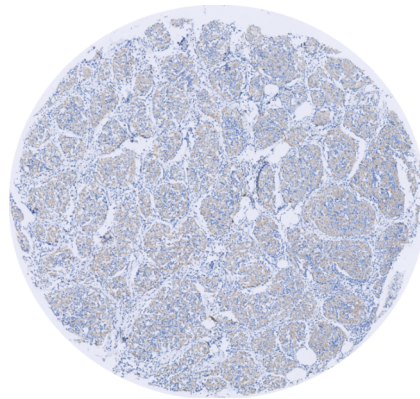
#### 2.14.2.1 Fixierung und Einbettung des Materials

Die in der Regel im Rahmen operativer Eingriffe an den Universitätskliniken Mannheim und Göttingen entnommenen Tumoren wurden unmittelbar nach ihrer Entfernung in 10 %

Formalinlösung (Methanal in Wasser) fixiert, wodurch auto- und heterolytische Prozesse im Gewebe unterbunden werden. Das Gewebe wurde für die anschließende Einbettung in einer Alkoholreihe aufsteigender Konzentrationen entwässert, um anschließend in lipophilem Paraffin eingebettet zu werden. Hierdurch wird das Gewebe gehärtet und somit schneid- und stanzbar.

#### 2.14.2.2 Erstellung der TMAs

*Tissue Microarrays* (TMAs) ermöglichen die Gruppierung zahlreicher Patientenfälle auf einem Objektträger (ca. 35 Fälle in Duplikaten), wodurch etwa immunhistochemische Analysen vereinfacht und standardisiert werden können. Erstens ermöglicht die parallele Darstellung die schnelle Begutachtung zahlreicher Fälle, wodurch ein hoher Durchsatz an Proben im Sinne eines *High-throuput-profiling*s ermöglicht wird (Kononen et al. 1998). Zweitens wird die Vergleichbarkeit erhöht, da sich zahlreiche Proben auf einem Objektträger befinden und die Vorbehandlung somit einheitlich ist (Camp et al. 2008).



**Abbildung 2.2:** Übersichtsaufnahme eines mikroskopischen Schnitts eines Stanzzylinders in einem TMA. Das Bild zeigt einen der bis zu 68 Schnitte der Stanzzyklinder, die auf einem Objektträger eines TMAs vorhanden sind.

Die TMAs wurden im Institut für Pathologie der UMG wie folgt hergestellt: Zunächst wurden Übersichtsschnitte von Tumoren erstellt und mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt, worauf die relevanten Areale (Tumor-Bereich) markiert wurden. In diesem Bereich wurden sodann zwei Stenzen aus unterschiedlichen Tumorarealen aus dem Paraffinblock (Donor-Block) entnommen, die in einen Akzeptor-Block an eine definierte Stelle in ein Raster eingefügt wurden (Wan et al. 1987). Der so entstehende TMA-Block enthielt auf diese Weise insgesamt Gewebe aus Tumoren von bis zu 34 Patient\*innen mit je zwei Stenzen (Duplikate aus unterschiedlichen Tumorarealen).

#### 2.14.2.3 Verarbeitung der TMAs und immunhistochemische Färbung

Die TMA-Blöcke wurden mit einem Schlittenmikrotom (Leica SM 2000R, Leica Microsystems) in 1 µm dünne Schnitte geschnitten und mit einem Pinsel in ein Wasserbad gezogen, um von dort auf spezielle Objektträger (Superfrost® Plus, Fa. Thermo Scientific) aufgezo- gen zu werden. Anschließend folgte eine thermische Entparaffinierung mittels Erhitzung der

Objektträger in einem Inkubator bei 60 °C für eine Stunde. Die immunhistochemische Färbung wurde mit einem standardisierten Kit gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt (EnVision FLEX+, *Mouse, High pH (Link)*, DAKO, Aligent Technologies Inc.). Der Färbeprozess wurde in einem Färbeautomaten (PT Link, Fa. Dako) nach dem folgenden Protokoll durchgeführt.

### 1. Epitopdemaskierung

Es wurde eine hitzeinduzierte Epitopdemaskierung durchgeführt. Hierzu wurden die Objektträger in einen auf 84 °C vorgeheizten Dako PT Link Färbeautomaten gegeben und direkt für 15 min auf 97 °C erhitzt. Dieser Prozess wurde in einem TRIS-EDTA basierten Puffer (pH 9, Teil des o. g. Kits = EnVision FLEX *Target Retrieval Solution, High pH* (50x)) durchgeführt. Auf diese Weise wurde eine Bindung des Primärantikörpers möglich gemacht. Nach anschließender Spülung in einem TBST-Waschpuffer (EnVision FLEX *Wash Buffer* (20x)) konnten die Objektträger zur folgenden Färbung in ein Färbegerät (*Autostainer Link* 48, DAKO) überführt werden.

### 2. Färbung

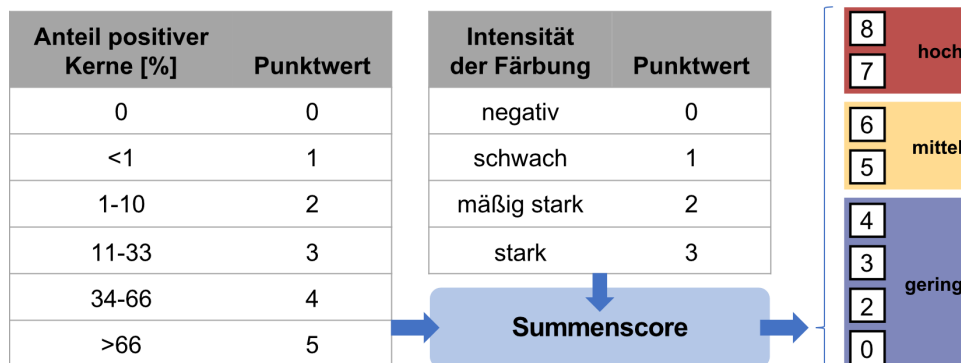
Im Färbegerät (s.o.) wurden die Objektträger zunächst mit Waschpuffer gewaschen und anschließend für 5 min mit einem wasserstoffperoxidbasierten Phosphatpuffer (EnVision FLEX *Peroxidase-Blocking Reagent*) behandelt, wodurch endogene Peroxidase-Aktivität, die mit der Färbung interferieren könnte, unterbunden wurde. Nach anschließender Spülung mit Waschpuffer folgte die 30-minütige Inkubation mit YAP-Primärantikörper (Cell Signaling Technologies), der mit TRIS-basierten Puffer (EnVision FLEX *Antibody Diluent*) in einer Konzentration von 1:400 angewendet wurde. Anschließend wurde erneut mit Waschpuffer gespült, wonach ein HRP-verknüpftes (*horseradish peroxidase*, Meerrettich-Peroxidase) Polymer (EnVision FLEX/HRP) hinzugegeben wurde, um für 20 min inkubiert zu werden. Da sich die Signalintensität auch ohne weitere Zugabe von Sekundärantikörpern (das Polymer enthält bereits Sekundärantikörper) als ausreichend darstellte, konnte hierauf verzichtet werden. Nach anschließendem zweimaligem Waschen wurde das Substrat für die HRP (EnVision FLEX DAB+ Chromogen, gelöst in EnVision FLEX *Substrate Buffer*) für 10 min hinzugegeben. In der ablaufenden chemischen Reaktion entsteht ein brauner Farbstoff, der lokal am Polymer verbleibt. Einer anschließenden Waschung folgte die Zugabe von Hämatoxylin (EnVision FLEX *Hematoxylin*) für 8 min zur Kontrastierung der Schnitte. Abschließend wurde mit Waschpuffer und Wasser gewaschen und die Schnitte nach Institutsstandard mit Deckgläsern konserviert.

#### **2.14.3 Immunreaktivitäts-Scoring**

Die TMAs wurden nach Färbung gegen YAP einem Immunreaktivitäts-*Scoring* unterzogen. Hierzu wurde semiquantitativ die Stärke der Färbung sowie der Anteil der gefärbten Tumorzellen durch Prof. Ströbel als erfahrenem Thymus-Pathologen validiert. Hierbei wurden die Punkte-*Scores* für Intensität (0 – 3) und Anteil der gefärbten Zellen (0 – 5) zu einem Summen-



*Score* addiert. Die verwendete Einteilung entspricht dem bei immunhistochemischen Analysen in Mammakarzinomen gängigen Allred-*Score* (Harvey et al. 1999). Die Summe ergab den Summen-*Score* (kann die Werte 0, 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 8 annehmen), die in drei Gruppen (geringe, mittlere und hohe Expression) unterteilt wurden, um statistische Analysen zu vereinfachen und eine Übersichtlichkeit zu gewährleisten. Dabei wurde eine Summe von 0, 2, 3 und 4 Punkten als geringe Expression, eine Punktsomme von 5 und 6 Punkten als mittlere Expressionsstärke und eine Summe von 7 oder 8 Punkten als hohe Expressionsstärke definiert. Siehe hierzu auch Abbildung 2.3.



**Abbildung 2.3: Immunreaktivitäts-Scoring und Einteilung nach Gruppen.** Die Abbildung zeigt in der linken Tabelle wie der Anteil positiv gefärbter Zellkerne eingeteilt wurde und in der rechten Tabelle wie die Intensität der Färbung, die molekular der Signalintensität entspricht, eingeteilt wurde. Rechts ist die Zuordnung des durch Addition ermittelten Summen-*Scores* in die drei Expressionsgruppen (geringe, mittlere und hohe Expression). Die Einteilung der Immunreaktivität erfolgte analog zum Allred-*Score* (Harvey et al. 1999).

## 2.15 Statistische Analysen

Alle in dieser Arbeit gezeigten Diagramme und deren statistische Analysen wurden durch Nutzung der Statistiksoftware Prism 9 für macOS (GraphPad Software LLC., San Diego, Kalifornien, Vereinigte Staaten) erstellt. Für Daten mit einer gruppierenden Variablen wurde ein unpaarer, zweiseitiger *t*-Test verwendet, für gruppierte Daten mit zwei gruppierenden Variablen wurde deren Einfluss auf die untersuchte Variable mittels *Two-way analysis of variance* (*two-way* ANOVA) mit Bonferroni-*Post-hoc*-Analyse untersucht. Für die statistische Analyse wurde mit  $n \geq 3$  gearbeitet, als signifikant wurde gängiger Konvention folgend ein *p*-Wert  $< 0,05$  angenommen (Signifikanzniveaus: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ), das Konfidenzintervall für den *t*-Test betrug 95 %. Wenn relative Werte angegeben sind, wurde der Messwert auf den Mittelwert der dem Experiment zugehörigen Kontrolle bezogen, welche für den Vergleich gleich null (bzw. 0 %) oder gleich 1,0 (bzw. 100 %) gesetzt wurde. In Fällen wo von den o. g. Konditionen abgewichen wurde, ist dies in den jeweiligen Abbildungslegenden aufgeführt.

Zur Darstellung der Verteilung der YAP-Expression in den verschiedenen Subtypen der Thymusneoplasien wurden *truncated Violin-Plots* erstellt. Diese ähneln *Whisker-Plots* dahingehend, dass sie sowohl Median als auch Quartilsgrenzen darstellen, zeigen jedoch die

Verteilung besser auf. Es handelt dabei um ein deskriptiv-statistisches Darstellungswerkzeug für Datensätze, die auf einem niedrigen Skalenniveau beruhen. Die Breite der „Violine“ repräsentiert dabei die Häufigkeit der jeweiligen Eigenschaft. Der Terminus „*truncated*“ bezieht sich dabei auf das obere und untere Ende der Verteilung, für das in der Kalkulation der Verteilung zwar rechnerisch weitere Werte existieren, die jedoch bei dem vorliegenden Datensatz keine sinnvollen Werte darstellen, da der *Score* nur die Werte 0 bis 8 annehmen kann. Die sonst spitz auslaufenden Enden wurden daher bei den *Score*-Grenzen gestutzt (= *truncated*).

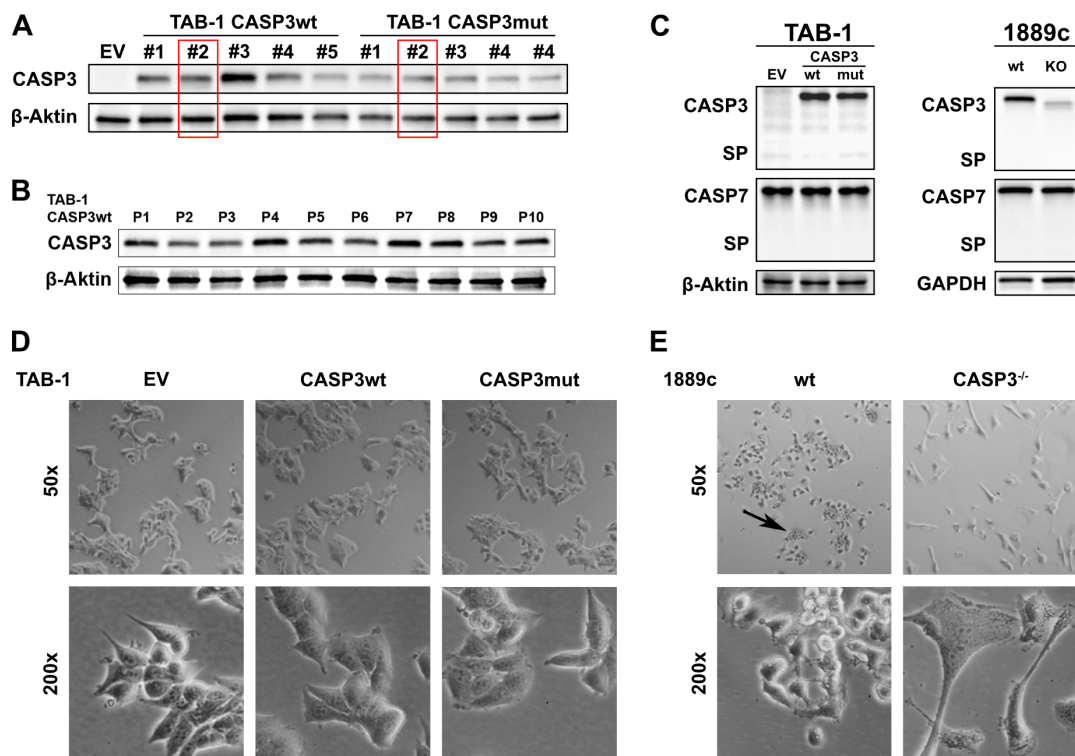
Die Kaplan-Meier-Kurven wurden mittels Prism 9 für macOS erstellt. Eine Testung auf Signifikanz erfolgte im selben Programm mittels Mantel-Cox und Gehan-Breslow-Wilcoxon-Test, die Signifikanzniveaus entsprachen den oben genannten.

Die Unterschiedliche Verteilung der *Myasthenia gravis* wurde bei geringer Fallzahl hinsichtlich Signifikanz mittels eines zweiseitigen Exakten Tests nach Fisher untersucht. Die Berechnung erfolgte ebenfalls mit Prism 9 für macOS.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Etablierung geeigneter Zellmodelle

Um die in Kapitel 1.4 beschriebene Fragestellung nach der Abhängigkeit thymischer Neoplasien vom Vorhandensein der Caspase-3 zu untersuchen, wurden zwei Zellmodelle verwendet. Einerseits wurde das Zellmodell IU-TAB-1 (nachfolgend TAB-1) als Modell für ein Thymom des WHO-Typs AB herangezogen, andererseits die Zelllinie 1889c als Modell für ein Thymuskarzinom.



**Abbildung 3.1: Etablierung geeigneter Zellmodelle.** **A** Einbringung von zwei verschiedenen Caspase-3-Plasmiden in jeweils fünf Ansätzen in die Zelllinie TAB-1, wt = Wildtyp-Caspase, mut = katalytisch inaktive mutierte Caspase als zur Berücksichtigung nicht-katalytischer Effekte. Zum Vergleich wurde TAB-1 mit einem pcDNA3.1 Leervektor (*empty vector* = EV) als Negativkontrolle transfiziert. Um gleiche Ausgangsbedingungen zu schaffen, wurden Ansätze mit etwa gleicher Expression für die weiteren Versuche eingesetzt (rote Markierung). **B** Die Beobachtung der Expression der Caspase-3 über zehn Passagen zeigt keine wesentliche Änderung. **C** Direkter Vergleich der Expression der Effektorcaspasen -3 & -7 in den beiden Zellmodellen (TAB-1: markierte Ansätze aus A), n = 3. **D** Lichtmikroskopische Morphologie des TAB-1-Modells ohne relevante Unterschiede. **E** Vergleich der Morphologie des 1889c-Modells im Durchlichtmikroskop mit deutlicher Änderung der Morphologie.

Da die Zelllinie TAB-1 über eine Deletion der Procaspase-3 (im Folgenden vereinfachend Caspase-3 genannt) verfügt, war es zunächst notwendig, diese in das Zellmodell einzubringen. Die verwendete Plasmidvektoren wurden über Addgene (Watertown, Massachusetts, Vereinigte Staaten) bezogen, entstammen dem Labor von G. Salvesen und sind gut validiert

(Stennicke und Salvesen 1997). Neben einer Wildtyp-Caspase-3 wurde darüber hinaus eine katalytisch inaktive Mutante der Caspase-3 eingebracht. Diese Caspase-3 verfügt über eine Mutation im katalytischen Zentrum (C163A). Da Caspasen als Cysteinyl-Aspartat-Proteasen von einem Cysteinyl-Rest im katalytischen Zentrum abhängig sind, führt die Substitution mit einem Alanin-Rest an dieser Stelle zu einer katalytischen Inaktivität (Fuentes-Prior und Salvesen 2004; Stennicke und Salvesen 1997). Die katalytisch defekte Mutante dient der Differenzierung von Effekten, die aus möglichen nicht-enzymatischen Funktionen der Caspase-3 resultieren oder denen eine dominant-negative Funktion des Proteins zugrunde liegt.

Nachdem das Plasmid, wie in Kapitel 2.12.1 beschrieben, amplifiziert und isoliert wurde, wurde eine Lipofektion mit TAB-1 durchgeführt (vgl. Kap. 2.13.6). Dabei wurden jeweils fünf Ansätze pro Plasmid erzeugt, eine Negativkontrolle zur Überprüfung der Wirksamkeit des Selektionsantibiotikums wurde jeweils mit ausplattiert. In einer vorherigen Testreihe wurde ermittelt, dass die kritische Konzentration von Geneticin (G-418) zur effektiven Abtötung nicht-transfizierter TAB-1-Zellen bei 800 µg/ml Medium lag. Nach sieben Tagen waren die nicht transfizierten Zellen in der lichtmikroskopischen Kontrolle sämtlich abgetötet und beim Wechseln des Mediums mit gewaschen, während die transfizierten Zellen in einzelnen Gruppen weiterhin vital aussahen und wuchsen. Um unspezifische Nebeneffekte des Plasmids auszuschließen, wurde pcDNA3.1(+) als Leervektor (EV = *Empty vector*) transfiziert und die selektierten Zellen als Negativkontrolle verwendet.

Zur Validierung des Transfektionserfolgs wurden nach ausreichender Expansion der selektierten Zellen Proteinlysate aller Zelllinien erstellt und im *Western Blot* auf die Caspase-3-Expression untersucht (vgl. Kap. 2.12.2). Es zeigte sich, dass die Caspase-3 in allen selektierten Zellen deutlich erkennbar exprimiert wird, während die Leervektor-Kontrolle, wie der Wildtyp, keine Caspase-3-Expression zeigte (Abbildung 3.1A). In einer gesonderten Untersuchung wurde außerdem die Stabilität der Expression des Wildtyps der Caspase-3 über zehn Passagen untersucht, wobei sich eine konstante Expression des Plasmids ohne Verlust der Expressionsstärke zeigte (Abbildung 3.1B). Für die weiteren Versuche wurde jeweils eine Zelllinie mit Wildtyp-Caspase-3 (TAB-1 CASP3wt) und mutierter Caspase-3-(C163A) (TAB-1 CASP3mut) ausgesucht, die im *Western Blot* eine gleich starke Expression der Caspase-3 zeigten, was im direkten Vergleich erneut bestätigt wurde (Abbildung 3.1C). Außerdem wurde eingehender untersucht, ob Spaltprodukte der Caspase-3 vorliegen, die beispielsweise bei einer Aktivierung auftreten können (Nicholson 1999; Tawa et al. 2004). Diese waren nicht detektierbar, ebenso wenig Veränderungen der Caspase-7, der anderen wichtigen Effektorcaspase (Abbildung 3.1C).

