

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

Überwindung der Chemoresistenz bei malignen Thymomen und Thymuskarzinomen

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Xenia Clementine Baronesse von Hahn

aus

Bremen

Göttingen 2021

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in Prof. Dr. med. P. Ströbel

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

Prüfungskommission

Referent/in Prof. Dr. med. P. Ströbel

Ko-Referent/in: Prof. Dr. med. Volker Ellenrieder

Drittreferent/in: Prof. Dr. hum. biol. Margarete Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 27.07.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Überwindung der Chemoresistenz bei malignen Thymomen und Thymuskarzinomen" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den
.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Der Thymus	1
1.2 Thymome und Thymuskarzinome.....	1
1.2.1 Epitheliale Tumoren des Thymus	1
1.2.2 Epidemiologie.....	2
1.2.3 Klassifikationen	2
1.2.4 Diagnostik	4
1.2.5 Therapie.....	4
1.2.6 Prognose.....	8
1.3 Cisplatin und Sunitinib.....	10
1.4 Mögliche Resistenz-Mechanismen	10
1.4.1 Cyclin B1	11
1.4.2 FoxM1.....	11
1.4.3 Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-1-Rezeptor (IGF-I-R)	12
1.4.4 TYRO3	12
1.5 Zielsetzung und Fragstellung	12
2 Material und Methoden	14
2.1 Material	14
2.1.1 Molekularbiologische Agenzien.....	14
2.1.2 Antikörper.....	16
2.1.3 siRNA	16
2.1.4 Plasmide.....	16
2.1.5 Puffer und Lösungen.....	17
2.1.6 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme.....	18
2.1.7 Gebrauchsmaterialien.....	19
2.1.8 Geräte.....	20
2.1.9 Software	21
2.2 Methoden	21
2.2.1 Zellen und Zellkultur.....	21
2.2.2 Zellen zählen.....	23
2.2.3 siRNA-Knockdown.....	23
2.2.4 Bestimmung der Zellviabilität mittels MTS-Assay.....	23
2.2.5 Western Blot.....	24

2.2.6	X-Gal Seneszenz-Färbung.....	25
2.2.7	Zellzyklus Assay	26
2.2.8	Plasmidvermehrung und Präparation	26
2.2.9	Konzentrationsbestimmung.....	27
2.2.10	Plasmid-Transfektion	27
2.2.11	Statistische Auswertung	27
3	Ergebnisse	29
3.1	Auswirkungen von FoxM1 und Cyclin B1 auf die Resistenzbildung gegenüber Cisplatin in 1889c-Zellen	29
3.1.1	Induktion der Cisplatin-Resistenz in 1889c-Zellen	29
3.1.2	Konzentrationen von Cyclin B1 und FoxM1 in 1889c-Zellen.....	30
3.1.3	Einfluss von FoxM1- und Cyclin B1-Knockdowns auf die Cisplatin-Resistenz	30
3.1.4	Seneszenzfärbung.....	32
3.1.5	Einfluss von Cisplatin auf den Zellzyklus.....	32
3.2	Veränderung der Resistenz von TAB-1 gegenüber Sunitinib unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen von TYRO3 und IGF-I-R.....	33
3.2.1	Induktion der Sunitinib-Resistenz in TAB-1-Zellen	33
3.2.2	Konzentrationen von TYRO3 und IGF-I-R in TAB-1-Zellen	34
3.2.3	Einfluss von TYRO3- und IGF-I-R-Knockdowns auf die Sunitinib-Resistenz.....	35
3.2.4	TYRO3- und IGF-I-R-Überexpression in TAB-1-Zellen.....	36
4	Diskussion	37
5	Zusammenfassung.....	42
6	Literaturverzeichnis	44

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Cisplatin-Behandlung parentaler und Cisplatin-resistenter 1889c-Zellen	29
Abbildung 2: FoxM1- und Cyclin B1-Spiegel in 1889c-Zelllinien.....	30
Abbildung 3: Einfluss von FoxM1- und Cyclin B1-Knockdowns auf die Zellviabilität.....	31
Abbildung 4: Seneszenzfärbung mit X-Gal	32
Abbildung 5: Zellzyklus-Assay.....	32
Abbildung 6: TAB-1-Zellen unter 5 μ M Sunitinib.....	34
Abbildung 7: TYRO3- und IGF-I-R-Spiegel in TAB-1-Zelllinien.....	34
Abbildung 8: siRNA-Knockdowns von TYRO3 und IGF-I-R in TAB-1-Zellen.....	35
Abbildung 9: Einfluss von TYRO3- und IGF-I-R-Knockdowns auf die Zellviabilität	35
Abbildung 10: Einfluss der TYRO3- und IGF-I-R-Überexpression auf die Zellviabilität	36

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Aktuelle Version der TNM-Klassifikation.....	3
Tabelle 2: Ansprechraten auf Kombinations-Chemotherapien mit Cisplatin	7
Tabelle 3: Ansprechraten auf Sunitinib als Zweitlinientherapie	7
Tabelle 4: Gesamtüberleben nach WHO-Klassifikation.....	8
Tabelle 5: Gesamtüberleben nach Masaoka-Stadien	9
Tabelle 6: Rezidivraten abhängig vom histologischen Typ nach der WHO-Klassifikation	9
Tabelle 7: Rezidivraten abhängig vom Masaoka-Stadium	10

Abkürzungsverzeichnis

ADOC	Adriamycin, Cisplatin, Vincristin und Cyclophosphamid
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i>
CAMP	Cisplatin, Doxorubicin und Methylprednisolon
Cis-R	Cisplatin-resistente 1889c-Zellen
CODE	Cisplatin, Vincristin, Doxorubicin und Etoposid
CR	Komplettes Ansprechen (<i>complete response</i>)
CSF1	<i>colony stimulating factor 1</i>
ctrl	Kontroll-siRNA (<i>control</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FLT3	<i>FMS-related tyrosine kinase 3</i>
FoxM1	<i>forkhead box M1</i>
IGF-I-R	<i>insulin-like growth factor 1 receptor</i>
KIT	<i>stem-cell growth factor receptor</i>
ko	siRNA-Knockdown
LB-Medium	<i>lysogeny-broth-Medium</i>
MPF	<i>maturation-promoting factor</i>
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-H-tetrazolium
OR	Gesamtansprechen (<i>overall response</i>)
PAC(P)	Cisplatin, Doxorubicin und Cyclophosphamid, ggf. Prednison
PAE	Cisplatin, Etoposid und Epidoxorubicin
par	Parentale Zelllinie
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PDGFR	<i>platelet derived growth factor receptor</i>
PR	Teilweises Ansprechen (<i>partial response</i>)
rcf	Relative Zentrifugationskraft (<i>relative centrifugal force</i>)
RET	<i>receptor for glial-derived neurotrophic factors</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
Sut-R	Sunitinib-resistente TAB-1-Zellen
TAM	TYRO3, Axl, MerTK
TYRO3	<i>tyrosine-protein kinase receptor</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)