Lichtmikroskopisch zeigten die Zelllinien keine morphologischen Unterschiede (Abbildung 3.1C). Diese Beobachtung ist bedeutsam, da in der Literatur eine Änderung der Morphologie von Kolonkarzinomzellen in Abhängigkeit vom Caspase-3-Status beschrieben wurde, die von den Autoren mit epithelial-mesenchymaler Transition und Migration in Verbindung gebracht wurde (Zhou et al. 2018).

Ein CRISPR/Cas9-vermittelter *Knockout* (Kap. 2.13.8) der Caspase-3 in der Thymuskarzinom-Zelllinie 1889c wurde durch Dr. Denise Müller (Pathologie, UMG) durchgeführt und mittels PCR validiert (nicht publizierte Daten). Freundlicherweise wurde dieses Modell von ihr für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. In einer angefertigten *Western-Blot*-Kontrolle zeigte sich ein vollständiges Fehlen der Caspase-3-Bande (Abbildung 3.1C). Der Knockout des Enzyms führte in dieser Zelllinie zu einer deutlichen Änderung der Morphologie mit dendritischen Ausläufern der Zellen und einem eher versprengten Wuchsmuster im Vergleich zum Wildtyp, der zu einem Wachstum in Kolonien (vgl. Pfeil Abbildung 3.1E) neigt und darüber hinaus ein eher plumpes und rundliches Aussehen präsentiert (Abbildung 3.1E). Zusammenfassend war die Generierung eines Zellmodells zu einer vergleichenden Untersuchung der Funktion von Caspase-3 in der Zelllinie TAB-1 erfolgreich. Weder das Verhalten der Zellen in Kultur noch die Untersuchung der Effektorcaspasen im *Western Blot* wiesen auf einen proapoptotischen Stress hin. Mit der Zelllinie 1889c stand ein weiteres Modell zur Untersuchung zur Verfügung.

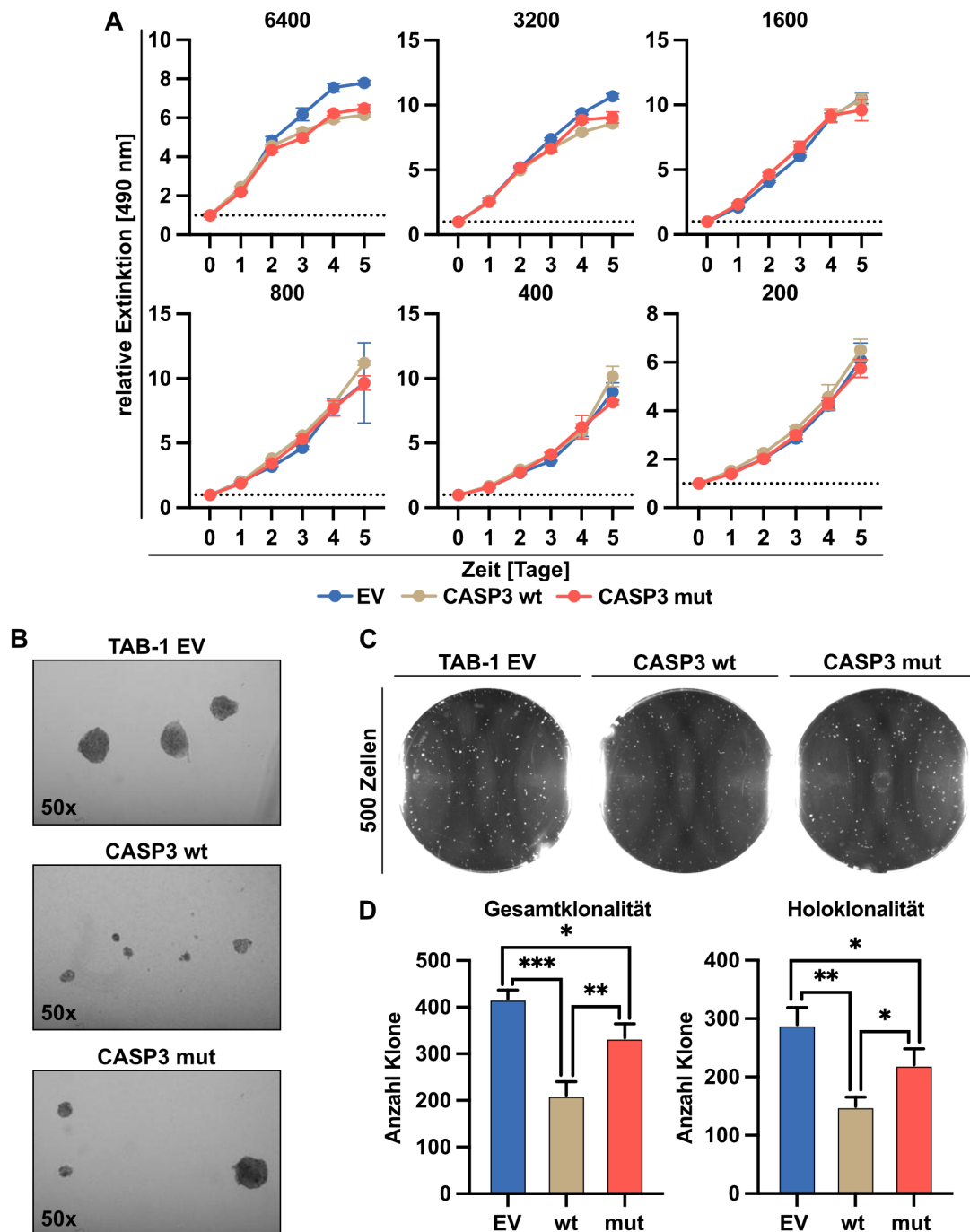
## 3.2 Untersuchungen im TAB-1-Modell

### 3.2.1 Wachstum der Zellen des TAB-1-Modells in 2D- und 3D-Zellkultur

Um den Einfluss der Eingebrachten Caspase-3 in TAB-1 hinsichtlich Veränderungen der Eigenschaften der Zelllinie zu untersuchen, wurde das Wachstum in zweidimensionaler (2D) und dreidimensionaler (3D) Zellkultur untersucht.

Zunächst wurde dabei die Entwicklung der Viabilität der Zellen in Abhängigkeit von der Zelldensität unter normalen Zellkultur-Bedingungen (= zweidimensionales Wachstum) untersucht. Es wurden dazu MTS-Viabilitätsassays (vgl. Kap. 2.13.4) durchgeführt, wobei die Zellen in unterschiedlicher Dichte (200, 400, 800, 1600, 3200, 6400 Zellen/*Well*) in 96-*Well*-Platten ausgesät wurden. Für jeden der insgesamt fünf Tage wurde eine Platte erstellt, diese wurden im Abstand von je 24 h mit dem Testsubstrat behandelt und nach zweistündiger Inkubation photometrisch gemessen. Die Messung am Tag der Aussaat wurde jeweils als Referenzwert herangezogen, sodass die Proliferationskurven in der zugehörigen Abbildung 3.2A relative Steigerungen der Extinktion darstellen. Hierbei zeigten sich für das TAB-1-Modell keine relevanten oder reproduzierbaren Unterschiede.

Des Weiteren wurde mit dem Modell ein Klonalitätsassay in Methylcellulose durchgeführt. Die hierbei beobachteten Holoklone haben keinen Kontakt zu einer festen Oberfläche und sind daher ein Parameter für das Wachstumsverhalten im dreidimensionalen Raum (vgl. Kap. 2.13.5). Hierbei zeigte sich, dass die Wiedereinbringung der funktionsfähigen Caspase-3 (CASP3wt) zu einer deutlichen Verminderung der Größe der Holoklone führte, während dieser Effekt bei Wiedereinbringung der mutierten Caspase-3 (CASP3mut) diesen Effekt nur zum Teil reproduzieren konnte (Abbildung 3.2B).



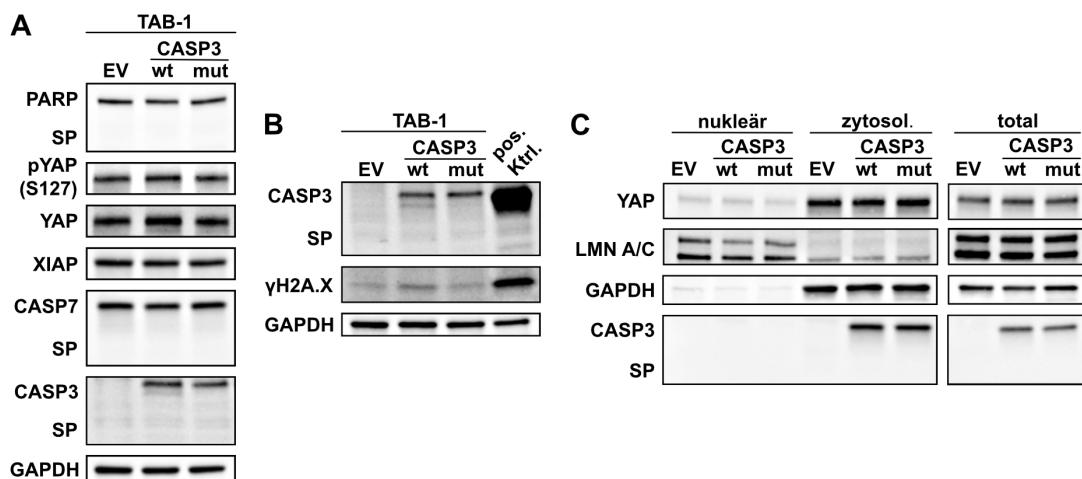
**Abbildung 3.2: Untersuchung des Wachstumsverhaltens des TAB-1-Modells.** **A** Vergleich der Viabilität der stabilen Zelllinien im MTS-Assay über fünf Tage in unterschiedlicher Ausgangszellichte (Zahlen über den Graphen, repräsentatives Beispiel aus  $n = 3$ , *Two-way*-ANOVA). Der Vergleich bei 6400 und 3200 Zellen ist im gezeigten Ansatz signifikant, ließ sich jedoch nicht reproduzieren, sodass auf eine Markierung verzichtet wurde. **B** Holoklone in Methylcellulose der Zelllinien in der Durchlichtmikroskopie mit deutlichen Größenunterschieden. **C** Übersichtsaufnahmen der 35 mm-Platten der Methylcellulose-Assays nach 10 Tagen Inkubation. **D** Statistische Auswertung der gezählten Klone (repräsentative Ergebnis aus  $n = 3$ , nonparametrischer *t*-Test).

Diese Reduktion der Klonalität auf mikroskopischer Ebene konnte auch in der Übersichtsaufnahme (Abbildung 3.2C) und in der Zählung reproduziert werden. So ergaben sich signifikante Unterschiede sowohl zwischen der Negativkontrolle (EV), der Wildtyp-Caspase-3 und der mutierten Variante, als auch zwischen den beiden verschiedenen Caspase-3-

Plasmiden, sodass die Rekonstitution insgesamt zu einer Wachstumsminderung unabhängig von der katalytischen Aktivität führte. Eine vorhandene Enzymfunktion bedingte jedoch eine signifikant stärkere Akzentuierung des beobachteten Effekts.

### 3.2.2 YAP-Status im TAB-1-Modell

Um der Frage nach einer Relevanz des Caspase-3-YAP-Moduls in den thymischen Zellmodellen nachzugehen, wurde zunächst die Expression der wesentlichen beteiligten Proteine mittels *Western Blot* bestimmt.



**Abbildung 3.3: Ermittlung des YAP-Status im TAB-1-Modell.** **A** *Western Blot* zur vergleichenden Analyse der drei Zelllinien hinsichtlich relevanter Marker des CASP3-YAP-Moduls (repräsentatives Beispiel aus  $n = 3$ ). **B** *Western Blot* zur Analyse von Doppelstrangbrüchen, als positive Kontrolle dienten HEK-293T-Zellen die über sechs Stunden mit  $\text{TNF}\alpha$  + Cycloheximid behandelt wurden (repräsentatives Beispiel aus  $n = 3$ ). **C** *Western Blot* nach sequenzieller Lyse der Zellen in zytosolische und nukleäre Fraktionen zur Analyse der subzellulären Lokalisation von YAP. Als Kontrollen dienten das zytosolische Protein GAPDH, und die nukleären Intermediärfilamente Lamin A und C (LMN A/C). Repräsentatives Beispiel aus  $n = 3$ .

Es zeigten sich keine nennenswerten Unterschiede in der Expression von YAP, pYAP(S127) (inaktivierte Form von YAP), Caspase-7 und XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis*, als kontext-assoziiertes Ziel von YAP). Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) als sensibler Marker des Vorhandenseins apoptotischen Stresses zeigte ebenfalls keine unterschiedliche Expression, auch ein Spaltprodukt war nicht nachweisbar (Abbildung 3.3A). Um die Rolle der Caspase-3 in Bezug auf die Induktion von genomischen Stress zu untersuchen, wurde das Vorhandensein von DNA-Doppelstrangbrüchen untersucht, indem ein *Western Blot* auf  $\gamma\text{H2A.X}$  (an Serin-139 phosphoryliertes Histon A2.X) durchgeführt wurde. Hierbei zeigte sich ein geringfügig höheres Vorhandensein in Zellen mit Caspase-3-Wildtyp, nicht jedoch in den Zellen mit der mutierten Caspase-3 (siehe Abbildung 3.3B). Als positive Kontrolle wurden über sechs Stunden mit  $\text{TNF}\alpha$  (40 ng/ml) und CHX (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) stimulierte HEK-293T-Zellen verwendet.

Da die Aktivität von YAP, wie in der Einleitung beschrieben, auch durch die subzelluläre Lokalisation reguliert wird, wurde die Verteilung des Proteins untersucht. Nach einer fraktionierten Lyse (vgl. Kap. 2.12.2.2) wurden die einzelnen Anteile der Zellen getrennt mittels *Western Blot* analysiert. Hierbei zeigte sich eine saubere Trennung der einzelnen Zellanteile, was anhand der Markerproteine GAPDH (zytosolische Lokalisation) und den Laminen A & C (nukleäre Lokalisation) ablesbar ist (Abbildung 3.3C). Die Lokalisation von YAP unterschied sich nicht relevant. Die Caspase-3 zeigte eine fast ausschließlich zytosolische Lokalisation. In der Immunfluoreszenzmikroskopie ließen sich, im Gegensatz zum 1889c-Modell, keine überzeugenden Signalintensitäten nachweisen, sodass die Zellfraktionierung hier Methode der Wahl war. Dies ließe sich z. B. durch die unterschiedlich starke Expression von YAP in TAB-1 und 1889c erklären (siehe Abbildung 6.1).

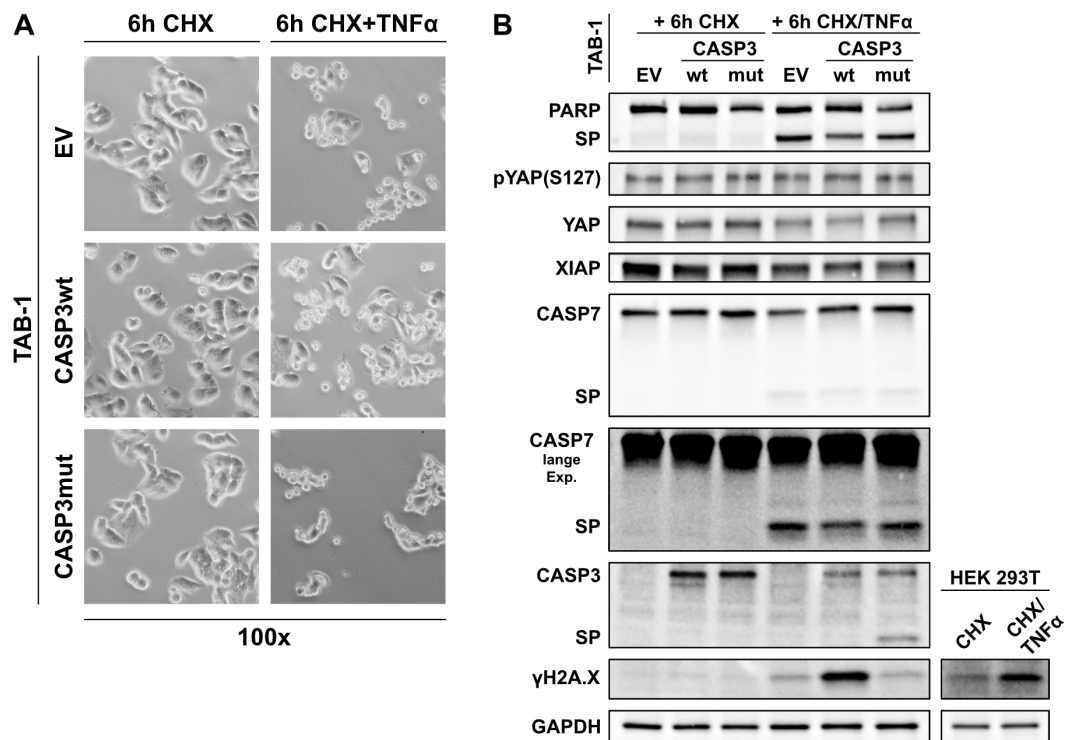
### 3.2.3 Aktivierung der eingebrachten Caspase-3

Da Caspase-3 ein Enzym ist, das nach aktuellem Kenntnisstand zahlreiche seiner wesentlichen Funktionen über seine katalytische Aktivität realisiert, sollte die Caspase-3 im Weiteren aktiviert werden, um den Einfluss der Aktivierung auf den YAP-Status und die Formierung von Doppelstrangbrüchen zu analysieren.

Hierzu wurden die Zellen mit dem ribosomalen Hemmstoff Cycloheximid (CHX, 5 µg/ml), bzw. CHX + Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ , 40 ng/ml) als Ligand eines Todesrezeptors zur Induktion des extrinsischen Aktivierungsweges der Apoptose über sechs Stunden behandelt. Aus den Zellen, die lichtmikroskopisch deutliche Zeichen des Zelltodes zeigten (Abbildung 3.4A) wurden Lysate erstellt, die mittels *Western Blot* analysiert wurden.

Im *Western Blot* (Abbildung 3.4B) zeigte sich, dass die Behandlung mit TNF $\alpha$  nach sechs Stunden zu einer gleichmäßigen Induktion der Spaltung von PARP führte, wobei eine differenzielle Aktivierung auf eine caspaseunabhängige PARP-vermittelte DNA-Fragmentierung (im Sinne eines parthanatotischen Zelltodes) hätte hindeuten können (Galluzzi et al. 2018), was nicht beobachtet wurde. Eine einfache Behandlung mit CHX zeigte diesen Effekt nicht. Analog hierzu zeigten die TNF $\alpha$ -behandelten Zellen eine deutliche Spaltung der Caspase-7, die in der CHX-Kontrolle nicht zu beobachten war. Der Status der Caspase-3 unterschied sich zwischen den verschiedenen Zelllinien: während sich unter TNF $\alpha$ -Stimulation in der mutierten Variante (CASP3mut) ein Spaltprodukt deutlich erkennbar ansammelte, war dies in den Zellen mit Wildtyp (CASP3wt) nicht der Fall. In Bezug auf YAP zeigte sich keine differenzielle Expression hinsichtlich der Expression von YAP, ebenso wenig hinsichtlich des Vorhandenseins von pYAP(S127). Auch XIAP war nicht differenziell exprimiert. Die Behandlung mit TNF $\alpha$  führte in allen Zelllinien zu einer Induktion der Phosphorylierung von H2A.X, also einer Induktion von  $\gamma$ H2A.X, die aber in den Zellen mit intakter Wildtyp-Caspase-3 sehr viel stärker ausgeprägt war, sodass auch hier ein unterschiedliches Verhalten zu beobachten war, die  $\gamma$ H2A.X-Menge der mutierten Variante entsprach der der Leervektor-Kontrolle (EV).