1 Einleitung

1.1 Der Thymus

Der Thymus liegt zwischen dem Sternum und der Herzbasis im *Mediastinum superius*. Das Organ gliedert sich in Mark und Rinde und wird von bindegewebigen Septen durchzogen, die von der Kapsel ausgehen und den Thymus in mehrere Läppchen unterteilen. Als primär lymphatisches Organ spielt der Thymus eine wichtige Rolle bei der Reifung von T-Lymphozyten und deren immunologischer Prägung. Nach ihrer Entstehung im Knochenmark gelangen die Thymozyten als Vorstufen der T-Lymphozyten in den Thymus. Dort reifen sie während ihrer Wanderung von der Rinde ins Mark. Bei der Mehrzahl der Zellen wird durch zweierlei Mechanismen, nämlich die positive oder die negative Selektion, die Apoptose eingeleitet. Unter der positiven Selektion, die hauptsächlich in der Rinde stattfindet, versteht man das Aussortieren von Zellen, die mit zu geringer Affinität an die MHC-Komplexe der kortikalen Thymusepithelzellen binden. Bei der negativen Selektion im Mark werden diejenigen Thymozyten apoptotisch abgebaut, die körpereigene Peptide binden. Durch diese Selektionsprozesse werden Thymozyten aussortiert, die nicht funktionstüchtig sind oder den eigenen Körper angreifen würden. So verlassen nur etwa 2 % der Thymozyten als reife T-Lymphozyten den Thymus, die nun körpereigene von fremden Antigenen unterscheiden können und damit eine entscheidende Rolle im Immunsystem einnehmen. Während der Pubertät bildet sich der Thymus zurück, was als Involution bezeichnet wird. Dabei wird das Thymusgewebe nach und nach durch Fettgewebe ersetzt, wobei jedoch immer Reste des spezifischen Thymusgewebes erhalten bleiben (Pawlina 2019).

1.2 Thymome und Thymuskarzinome

1.2.1 Epitheliale Tumoren des Thymus

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) unterteilt die Tumore des Thymus in verschiedene Subgruppen. Dabei unterscheidet sie epitheliale Tumore von Keimzelltumoren, mediastinalen Lymphomen und mesenchymalen sowie hämatopoetischen Neoplasien. Das Thymom und das Thymuskarzinom sind Tumore, die vom epithelialen Gewebe des Thymus ausgehen (Travis et al. 2004; Ammann et al. 2013).

Der Begriff „malignes Thymom“ wird für Thymome in fortgeschrittenen Stadien, also lokal invasive Thymome mit pleuralen oder perikardialen Metastasen, aber auch für thymische Epitheltumoren mit ausgeprägter Atypie verwendet. Thymome weisen organspezifische Merkmale auf und kommen nicht in anderen Organen vor. Jedoch können sie aus heterotopem Thymusgewebe überall in Mediastinum, Pleura und Lunge entstehen. Thymuskarzinome

weisen hingegen kaum „organotypische“ Eigenschaften auf und unterscheiden sich nur wenig von homologen Tumoren in anderen Organen (z. B. Plattenepithelkarzinome der Lunge). Typisch für Thymuskarzinome ist ihr invasives Wachstum mit Ausbildung einer desmoplastischen Stromareaktion und ihre Befähigung zu Fernmetastasen auch in extra-thorakale Organe (den Bakker et al. 2014; Travis et al. 2015).

Da Thymome zunächst meist keine Symptome verursachen, sind sie oftmals Zufallsbefunde. Einige Patienten leiden jedoch unter lokalen Komplikationen, wie Schmerzen, einer oberen Einflusstauung, respiratorischer Insuffizienz oder Tachykardie. Aber auch systemische Symptome wie Fieber oder Gewichtsverlust können sich manifestieren. Zudem treten gehäuft Autoimmunkrankheiten auf. In diesem Zusammenhang ist insbesondere die Myasthenia gravis zu nennen, die vor allem mit Thymomen vom Typ AB, B2 und B3 assoziiert ist. Bei Thymuskarzinomen tritt die Myasthenie dagegen nicht auf (Travis et al. 2004; Ammann et al. 2013).

1.2.2 Epidemiologie

Tumore des Thymus sind sehr selten und machen weniger als 1 % der adulten Tumore aus. Die Inzidenz maligner Thymome liegt pro Jahr bei 0,15 pro 100.000 Einwohner (Engels und Pfeiffer 2003). Männer und Frauen sind dabei gleichermaßen betroffen. Thymome und Thymuskarzinome können in nahezu allen Altersklassen vorkommen, es besteht aber eine Häufung zwischen 55 und 65 Jahren (Travis et al. 2004).

1.2.3 Klassifikationen

Thymome bestehen aus epithelialen und lymphozytären Zellen in unterschiedlicher Zusammensetzung. Dabei sind die Epithelzellen die eigentlich neoplastischen Zellen (Ammann et al. 2013). Verschiedene Autoren und Gruppen haben unterschiedliche Klassifikationen von Thymustumoren vorgeschlagen. Inzwischen gilt aber die WHO-Klassifikation als internationaler Standard. Die Einteilung nach TNM (Wittekind 2017) hat die ältere Stadieneinteilung nach Masaoka-Koga teilweise abgelöst, obwohl in der Praxis weiterhin beide Klassifikationen nebeneinander verwendet werden.