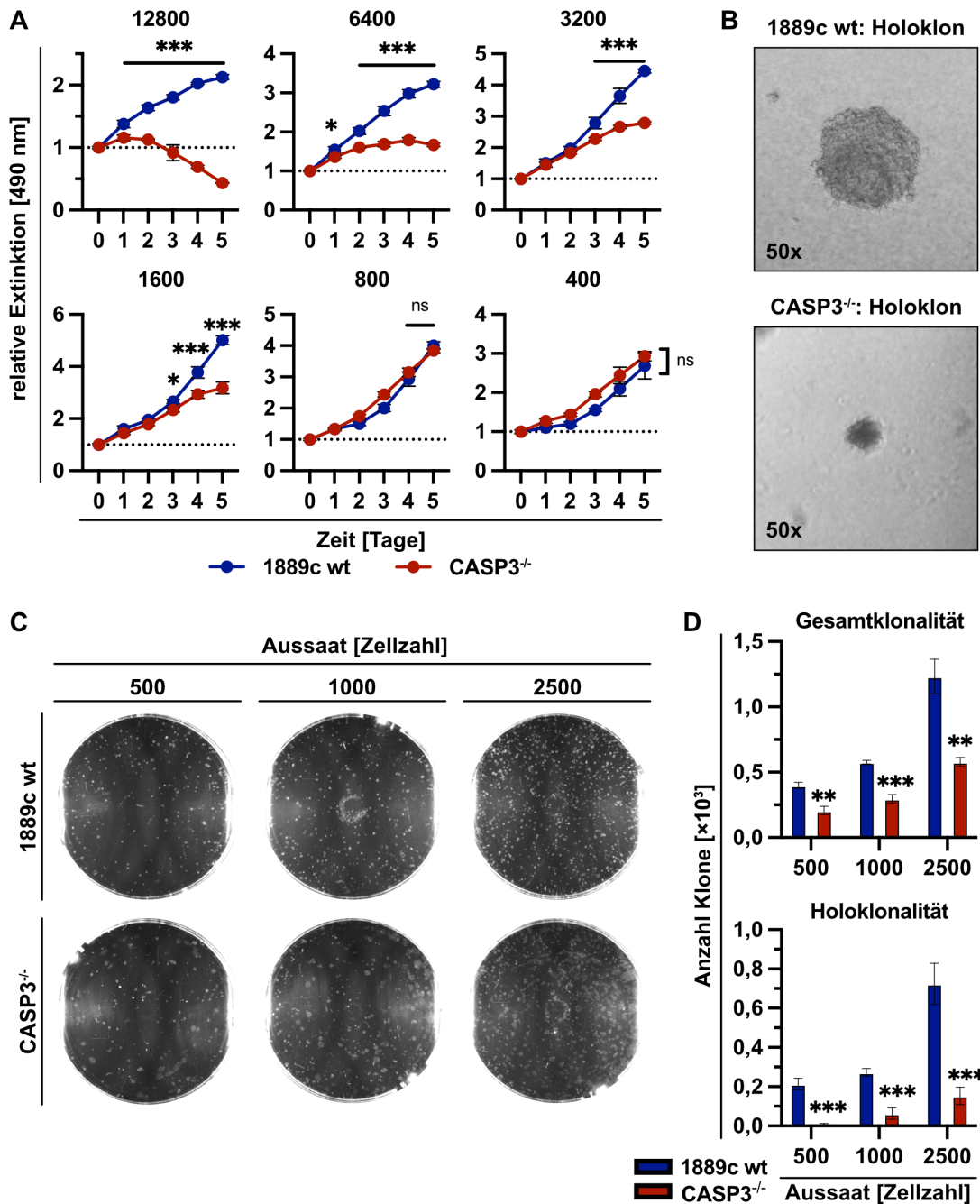
**Abbildung 3.4: Aktivierung der Caspase-3.** **A** Lichtmikroskopischer Nachweis des Effektes der Behandlung mit Cycloheximid (CHX, 5  $\mu$ g/ml) als negative Kontrolle, bzw. CHX + TNF $\alpha$  (40 ng/ml) nach 6 h. Deutlich sind tote Zellen nach Behandlung mit CHX+TNF $\alpha$  zu erkennen. **B** *Western-Blot*-Analyse der Effektorcaspasen, des CASP3-YAP-Moduls und der Induktion von Doppelstrangbrüchen der DNA nach der Behandlung. HEK-293T-Zellen als Positivkontrolle für die Antikörperfunktion.

### 3.3 Untersuchungen im 1889c-Modell

Analog zu den in Kapitel 3.2 durchgeführten Versuchen wurden ähnliche Analysen für das zweite Zellmodell durchgeführt, nachdem diese Zelllinie von Dr. Denise Müller (Pathologie, UMG) freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde.

#### 3.3.1 Wachstum der Zellen des 1889c-Modells in 2D- und 3D-Zellkultur

Es wurde zunächst analog zu Abbildung 3.2 das Wachstum der Zellen in der Kulturschale und in Methylcellulose durchgeführt. Wie in Abbildung 3.5A erkennbar, führte der *Knockout* der Caspase-3 (*CASP3*<sup>-/-</sup>) in der Zelllinie 1889c zu einer deutlichen Minderung der Viabilität im MTS-Assay. Dieser Effekt war abhängig von der Zelldichte in der Kulturschale: So war der Zuwachs der photometrischen Extinktion nach fünf Tagen bei niedriger initialer Zelldichte (400 Zellen/*Well*) zwischen beiden Zelllinien identisch.



**Abbildung 3.5: Untersuchung des Wachstumsverhaltens des 1889c-Modells.** **A** MTS-Viabilitätsassay zur Analyse des Zellwachstums in 2D-Zellkulturschalen. Unterschiedliche Zellzahlen (Zahl über dem Graphen) wurden über fünf Tage inkubiert und jeweils ins Verhältnis zum Tag 0 gesetzt. Repräsentatives Beispiel aus  $n = 3$ , *Two-Way*-ANOVA. **B** Beispiele für Holoklone deutlich unterschiedlicher Größe in Methylcellulose nach 12 Tagen Inkubation. **C** Übersichtsaufnahmen von 35 mm-Platten nach 12-tägiger Inkubation der Zellen in Methylcellulose. Bei den wt-Zellen mit bloßem Auge erkennbar mehr Holoklone (weiße, kompakte Punkte) als bei *CASP3*<sup>-/-</sup>-Zellen. **D** Ergebnis der Zählung mit deutlicher Minderung der Gesamtklonalität und noch ausgeprägterer Minderung der Holoklonalität (Repräsentatives Beispiel aus  $n = 3$ , *t*-Test).

Eine schrittweise Verdopplung der Zelldichte führte ab 1600 Zellen/*Well* zu deutlichen Unterschieden, die sich hin zur maximalen untersuchten Dichte von 12.800 Zellen/*Well* weiter ausprägten. In dieser höchsten initialen Zelldichte war sogar eine Abnahme der Extinktion

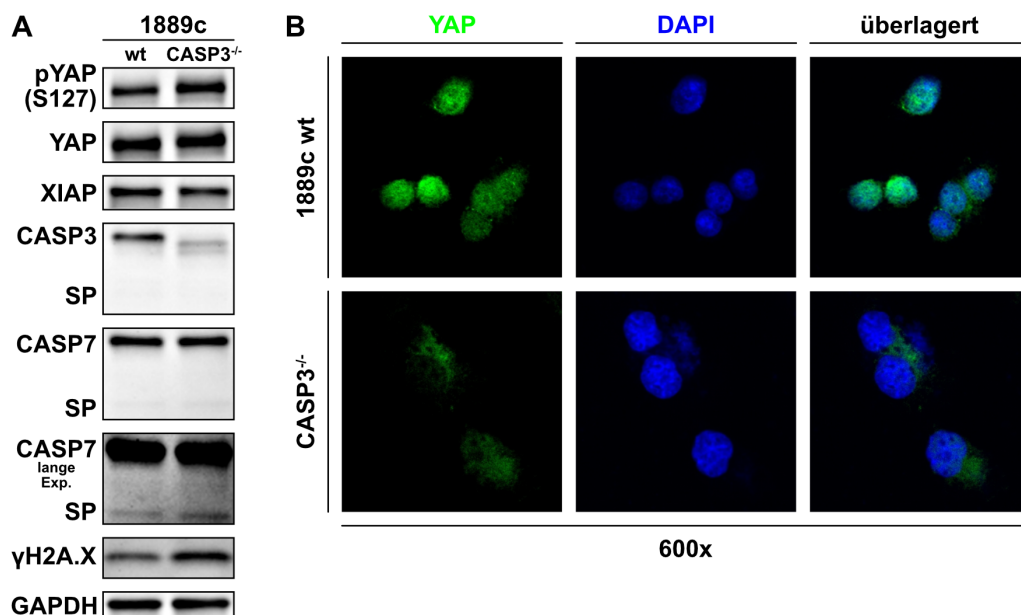
über fünf Tage in Relation zur Messung des Referenzwertes von Tag 0 in den *CASP3*<sup>-/-</sup>-Zellen zu beobachten.

Diese Beobachtungen stimmen mit den Beobachtungen aus dem Umgang mit der *CASP3*<sup>-/-</sup>-Zelllinie überein: Um ausreichende Zellzahlen für die Experimente zu erhalten war stets die Kultivierung in großen Flaschen (175 cm<sup>2</sup>) nötig, da kleinere Kulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) regelmäßig zu geringe Zellmengen enthielten.

Im Methylcellulose-Assay präsentierte sich 1889c *CASP3*<sup>-/-</sup> als ausgeprägt attenuiert. Die vorhandenen Holoklone waren im Mittel deutlich kleiner als die des Wildtyps (beispielhaft dargestellt in Abbildung 3.5B). In der Übersichtsaufnahme (Abbildung 3.5C) und in der Zählung (Abbildung 3.5D) ließ sich dieser Effekt verifizieren: Die Gesamtklonalität präsentierte sich in 1889c *CASP3*<sup>-/-</sup> insgesamt signifikant reduziert, ein Effekt, der sich in der Zählung der Holoklone noch deutlich stärker bemerkbar machte. Dieser Effekt ließ sich in verschiedenen Zelldichten (500, 1000 bzw. 2500 Zellen) nachweisen.

### 3.3.2 YAP-Status im 1889c-Modell

Um mögliche Veränderungen der YAP-Regulation im 1889c-Modell zu untersuchen, wurden zunächst *Western-Blot*-Analysen der YAP-Expression durchgeführt.



**Abbildung 3.6: YAP-Status im 1889c-Modell.** **A** *Western-Blot*-Analyse des YAP-Status sowie des Vorhandenseins von Doppelstrangbrüchen ( $\gamma$ H2A.X) im 1889c-Modell, repräsentatives Beispiel aus  $n = 3$ . **B** Immunfluoreszenz-Analyse der subzellulären YAP-Lokalisation im 1889c-Modell, repräsentativer Ausschnitt aus  $n = 2$ . Es zeigt sich in den *CASP3*<sup>-/-</sup>-Zellen eine geringere Überlappung der Lokalisation von YAP und DAPI, die auf zytosolische Lokalisation von YAP in diesen Zellen hindeutet.

Da die Regulation der YAP-Expression ebenso wie die Effekte der Viabilitätsänderung im 1889c-Modell von der Zelldichte abhängig sind, wurde für die in Abbildung 3.6 durchgeführten Experimente auf eine ähnliche Zelldichte besonderen Wert gelegt.

Es zeigte sich keine Veränderung der Expression von YAP in der *Western-Blot*-Analyse, jedoch konnte eine Erhöhung des pYAP(S127) in den *CASP3-Knockout*-Zellen beobachtet werden. Ebenso waren die Expression von  $\gamma$ H2A.X und des Spaltproduktes der Caspase-7 in diesen Zellen erhöht, während sich XIAP nahezu unverändert bis leicht reduziert präsentierte (Abbildung 3.6A).

Zum Nachweis der subzellulären Lokalisation von YAP wurde eine konfokale Immunzytofluoreszenz-Analyse durchgeführt (Abbildung 3.6B), da sich im Gegensatz zu den TAB-1-Modellen eine überzeugende Fluoreszenz erreichen ließ. Dies ist in anbetracht eines höheren YAP-Gehaltes der Zelllinie gut nachvollziehbar (vgl. Abbildung 6.1). Die DNA wurde mit DAPI kontrastiert, während YAP nach Bindung durch einen spezifischen Antikörper mit einem Alexa Fluor 488 Sekundärantikörper gefärbt wurde. Hierbei zeigte sich, dass für YAP in den Wildtyp-Zellen eine höhere Fluoreszenz im Zellkern zu beobachten war als in den *CASP3<sup>-/-</sup>*-Zellen, in denen es überwiegend zytosolisch nachzuweisen war und nur zu geringem Anteil mit DAPI als Korrelat des Zellkerns co-lokalisierte. Überdies war die Fluoreszenz in den *Knockout*-Zellen insgesamt geringer ausgeprägt.

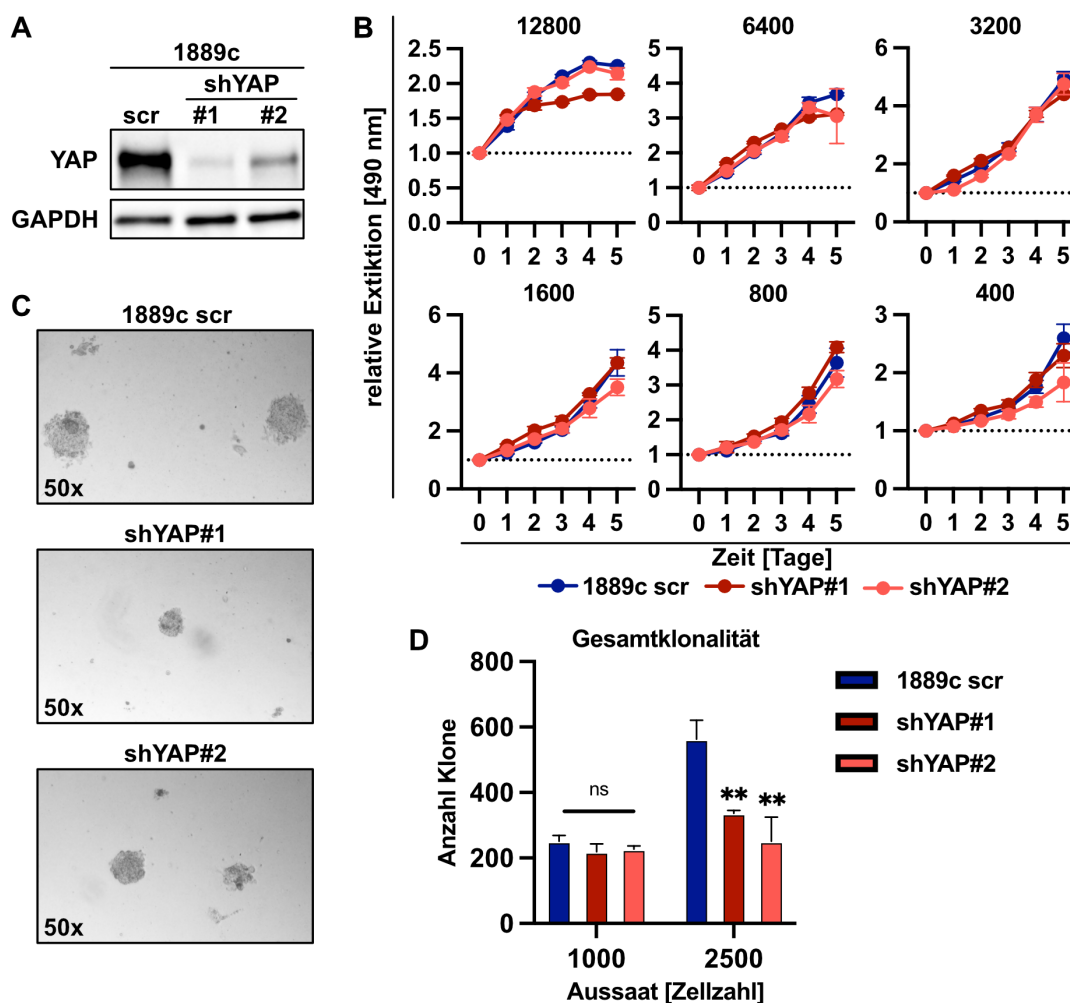
### 3.3.3 YAP-attributabler Effekt in der Attenuierung des 1889c-Wachstums durch Caspase-3-Knockout

Wären die in Kap. 3.3.1 dargestellten Wachstumsminderungen primär auf die biologische Wirkungsverminderung von YAP zurückzuführen (vgl. bspw. die Kap. 3.3.2 durchgeführten Experimente), so müsste eine Reduktion der YAP-Expression zu einer ähnlichen Minderung des Wachstums in den Zellen führen. Um dies zu prüfen, wurden in die Zelllinie 1889c mittels lentiviraler Transduktion shRNA-Plasmide eingebracht, um einen stabilen YAP-*Knockdown* zu etablieren. Es wurden zwei verschiedene Sequenzen verwendet (shYAP#1 bzw. #2). Als Negativ-Kontrolle wurde eine shRNA ohne codierende Zielstruktur verwendet (*scrambled* = scr).

Nach Selektion mit Puromycin (6  $\mu$ g/ml über 48 h) wurden die überlebenden Zellen kultiviert und der *Knockdown* mittels *Western Blot* validiert (Abbildung 3.7A): Hierbei zeigte sich eine deutliche Reduktion der YAP-Expression in den *Knockdown*-Zellen.

Anschließend wurde das Wachstum der Zellen in 2D- und 3D-Zellkultur überprüft. Hierbei zeigte sich, dass sich die Viabilität im MTS-Assay unabhängig von der Zelldichte nicht veränderte, ein YAP-*Knockdown* in der 2D-Zellkultur also keinen Einfluss auf die Viabilitätszunahme und mithin das Wachstum nahm (Abbildung 3.7B). Im Methylcellulose-Assay hingegen präsentierte sich die Größe der Holoklone unter einem YAP-*Knockdown* als deutlich reduziert (Abbildung 3.7C). Dies ließ sich auch in der Quantifizierung in höheren Zelldichten verifizieren: der *Knockdown* von YAP führt zu einer Verminderung der Klonalität.

Zusammenfassend führt ein YAP-*Knockdown* in der Zelllinie 1889c zwar zu keinem veränderten Wachstum unter kulturellen Standard-Bedingungen, jedoch zu einer Verminderung der Klonalität im Methylcellulose-Assay.



**Abbildung 3.7: Einfluss von YAP-Knockdown auf das Verhalten der 1889c-Zelllinie.** **A** Nach Etablierung eines shRNA vermittelten *Knockdowns* mittels lentiviraler Transduktion wurde der Status der YAP-Expression mittels *Western Blot* verglichen, shYAP#1 und #2 bezeichnen hierbei zwei verschiedene shRNAs. Repräsentatives Beispiel aus  $n = 3$ . **B** MTS-Viabilitätsassay in 2D-Zellkultur in unterschiedlichen Zelldichten (Zahlen über den Graphen) über fünf Tage. Werte im Vergleich zu Tag 0, repräsentatives Beispiel aus  $n = 3$ , statistischer Test mittels *Two-Way*-ANOVA. **C** Einzelklone aus Methylcellulose-Assay im auflichtmikroskopischen Vergleich. Der YAP-*Knockdown* bewirkt eine Reduktion der mittleren Klonegröße. **D** Ergebnis der Auszählung mit signifikanter Reduktion der Klonalität durch YAP-*Knockdown* bei höherer Ausgangszelldichte, repräsentatives Beispiel aus  $n = 3$ .