Die WHO-Klassifikation in ihrer derzeit noch gültigen Fassung von 2015 unterteilt Thymome in sechs verschiedene histologische Typen. Diese Einteilung korreliert mit Invasivität, krankheitsfreiem Überleben und Rezidivraten (Nakagawa et al. 2003; Kondo et al. 2004). Thymome werden von der WHO in die Kategorien A, AB und B (B1, B2 und B3) gegliedert. Typ A Thymome sind durch spindelförmige oder ovale Zellen gekennzeichnet, wohingegen runde oder polygonale Zellen kennzeichnend sind für Typ B Thymome. Letztere werden aufgrund ihres Ausmaßes von lymphatischem Gewebe weiter in drei Subtypen unterteilt: B1 als lymphozytenreichster Typ, B2 und schließlich B3 als epithelzellenreichster Typ. Thymome, die Merkmale der Typen A und B innehaben, werden als Typ AB bezeichnet. Die Thymome A und AB verhalten sich wie benigne Tumore. Typ B1 ist niedriggradig maligne, der Typ B2

verhält sich dagegen bösartiger und fortgeschrittene Thymome vom Typ B3 haben eine ähnlich schlechte Prognose wie Thymuskarzinome (Travis et al. 2015).

Die Thymuskarzinome werden abhängig von ihrer Differenzierung weiter in Lymphoepitheliom-ähnliche Karzinome, Plattenepithel-, Basalzell- oder neuroendokrine Karzinome unterteilt. Im Gegensatz zu Thymomen weisen sie zytologische Malignitätskriterien auf (Travis et al. 2015).

Das Masaoka-Staging ist ein System zur klinischen Stadieneinteilung. Unterteilt werden die Thymome nach ihrer mikroskopischen und makroskopischen Ausdehnung in Tumorkapsel und umliegendes Gewebe. Im Stadium I ist der Tumor makroskopisch vollständig umkapselt und dringt mikroskopisch nicht in die Kapsel ein. Das Stadium II ist unterteilt in II.1, in dem der Tumor in das umliegende Fettgewebe oder die mediastinale Pleura eindringt, und in II.2, in dem makroskopisch eine Invasion in die Kapsel zu erkennen ist. Stadium III beschreibt das Eindringen des Tumors in benachbarte Organe, wie Perikard, große Blutgefäße oder in die Lunge. Das Stadium IVa bezeichnet perikardiale oder pleurale Absiedlungen und das Stadium IVb umfasst die hämatogene oder lymphogene Metastasierung (Masaoka et al. 1981; Masaoka 2010). Bei Diagnosestellung ist die lymphogene oder hämatogene Ausbreitung allerdings selten (Yamakawa et al. 1991).

In der neuesten Auflage der TNM Klassifikation maligner Tumore hielt auch eine Klassifikation für Thymustumore Einzug (Wittekind 2017). Diese Klassifikation teilt die Tumore nach Invasionstiefe (T), Lymphknotenmetastasen (N) und Fernmetastasen (M) ein.

Tabelle 1: Aktuelle Version der TNM-Klassifikation nach Wittekind (2017)

T – Primärtumor

TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Gekapselter Tumor oder Tumor mit Ausbreitung in das mediastinale Weichgewebe, kann die mediastinale Pleura beteiligen <ul style="list-style-type: none"> - T1a Keine Beteiligung der mediastinalen Pleura - T1b Direkte Invasion der mediastinalen Pleura
T2	Tumor mit direkter Beteiligung des Perikards (partielle oder vollständige Dicke)
T3	Tumor mit direkter Invasion einer der genannten Strukturen: Lunge(n), V. brachiocephalica, V. cava superior, N. phrenicus, Brustwand oder extraperikardiale Pulmonalarterie(n) oder Pulmonalvene(n)
T4	Tumor mit direkter Invasion einer der genannten Strukturen: Aorta (A. ascendens, Aortenbogen, A. descendens), Bogengefäße, intraperikardiale Pulmonalarterie, Myokard, Trachea oder Ösophagus

N – Regionale Lymphknoten

NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in anterioren (perithymischen) Lymphknoten
N2	Metastase(n) in tiefen intrathorakalen oder zervikalen Lymphknoten

M – Fernmetastasen

M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen <ul style="list-style-type: none"> - M1a Separate Pleura- oder Perikardmetastasen - M1b Fernmetastasen jenseits der Pleura oder des Perikards

1.2.4 Diagnostik

Wie oben beschrieben sind Thymome oftmals Zufallsbefunde. Der CT-Scan gilt als geeignetes Instrument der Diagnosestellung (Ruffini et al. 2011). Da das klinische Erscheinungsbild und die Bildgebung meist ein eindeutiges Bild formen, ist eine präoperative histologische Bestätigung der Diagnose bei Patienten mit Myasthenia gravis durch eine Biopsie nicht zwingend notwendig (Padda et al. 2016). Eine Biopsie wird daher nur dann durchgeführt, sobald die Läsion invasiv wächst oder falls vor einer Induktionstherapie bei Inoperabilität eine histologische Abklärung benötigt wird (Kurup und Loehrer 2004). Dies birgt allerdings die Sorge um transthorakale oder pleurale Aussaat, auch wenn diese in der Literatur bislang nicht begründet wird (Ruffini et al. 2011).

1.2.5 Therapie

Die optimale Therapie für Thymome und Thymuskarzinome ist schwer zu definieren, da aufgrund der kleinen Fallzahlen keine großen randomisierten Studien möglich sind. Behandlungsstrategien basieren größtenteils auf retrospektiven Studien (Ruffini et al. 2011).

Thymome zeigen im Allgemeinen ein langsam progredientes Verhalten, sind aber von Natur aus bösartig und sollten daher generell behandelt werden (Detterbeck 2010). Zur Verfügung stehen operative Entfernung des malignen Gewebes, Strahlentherapie und Chemotherapie. Entscheidend für die Therapiemodalität ist das Tumorstadium. Für Thymome in Stadium I ist die komplette chirurgische Entfernung ausreichend. Für Stadium II und III wird der Nutzen einer postoperativen Radiotherapie diskutiert und Thymome im Stadium IV werden nach der Operation mit einer Radiochemotherapie behandelt (Kondo und Monden 2003). Generell lässt sich jedoch sagen, dass ein multimodaler Ansatz sowohl bei Thymomen als auch bei

Thymuskarzinomen die besten Ergebnisse hinsichtlich des Überlebens zeigt (Berardi et al. 2014).

1.2.5.1 Chirurgische Resektion

Goldstandard der Therapie ist die komplette chirurgische Entfernung des Thymus sowie des ihn umgebenden Fettgewebes und ist insbesondere bei Stadium I und II Thymomen der Grundpfeiler der Therapie (Kondo und Monden 2003; Detterbeck 2010). Die Operation wird in der Regel durch eine mediane Sternotomie durchgeführt (Venuta et al. 2010). Auch angrenzende Strukturen wie Lunge, Perikard oder Zwerchfell können bei Beteiligung teilweise mit entfernt werden. Bei Beteiligung der großen Gefäßen und auch hinsichtlich der beiden Nervi phrenici gibt es allerdings Einschränkungen bei der Durchführbarkeit einer Totalresektion des Tumors (Ruffini et al. 2011). Das Langzeit- und das rezidivfreie Überleben weisen bei vollständiger Resektion von Stadium I und II Thymomen sehr gute Quoten auf (Detterbeck 2010).

Obwohl das Ziel eine komplette Resektion sein sollte, ist dies nicht immer möglich. Stadium I Tumore sind nahezu immer operativ entfernbar, auch die Rate an resezierbaren Stadium II Tumoren ist mit 87 % sehr hoch. Dagegen ist nur etwa die Hälfte aller Stadium III Thymome (49 %) und ein Viertel der Stadium IV Thymome (25 %) resezierbar. Doch auch eine Teilresektion soll einen, wenn auch kleinen, Vorteil im Überleben gegenüber nicht operierten Patienten bringen (Pearson und Patterson 2008).

1.2.5.2 Radiotherapie

Bis zu einem Drittel der Patienten mit Thymomen haben einen lokal infiltrierenden oder inoperablen Tumor, sodass neben der chirurgischen Therapie an andere Modalitäten gedacht werden muss (Loehrer et al. 1997).

Die ESMO-Guidelines (European Society for Medical Oncology) von 2015 fassen die bisherigen Erkenntnisse über die Anwendung und den Nutzen adjuvanter Radiotherapie zusammen. Darin wird beschrieben, dass die postoperative Strahlentherapie in den letzten Jahren tendenziell seltener eingesetzt wurde und eher bei Hochrisikofällen Anwendung findet. Eine postoperative Radiotherapie ist bei Masaoka-Koga Stadium I Thymomen nicht indiziert, da sich hier kein Nutzen im Outcome zeigte. Auch bei Stadium II Thymomen, die R0 reseziert wurden, wird eine Radiotherapie nicht empfohlen. Allerdings sollte eine adjuvante Radiotherapie im Fall von aggressiven histologischen Typen (Typ B2, B3) in Erwägung gezogen werden. In höheren Stadien (III/IVA) verbessert eine Radiotherapie das Gesamt- sowie das rezidivfreie Überleben. Bei Thymuskarzinomen im Stadium I ist eine Strahlentherapie optional, in Stadium II ist diese zu erwägen und in den Stadien III sowie IVA ist sie empfohlen. Ebenso wird eine adjuvante Radiotherapie bei inkompletter Resektion des Karzinoms empfohlen (Girard et al. 2015).

1.2.5.3 Chemotherapie

Thymome sind chemosensible Tumore (Pearson und Patterson 2008; Spaggiari et al. 2012). Die Chemotherapie kann in zwei Formen eingesetzt werden: neoadjuvante Chemotherapie bei Patienten mit primär inoperablen Erkrankungen (Masaoka Stadium III und IV) und anschließender Operation oder definitive Chemotherapie in Kombination mit Strahlentherapie bei metastasierten Erkrankungen (Spaggiari et al. 2012). Die neoadjuvante Chemotherapie kann bei nicht resezierbaren Tumoren eingesetzt werden mit der Hoffnung, anschließend den Tumor chirurgisch entfernen zu können. Im Anschluss wird eine adjuvante Radiotherapie für sinnvoll erachtet (Kurup und Loehrer 2004).

In dieser Therapiemodalität wird ein Ansatz der Kombinations-Chemotherapie verfolgt (Loehrer et al. 1997). Oftmals werden Cisplatin-basierte Therapien verwendet. Dabei kommen Kombinationen wie das PAC-Schema (Cisplatin, Adriamycin und Cyclophosphamid), das ADOC-Schema (Doxorubicin, Cisplatin, Cyclophosphamid und Vincristin) oder Cisplatin zusammen mit Etoposid zum Einsatz (Loehrer et al. 1994; Giaccone et al. 1996; Loehrer et al. 1997; Kurup und Loehrer 2004).

In Tabelle 2 sind die Ansprechraten auf unterschiedliche Kombinations-Chemotherapien mit Cisplatin aus verschiedenen Studien aufgeführt. Insgesamt sprechen gut 70 % der Patienten auf die Chemotherapie an, wobei meist weniger Patienten ein komplettes als ein partielles Ansprechen zeigen.

Für Patienten, die nicht auf die Platin-basierte Chemotherapie ansprechen, wird eine Zweitlinientherapie benötigt. Dies trifft für etwa 50 % der Patienten mit malignen Thymomen oder Thymuskarzinomen zu (Ströbel et al. 2010b). Allerdings gibt es hier noch keine Standardtherapie. Therapeutika wie Isofosfamid, Etoposid, Gemcitabin, Pemetrexed, Octreotid/Prednison oder Paclitaxel haben eine gewisse Antitumoraktivität gezeigt, zeigen jedoch in Bezug auf Ansprechrate und Überleben schlechte Ergebnisse (Cabezón-Gutiérrez et al. 2018). Eine weitere Therapiemöglichkeit stellt Sunitinib dar. Bisher sind nur wenige Studien zu Ansprechraten und Überleben veröffentlicht, jedoch scheint Sunitinib eine der besseren Optionen zu sein, insbesondere bei metastasiertem Thymuskarzinom (Ströbel et al. 2010a; Thomas et al. 2015; Cabezón-Gutiérrez et al. 2018). Tabelle 3 zeigt ein Ansprechen von 31 % auf Sunitinib als Zweitlinientherapie nach erfolgloser Behandlung mit Platin-basierter Ersttherapie.