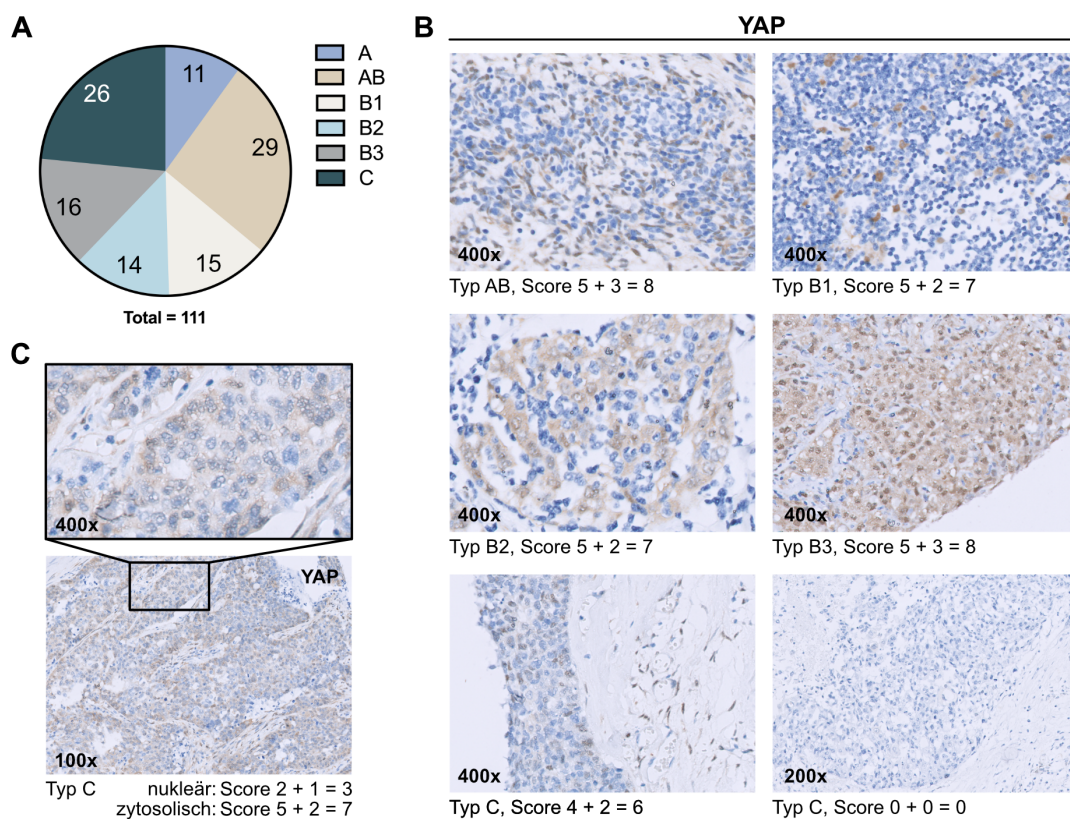
### 3.4 Untersuchungen im Gewebe humaner Thymustumoren

#### 3.4.1 Beschreibung des Kollektivs der Gewebeproben und YAP-Expression

Um der Frage nach der generellen Relevanz von YAP als entscheidendem Glied im CASP3-YAP-Modul in den epithelialen Neoplasien des Thymus nachzugehen, wurde in einem Kollektiv von gesammelten Gewebeproben die Expression von YAP in den Tumorzellen *in situ* semiquantitativ analysiert. Dies erfolgte mittels *Tissue Microarrays* (TMAs), wie in Kap. 2.14.2 beschrieben.

Hierzu wurden auf den insgesamt vier TMAs zunächst die verwertbaren Fälle ermittelt und jeweils zwei Stenzen aus demselben Tumor analysiert. Es zeigten sich insgesamt 111 verwertbare Patientenfälle. Anschließend wurde der histologische Subtyp (nach WHO, siehe Kap. 2.14) anhand einer institutsinternen Datenbank ermittelt und deren Verteilung analysiert (Abbildung 3.8A). Hierbei zeigte sich, dass die Zusammensetzung des Kollektivs in etwa den Angaben der WHO hinsichtlich der relativen Häufigkeit der einzelnen Subtypen entsprach (Travis et al. 2015).

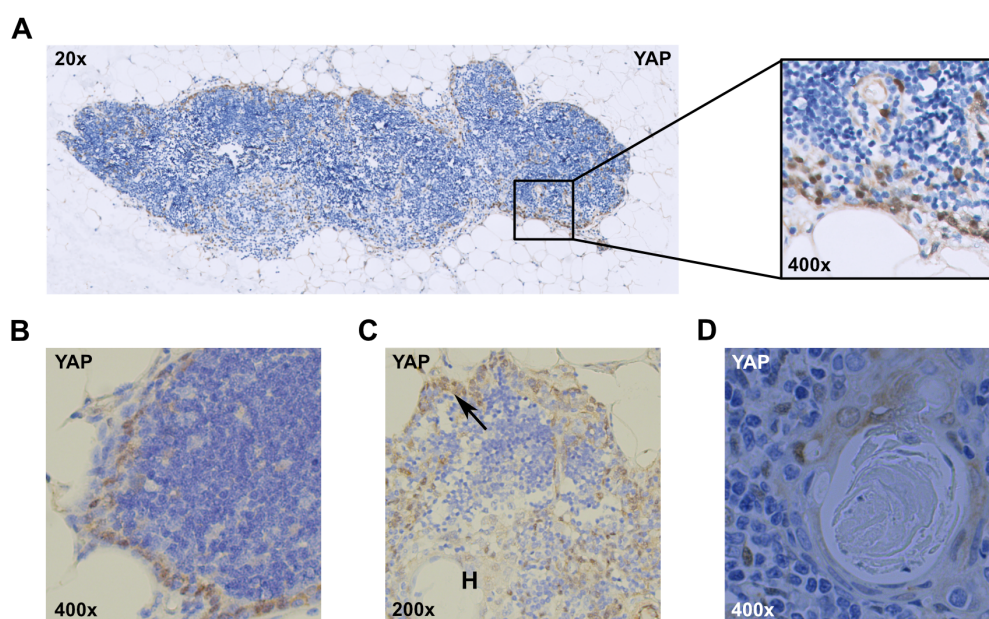
Es wurde (validiert durch Prof. Ströbel) anhand des in Kap. 2.14.3 erläuterten Systems eine Einteilung der Expression der Tumoren vorgenommen. Die Abbildung 3.8B zeigt exemplarisch Ausschnitte aus Tumoren, einschließlich deren histologischer Diagnose und dem ihnen zugeordneten Score. Hierbei war insbesondere wichtig, dass für die Fragestellung die Expression des nukleären YAP entscheidend war und daher insbesondere auch eine detaillierte Analyse bei hoher Vergrößerung notwendig war, da bisweilen deutliche Diskrepanzen zwischen zytosolischem und nukleärem Score zu beobachten war (bspw. dargestellt in Abbildung 3.8C). Die Thymozyten (thymische T-Lymphozyten) stellten sich YAP-negativ dar.



**Abbildung 3.8: Immunhistologische Untersuchungen zur YAP-Expression in Thymus-Neoplasien.**

**A** Verteilung der histologischen Tumortypen unter den 111 verwertbaren Patientenfällen, die Zahl im Tortenstück entspricht der absoluten Fallanzahl für den jeweiligen Subtyp. **B** Beispielhafte Darstellung verschiedener Ausschnitte aus Tumoren mit Färbung gegen YAP und dem dazugehörigen Score, es wurden hierbei nur die Tumorzellen beachtet und nicht die Thymozyten. **C** Beispiel für einen zytosolisch stark gefärbten Tumor, der sich in höherer Vergrößerung nukleär mit nur geringer Expression darstellt (Diskrepanz der beiden Scores).

Als Nebenbefund zeigte sich in mehreren Stanzten auch Gewebe von Resten des Normalthymus. Dieses wurde nicht in die Auswertung mit einbezogen. In allen Präparaten in denen Thymusrinde zur Darstellung kam, zeigte sich, dass insbesondere die marginalen kortikalen Epithelzellen Typ I (cTEC Typ I) ein intensives nukleäres Signal, entsprechend einer starken Expression von YAP, aufwiesen. Die Expression entspräche hierbei einem Summen-Score von 7 oder 8 und damit einer hohen Expression. Diese Beobachtung wurde in gefärbten Normalthymi reproduziert (Abbildung 3.9A+B). Im Mark zeigte sich eine weniger einheitliche Situation, jedoch waren auch hier marginale Zellen teils positiv, allerdings fanden sich vermehrt auch positive Zellen in der Binnenstruktur (Abbildung 3.9C). Es zeigte sich, dass die für das Thymusmark typischen Hassall-Körperchen keine relevante Anfärbbarkeit aufwiesen (Abbildung 3.9D).



**Abbildung 3.9: YAP-Färbung im Normalthymus.** **A** Rinde des Normalthymus, die in der Übersicht eine starke YAP-Expression an der Grenze zum umliegenden Fettgewebe zeigt. In der Vergrößerung zeigt sich, dass cTECs Typ I eine starke nukleäre YAP-Expression aufweisen. **B** Marginale cTECs mit starker YAP-Expression in einem anderen Patienten. **C** Thymusmark mit ungeordnetem Expressionsmuster: Sowohl marginale positive Cluster ( $\rightarrow$ ), vergleichbar mit der Rinde als auch diffuse Expression im Mark, H = Hassall-Körperchen. **D** Hassall-Körperchen exprimieren YAP nur wenig im Randbereich. Die Expression konnte in insgesamt  $n = 7$  von 7 untersuchten Normalthymi nachgewiesen werden.

### 3.4.2 Statistische Analysen hinsichtlich Verteilung, Überleben und Myasthenie

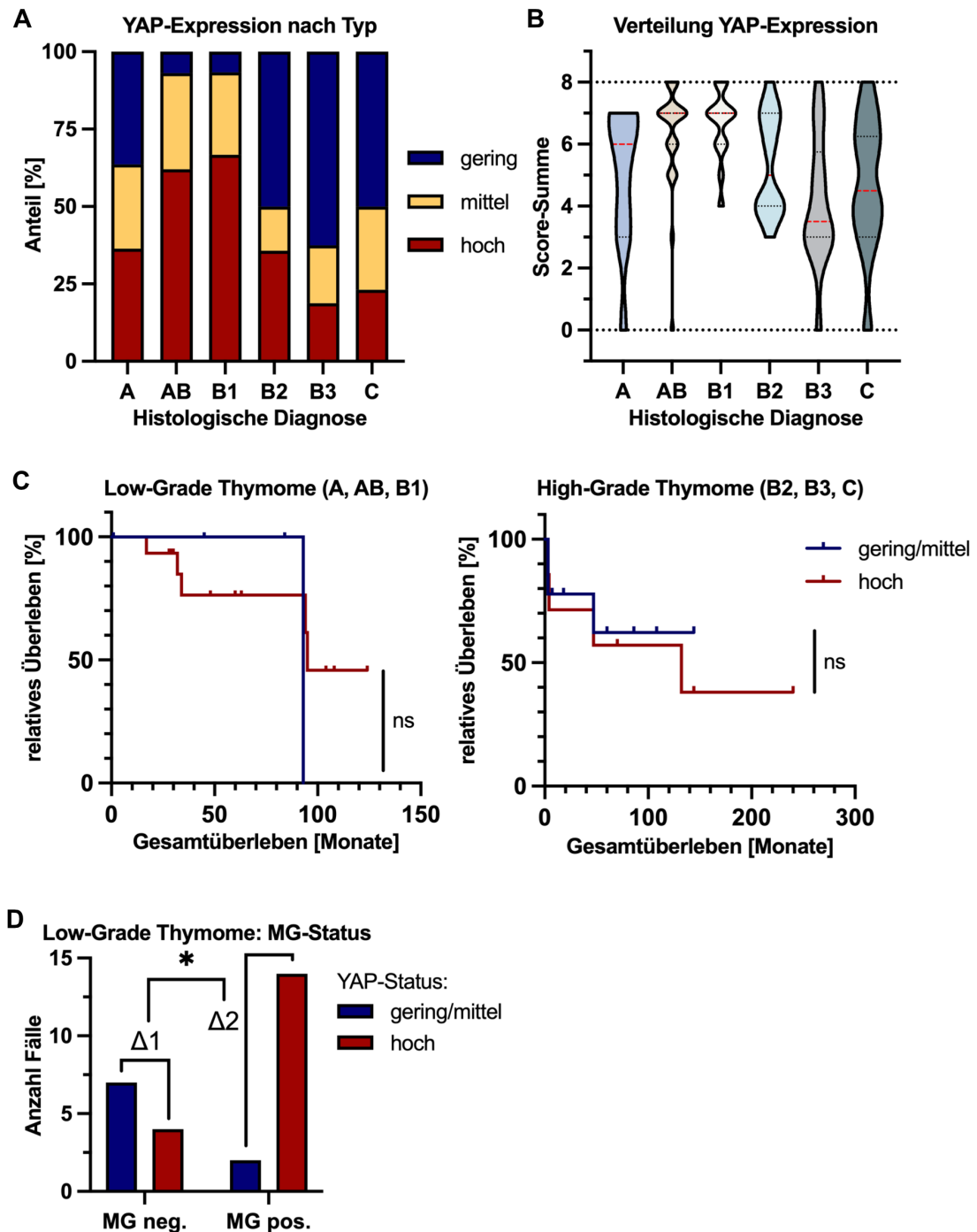
Mit dem in Kapitel 3.4.1 geschilderten Vorgehen wurden die Daten aus dem Kollektiv untersucht. Zunächst sollte geprüft werden, ob die Expressionsstärke von YAP abhängig vom histologischen Typ ist. Hierzu wurde zunächst der jeweilige Anteil der verschiedenen Expressionsstärken (gering, mittel, hoch) an den jeweiligen Gruppen ermittelt: Aus der Abbildung 3.10A geht hervor, dass besonders in den Gruppen AB und B1 ein Anteil von über 50% der Tumoren eine hohe YAP-Expression hat (Score 7 oder 8). Die Entitäten A und B2,

die diese beiden höher exprimierenden Gruppen flankieren, wiesen ein eher intermediäres Expressionsprofil auf, während insbesondere die Typen B3 und C (Thymuskarzinom) den niedrigsten Anteil an stark exprimierenden Tumoren aufwiesen.

Da in der Abbildung 3.10A die Verteilung der einzelnen Tumoren über das Spektrum von 0 bis 8 Punkten nicht gut ersichtlich ist, wurden *Violin Plots* zur detaillierteren Aufschlüsselung der Verteilung erstellt (Abbildung 3.10B). *Violin Plots* ermöglichen, ähnlich *Whisker-Plots*, die Darstellung der Verteilung samt des Median (hier rote Linien) sowie den Quartil-Grenzen (hier schwarze Linien). Hier bestätigte sich, dass der Median (rote Linien) und auch das zweite und vierte Quartil bei den Typen AB und B1 deutlich zu höheren Punktwerten im Score verschoben ist, diese also häufiger eine hohe YAP-Expression aufweisen als die Typen B3 und C. Bei Letzteren zeigte sich jedoch, dass die Verteilung insgesamt zwar zu einer geringeren *Score*-Summe verlagert ist, dieser Trend ist jedoch weniger stark ausgeprägt als bei den Typen AB und B1. Bei den Typen B3 und C sind Tumoren über alle Summen-*Scores* gleichmäßiger verteilt, was insbesondere bei den Karzinomen (Typ C) besonders ausgeprägt ist (daher ein breiterer *Plot*). Dies spricht für eine stärkere Heterogenität der Tumoren, die mit einer höherer Expressionsvarianz einhergeht.

Im Weiteren sollte analysiert werden, inwieweit sich die Expression von YAP auf das Gesamtüberleben der Patient\*innen auswirkt. Als primärer Endpunkt wurde dabei der Tod von Patient\*innen in Folge des Tumorleidens gewählt. Die Anzahl der Patient\*innen für die das Gesamtüberleben nach Diagnose bekannt war, betrug  $n = 36$ . Um diese Gruppen, eingeteilt nach „YAP-hoch“ bzw. „YAP-niedrig/mittel“, sinnvoll vergleichen zu können mussten mehrere histologische Entitäten zusammengefasst werden. Dabei musste der von der histologischen Diagnose abhängigen unterschiedlichen Prognose Rechnung getragen werden. Die Tumoren wurden in zwei Gruppen eingeteilt: „*low-grade* Thymome“ (Typ A, AB, B1,  $n = 19$ ) und „*high-grade* Thymome“ (Typ B2, B3, C,  $n = 17$ ) (Abbildung 3.10C). Diese Einteilung deckt sich weitestgehend mit der Prognose, die sich bei den Thymomen zwischen den Entitäten A, AB, B1 nicht unterscheidet (= *low-grade* mit besserer Prognose) und nur bei Typ B2 und B3 schlechter ist (= *high-grade*) (Marchevsky et al. 2008). Aufgrund der geringen Fallzahl mussten die Typen B2, B3 und C als Tumoren mit schlechterer Prognose zusammengefasst werden, obwohl sich diese zwischen den Subgruppen durchaus unterscheidet. Dieses Vorgehen ist in dieser Form etabliert (Müller D et al. 2021). Es wurden Kaplan-Meier-Kurven erstellt und die Unterschiede im Gesamtüberleben mittels zweier statistischer Tests (Mantel-Cox-Test, Gehan-Breslow-Wilcoxon-Test) verglichen. Dabei konnten hinsichtlich des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von der YAP-Expression keine signifikanten Unterschiede in den Patientengruppen festgestellt werden (Mantel-Cox:  $p_{low-grade} = 0,779$ ;  $p_{high-grade} = 0,699$ ; Gehan-Breslow-Wilcoxon:  $p_{low-grade} = 0,707$ ;  $p_{high-grade} = 0,851$ ).





**Abbildung 3.10: Statistische Analysen zu Verteilung, Gesamtüberleben und Myasthenie.** **A** Relative Verteilung der Expression nach histologischer Diagnose. **B** *Violin-Plot* als alternative Darstellung der Verteilung: Die Breite zeigt die Häufigkeit des Auftretens des jeweiligen *Scores*, die rote Linie zeigt den Median, die schwarzen Linien das zweite, bzw. dritte Quartil an. **C** Kaplan-Meier-Graph zum Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der YAP-Expression. Hierbei wurde die mittlere Expression mit der geringen Expression gemeinsam gruppiert. Außerdem wurden die Typen A, AB und B1 zusammengefasst („*low-grade*“, n = 19), ebenso wie die Typen B2, B3 und C („*high-grade*“, n = 17). Signifikanztest mittels Mantel-Cox-Test und Gehan-Breslow-Wilcoxon-Test. **D** Vergleich der Verteilung der YAP-Expression in Abhängigkeit vom Vorliegen paraneoplascher *Myasthenia gravis* (MG), Exakter Test nach Fisher (p = 0,0115).

Wie in Kap. 1.1.2 beschrieben können Thymome die Entwicklung einer *Myasthenia gravis* (MG) im Sinne eines paraneoplastischen Syndroms bedingen. Es sollte daher untersucht werden, ob sich der YAP-Status in Patient\*innen mit MG von dem der Patient\*innen ohne MG unterscheidet. Da die *Myasthenia gravis* nur sehr selten in Patient\*innen mit höhergradigen Thymomen und nie in Thymuskarzinomen beschrieben wurde und auch im analysierten Kollektiv in diesen nicht vorkam, wurden nur Patient\*innen mit *low-grade* Thymomen in die Analyse einbezogen (Abbildung 3.10D). Es zeigte sich dabei, dass unter den Patient\*innen mit *Myasthenia gravis* ein signifikant erhöhter Anteil ( $p = 0,0115$ ; Exakter Test nach Fisher) mit Tumoren zu finden war, in denen eine hohe YAP-Expression nachweisbar war. Auch hier sei auf die geringe Anzahl an verfügbaren Patientenfällen verwiesen, die in der Seltenheit der Neoplasien begründet ist.