Tabelle 2: Ansprechraten auf Kombinations-Chemotherapien mit Cisplatin

Studie	Therapie	OR (%)	CR/PR	Stadium	Patientenzahl
(Berruti et al. 1999)	ADOC	81	1/12	III/ IVa	16
(Fornasiero et al. 1991)	ADOC	92	16/18	III/ IV	37
(Koizumi et al. 2002)	ADOC	75	0/6	NR**	8
(Rea et al. 2004)	ADOC	100	9/23	III/ IVa	32
(Yokoi et al. 2007)	CAMP	93	1/12	III/ IV	14
(Kunitoh et al. 2009)	CODE	59	0/16	IVa/IVb	27
(Kunitoh et al. 2010)	CODE	62	0/13	III	21
(Yoh et al. 2003)	CODE	42	0/5	III/ IV**	12
(Loehrer et al. 1994)	PAC	50	3/12	III/ IV*	30
(Loehrer et al. 1997)	PAC	70	5/11	III*	23
(Shin et al. 1998)	PACP	92	3/8	III/ IVa	12
(Kim et al. 2004)	PACP	77	3/14	III/ IV	22
(Lucchi et al. 2006)	PAE	73	2/20	III/ IVa	30
(Giaccone et al. 1996)	PE	60	5/4	III/ IV	15
Mittelwert		73			

ADOC: Adriamycin, Cisplatin, Vincristin, Cyclophosphamid; CAMP: Cisplatin, Doxorubicin, Methylprednisolon; CODE: Cisplatin, Vincristin, Doxorubicin, Etoposid; PAC(P): Cisplatin, Doxorubicin, Cyclophosphamid, (Prednison); PAE: Cisplatin, Etoposid, Epidoxorubicin; CR: komplettes Ansprechen (*complete response*); PR: teilweises Ansprechen (*partial response*); OR: Gesamtansprechen (*overall response*); Stadium: nach Masaoka; *: inklusive Thymuskarzinom; **: nur Thymuskarzinom

Tabelle 3: Ansprechraten auf Sunitinib als Zweitlinientherapie

Studie	Tumor	OR (%)	CR/PR	Patientenzahl
(Thomas et al. 2015)	Thymom	6,3	0/1	16
(Thomas et al. 2015)	Thymuskarzinom	26,1	0/6	23
(Remon et al. 2016)	Thymom	28,6	0/2	7
(Remon et al. 2016)	Thymuskarzinom	20	0/4	20
(Ströbel et al. 2010a)	Thymuskarzinom	75	0/3	4
Mittelwert		31		

1.2.6 Prognose

Das Langzeitüberleben von Thymomen und Thymuskarzinomen hängt stark vom histologischen Typ nach der WHO, dem Stadium nach Masaoka und der Resektabilität ab (Kondo und Monden 2003; Ströbel et al. 2004; Suk Park et al. 2004). Außerdem spielen Faktoren wie das Alter und das Vorhandensein von Myasthenia gravis eine Rolle (Suk Park et al. 2004). Thymuskarzinome haben eine sehr viel schlechtere Prognose als Thymome, da sie im Gegensatz zu den meist eher langsam wachsenden Thymomen ein sehr viel aggressiveres Verhalten aufweisen (Kondo und Monden 2003; Zucali et al. 2010).

Hinzu kommen die relativ hohen Rezidivraten. Insbesondere Thymuskarzinome und Stadium III und IV Thymome haben dahingehend eine schlechte Prognose.

Tabelle 4: Gesamtüberleben nach WHO-Klassifikation

Studie	5-Jahres-Überlebensrate (%)						10-Jahres-Überlebensrate (%)					
	A	AB	B1	B2	B3	Ca	A	AB	B1	B2	B3	Ca
(Kondo et al. 2004)	NR	NR	NR	NR	NR	NR	100	100	94	94	92	58
(Suk Park et al. 2004)	100	93,2	88,9	82,4	71,3	22,7	NR	NR	NR	NR	NR	NR
(Rea et al. 2004)	NR	NR	NR	NR	NR	NR	100	90	78	33	35	0
(Rena et al. 2005)	100	100	100	100	65	NR	100	100	94	77	NR	NR
(Yin et al. 2009)	100	100	93	83	43	0	100	100	81	70	33	0
(Kondo und Monden 2003)	NR	NR	NR	NR	NR	50,5	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Mittelwert	100	98	94	89	60	24,4	100	98	87	67	53	19

5- und 10-Jahres-Überlebensraten in %; Ca, Karzinom; NR, keine Angaben (*not reported*)

Tabelle 5: Gesamtüberleben nach Masaoka-Stadien

Studie	5-Jahres-Überlebensrate (%)				10-Jahres-Überlebensrate (%)			
	I	II	III	IVa/IVb (IV)	I	II	III	IVa/IVb (IV)
(Kondo und Monden 2003)	100	98,4	88,7	70,6/52,8	NR	NR	NR	NR
(Kondo et al. 2004)	100	100	68,8	(57,2)	NR	NR	NR	NR
(Rea et al. 2004)	93	93	60	36/NR	84	82	51	0/NR
(Rena et al. 2005)	100	100	100	NR	100	100	85	NR
(Suk Park et al. 2004)	100	88,2	63	22,5/17,2	NR	NR	NR	NR
(Yin et al. 2009)	100	77	54	0/NR	100	70	27	0/NR
Mittelwert	99	93	72	32/35	95	84	54	0/NR

Tabelle 6: Rezidivraten abhängig vom histologischen Typ nach der WHO-Klassifikation

Studie	Rezidivrate (%)					
	A	AB	B1	B2	B3	Ca
(Kondo und Monden 2003)	NR	NR	NR	NR	NR	51
(Kondo et al. 2004)	0	0	15	0	36	47
(Rena et al. 2005)	0	4,4	10	18	40	NR
(Suk Park et al. 2004)	0	15,4	7,7	12,5	13	31,3
(Wright et al. 2005)	0	0	7,4	8,3	27,4	50
Mittelwert	0	5	10	10	29	45

Tabelle 7: Rezidivraten abhängig vom Masaoka-Stadium

Studie	Rezidivrate (%)			
	I	II	III	IVa/IVb (IV)
(Kondo und Monden 2003)	0,9	4,1	8,4	(34,3)
(Kondo et al. 2004)	2,8	7,7	50	(50)
(Rena et al. 2005)	19	7,4	28	40/NR
(Wright et al. 2005)	0	1,7	31,1	(45,4)
Mittelwert	6	5	29	40/NR (43)

1.3 Cisplatin und Sunitinib

Als eines der am weitesten verbreiteten Medikamente der Krebstherapie wird Cisplatin neben der Behandlung von Thymomen und Thymuskarzinomen unter anderem auch bei Lungen-, Ovarial-, Brust- und Nierenkarzinomen eingesetzt. Cisplatin, auch *cis*-Diammindichloridoplatin(II) oder *cis*-DDP genannt, ist eine metallische Verbindung mit einer quadratischen planaren Form. Sobald das Cisplatin in die Zelle gelangt, wird es aktiviert, indem im Zytoplasma die Chloridliganden am Cisplatin durch Wasser ersetzt werden. Das Produkt wirkt stark elektrophil und reagiert daher mit den Stickstoffatomen an Nukleinsäuren. Cisplatin bindet an das N7-reaktive Zentrum von Purinbasen wie Guanin und Adenosin. Dies führt zu interstrang und intrastrang Addukten und schädigt somit die Desoxyribonukleinsäure (DNA), kann Zellteilung blockieren und zu Apoptose führen (Siddik 2003; Dasari und Tchounwou 2014).

Sunitinib (Sutent, Pfizer) ist ein Multitarget-Tyrosinkinase-Inhibitor, welcher intrazellulär Rezeptorbindungsstellen verschiedener Tyrosinkinasen blockiert und somit antiangiogen und antitumoral wirkt. Unter die inhibierten Tyrosinkinasen fallen die *vascular endothelial growth factors 1-3* (VEGF 1-3), *platelet derived growth factor receptor α* und *β* (PDGFR α und PDGFR β), *stem-cell growth factor receptor* (KIT), *FMS-related tyrosine kinase 3* (FLT3), *receptor for glial-derived neurotrophic factors* (RET) und *colony stimulating factor 1* (CSF1) (Faivre et al. 2007).

1.4 Mögliche Resistenz-Mechanismen

In den letzten Jahren gab es vermehrte Versuche, die Mechanismen für Aggressivität und Chemoresistenz von Thymomen und Thymuskarzinom auf molekularbiologischer Ebene zu analysieren. Ströbel et al. (2010a) untersuchten zum Beispiel malignes Thymusgewebe mittels Phospho-Protein-Arrays auf die Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs). Dabei fiel auf, dass unter anderem der Protein-Tyrosinkinase-Rezeptor TYRO3 (*tyrosine-protein kinase receptor*) und der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor-1-Rezeptor (*insulin-like growth factor 1 recep-*

tor, kurz IGF-I-R) in Sunitinib-sensiblen Gewebe stark aktiviert waren (Ströbel et al. 2010a). In einer anderen Studie zeigte sich eine hohe Expression von IGF-I-R insbesondere in Thymuskarzinomen (Girard et al. 2010). Weitere Beobachtungen zeigten eine Überexpression von Cyclin B1 in Tumorzellen des Thymus von Mäusen mit einer Tendenz zur Metastasierung (Vella et al. 2009).

1.4.1 Cyclin B1

Cyclin B1 wird von dem Gen CCNB1 kodiert. Als Regulatorprotein steuert Cyclin B1 den Prozess der Mitose. Es kontrolliert den korrekten Ablauf der G2/M-Übergangsphase und ist damit für die Zellproliferation wichtig. Hierfür geht Cyclin B1 eine Bindung mit p34(cdc2) ein und bildet so den *maturation-promoting factor* (MPF). Der Komplex sorgt für die Chromosomenkondensation, die Auflösung der Kernmembran und die Bildung der mitotischen Spindel (Soria et al. 2000). Die Konzentration von Cyclin B1 variiert während des Zellzyklus. So wird es zwar in allen Phasen gebildet, akkumuliert jedoch wesentlich in der G2-Phase. Dagegen ist der Spiegel von p34(cdc2) während des Zellzyklus konstant (Pines und Hunter 1989).

Die Konzentration von Cyclin B1 ist häufig in Krebszellen in deutlichem Maße erhöht (Kawamoto et al. 1997). Eine starke Expression von Cyclin B1 wirkt zum Beispiel bei Darmkrebs onkogen (Fang et al. 2014).

1.4.2 FoxM1

Forkhead box M1 (FoxM1) gehört zu der *forkhead*-Familie der Transkriptionsfaktoren. Die Gruppe der *forkhead*- oder *winged-helix*-Proteine umfasst eine große Anzahl von Transkriptionsfaktoren, die durch ihre DNA-Bindungsdomäne charakterisiert sind (Korver et al. 1997). FoxM1 wird in der Literatur unter verschiedenen Namen aufgeführt: Trident (in Mäusen), WIN oder INS-1 (in Ratten), HFH-11, MPP-2 oder FKHL-16 (Yao et al. 1997; Laoukili et al. 2007; Koo et al. 2012; Zona et al. 2014). Der Einfachheit halber wird im Folgenden nur von FoxM1 gesprochen.

In Experimenten mit Ratten zeigte sich, dass FoxM1 ubiquitär im sich entwickelnden Embryo exprimiert wird. In adulten Zellen ist es dagegen limitiert, besonders hoch sind die Werte jedoch in Hoden- und Thymusgewebe (Korver et al. 1997; Yao et al. 1997). FoxM1 wird nur in proliferierenden, nicht aber in ruhenden Zellen exprimiert. In Experimenten mit Rattenzellen zeigte sich ein Ansteigen des FoxM1-mRNA-Spiegels zeitgleich mit dem Beginn der S-Phase (Korver et al. 1997). Weitere Untersuchungen zeigten Spitzenwerte von FoxM1 in der G2/M-Phase. In dieser Phase geht FoxM1 mit dem sogenannten MUVB-Komplex eine Bindung ein und induziert die Expression von Cyclin B1 (Otto und Sicinski 2017). Damit spielt FoxM1 eine wichtige Rolle in der Regulierung des Zellzyklus (Leung et al. 2001).

Darüber hinaus wurde eine erhöhte Konzentration von FoxM1 in einigen Karzinomzelllinien entdeckt (Korver et al. 1997). So ist bekannt, dass das Proteinlevel auch beim Menschen in Leber-, Lungen-, Prostata-, Cervix-, Kolon-, Hirn- und Brustkrebs erhöht ist (Kalinichenko et

al. 2004; Pilarsky et al. 2004; Douard et al. 2006; Kim et al. 2006; Liu et al. 2006; Chan et al. 2008). Dabei zeigen Brustkrebszellen mit einer erhöhten FoxM1-Expression eine Cisplatin-Resistenz (Kwok et al. 2010).