## 4 Diskussion

Die Diskussion soll systematisch auf die in Kapitel 1.4 formulierte Fragestellung eingehen. Hierzu soll zunächst auf die Relevanz der Modulation des Caspase-3-Status in den beiden verwendeten Zellmodellen eingegangen werden, um hieran eine Rolle derselben in der Wachstumsfähigkeit der Zellen zu evaluieren (Kap. 4.1). Danach soll auf die mögliche Verbindung mit YAP in diesen Zellmodellen eingegangen werden (Kap. 4.2), um anschließend auf die Ergebnisse aus den Gewebeuntersuchungen einzugehen (Kap. 4.3). Kurz soll auf methodologische Limitationen dieser Arbeit im Speziellen und der Untersuchungen am Thymus im Allgemeinen eingegangen werden (Kap. 4.4). Abschließend werden die Ergebnisse und deren Diskussion konklusiv zusammengefasst und ein Ausblick auf aus dieser Arbeit resultierende Fragestellungen und deren mögliche Untersuchung gegeben (Kap. 4.5).

### 4.1 Der Einfluss von Caspase-3 auf das Wuchsverhalten in Zellmodellen thymischer Neoplasien

Wie in Kapitel 1.2 beschrieben ist Caspase-3 mehr als nur ein Endglied der apoptotischen Maschinerie. Neben den traditionellen, als kanonisch bezeichneten Funktionen der Caspase-3 und allgemeiner des apoptotischen Programms, stellte sich in den letzten Jahren heraus, dass unterschiedliche Mechanismen zu einer Umkehrung der Effekte führen können. So führt eine Aktivierung in der Bilanz nicht obligat zu Zellverlust, sondern kann zu Proliferation, Wachstum, Zellregeneration und genomischem Stress beitragen (Donato et al. 2014; Ichim et al. 2015; Liu et al. 2015), was mit einer schlechteren Prognose von Patient\*innen mit Caspase-3-exprimierenden Tumoren im Vergleich zu Caspase-3-deletierten Tumoren vergesellschaftet ist (Huang Q et al. 2011). Letztlich wirken sich die Effekte der Caspase-3 also janusköpfig aus und können kontextabhängig sowohl onkogen als auch tumorsuppressiv wirken. Da von Dr. Stefan Küffer (Pathologie, UMG) und Kolleg\*innen gezeigt werden konnte, dass auch in Thymusneoplasien eine rekurrente Caspase-3-Deletion vorkommt, stellt sich die Frage, auf welche Weise die hiermit verknüpfte Verbesserung der Prognose (unveröffentlichte Daten, vgl. Abbildung 1.5) erklärbar ist. In dieser Arbeit wurden dazu zunächst die etablierten Zellmodelle für Thymusneoplasien in ihrem Caspase-3-Status erfolgreich moduliert und das Wachstum der Zellen daraufhin analysiert. Dazu wurden mittels Lipofektion in der genuin Caspase-3-depletierten TAB-1-Zelllinie (vgl. Abbildung 1.1) sowohl eine Wildtyp-Caspase-3, als auch eine Caspase-3 mit Mutation im katalytischen Zentrum (C163A) konstitutiv reexprimiert. Die Mutante diente zum Ausschluss dominant-negativer Effekte oder von nicht-katalytischen Effekten der Caspase-3. Diese beiden generierten Zellmodelle wurden mit einer TAB-1-abgeleiteten Zelllinie verglichen, in die ein Leervektor eingebracht wurde, um transfektionsassoziierte Effekte auszuschließen. Zum anderen wurde von Dr. Denise Müller aus der Arbeitsgruppe von Dr. S. Küffer (Pathologie, UMG) freundlicherweise eine mittels CRISPR/Cas9 Caspase-3-depletierte 1889c-Version zur Verfügung gestellt.

#### 4.1.1 TAB-1: Wachstum in Abhängigkeit von Caspase-3-Expression

Das Wachstum der Caspase-3-rekonstituierten TAB-1-Zelllinien wurde mittels MTS-Assay (2D) und durch Klonalitätsanalyse in Methylcellulose (3D) analysiert. Hierbei zeigte sich, dass beide Zelllinien (sowohl mit intakter Caspase-3 als auch mit mutierter Variante) durch die Rekonstitution nicht zu einer Wachstumsverstärkung im MTS-Assay führte. Hierbei sei nochmals darauf hingewiesen, dass der MTS-Assay zwar einen validen Test zur Bestimmung der Viabilität und eines Wachstums darstellt, die Ursache dieses Wachstums jedoch nicht differenziert werden kann. Da der Farbstoff des Assays in Mitochondrien umgesetzt wird, zeigt die erhöhte Umsetzung über die Zeit zwar ein Wachstum des Stoffwechsels an, dies kann jedoch sowohl bspw. in Zellwachstum im Sinne einer Hypertrophie als auch in Proliferation begründet sein. Insgesamt ist der Assay unter Bedingungen einer Zellkultur suggestiv für Proliferation, stellt jedoch im Gegensatz zu einer Zählung der Zellen, etwa mittels FACS-Analyse, keinen Beweis für dieselbe dar. Die Abhängigkeit der Viabilitätszunahme (ausgehend vom Tag der Aussaat) von der Zelldichte bei Aussaat ist insbesondere durch die enge Regulation von YAP durch Zellkontakte (Schlegelmilch et al. 2011) relevant: wäre das CASP3-YAP-Modul relevant für eine etwaige Wachstumssteigerung, würde zu erwarten sein, dass diese Effekte abhängig von der Zelldichte wären, da diese einen Einfluss auf die Aktivität des transkriptionellen Co-Aktivators haben könnten.

Dass das apoptotische Programm und im Speziellen die Caspase-3 weitreichende Effekte auf die Aggressivität und das Überleben von Zellen haben kann, wurde in zahlreichen Publikationen nachgewiesen, in denen der *Soft-Agar*-Assay eine häufig verwendete Methode zur Evaluation dieser Effekte war (Cartwright et al. 2017; Ichim et al. 2015; Liu et al. 2015; Zhou et al. 2018). In dieser Arbeit wurde abweichend von dem in o. g. Publikationen verwendeten *Soft-Agar*-Assay ein analoges Testsystem verwendet, das auf Methylcellulose basiert. Dieses System ist standardisiert für die Anwendung in der Hämatologie und dient dort der Bestimmung der Klonalität hämatopoietischer Stammzellen. Die Standardisierung des Mediums bietet den Vorteil einer hohen Vergleichbarkeit zwischen den Ansätzen und ist auch in der Forschung an soliden Tumoren bereits etabliert (Venkataramani et al. 2018). In der TAB-1 Zelllinie führte die Caspase-3-Rekonstitution zu einer signifikanten Abschwächung der Klonalität. Diese Abschwächung war sowohl im Vergleich zwischen CASP3wt und Leervektor (EV) als auch zwischen CASP3mut und EV signifikant, jedoch war die Abschwächung in CASP3wt signifikant größer als in CASP3mut Zellen. Hieraus kann gefolgert werden, dass die Caspase-3-Rekonstitution einerseits unabhängig von der enzymatischen Aktivität, als auch durch ihre enzymatische Aktivität zu Wachstumseinbußen beiträgt. Unterstützend zu den numerischen Beobachtungen (Abbildung 3.2D) wurden diese Ergebnisse durch die Morphologie der Klone unterstützt: starke Größenreduktion in CASP3wt, weniger stark in CASP3mut.

Zusammenfassend konnte im TAB-1-Zellmodell durch das Wachstum *in vitro* keine Modellierung des in Thymom-Patient\*innen beobachteten CASP3-Effektes nachgewiesen werden,

da die Effekte eher gegenteilig zu den erwarteten Ergebnissen ausfielen. In den Thymom-Patient\*innen führt die Deletion zu einer verbesserten Prognose, daher wäre zu erwarten, dass die Rekonstitution in der Zelle zu einem vermehrten Wachstum führt, was nicht beobachtet wurde. Eher scheint es, dass die Caspase-3 in TAB-1 das Wachstum im häufig mit Aggressivität korrelierten Klonalitätsassay (Cartwright et al. 2017; Ichim et al. 2015; Overholtzer et al. 2006) vermindert, ganz so als seien die kanonischen (proapoptotischen) Funktionen hier relevanter, welche das intrazelluläre Gleichgewicht aus pro- und antiapoptotischen Signalen auf die Seite der Apoptose verlagern. Die Rekonstitution könnte dann, wie beobachtet, die Bilanz aus pro- und antiapoptotischen Signalen in einer Teilfraktion der Zellen in Richtung eines Zelltodes verschieben, was ein vermindertes Wachstum erklären könnte. Interessant ist hierbei insbesondere, dass bereits das Vorhandensein einer katalytisch inaktiven mutierten Caspase-3 einen Anteil zu dieser Abschwächung beitragen kann. Hinweise auf nicht-enzymatische Funktionen der Caspase-3 konnten in der Vergangenheit bereits beschrieben werden: In einer Publikation konnte etwa eine Rolle als Transkriptionsfaktor durch direkte Bindung an DNA nachgewiesen werden (Bernard et al. 2019). Hier wurden allerdings Effekte beobachtet, die die Angiogenese förderten und zu einer erhöhten Resistenz gegen Chemotherapie beitrugen, die Klonalität wurde nicht untersucht. Wie genau Caspase-3 in der Zelllinie TAB-1 zu einer Verminderung des Wachstums *in vitro* führt, kann auf Basis der gewonnenen Daten nicht abschließend beantwortet werden.

#### 4.1.2 1889c: Wachstum in Abhängigkeit von Caspase-3-Expression

Die Thymuskarzinom-Zelllinie 1889c exprimiert, anders als TAB-1, Caspase-3. Untersuchungen einer Caspase-3-deletierten 1889c-Version zeigten eine von der Zelldichte abhängige Veränderung des Wachstumsverhaltens. Im Viabilitätsassay zeigte sich bei geringen Zelldichten kein Unterschied des Wachstums. Mit zunehmender Dichte zeigte sich eine zunehmende Diskrepanz zugunsten des Wildtyps, während der Kurvenverlauf für die *CASP3*<sup>-/-</sup>-Zellen zunächst eine Wachstumsbegrenzung (mit Annäherung an eine Asymptote) und bei noch höheren Dichten sogar ein negatives Wachstum (i. S. von Viabilitätsverlust) implizierte. Letzteres kann im Viabilitätsassay theoretisch mehrere Ursachen haben, so könnten etwa eine Zellzahlreduktion im Sinne von Zelltod, aber auch eine Störung bzw. Reduktion des mitochondrialen Stoffwechsels, wie er beispielsweise auch in seneszenten Zellen beobachtbar ist (Chapman et al. 2019), ursächlich sein. Hierdurch wird die Spezifität dieser Beobachtung eingeschränkt. Jedoch könnte eine derartige Beobachtung in Bezug auf die Biologie von YAP relevant sein: YAP wird neben dem postulierten CASP3-YAP-Modul entscheidend durch das Vorhandensein von Zellkontakten reguliert (Schlegelmilch et al. 2011). Bei höheren Zelldichten liegen mehr solcher Zellkontakte vor, die zu einer YAP-Sequestration beitragen. Fehlt ein YAP-stimulierender Faktor, wie etwa Caspase-3, könnte sich dies durch eine Gleichgewichtsstörung in höheren Zelldichten mit verminderter YAP-Aktivität zeigen, die zu einer verminderten Viabilität und vermindertem Wachstum beiträgt, was beobachtete Effekte erklären könnte.

Dass eine echte Verminderung des Wachstums in 1889c durch den *Knockout* von Caspase-3 vorhanden ist, wird durch Beobachtungen aus dem Wachstumsverhalten in Methylcellulose unterstützt. Hier zeigte sich eine drastische Reduktion der Anzahl und Größe insbesondere der Holoklone (Abbildung 3.5B-D). Diese Beobachtungen decken sich mit denen zahlreicher anderer Arbeiten, in denen eine Modulation des Caspase-3-Status der Zellen ebenfalls zu einer Änderung der Klonalität führte, wofür unterschiedliche Ursachen gefunden werden konnten, wie etwa eine durch Kooperation mit c-MYC vermittelte Onkogenese (Cartwright et al. 2017) oder erhöhte genomische Instabilität in Caspase-3-exprimierenden Zellen (Liu et al. 2015).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die beiden etablierten neoplastischen Thymus-Zelllinien TAB-1 und 1889c unterschiedlich auf die Veränderung des CASP3-Status reagieren: während eine Rekonstitution eher eine Abschwächung der Klonalität in TAB-1 bedingt, wie es unter Berücksichtigung der kanonischen Eigenschaften zu erwarten wäre, führt ein *Knockout* von Caspase-3 in explorativen Experimenten in 1889c ebenfalls zu einer Abschwächung, was sich eher mit den non-kanonischen Eigenschaften der Caspase-3 erklären ließe. Es zeigt sich hier die Abhängigkeit der zellulären Caspase-3-Effekte vom Kontext in dem die Modulation stattfindet: ein Zugewinn (Abschwächung des Wachstums) in einer Zelllinie hat einen vergleichbaren Effekt wie der Verlust des Enzyms in einer anderen Zelllinie (ebenfalls Abschwächung des Wachstums).

## 4.2 Der Einfluss des Caspase-3-Status auf den YAP-Status und DNA-Schädigung

Von Yosefzon et al. (2018) konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen von Caspase-3 in muriner Haut zu einer Atrophie des Haarapparates durch Störungen der Homöostase im Stammzellkompartiment führt. Insbesondere waren hiervon die Talgdrüsen betroffen. Als ursächlich konnte von den Autoren eine gestörte Regulation von YAP gefunden werden, wobei sich insbesondere eine verminderte nukleäre Lokalisation von YAP zeigte. Verantwortlich hierfür sei eine Caspase-3-vermittelte Spaltung von  $\alpha$ -Catenin, die im physiologischen Kontext zu einer Freisetzung sequestrierter YAP-Moleküle beitrüge und so dessen nukleäre Translokation begünstige. Dies habe einen negativen *Feedback*-Mechanismus zur Folge, in dem XIAP vermehrt exprimiert und zu einer Inhibition der Caspase-3-Aktivität führe (Yosefzon et al. 2018). Außerdem konnte in zahlreichen Publikationen ein Zusammenhang zwischen genomischer Instabilität und einer Steigerung des onkogenen Potenzials durch Aktivierung apoptotischer Signalwege nachgewiesen werden (Ichim et al. 2015; Liu et al. 2015), weshalb zusätzlich das Vorhandensein von Doppelstrangbrüchen in der DNA überprüft wurde.

### 4.2.1 TAB-1: YAP-Status, DNA-Doppelstrangbrüche und Stimulationsversuche

Eine Rekonstitution der Caspase-3 führte nicht zu Unterschieden zwischen Leervektorkontrolle, CASP3wt und CASP3mut hinsichtlich des YAP-Gehaltes. Da dieser eventuell weniger

sensitiv für Veränderungen im YAP-Umsatz ist als das kurzlebige pYAP(S127) (und im Gegensatz zu letzterem teils trotz starker Evidenz für eine Änderung des Status *in vivo* im *Western Blot* dennoch unverändert war (Yosefzon et al. 2018)), wurde pYAP(S127) ebenfalls untersucht, ohne dass eine Änderung vorhanden gewesen wäre. Auch blieb XIAP als postuliertes Gen-Target unverändert. Die Effektorcaspasen (CASP3 & CASP7) waren gleich stark – so weit im *Western Blot* beurteilbar – exprimiert, Unterschiede in der subzellulären Lokalisation waren nicht feststellbar, sodass zusammenfassend keine Änderung im YAP-Status der Zellen festgestellt werden konnte. Es zeigte sich jedoch ein erhöhtes Vorhandensein von Doppelstrangbrüchen in der DNA (gemessen als  $\gamma$ H2A.X) nur in CASP3wt-Zellen, nicht jedoch in CASP3mut-Zellen, was eine Abhängigkeit des Auftretens derselben von der katalytischen Aktivität belegt. Da Caspase-3 sowohl über die proteolytische Aktivierung von Caspase-aktivierter DNase (CAD) (Wolf et al. 1999) als auch durch Endonuklease G (Liu et al. 2015) an der Fragmentierung der DNA beteiligt ist, lässt sich diese Beobachtung gut erklären. Sie deutet auf eine geringgradige Aktivierung der Caspase-3 *in vitro* auch ohne exogene Stimulation hin, da diese Erhöhung der Doppelstrangbrüche nur in CASP3wt-Zellen vorkommt.

Da zahlreiche Effekte der Caspase-3, wie in der Einleitung beschrieben, auf ihre proteolytischen Eigenschaften zurückzuführen sind, wurde ein externer Stimulus gewählt, der zu einer Aktivierung führt. Durch eine Stimulation mit TNF $\alpha$  und Cycloheximid über 6 h konnte visuell verifizierbarer Zelltod in allen TAB-1 Modellen erreicht werden. TNF $\alpha$  bindet an die TNF $\alpha$ -Rezeptorfamilie, deren Mitglieder über eine Todesdomäne Zelltod durch Stimulation der apoptotischen Maschinerie bewirken können (Chen G und Goeddel 2002). Dass alle Zelllinien sensibel auf TNF $\alpha$  reagieren, ist nicht verwunderlich, da Caspase-3 nicht obligat für die Induktion von Zelltod ist, was bspw. in der *CASP3*-defizienten Zelllinie MCF-7 gezeigt werden konnte (Kagawa et al. 2001). In *Western-Blot*-Analysen von Lysaten der Zelllinie zeigte sich, dass die oben beschriebene Akkumulation von  $\gamma$ H2A.X in der Tat abhängig von der katalytischen Aktivität der Caspase-3 ist, da nur CASP3wt-Zellen diesen Marker aufwiesen. Eine weitere Beobachtung war, dass in CASP3mut-rekonstituierten Zellen Fragmente der Caspase-3 bei ca. 15 kDa akkumulierten, was bei den CASP3wt Zellen nicht der Fall war. Dieser Unterschied lässt sich über den Metabolismus der Caspase-3-Fragmente erklären. Ihr Abbau erfolgt über die katalytische Aktivität der Caspase-3 selbst (Tawa et al. 2004), wodurch die Fragmente in Zellen mit katalytisch inaktiver Caspase-3 akkumulieren. Hinsichtlich des YAP-Status zeigten sich keine Caspase-3-abhängigen Unterschiede, sodass diesbezüglich angenommen werden kann, dass YAP in der Zelllinie TAB-1 nicht primär durch den Caspase-3-Status reguliert wird. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass eine starke und relevante Aktivierung von YAP den TNF $\alpha$ -vermittelten Zelltod blockieren oder zumindest reduzieren kann (Dong et al. 2007). Eine Blockade wäre vermutlich auch bei dem gewählten Experimentaldesign aufgefallen, eine Reduktion müsste durch Quantifizierung etwa mittels FACS-Analyse belegt werden, was jedoch in Anbetracht der fehlenden Hinweise auf eine Relevanz von YAP im TAB-1-Modell als wenig zielführend einzustufen ist.

### 4.2.2 1889c: YAP-Status und seine Relevanz für das Wachstum der Zelllinie

In der *Western-Blot*-Analyse des 1889c-Modells zeigte sich eine unveränderte YAP-Expression, aber eine erhöhte Expression von pYAP(S127). Wie in Kap. 4.2.1 bereits erwähnt wurde, scheint pYAP(S127) sensitiver auf Veränderungen im YAP-Status zu reagieren als die YAP-Gesamtmenge, die vom hier verwendeten Antikörper gegen YAP erfasst wird (Yosefzon et al. 2018). Des Weiteren zeigte sich eine diskrete Verminderung der Expression von XIAP, was dem von Yosefzon et al. (2018) postulierten Signalweg entspricht (Yosefzon et al. 2018). Da die Zelllinie 1889c eine höhere Expression von YAP aufweist als die Zelllinie TAB-1 (vgl. Abbildung 6.1A im Anhang), ließ sich die YAP-Lokalisation immunfluoreszenzmikroskopisch nachweisen, wobei sich in den in geringer Dichte ausgesäten Zellen eine unterschiedlich regulierte YAP-Lokalisation nachweisen ließ, die mit den Ergebnissen von Yosefzon et al. (2018) kohärent ist (Yosefzon et al. 2018).