1.4.3 Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-1-Rezeptor (IGF-I-R)

Zwei Subtypen der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor-Rezeptoren sind bekannt. Der Typ 1-Rezeptor ähnelt, wie der Name schon sagt, dem Insulin-Rezeptor. Der IGF-I-R ist ein Tetramer, bestehend aus jeweils zwei α - und β -Untereinheiten, die über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Die α -Untereinheiten sind extrazellulär angeordnet und binden Hormone wie IGF-I, aber auch IGF-II und mit etwas schwächerer Affinität Insulin. Die Bindung des Substrats an den Rezeptor führt zur Autophosphorylierung der transmembranen β -Untereinheiten, die über eine intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität verfügen und unter anderem den Phosphoinositid-3-Kinase- (PI3-Kinase) oder den *Mitogen-activated protein-kinase*-Signalweg (MAP-Kinase) aktivieren (Rechler und Nissley 1985; Stewart und Rotwein 1996). Diese Kaskaden induzieren Proliferation, Differenzierung und Überleben der Zellen (Stewart und Rotwein 1996; Hakuno und Takahashi 2018). Dysregulationen im Signalweg der Insulin-ähnlichen Rezeptoren und deren Substrate führen zu Wachstumsstörungen und altersbedingten Erkrankungen, darunter auch Krebs (Hakuno und Takahashi 2018).

1.4.4 TYRO3

TYRO3 gehört zur TAM-Familie (TYRO3, Axl, MerTK) der RTK (Vouri und Hafizi 2017). Verschiedene Namen werden für diesen Rezeptor verwendet: Brt, Dtk, Etk 2, Rse, Sky und Tif (Crosier und Crosier 1997). Im Folgenden wird der Name TYRO3 benutzt.

Bei Aktivierung des TYRO3-Rezeptors werden verschiedene Signalwege aktiviert, die schließlich in Zellwachstum, Zellproliferation, Migration, Immunsuppression, Zelltransformation und Anti-Apoptose münden (Hsu et al. 2019). Obwohl es sich bei den TAMs nicht um starke Onkogene handelt, ist bekannt, dass ihre Überexpression zur Entwicklung von Resistenzen sowohl gegen klassische Chemotherapie als auch gegen zielgerichtete Therapie (*targeted therapy*) bei soliden Tumoren beiträgt (Chien et al. 2016; Vouri und Hafizi 2017).

1.5 Zielsetzung und Fragstellung

Die Behandlung von malignen Thymomen und Thymuskarzinomen stellt oftmals eine Herausforderung dar. Das Ansprechen auf eine Cisplatin-basierte Erstlinientherapie ist mit etwa 70 % relativ hoch. Bei Therapie-Versagen mit Cisplatin gilt Sunitinib als mögliche Zweitlinientherapie, jedoch reagieren auch hier längst nicht alle epithelialen Thymustumoren sensibel. Daher stellt sich die Frage, welche molekularen Mechanismen auf zellulärer Ebene zu einer Resistenz führen.

In dieser Arbeit wurden Proteine untersucht, die bereits für Tumorprogression und Resistenzentwicklung in anderen Tumorentitäten bekannt sind oder deren unterschiedlich starke Expression bereits bei Thymomen und Thymuskarzinomen beobachtet wurde. Spielt eine erhöhte oder verminderte Proteinexpression bei der Resistenz in Thymustumoren eine Rolle und können diese Proteine als Marker für eine personalisierte Therapie verwendet werden? Um die Auswirkungen von FoxM1, Cyclin B1, IGF-I-R und TYRO3 besser zu verstehen, wurden in zwei Zelllinien Resistenzen gegen Cisplatin bzw. Sunitinib induziert. Anschließend wurden die genannten Proteine per siRNA-Knockdown (*small interfering ribonucleid acid*) oder Vektor basierter transientser Expression reduziert bzw. hochreguliert. Nachfolgend wurden zur Bestätigung der verschiedenen Proteinkonzentrationen in den Zelllinien Western Blots gefertigt. Schließlich wurde per MTS-Assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-H-tetrazolium) die Zellviabilität der verschiedenen Zellreihen unter steigenden Konzentrationen Cisplatin oder Sunitinib gemessen.

Ziel der Untersuchung war es, die genannten Proteine auf ihre Rolle in der Resistenzentwicklung von Thymomen und Thymuskarzinomen zu untersuchen und sie ggf. als Marker für eine personalisierte Therapie zu bestätigen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Molekularbiologische Agenzien

Material	Hersteller
2x Lämmli Sample Puffer	Bio Rad, Hercules, USA
4x Lämmli Sample Puffer	Bio Rad, Hercules, USA
AllStar Neg. Control siRNA (20 nmol)	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>Aqua destillata</i> (Aqua dest.)	Universitätsmedizin Göttingen, Deutschland
Cisplatin NeoCorp® 1 mg/ml	Hexal AG, Holzkirchen, Deutschland
CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagent	Promega Corporation, Madison, USA
Complete EDTA (1 Tablette gelöst in 2 ml H ₂ O)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
DC Protein Assay Reagent A	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
DC Protein Assay Reagent B	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
DC Protein Assay Reagent S	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Honeywell, Morris Plains, USA
Eisessig (100 %)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol 99 %	Chemsolute®, Renningen, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA
Formaldehydlösung 4 %	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
HiPerFect Transfection Reagent	Qiagen, Hilden, Deutschland
Igepal CA-630	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin 200 mM	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA
LB-Medium (<i>lysogeny-broth</i> -Medium) (Luria/ Miller)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Material	Hersteller
Magermilchpulver, Blotting grade	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdeoxycholat	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Natriumdihydrogenphosphat Na ₂ HPO ₄	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumorthovandate	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder, 10 – 250 kDa	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
Penicillin-Streptomycin 10,000 U/ml	Gibco by Life Technologies, Carlsbad, USA
Phenylmethanesulfonyl fluoride solution (PMSF)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>Phosphate buffered saline</i> , kurz PBS) Dulbecco	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Propidium Iodide (PI)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Ponceau S (C.I. 27195)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Puregene® Core Kit A	Qiagen, Hilden, Deutschland
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Re-Blot Strong Solution (10x)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
RPMI-Medium 1640	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA
Sunitinib Malate	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
TGS (10x)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Trans-Blot Turbo 5x Transferpuffer	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Tris Pufferan®	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris-Hydrochlorid Pufferan®	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA 0,05 %	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Tween 20	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Western Lightning Plus ECL	PerkinElmer Inc., Waltham, USA
X-Gal	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
X-tremeGENE HP DNA	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