Da diese Beobachtungen noch keinen Zusammenhang zu den Veränderungen des Wachstums im 1889c-Modell herstellen, wurde durch *Knockdown*-Experimente überprüft, inwieweit YAP selbst eine Rolle in der Wachstumsregulation von 1889c spielt. Hierbei zeigte sich, dass die Viabilität im MTS-Assay unabhängig von der Zelldichte unverändert war, jedoch das Wachstum in Methylcellulose sowohl hinsichtlich der Größe der Holoklone als auch die Anzahl der Klone insbesondere in höheren Zelldichten vermindert war, sodass hier eine Rolle von YAP in der Wachstumsregulation der Zelllinie angenommen werden kann. Damit konnten die Effekte des *CASP3-Knockouts* zumindest teilweise reproduziert werden. Ein Beleg für einen direkten Zusammenhang ließe sich über die forcierte nukleäre Lokalisation von YAP in 1889c mit *CASP3<sup>-/-</sup>* erzeugen. Hierzu könnte ein Konstrukt verwendet werden, das YAP(5SA) enthält. Durch die Substitution von den fünf Serin-Resten durch Alanin, an denen YAP phosphoryliert werden kann, wird eine posttranslationale Phosphorylierung verhindert wodurch YAP forciert in den Zellkern transloziert (Zhao et al. 2007). Wenn eine solche Veränderung der Zelle zu einer Wiederherstellung der Wachstumskapazität führen würde, könnte ein direkter Zusammenhang als wahrscheinlich angenommen werden.

## 4.3 Validierung im Gewebe humaner Thymusneoplasien

### 4.3.1 YAP-Expression in Thymusneoplasien

Der Thymus und die Haut sind ontogenetisch miteinander verwandt, wie in Kap. 1.1.1 beschrieben. Dies zeigt sich durch die überlappenden Expressionsprofile von Oberflächenmarkern auf Keratinozyten und Thymusepithelzellen (Patel et al. 1995), FOXN1-abhängige Organentwicklung (Nehls et al. 1996) und durch ähnliche Morphologie mit Verhornungstendenzen und Polarität im Thymus in Richtung der Hassall-Körperchen (van Ewijk et al. 2000). YAP stellte sich in mehreren Publikationen als wichtiger Regulator der epidermalen Gewebemöostase heraus (Schlegelmilch et al. 2011; Yosefzon et al. 2018), wobei auch ein Zusammenhang zu neoplastischen Hauterkrankungen hergestellt wurde (Silvis et al. 2011).



Insgesamt ist eine Expression von YAP in zahlreichen neoplastischen Entitäten eher mit Malignität, weiter fortgeschrittenem Erkrankungsstadium und schlechterer Prognose assoziiert (Piccolo et al. 2014). In den häufigsten neoplastischen Erkrankungen des Thymus konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die YAP-Expression nicht mit den *high-grade* Neoplasien korreliert, sondern dass insbesondere die Typen AB und B1 als *low-grade* Neoplasien einen hohen Anteil von Tumoren mit starker YAP-Expression aufweisen. Dies entspricht also nicht den üblichen Beobachtungen hinsichtlich der YAP-Expression, deckt sich jedoch mit der nebenbefundlich ermittelten starken Expression von YAP in einigen Epithelzellen des gesunden Thymus, da die *low-grade* Neoplasien der thymischen Architektur histologisch stärker ähneln (Ströbel et al. 2014). In den *high-grade* Neoplasien ist die YAP-Expression deutlich variabler (vgl. Abbildung 3.10B), dies könnte den insgesamt geringeren Ordnungszustand und die zunehmende Dysregulation in malignen *high-grade* Neoplasien reflektieren.

Ob die YAP-Expression in humanen Thymi eine physiologische Relevanz hat, ist bisher nicht geklärt, ist insbesondere aufgrund der regelhaft vorkommenden Thymusinvolution jedoch interessant, da dieser Prozess in der nahezu vollständigen Rückbildung des Organs mündet. Eine Verbindung dieses Mechanismus mit einem potenten Regulator der Organgröße und Gewebemöostase wie YAP wäre zumindest vorstellbar. In Mausmodellen mit *YAP-Knockout* wurde kein entsprechender Befund (etwa das Fehlen einer Anlage) erhoben, da entsprechende Embryonen im Entwicklungsstadium E8.5 sterben (Morin-Kensicki et al. 2006). Damit lässt sich keine suffiziente Aussage über eventuelle YAP-bedingte Störungen der Entwicklung der Thymusanlage in Mäusen treffen, da die Anlage der *Gl. parathyroidea* in der dritten Schlundtasche aus der die murine Thymusanlage hervorgeht erst an Entwicklungstag E9.5 erscheint, während die durch FOXP1-Expression demarkierte Thymusanlage selbst erst ab Tag E11.5 abgrenzbar wird (Gordon und Manley 2011). Die in Vertebraten konservierte Involution des Thymus (Cowan et al. 2020) lässt sich daher im *YAP-Knockout-Setting* ebenfalls nicht untersuchen. Es bleibt daher unklar, welche Rolle YAP in der Physiologie des Thymus spielt, lediglich konnte, im Sinne einer Serendipität, eine starke nukleäre YAP-Expression in mehreren humanen Thymi insbesondere in Typ-I-Epithelzellen gezeigt werden. Interessant ist dies, da diese Epithelzellen bspw. den Marker CD49f exprimieren (Campinoti et al. 2020), ein Integrin, das typisch für basale Zellen in stratifizierten Epithelien ist (Watt 2002). Von Campinoti et al. (2020) konnte kürzlich gezeigt werden, dass vor allem diese Zellen ein hohes Proliferationspotenzial mit starker *in-vitro*-Klonalität aufweisen, das auch zu einer *ex-vivo*-Repopulation dezellularisierter Thymusmatrix genutzt werden konnte (Campinoti et al. 2020). Diese Beobachtungen deuten auf ein Stammzell- oder zumindest Progenitorpotenzial dieser Zellen hin, was sich exzellent mit der Beobachtung einer YAP-Expression in diesen Zellen deckt, da YAP als potenter Regulator von Proliferation, Regeneration und Stammzeleigenschaften bekannt ist (Piccolo et al. 2014; Yu et al. 2015). Dass YAP im Thymus mehr sein könnte als ein Surrogat für *Stemness* und Proliferation basaler Zellpopulationen, wird durch seine funktionelle Rolle in der Homöostase anderer stratifizierter Epithelien, wie der Epidermis, unterstrichen (Schlegelmilch et al. 2011; Yosefzon et al.

2018) und wird insbesondere durch die nahe Verwandtschaft dieser Organe noch wahrscheinlicher. Somit könnte YAP eine Funktion in der Homöostase des Normalthymus spielen, ebenso wie in dessen Involution.

#### 4.3.2 YAP-Effekte in Thymusneoplasien

Wie in Kap. 4.3.1 beschrieben, korreliert eine starke YAP-Expression und nukleäre Lokalisation mit einem verminderten Gesamtüberleben. YAP scheint tendenziell eher in späteren Stadien relevant zu werden (Piccolo et al. 2014; Zanconato et al. 2016) und insbesondere auch im Kontext von Metastasierung eine Rolle zu spielen (Lamar et al. 2012; Lau et al. 2014). In dieser Arbeit untersuchten Patientenkollektiv konnte weder in der Subgruppe der „*low-grade*“ noch bei den „*high-grade*“ Neoplasien ein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben gefunden werden. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass die Seltenheit der Thymusneoplasien derartigen statistischen Analysen natürliche Limitationen setzt. Lediglich für insgesamt 19 Patient\*innen der „*high-grade*“-Gruppe und für 17 Patient\*innen der „*low-grade*“-Gruppe lagen Informationen zum Gesamtüberleben vor.

Das häufigste paraneoplastische Syndrom, das mit Thymomen vergesellschaftet ist, ist die *Myasthenia gravis* (Travis et al. 2015). Diese kann unabhängig von Thymomen auftreten, ist jedoch in bis zu 10 % der Patient\*innen Folge eines Thymoms. Hierbei wird insbesondere bei dem Subtyp der *Early-onset-Myasthenia*, die durch ein früheres Auftreten gekennzeichnet ist, eine deutliche Assoziation mit histologischen Korrelaten von Entzündung im Thymus (wie etwa Lymphfollikeln) beobachtet (Mori et al. 2007). Das Vorhandensein solcher Lymphfollikel ist vor allem in den Thymomen des B-Spektrums zu beobachten, welche am häufigsten mit paraneoplastischer *Myasthenia gravis* einhergehen (Travis et al. 2015). Es zeigte sich in dieser Arbeit, dass eine starke YAP-Expression in *low-grade* Neoplasien signifikant mit einer höheren Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer *Myasthenia gravis* assoziiert war. *High-grade* Neoplasien induzieren das Auftreten dieses paraneoplastischen Syndroms nicht. Es kann anhand dieser isolierten Beobachtung nicht auf eine Kausalität geschlossen werden. Zwischen YAP-Aktivität und Entzündung konnte jedoch ein Zusammenhang nachgewiesen werden. Eine Entzündung kann in Epithelzellen eine Aktivierung von YAP induzieren. Dies scheint biologisch einer Erhöhung der Resistenz der Epithelzellen gegen Stressoren und einer Geweberegeneration zu dienen (Taniguchi et al. 2015). Es scheint daher möglich, dass entzündliche Infiltrate, die in Thymomen mit paraneoplastischer *Myasthenia gravis* häufiger auftreten, eine Induktion von YAP in den Epithelzellen bewirken könnten, was die differenzielle YAP-Expression erklären könnte. Bei dieser Interpretation würde die höhere YAP-Expression ein Epiphänomen der Entzündung sein und wäre eher nicht kausal an der Entstehung beteiligt.

Prinzipiell sind Forschungsansätze, die die molekulare Pathogenese der Thymusneoplasien entschlüsseln, bei dieser Gruppe von Tumoren von besonderer Bedeutung. Die geringe Inzidenz stellt eine natürliche Limitation der evidenzbasierten Medizin dar, da eine

randomisierte und kontrollierte Untersuchung pharmakologischer Interventionen erschwert wird (Relevanz von *Confoundern* bei geringer Fallzahl, veraltete Regime bei langer Studienlaufzeit etc.). Gerade hierbei könnten personalisierte, oder zumindest entitätsbezogene Lösungsansätze von besonderer Bedeutung sein. Insbesondere die auf geringen Proliferationsraten basierende langsame Progressionstendenz speziell der *low-grade* Thymome (Detterbeck 2010) führt den Gedanken einer unselektiven zytostatischen Chemotherapie, wie sie momentan in kurativer Intention eingesetzt wird, an eine logische Grenze, da die Trennschärfe zwischen Tumorzelle und normaler Zelle diesbezüglich verschwimmt.

#### 4.4 Methodologische Überlegungen

Die Zellmodelle von TAB-1 und 1889c wurden in möglichst niedriger Passage erhalten (durch regelmäßige Kryokonservierung), jedoch ist bei immortalen Zelllinien immer eine Alterung zu erwarten, das biologische Alter (im Gegensatz zum kalendarischen) lässt sich anhand der Passagennummer nur sehr grob bestimmen. Beim 1889c-*CASP3*<sup>-/-</sup>-Modell wurde ein einzelner Klon nach *Knockout* selektiert und die anschließenden Experimente mit diesem herangezüchteten Subklon durchgeführt. Bei den TAB-1-Zellmodellen, sowie bei 1889c shRNA YAP-Modellen wurden keine Einzelklone verwendet, sondern direkt nach Selektion mittels Antibiotikums eine heterogene Population aus mehreren Subklonen verwendet. Beide Verfahren weisen Vor- und Nachteile auf. Die Selektion eines Einzelklons bedingt eine initiale Homogenität der Zelllinie, die anfangs zu einer geringeren Varianz der Zellen führen kann. YAP scheint jedoch vor allem in weiter fortgeschrittenen Neoplasien relevant zu sein (Zanconato et al. 2016), die als heterogene polyklonale Populationen mit hoher Varianz betrachtet werden (Nowell 1976), sodass eine Selektion zur Artefaktbildung beitragen kann. Dass das eingangs erwähnte schwer zu bestimmende Alter der Zelllinien darüber hinaus eine weitere Quelle für eine Entfremdung der Zelllinie von ihrem ursprünglichen Tumor darstellt, konnte am Beispiel der Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7, aber auch an anderen Zelllinien, von Ben-David et al. (2018) eindrucksvoll gezeigt werden. Die Autoren zeigten, dass eine erhebliche genetische Heterogenität zwischen Proben der gleichen Zelllinie aus unterschiedlichen Laboratorien vorlag, die zu einer drastischen Heterogenität im Ansprechen der Zellen auf Chemotherapie *in vitro* führte (Ben-David et al. 2018). Dieses Problem führt zu erschwerter Reproduzierbarkeit, aber auch zu Artefaktbildung und zeigt die Schwierigkeiten im Umgang und in der Interpretation zellkultureller Ergebnisse, insbesondere wenn entsprechende Versuche nicht als lineare Signalweg-Analyse konzipiert, sondern, wie teilweise in dieser Arbeit, zur Analyse der phänotypischen Veränderung der Zellen als Antwort auf eine Modulation ausgelegt ist.

Insbesondere da das 1889c-Modell als selektierter Subklon verwendet wurde, müssten die Ergebnisse, die in dieser Arbeit generiert wurden, weiter validiert werden, um eine Artefaktbildung letztlich ausschließen zu können: So müssten die beobachteten Effekte entweder in mindestens einem weiteren selektierten Subklon reproduzierbar sein, oder eine

Rekonstitution der intakten Procaspase-3 müsste zu einer weitgehenden Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps führen. Nach Abschluss der Experimente dieser Arbeit konnte die Viabilitätsminderung in weiteren Klonen reproduziert werden. Eine Überprüfung der Klonalität erfolgte bisher nicht. Weiterhin ist anzumerken, dass eine weitere Validierung insbesondere aufgrund von *Off-target*-Effekten, die unter Einsatz von CRISPR/Cas9 auftreten können (Anderson et al. 2018), wichtig wäre. Diese könnte neben weiteren Klonen auch *Knockdown*-Versuche, die Pharmakomodulation von Caspase-3 oder andere CRISPR/Cas9-Vektoren (Zhou et al. 2018) beinhalten.

YAP ist, wie in der Einleitung eingehend beschrieben, ein pleiotrop regulierter Faktor, der zu pleiotropen Effekten führt (Piccolo et al. 2014). Von einigen Autoren wurde, wie in Kap. 1.3.1 beschrieben, die Regulation von YAP durch die umgebende Matrix als eine Art übergeordnetes Regulationsprinzip beschrieben (Aragona et al. 2013). In aufwendigen Experimenten konnte dieser Zusammenhang mit den mechanischen Eigenschaften in Zusammenhang gebracht werden (Aragona et al. 2013; Dupont et al. 2011). Diese Effekte in dreidimensionalem Medium können von einem Viabilitätsassay in zwei Dimensionen nicht, und von einem Klonalitätsassay in Methylcellulose nur unzureichend adressiert werden. Dies mag erklären weshalb in dieser Arbeit ein stabiler *Knockdown* von YAP in 1889c zwar zu einer Reduktion der Klonalität in dreidimensionalem Medium führte, aber nicht zu einer Änderung der Viabilität im 2D-Viabilitätsassay. Damit der Nachweis einer Relevanz des CASP3-YAP-Moduls im onkologischen Kontext gelingen kann müsste das Problem der Matrix-Regulation von YAP *in vitro* adressiert werden, um die Zellen in einen Status versetzen zu können in dem YAP aktivierbar ist. Die verwendete Methylcellulose (Miltenyi Biotech, Deutschland) ist hinsichtlich der mechanischen Eigenschaften nicht veränderbar. Alternativ wäre eine Validierung *in vivo* sinnvoll, da hier eher realitätsnahe Bedingungen angenommen werden können, die sich insbesondere für die YAP-Biologie nur unter großem Aufwand *in vitro* simulieren lassen.

## 4.5 Synopsis und Perspektiven

In dieser Arbeit konnte *in vitro* die Kontextsensitivität der Funktionen der Caspase-3 vor onkologischem Hintergrund nachgewiesen werden. Außerdem konnte in der Thymuskarzinom-Zelllinie 1889c *in vitro* eine Caspase-3-abhängige differenzielle Regulation von YAP gezeigt werden, ebenso wie ein Effekt von YAP auf die Tumorigenität dieser Zelllinie. *In situ* wurde erstmals die Expression von YAP in Thymusneoplasien untersucht, wobei sich zeigte, dass die YAP-Expression nicht wie in anderen Neoplasien mit höhergradiger Entdifferenzierung korreliert, sondern eher in *low-grade* Neoplasien (v. a. in Typ AB und B1) durchweg hohe nukleäre Expression aufweist. Daher ist fraglich inwieweit die Zelllinie 1889c in Bezug auf die recht starke YAP-Expression (vgl. Abbildung 6.1, Anhang) repräsentativ für die Thymuskarzinome ist, die *in situ* eine sehr heterogene Expression des Proteins aufweisen. Da ein Gesamtüberleben der Patient\*innen nicht signifikant von der YAP-Expression abhängt,

muss zunächst der Schluss gezogen werden, dass YAP in der Progression maligner epithelialer Thymusneoplasien eine – wenn überhaupt – untergeordnete Rolle spielt. Die nebenbefundlich beschriebene starke nukleäre Expression von YAP in cTEC wirft die Frage auf, ob YAP in der Organogenese und Homöostase, eventuell sogar in der Involution des Thymus eine Rolle spielt. Die hohe Expression in Normalthymi passt dabei gut zu der in *low-grade* Neoplasien beobachteten starken Expression und unterstreicht erneut deren relative biologische Nähe zum Normalthymus. Im Unterschied zu diesem zeigen sie nicht das beschriebene Ordnungsmuster mit vor allem marginaler Expression, sondern eine chaotischere Verteilung der YAP-positiven Zellen (vgl. Abbildung 3.8).

Dass die Kooperation zweier kontextsensitiver Onkogene (Caspase-3 & YAP) zu einer Onkogenese beitragen kann, müsste anhand weiterer Experimente belegt werden, wie weiter unten eingehender diskutiert wird. Dieses Modell ist interessant, da es im Gegensatz zum klassischen Dogma „Krebs als primär genomische Erkrankung“ primär ohne weitere genetische Alterationen eine Progression erklären kann, was insbesondere in den hypomutierten Thymusneoplasien (Radovich et al. 2018) ein interessanter Aspekt hätte sein können. Generell ist die geringe Mutationslast suggestiv für eine hohe Relevanz nicht-genomischer Effekte in Thymusneoplasien. Es kann daher gemutmaßt werden, dass insbesondere die *low-grade* Neoplasien eher von einer Störung der Homöostase auf Gewebeebene angetrieben werden, während klassische klonal-neoplastische Erkrankungen überwiegend durch Treibermutationen angetrieben sind. Es könnte daher sein, dass die Schwierigkeit in der Dechiffrierung der Ätiopathogenese humaner Thymusneoplasien gerade darin besteht, dass diese in hohem Maße in einer Pathologie des *Microenvironments*, von Gewebe-*Checkpoints* und somit im zellulären *Networking* begründet ist und weniger in einer klonalen „intrazellulären“ Pathologie wie bei klassischen neoplastischen Erkrankungen. Derartige Zusammenhänge überschreiten schnell die Möglichkeiten der klassischen zellkulturbasierten *in-vitro*-Forschung.

#### 4.5.1 Mögliche Beiträge zur Onkogenese durch Caspase-3 im Thymus

Zusätzlich muss ein weiterer Aspekt im Zusammenhang mit dem CASP3-YAP-Modul untersucht werden. Neben den Thymusepithelzellen existieren sowohl im Thymus als auch in verschiedenen Thymomen unterschiedliche Mengen teils unreifer Lymphozyten (= Thymozyten) (Travis et al. 2015). Dass eine Interaktion zwischen Thymozyten und Tumorzellen relevant ist, konnte bspw. anhand der *Myasthenia gravis* gezeigt werden (Ströbel et al. 2002). Umgekehrt könnte das *Microenvironment*, das sich aus überlebenden und (prä-)apoptotischen Thymozyten zusammensetzt, eine wichtige Rolle in der Entstehung und Aufrechterhaltung des neoplastischen Wachstums im Thymus haben. Für die Caspase-3 konnte ein parakriner PGE2-vermittelter Mechanismus beschrieben werden, der im physiologischen Kontext zur Wundheilung (Li F et al. 2010), im neoplastischen Kontext jedoch zum Tumorwachstum beitrug (Huang Q et al. 2011). Auch konnte ein durch apoptotische Zellen vermittelter, Sekretom-assoziiertes positiver Effekt auf die Proliferation mittels eines Pannexin-1 vermittelten Mechanismus beschrieben werden (Medina et al. 2020). Der in Thymom-Patient\*innen

beobachtete Effekt eines verbesserten Gesamtüberlebens bei Caspase-3-Deletion könnte daher auch durch eine Verminderung derartiger parakriner Effekte vermittelt sein, wenn umgebende Zellen (Thymusepithel, Lymphozyten) eine verminderte Expression oder Aktivität von Caspase-3 aufwiesen.

#### 4.5.2 Validierung des CASP3-YAP-Moduls im onkologischen Kontext

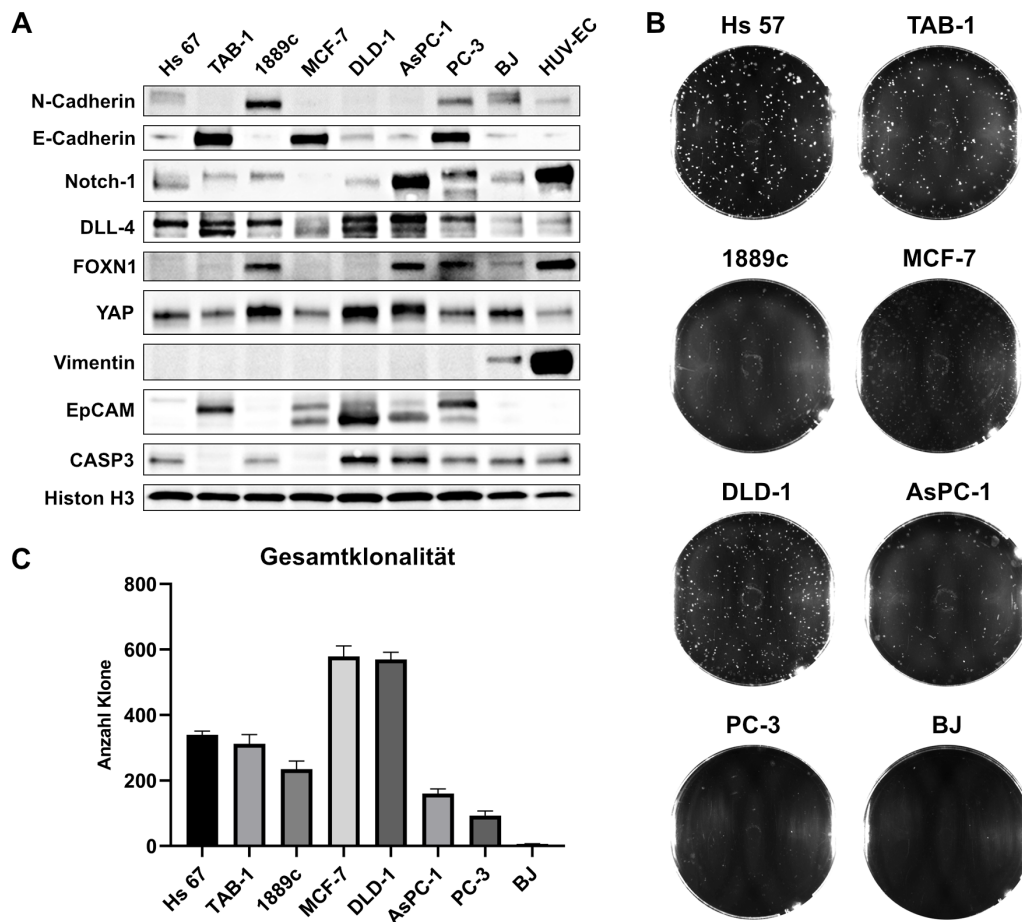
Wie in der Einleitung beschrieben, weist Caspase-3 kontextsensitive Effekte auf, die sowohl tumorsuppressiv als auch onkogen wirken können. Dies konnte durch die unterschiedlichen Effekte einer Rekonstitution bzw. eines *Knockouts* in dieser Arbeit nachvollzogen werden. Caspase-3 kann daher als Kooperationsonkogen bezeichnet werden, bzw. als *Non-oncogenic dependency*, da die onkogenen Effekte der Caspase-3 nicht allein, sondern immer nur vor einem geeigneten molekularen Hintergrund in Erscheinung treten. Für YAP trifft ähnliches zu: nur selten sind der Hippo-Signalweg, YAP oder seine wichtigsten Ziel-Transkriptionsfaktoren (TEAD-Familie) selbst von Mutationen im Sinne einer klassischen Onkogenese betroffen (Zanconato et al. 2016). Auch YAP ist daher in den meisten Entitäten kein klassisches Onkogen. Der Nachweis einer Relevanz des CASP3-YAP-Moduls könnte zeigen, wie die Kooperation zweier Proteine zu einer Onkogenese beitragen kann, ohne dass eines der beiden codierenden Gene hierfür mutiert sein müsste. Um dies nachzuweisen, wäre ein etabliertes Zellmodell, das sowohl in der YAP-Forschung, als auch im Caspase-3-Feld bereits Verwendung fand, wünschenswert. So käme etwa die Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116 hierfür in Frage. Für sie sind sowohl relevante Effekte durch YAP-Modulation publiziert (Rosenbluh et al. 2012), als auch Effekte durch einen *CASP3-Knockout* (Zhou et al. 2018). In Anbetracht einer hohen Expression von YAP und CASP3 in der Zelllinie DLD-1 (Abbildung 6.1 im Anhang), käme ein Versuch auch hiermit in Frage. Diese Modelle böten zudem den Vorteil, dass die Effekte *in vivo* validiert werden könnten, während für Thymusneoplasien keine Tiermodelle existieren. So konnten bisher lediglich ektope Thymi in *FOXN1<sup>-/-</sup>*-Mäusen *in vivo* zu Experimenten genutzt werden, die entweder als allogenes Transplantat (Hu et al. 2016), aus transdifferenzierten humanen embryonalen Stammzellen generiert (Parent et al. 2013) oder aus dezellularisierter und repopularisierter Thymusmatrix (Campinoti et al. 2020) transplantiert wurden. Da über die Ätiopathogenese von Thymusneoplasien wenig bekannt ist, konnten diese Bestrebungen jedoch nicht in den onkologischen Kontext übertragen werden, da bisher keine suffiziente Modellierung neoplastischer Thymuserkrankungen gelingen konnte. Eine Validierung *in vivo* wäre jedoch aufgrund der in Kap. 4.4 diskutierten Limitationen der YAP-Untersuchung *in vitro* wünschenswert (Mechanotransduktion, Zellkontakte etc.).

Auch eine Analyse der physiologischen YAP-Funktionen in der Homöostase des gesunden Thymus, wie eingehender in Kap. 4.3.1 diskutiert, erscheint in Hinblick auf die Expression des Proteins im Thymus und seiner Rolle im Erhalt von *Stemness* und der Gewebekomöostase ontogenetisch verwandter Gewebe eine interessante Frage für eine genaue Untersuchung zu sein.

## 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der molekularen Entstehung von Thymusneoplasien. Thymusneoplasien sind sehr seltene Neubildungen im Thymus, die aus dem Epithel des im *Mediastium* situierten Thymus hervorgehen. Über ihre Ätiopathogenese ist wenig bekannt, sie stellen jedoch die adulte Tumorentität mit der geringsten Mutationslast dar. Eine zielgerichtete Therapie der auch nach Jahren zu Lokalrezidiven neigenden Tumore ist daher schwierig. In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass in einem Anteil der Thymustumore eine Deletion des Apoptose-Enzyms Caspase-3 vorliegt, was mit einer verbesserten Prognose einhergeht. Dem klassischen Rollenverständnis der Apoptose in neoplastischen Erkrankungen widerspricht dies zunächst, jedoch ergaben zahlreiche Publikationen in der jüngeren Zeit Hinweise auf non-kanonische Funktionen der Caspase-3, die zu einer Tumorprogression beitragen können. Eine dieser non-kanonischen Funktionen ist die Interaktion mit dem transkriptionellen Co-Aktivatoren YAP, welcher zahlreiche Funktionen in der Regulation der Gewebemöostase physiologischer und neoplastischer Zellverbände erfüllt. Es wurde anhand zweier etablierter thymischer Zellmodelle der Einfluss der Modulation des Caspase-3-Status *in vitro* untersucht. Hierfür wurden zunächst erfolgreich Zellmodelle erzeugt und etabliert. Es folgten Wachstumsanalysen in 2D- und 3D-Zellkultur, die in der Thymuskarzinomzelllinie 1889c einen wachstumssteigernden Effekt, in der Thymom-Zelllinie TAB-1 einen wachstumshemmenden Effekt der Caspase-3 nachweisen konnte, was die Kontextsensitivität der Caspase-3-Effekte anschaulich darstellt. In nachfolgenden Analysen wurde der YAP-Status in den Zellen analysiert, wobei sich, konsistent mit den beobachteten Effekten, keine differenzielle Regulation von YAP im TAB-1-Modell zeigte. Im 1889c-Modell konnte eine erhöhte Lokalisation von YAP im Zellkern, die mit einer Aktivität des Proteins korreliert ist, fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden. Eine im Anschluss erfolgte Erzeugung und Etablierung eines stabilen YAP-*Knockdown*-Modells in 1889c-Zellen konnte die in 1889c beobachtete Verminderung der Klonalität durch Caspase-3 partiell reproduzieren. Um die *in vitro* generierten Ergebnisse zu validieren, wurden immunhistochemische Untersuchungen in Bezug auf die YAP-Expression an Gewebeproben von 111 Patient\*innen mit epithelialer Thymusneoplasie durchgeführt, wobei sich zeigte, dass eher die dem Normalthymus ähnlichen Subtypen eine hohe Expression von YAP aufwiesen als die *high-grade* Neoplasien, was nicht die sonst häufig beobachtete Korrelation von YAP mit fortgeschrittenem Tumorstadium und schlechter Prognose reflektiert. Eine Abhängigkeit des Gesamtüberlebens vom YAP-Status konnte nicht gezeigt werden. Nebenbefundlich zeigte sich in Normalthymi eine starke YAP-Expression in Typ-I-Epithelzellen. Die Ergebnisse deuten nicht auf eine dominierende Rolle von YAP in Thymusneoplasien hin. Die *in vitro* generierten Ergebnisse deuten zwar auf eine Rolle der Caspase-3 und von YAP hin, einer Validierung im Gewebe hielten sie jedoch nicht stand. Eine Rolle des CASP3-YAP-Moduls im Kontext der Onkogenese scheint jedoch möglich, sollte aber in anderen Entitäten und auch *in vivo* validiert werden. Auch ob YAP eine physiologische Rolle in Thymusentwicklung und -involution spielt, könnte eine Fragestellung für zukünftige Untersuchungen sein.

## 6 Anhang



**Abbildung 6.1: Vergleich eines Panels humaner Zelllinien.** **A** Explorative *Western-Blot*-Analysen mit einem Panel etablierter Tumorzelllinien. Verwendet wurden mehrere Marker, die sowohl die epitheliale Differenzierung (EpCAM, E-Cadherin) als auch die thymische Herkunft (FOXN1, DLL-4, Notch-1) untersuchen (Parent et al. 2013). Aufgrund begrenzten Probenmaterials wurden interne Kontrollen durchgeführt (Vimentin, Caspase-3, N-Cadherin), wobei sich die beschriebenen Caspase-3-Deletionen von MCF-7 und TAB-1 präsentieren. Die Expression von YAP ist insbesondere im direkten Vergleich in 1889c deutlich stärker als in TAB-1. Als Ladekontrolle fungierte Histon H3. Die humane thymische Zelllinie Hs 67 wurde von ATCC erworben und bisher abseits der fibroblastischen Morphologie nicht genauer typisiert. Weitere Einordnung der Zelllinien siehe Kap. 2.9. **B** Deutlich unterschiedliche Klonalität der in A untersuchten Zelllinien in den Übersichtsaufnahmen. **C** Quantifizierung der Klonalität im Vergleich (B+C als repräsentative Auswahl aus  $n = 2$ ). Auffällig ist insbesondere die starke Klonalität von Hs 67, die im Gegensatz zu anderen mesenchymalen Zellen (BJ, HUV-EC) zahlreiche Klone bildet und darüberhinaus kein Vimentin (vgl. A) exprimiert.



## 7 Literaturverzeichnis

- Anderson KR, Haeussler M, Watanabe C, Janakiraman V, Lund J, Modrusan Z, Stinson J, Bei Q, Buechler A, Yu C, et al. (2018): CRISPR off-target analysis in genetically engineered rats and mice. *Nat Methods* **15**, 512-514
- Aragona M, Panciera T, Manfrin A, Giulitti S, Michielin F, Elvassore N, Dupont S, Piccolo S (2013): A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors. *Cell* **154**, 1047-1059
- Azzolin L, Panciera T, Soligo S, Enzo E, Bicciato S, Dupont S, Bresolin S, Frasson C, Basso G, Guzzardo V, et al. (2014): YAP/TAZ incorporation in the  $\beta$ -catenin destruction complex orchestrates the Wnt response. *Cell* **158**, 157-170
- Barrandon Y, Green H (1987): Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 2302-2306
- Basu-Roy U, Bayin NS, Rattanakorn K, Han E, Placantonakis DG, Mansukhani A, Basilico C (2015): Sox2 antagonizes the Hippo pathway to maintain stemness in cancer cells. *Nat Commun* **6**, 6411
- Ben-David U, Siranosian B, Ha G, Tang H, Oren Y, Hinohara K, Strathdee CA, Dempster J, Lyons NJ, Burns R, et al. (2018): Genetic and transcriptional evolution alters cancer cell line drug response. *Nature* **560**, 325-330
- Berardi R, De Lisa M, Pagliaretta S, Onofri A, Morgese F, Savini A, Ballatore Z, Caramanti M, Santoni M, Mazzanti P, et al. (2014): Thymic neoplasms: an update on the use of chemotherapy and new targeted therapies. A literature review. *Cancer Treat Rev* **40**, 495-506
- Bernard A, Chevrier S, Beltjens F, Dosset M, Viltard E, Lagrange A, Derangère V, Oudot A, Ghiringhelli F, Collin B, et al. (2019): Cleaved Caspase-3 Transcriptionally Regulates Angiogenesis-Promoting Chemotherapy Resistance. *Cancer Res* **79**, 5958-5970
- Calvo F, Ege N, Grande-Garcia A, Hooper S, Jenkins RP, Chaudhry SI, Harrington K, Williamson P, Moendarbary E, Charras G, et al. (2013): Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nat Cell Biol* **15**, 637-646
- Camargo FD, Gokhale S, Johnnidis JB, Fu D, Bell GW, Jaenisch R, Brummelkamp TR (2007): YAP1 increases organ size and expands undifferentiated progenitor cells. *Curr Biol* **17**, 2054-2060
- 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
- Campinoti S, Gjinovci A, Ragazzini R, Zanieri L, Ariza-McNaughton L, Catucci M, Boeing S, Park JE, Hutchinson JC, Muñoz-Ruiz M, et al. (2020): Reconstitution of a functional human thymus by postnatal stromal progenitor cells and natural whole-organ scaffolds. *Nat Commun* **11**, 6372
- Cartwright IM, Liu X, Zhou M, Li F, Li CY (2017): Essential roles of Caspase-3 in facilitating Myc-induced genetic instability and carcinogenesis. *Elife* **6**, e26371
- Chapman J, Fielder E, Passos JF (2019): Mitochondrial dysfunction and cell senescence: deciphering a complex relationship. *FEBS Lett* **593**, 1566-1579
- Chen G, Goeddel DV (2002): TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* **296**, 1634-1635
- Chen WH, Horoszewicz JS, Leong SS, Shimano T, Penetrante R, Sanders WH, Berjian R, Douglass HO, Martin EW, Chu TM (1982): Human pancreatic adenocarcinoma: in vitro and in vivo morphology of a new tumor line established from ascites. *In Vitro* **18**, 24-34
- Cheng J, He S, Wang M, Zhou L, Zhang Z, Feng X, Yu Y, Ma J, Dai C, Zhang S, et al. (2019): The Caspase-3/PKC $\delta$ /Akt/VEGF-A Signaling Pathway Mediates Tumor Repopulation during Radiotherapy. *Clin Cancer Res* **25**, 3732-3743
- 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

- Cowan JE, Takahama Y, Bhandoola A, Ohigashi I (2020): Postnatal Involution and Counter-Involution of the Thymus. *Front Immunol* 11, 897
- Cox AG, Hwang KL, Brown KK, Evason K, Beltz S, Tsomides A, O'Connor K, Galli GG, Yimlamai D, Chhangawala S, et al. (2016): Yap reprograms glutamine metabolism to increase nucleotide biosynthesis and enable liver growth. *Nat Cell Biol* 18, 886-896
- Detterbeck FC (2010): Evaluation and treatment of stage I and II thymoma. *J Thorac Oncol* 5, S318-322
- Dexter DL, Barbosa JA, Calabresi P (1979): N,N-dimethylformamide-induced alteration of cell culture characteristics and loss of tumorigenicity in cultured human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 39, 1020-1025
- Donato AL, Huang Q, Liu X, Li F, Zimmerman MA, Li CY (2014): Caspase 3 promotes surviving melanoma tumor cell growth after cytotoxic therapy. *J Invest Dermatol* 134, 1686-1692
- Dong J, Feldmann G, Huang J, Wu S, Zhang N, Comerford SA, Gayyed MF, Anders RA, Maitra A, Pan D (2007): Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals. *Cell* 130, 1120-1133
- DuBridge RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, Calos MP (1987): Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* 7, 379-387
- Dupont S, Morsut L, Aragona M, Enzo E, Giulitti S, Cordenonsi M, Zanconato F, Le Digabel J, Forcato M, Bicciato S, et al. (2011): Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* 474, 179-183
- 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
- Fehér I, Gidáli J (1974): Prostaglandin E2 as stimulator of haemopoietic stem cell proliferation. *Nature* 247, 550-551
- Feng X, Yu Y, He S, Cheng J, Gong Y, Zhang Z, Yang X, Xu B, Liu X, Li CY, et al. (2017): Dying glioma cells establish a proangiogenic microenvironment through a caspase 3 dependent mechanism. *Cancer Lett* 385, 12-20
- Frank J, Pignata C, Panteleyev AA, Prowse DM, Baden H, Weiner L, Gaetaniello L, Ahmad W, Pozzi N, Cserhalmi-Friedman PB, et al. (1999): Exposing the human nude phenotype. *Nature* 398, 473-474
- Fuchs Y, Steller H (2011): Programmed cell death in animal development and disease. *Cell* 147, 742-758
- Fuentes-Prior P, Salvesen GS (2004): The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J* 384, 201-232
- Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, Alnemri ES, Altucci L, Amelio I, Andrews DW, et al. (2018): Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* 25, 486-541
- Giaccone G, Kim C, Thompson J, McGuire C, Kallakury B, Chahine JJ, Manning M, Mogg R, Blumenschein WM, Tan MT, et al. (2018): Pembrolizumab in patients with thymic carcinoma: a single-arm, single-centre, phase 2 study. *Lancet Oncol* 19, 347-355
- Gökmen-Polar Y, Sanders KL, Goswami CP, Cano OD, Zaheer NA, Jain RK, Kesler KA, Nelson RP, Jr., Vance GH, Smith D, et al. (2012): Establishment and characterization of a novel cell line derived from human thymoma AB tumor. *Lab Invest* 92, 1564-1573
- Gordon J, Manley NR (2011): Mechanisms of thymus organogenesis and morphogenesis. *Development* 138, 3865-3878
- Green DR (2020): Ghostly metabolic messages from dying cells. *Nature* 580, 36-37

- Hanahan D, Weinberg RA (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674
- Hanson WR, Thomas C (1983): 16, 16-dimethyl prostaglandin E2 increases survival of murine intestinal stem cells when given before photon radiation. *Radiat Res* **96**, 393-398
- Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC (1999): Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol* **17**, 1474-1481
- Hayashi H, Higashi T, Yokoyama N, Kaida T, Sakamoto K, Fukushima Y, Ishimoto T, Kuroki H, Nitta H, Hashimoto D, et al. (2015): An Imbalance in TAZ and YAP Expression in Hepatocellular Carcinoma Confers Cancer Stem Cell-like Behaviors Contributing to Disease Progression. *Cancer Res* **75**, 4985-4997
- HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee) Database (Hrsg.): Gene Group: Caspases (CASP). European Molecular Biology Laboratory, European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), Wellcome Genome Campus, Hinxton, Cambridge, Vereinigtes Königreich 2021; <https://www.genenames.org/data/genegroup/#!/group/468>; abgerufen am 20.03.2021
- Hoffacker V, Schultz A, Tiesinga JJ, Gold R, Schalke B, Nix W, Kiefer R, Müller-Hermelink HK, Marx A (2000): Thymomas alter the T-cell subset composition in the blood: a potential mechanism for thymoma-associated autoimmune disease. *Blood* **96**, 3872-3879
- Holländer GA, Wang B, Nichogiannopoulou A, Platenburg PP, van Ewijk W, Burakoff SJ, Gutierrez-Ramos JC, Terhorst C (1995): Developmental control point in induction of thymic cortex regulated by a subpopulation of prothymocytes. *Nature* **373**, 350-353
- Hu B, Simon-Keller K, Küffer S, Ströbel P, Braun T, Marx A, Porubsky S (2016): Myf5 and Myogenin in the development of thymic myoid cells - Implications for a murine in vivo model of myasthenia gravis. *Exp Neurol* **277**, 76-85
- Huang J, Rizk NP, Travis WD, Riely GJ, Park BJ, Bains MS, Dycoco J, Flores RM, Downey RJ, Rusch VW (2009): Comparison of patterns of relapse in thymic carcinoma and thymoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* **138**, 26-31
- Huang Q, Li F, Liu X, Li W, Shi W, Liu FF, O'Sullivan B, He Z, Peng Y, Tan AC, et al. (2011): Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. *Nat Med* **17**, 860-866
- Ichim G, Lopez J, Ahmed SU, Muthalagu N, Giampazolias E, Delgado ME, Haller M, Riley JS, Mason SM, Athineos D, et al. (2015): Limited mitochondrial permeabilization causes DNA damage and genomic instability in the absence of cell death. *Mol Cell* **57**, 860-872
- 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
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR (1973): Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* **52**, 2745-2756
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012): A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**, 816-821
- Kagawa S, Gu J, Honda T, McDonnell TJ, Swisher SG, Roth JA, Fang B (2001): Deficiency of caspase-3 in MCF7 cells blocks Bax-mediated nuclear fragmentation but not cell death. *Clin Cancer Res* **7**, 1474-1480
- Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW (1979): Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* **17**, 16-23
- Karlsson A, Deb-Basu D, Cherry A, Turner S, Ford J, Felsher DW (2003): Defective double-strand DNA break repair and chromosomal translocations by MYC overexpression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9974-9979

- Kelesidis T, Yang O (2010): Good's syndrome remains a mystery after 55 years: A systematic review of the scientific evidence. *Clin Immunol* 135, 347-363
- Kerr JF (1965): A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. *J Pathol Bacteriol* 90, 419-435
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257
- Kondo K, Monden Y (2003): Therapy for thymic epithelial tumors: a clinical study of 1,320 patients from Japan. *Ann Thorac Surg* 76, 878-885
- 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
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Lamar JM, Stern P, Liu H, Schindler JW, Jiang ZG, Hynes RO (2012): The Hippo pathway target, YAP, promotes metastasis through its TEAD-interaction domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, E2441-2450
- Lau AN, Curtis SJ, Fillmore CM, Rowbotham SP, Mohseni M, Wagner DE, Beede AM, Montoro DT, Sinkevicius KW, Walton ZE, et al. (2014): Tumor-propagating cells and Yap/Taz activity contribute to lung tumor progression and metastasis. *EMBO J* 33, 468-481
- Li F, Huang Q, Chen J, Peng Y, Roop DR, Bedford JS, Li CY (2010): Apoptotic cells activate the "phoenix rising" pathway to promote wound healing and tissue regeneration. *Sci Signal* 3, ra13
- Li LY, Luo X, Wang X (2001): Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95-99
- Liu X, He Y, Li F, Huang Q, Kato TA, Hall RP, Li CY (2015): Caspase-3 promotes genetic instability and carcinogenesis. *Mol Cell* 58, 284-296
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275
- Ma B, Chen Y, Chen L, Cheng H, Mu C, Li J, Gao R, Zhou C, Cao L, Liu J, et al. (2015): Hypoxia regulates Hippo signalling through the SIAH2 ubiquitin E3 ligase. *Nat Cell Biol* 17, 95-103
- Marchevsky AM, Gupta R, McKenna RJ, Wick M, Moran C, Zakowski MF, Suster S (2008): Evidence-based pathology and the pathologic evaluation of thymomas: the World Health Organization classification can be simplified into only 3 categories other than thymic carcinoma. *Cancer* 112, 2780-2788
- Marx A, Willcox N, Leite MI, Chuang WY, Schalke B, Nix W, Ströbel P (2010): Thymoma and paraneoplastic myasthenia gravis. *Autoimmunity* 43, 413-427
- 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
- Masaoka A (2010): Staging system of thymoma. *J Thorac Oncol* 5, S304-312
- Medina CB, Mehrotra P, Arandjelovic S, Perry JSA, Guo Y, Morioka S, Barron B, Walk SF, Ghesquiere B, Krupnick AS, et al. (2020): Metabolites released from apoptotic cells act as tissue messengers. *Nature* 580, 130-135
- Mo JS, Meng Z, Kim YC, Park HW, Hansen CG, Kim S, Lim DS, Guan KL (2015): Cellular energy stress induces AMPK-mediated regulation of YAP and the Hippo pathway. *Nat Cell Biol* 17, 500-510
- Mori T, Nomori H, Ikeda K, Kobayashi H, Iwatani K, Kobayashi T (2007): The distribution of parenchyma, follicles, and lymphocyte subsets in thymus of patients with myasthenia gravis, with special reference to remission after thymectomy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 133, 364-368

- Morin-Kensicki EM, Boone BN, Howell M, Stonebraker JR, Teed J, Alb JG, Magnuson TR, O'Neal W, Milgram SL (2006): Defects in yolk sac vasculogenesis, chorioallantoic fusion, and embryonic axis elongation in mice with targeted disruption of Yap65. *Mol Cell Biol* 26, 77-87
- 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
- Müller I, Strozyk E, Schindler S, Beissert S, Oo HZ, Sauter T, Lucarelli P, Raeth S, Hausser A, Al Nakouzi N, et al. (2020): Cancer Cells Employ Nuclear Caspase-8 to Overcome the p53-Dependent G2/M Checkpoint through Cleavage of USP28. *Mol Cell* 77, 970-984 e977
- Nehls M, Kyewski B, Messerle M, Waldschutz R, Schuddekopf K, Smith AJ, Boehm T (1996): Two genetically separable steps in the differentiation of thymic epithelium. *Science* 272, 886-889
- Nicholson DW (1999): Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 6, 1028-1042
- Nowell PC (1976): The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23-28
- Okuma Y, Hosomi Y, Watanabe K, Yamada Y, Horio H, Maeda Y, Okamura T, Hishima T (2014): Clinicopathological analysis of thymic malignancies with a consistent retrospective database in a single institution: from Tokyo Metropolitan Cancer Center. *BMC Cancer* 14, 349
- Overholtzer M, Zhang J, Smolen GA, Muir B, Li W, Sgroi DC, Deng CX, Brugge JS, Haber DA (2006): Transforming properties of YAP, a candidate oncogene on the chromosome 11q22 amplicon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 12405-12410
- Pantelouris EM (1968): Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature* 217, 370-371
- Parent AV, Russ HA, Khan IS, LaFlam TN, Metzger TC, Anderson MS, Hebrok M (2013): Generation of functional thymic epithelium from human embryonic stem cells that supports host T cell development. *Cell Stem Cell* 13, 219-229
- Park JE, Botting RA, Dominguez Conde C, Popescu DM, Lavaert M, Kunz DJ, Goh I, Stephenson E, Ragazzini R, Tuck E, et al. (2020): A cell atlas of human thymic development defines T cell repertoire formation. *Science* 367, eaay3224
- Patel DD, Whichard LP, Radcliff G, Denning SM, Haynes BF (1995): Characterization of human thymic epithelial cell surface antigens: phenotypic similarity of thymic epithelial cells to epidermal keratinocytes. *J Clin Immunol* 15, 80-92
- Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D (1993): Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8392-8396
- 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
- Piccolo S, Dupont S, Cordenonsi M (2014): The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiol Rev* 94, 1287-1312
- Povero D, Eguchi A, Niesman IR, Andronikou N, de Mollerat du Jeu X, Mulya A, Berk M, Lazic M, Thapaliya S, Parola M, et al. (2013): Lipid-induced toxicity stimulates hepatocytes to release angiogenic microparticles that require Vanin-1 for uptake by endothelial cells. *Sci Signal* 6, ra88
- 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
- Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F (2013): Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 8, 2281-2308

- Rao DD, Vorhies JS, Senzer N, Nemunaitis J (2009): siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Adv Drug Deliv Rev* 61, 746-759
- Ray S, Atkuri KR, Deb-Basu D, Adler AS, Chang HY, Herzenberg LA, Felsher DW (2006): MYC can induce DNA breaks in vivo and in vitro independent of reactive oxygen species. *Cancer Res* 66, 6598-6605
- Rosenbluh J, Nijhawan D, Cox AG, Li X, Neal JT, Schafer EJ, Zack TI, Wang X, Tsherniak A, Schinzel AC, et al. (2012):  $\beta$ -Catenin-driven cancers require a YAP1 transcriptional complex for survival and tumorigenesis. *Cell* 151, 1457-1473
- Rothe M, Chêne L, Nugeyre MT, Braun J, Barré-Sinoussi F, Israël N (1998): Contact with thymic epithelial cells as a prerequisite for cytokine-enhanced human immunodeficiency virus type 1 replication in thymocytes. *J Virol* 72, 5852-5861
- Ruffini E, Detterbeck F, Van Raemdonck D, Rocco G, Thomas P, Weder W, Brunelli A, Evangelista A, Venuta F, European Association of Thoracic Surgeons Thymic Working G (2014): Tumours of the thymus: a cohort study of prognostic factors from the European Society of Thoracic Surgeons database. *Eur J Cardiothorac Surg* 46, 361-368
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM (2005): Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098-1101
- 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
- Schlegelmilch K, Mohseni M, Kirak O, Pruszk J, Rodriguez JR, Zhou D, Kreger BT, Vasioukhin V, Avruch J, Brummelkamp TR, et al. (2011): Yap1 acts downstream of  $\alpha$ -catenin to control epidermal proliferation. *Cell* 144, 782-795
- Silvis MR, Kreger BT, Lien WH, Klezovitch O, Rudakova GM, Camargo FD, Lantz DM, Seykora JT, Vasioukhin V (2011):  $\alpha$ -catenin is a tumor suppressor that controls cell accumulation by regulating the localization and activity of the transcriptional coactivator Yap1. *Sci Signal* 4, ra33
- Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M (1973): A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51, 1409-1416
- Stennicke HR, Salvesen GS (1997): Biochemical characteristics of caspases-3, -6, -7, and -8. *J Biol Chem* 272, 25719-25723
- 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
- Ströbel P, Bargou R, Wolff A, Spitzer D, Manegold C, Dimitrakopoulou-Strauss A, Strauss L, Sauer C, Mayer F, Hohenberger P, et al. (2010a): Sunitinib in metastatic thymic carcinomas: laboratory findings and initial clinical experience. *Br J Cancer* 103, 196-200
- Ströbel P, Hohenberger P, Marx A (2010b): Thymoma and thymic carcinoma: molecular pathology and targeted therapy. *J Thorac Oncol* 5, S286-290
- 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
- Sudol M (1994): Yes-associated protein (YAP65) is a proline-rich phosphoprotein that binds to the SH3 domain of the Yes proto-oncogene product. *Oncogene* 9, 2145-2152
- Tan MH, Shimano T, Chu TM (1981): Differential localization of human pancreas cancer-associated antigen and carcinoembryonic antigen in homologous pancreatic tumoral xenograft. *J Natl Cancer Inst* 67, 563-569
- Taniguchi K, Wu LW, Grivennikov SI, de Jong PR, Lian I, Yu FX, Wang K, Ho SB, Boland BS, Chang JT, et al. (2015): A gp130-Src-YAP module links inflammation to epithelial regeneration. *Nature* 519, 57-62

- Tateyama H, Eimoto T, Tada T, Mizuno T, Inagaki H, Hata A, Sasaki M, Masaoka A (1995): p53 protein expression and p53 gene mutation in thymic epithelial tumors. An immunohistochemical and DNA sequencing study. *Am J Clin Pathol* 104, 375-381
- Tawa P, Hell K, Giroux A, Grimm E, Han Y, Nicholson DW, Xanthoudakis S (2004): Catalytic activity of caspase-3 is required for its degradation: stabilization of the active complex by synthetic inhibitors. *Cell Death Differ* 11, 439-447
- Thomas A, Rajan A, Berman A, Tomita Y, Brzezniak C, Lee MJ, Lee S, Ling A, Spittler AJ, Carter CA, et al. (2015): Sunitinib in patients with chemotherapy-refractory thymoma and thymic carcinoma: an open-label phase 2 trial. *Lancet Oncol* 16, 177-186
- Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG: WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart (WHO Classification of Tumours). Band 7; 4. Auflage; WHO Press, Lyon 2015
- van Ewijk W, Holländer G, Terhorst C, Wang B (2000): Stepwise development of thymic microenvironments in vivo is regulated by thymocyte subsets. *Development* 127, 1583-1591
- Venkataramani V, Küffer S, Cheung KCP, Jiang X, Trümper L, Wulf GG, Ströbel P (2018): CD31 Expression Determines Redox Status and Chemoresistance in Human Angiosarcomas. *Clin Cancer Res* 24, 460-473
- Walters J, Pop C, Scott FL, Drag M, Swartz P, Mattos C, Salvesen GS, Clark AC (2009): A constitutively active and uninhibitable caspase-3 zymogen efficiently induces apoptosis. *Biochem J* 424, 335-345
- 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 G, Lu X, Dey P, Deng P, Wu CC, Jiang S, Fang Z, Zhao K, Konaparthi R, Hua S, et al. (2016): Targeting YAP-Dependent MDSC Infiltration Impairs Tumor Progression. *Cancer Discov* 6, 80-95
- Wang W, Xiao ZD, Li X, Aziz KE, Gan B, Johnson RL, Chen J (2015): AMPK modulates Hippo pathway activity to regulate energy homeostasis. *Nat Cell Biol* 17, 490-499
- Watt FM (2002): Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *EMBO J* 21, 3919-3926
- Wolf BB, Schuler M, Echeverri F, Green DR (1999): Caspase-3 is the primary activator of apoptotic DNA fragmentation via DNA fragmentation factor-45/inhibitor of caspase-activated DNase inactivation. *J Biol Chem* 274, 30651-30656
- Yosefzon Y, Soteriou D, Feldman A, Kostic L, Koren E, Brown S, Ankawa R, Sedov E, Glaser F, Fuchs Y (2018): Caspase-3 Regulates YAP-Dependent Cell Proliferation and Organ Size. *Mol Cell* 70, 573-587 e574
- Yu FX, Zhao B, Guan KL (2015): Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer. *Cell* 163, 811-828
- Zanconato F, Forcato M, Battilana G, Azzolin L, Quaranta E, Bodega B, Rosato A, Bicciato S, Cordenonsi M, Piccolo S (2015): Genome-wide association between YAP/TAZ/TEAD and AP-1 at enhancers drives oncogenic growth. *Nat Cell Biol* 17, 1218-1227
- Zanconato F, Cordenonsi M, Piccolo S (2016): YAP/TAZ at the Roots of Cancer. *Cancer Cell* 29, 783-803
- Zhang N, Bai H, David KK, Dong J, Zheng Y, Cai J, Giovannini M, Liu P, Anders RA, Pan D (2010): The Merlin/NF2 tumor suppressor functions through the YAP oncoprotein to regulate tissue homeostasis in mammals. *Dev Cell* 19, 27-38
- Zhao B, Wei X, Li W, Udan RS, Yang Q, Kim J, Xie J, Ikenoue T, Yu J, Li L, et al. (2007): Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev* 21, 2747-2761

- Zhao B, Ye X, Yu J, Li L, Li W, Li S, Yu J, Lin JD, Wang CY, Chinnaiyan AM, et al. (2008): TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes Dev* 22, 1962-1971
- Zhao B, Li L, Lu Q, Wang LH, Liu CY, Lei Q, Guan KL (2011): Angiomotin is a novel Hippo pathway component that inhibits YAP oncoprotein. *Genes Dev* 25, 51-63
- Zhao B, Li L, Wang L, Wang CY, Yu J, Guan KL (2012): Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis. *Genes Dev* 26, 54-68
- Zhou M, Liu X, Li Z, Huang Q, Li F, Li CY (2018): Caspase-3 regulates the migration, invasion and metastasis of colon cancer cells. *Int J Cancer* 143, 921-930



## Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Philipp Ströbel bedanken, der mir die Möglichkeit gab, an seinem Institut zu promovieren und der den gesamten Prozess unterstützend begleitete. Insbesondere möchte ich mich auch für die niederschwellige Kontaktierbarkeit und schnellen Antworten auf Fragen aller Art sowie die Validierung des Immunreaktivitäts-*Scorings* durch ein erfahrenes Auge herzlich bedanken.

Weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Volker Ellenrieder für die Übernahme der Ko-Betreuung.

Großer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Vivek Venkataramani, der an mich und das Projekt glaubte und stets mit zahlreichen Ideen neue Denkanstöße gab und dazu beitrug in der immer detaillierteren Grundlagenforschung auch *prima vista* nicht verknüpfte Aspekte miteinander in Verbindung zu bringen.

Besonders möchte ich Herrn Dr. sc. hum. Stefan Küffer danken, der stets mit Rat und Tat besonnen und unterstützend zur Seite stand und vor allem bei methodologischen Fragen und der statistischen Auswertung wertvolle Beiträge liefern und seine große Erfahrung hinsichtlich der Thymus-Forschung einbringen konnte. Darüber hinaus möchte ich dem Team des Forschungslabors danken, das dafür sorgte, dass eine Forschung in adäquater Umgebung überhaupt möglich war.

Weiterer Dank richtet sich an Frau Dr. rer. nat. Denise Müller, die die 1889c-Zelllinie mit *CASP3*<sup>-/-</sup> erstellte und für die Untersuchungen in dieser Arbeit zur Verfügung stellte.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Gerald Wulff bedanken, in dessen Labor mir Frau Christina Kiecke, der ich zu besonderem Dank verpflichtet bin, in technischen Fragen immer wieder weiterhelfen konnte und mir mit wertvollen Erklärungen das Erlernen zahlreicher Methoden erleichterte.