2.1.2 Antikörper

2.1.2.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Isotyp	Hersteller
Cyclin B1 (D5C10)	1:1000	Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
FoxM1 (D12D5)	1:1000	Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
IGF-I Receptor	1:1000	Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Monoclonal Anti- β -Aktin	1:1000	Maus IgG	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Tyro 3 (D38C6)	1:1000	Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology, Danvers, USA

2.1.2.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Polyclonal Kaninchen- anti- Maus IgG	1:1000	Dako, Glostrup, Dänemark
Polyclonal Ziege-anti - Kaninchen IgG	1:1000	Dako, Glostrup, Dänemark

2.1.3 siRNA

siRNA	Katalognummer	Hersteller
Cyclin B1	SR300627	Qiagen, Hilden, Deutschland
FoxM1	SR320176	Qiagen, Hilden, Deutschland
IGF-I-R	SR320617	Qiagen, Hilden, Deutschland
negativ Kontrolle	SR30004	Qiagen, Hilden, Deutschland
TYRO3	SR304986	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.1.4 Plasmide

Plasmide	Hersteller
IGF-I-R (NM_000875)	OriGene Technologies, Rockville, USA
TYRO3 (NM_006293)	OriGene Technologies, Rockville, USA

2.1.5 Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
Einfriermedium	RPMI Medium mit 10 % DMSO
70 % Ethanol	99 % Ethanol (7 ml) Aqua dest. (3 ml)
Kulturmedium	RPMI Medium 1640 FCS (10 %) Penicillin-Streptomycin (1 %) Glutamin (1 %)
10x TBS	NaCl (292,7 g/l) Tris (4,24 g/l) TrisHCL (26,0 g/l) 1 l Aqua dest.
TBS-T	1x TBS (1 l) Tween 20 (1 ml) 9 l Aqua dest.
1x Laemmli-Puffer	2x Laemmli Sample Buffer (500 µl) RIPA-Puffer (500 µl)
4x Laemmli-Puffer	900µl 4x Laemmli Sample Buffer 100 µl Mercapto Ethanol
Laufpuffer	10x TGS (100 ml) Aqua dest. (900 ml)
LB-Medium	LB-Medium (25 g) Aqua dest. (1 l)
5 % Magermilchpulver	Magermilchpulver (2,5 g) 1x TBS-T (50 ml)
Transferpuffer	5x Trans-Blot Turbo Transferpuffer (100ml) Aqua dest. (400 ml)
Ponceau-Puffer	Ponceau (0,5 g) Aqua dest. (495 ml) Eisessig 100 % (5 ml)

Puffer	Zusammensetzung
1 ml RIPA-Puffer	1x PBS pH 7,4 (1 l) Natriumdeoxycholat 0,5 % (5 g) Igepal Ca-630 (NP40) 1 % (10 ml)
RIPA-Lysepuffer	RIPA-Puffer (960 µl) 25 complete x EDTA (40 µl) PMSF (10 µl, 100 mM) Natriumorthovanadat (10 µl, 100 mM)
PBS	Na ₂ HPO ₄ (5,75 g) KH ₂ PO ₄ (1 g) NaCl (40 g) KCl (1 g) Aqua dest. (500 ml)
Transferpuffer	Transferpuffer (200 ml) Aqua dest. (600 ml) Ethanol (200 ml)
X-Gal-Lösung	X-Gal mit PBS in 1:25 Verdünnung

2.1.6 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Reaktionssystem	Hersteller
Muse™ Cell Cycle Assay Kit	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Muse™ Count & Viability Kit	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

2.1.7 **Gebrauchsmaterialien**

Material	Hersteller
Abgesetzter Roller	Bio Rad Laboratories, Hercules, USA
Combitips advanced (1 ml; 5 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Cryo Pure Röhrchen (1,8 ml)	Sarstedt AG & CO. KG, Nümbrecht, Deutschland
Elektrophorese-Gel (Mini-Protean TGX Precast Gels 4-15 %)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Händedesinfektionsmittel	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Handschuhe (Sempercare nitrile skin)	Semperit Technische Produkte GmbH, Wien, Österreich
Mikro-Schraubröhre 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Mikrotestplatte 96-Well	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Objektträger	Labortechnik Süsse, Gudensberg, Deutschland
Pasteurpipetten (Kalk-Soda-Glas; 230 mm)	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
Pipetten, serologisch (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen Biosphere Filter Tips (0,1 - 20 µl, 2 - 200 µl, 100 - 1000µl)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen Biosphere Quality Tips (0,1 - 20 µl, 2 - 200 µl, 100 - 1000 µl)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Standard-Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Trans-Blot Turbo Mini-size Transfer-Stacks	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Trans-Blot Turbo Mini-size Nitrocellulose Membran	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Waschlotion	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
Zellkulturflasche TC-Flasche (25 cm ² , 75 cm ²)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Zellkultur Microplatte, (6-Well, 12-Well, 96-Well) PS, Transp., Cellstar®, TC, Abdeckplatte mit Kondensationsringen, steril, einzeln verpackt	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Zentrifugenröhrchen, Cellstar® Centrifuge Tubes, 15 ml/ 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Zellschaber (25 cm)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland

2.1.8 Geräte

Geräte	Hersteller
BD FACSCanto II	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Brutschrank, Sanyo CO2 Incubator	Sanyo, Moriguchi, Präfektur Osaka, Japan
Elektrophorese-Kammer (Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Flockeneisbereiter AF80	Scotsman Industries, Illinois, USA
Fusion FX Vilber Lourmat Analysekamera	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Gefrierschrank (-20 °C) Liebherr Comfort	Liebherr, Biberach, Deutschland
Kamera Canon Eos 650D	Canon, Gießen, Deutschland
Kolbenhubpipetten (0,1-2,5 µl; 0,5-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kolbenhubpipetten (0,1-2,5 µl; 0,5-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl)	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Kühlschrank Sikafrost Comfort (+4 °C, -20 °C)	Siemens, München, Deutschland
LC-/AC-Waage LC 620s manual	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen im Breisgau, Deutschland
Mikroskop Zeiss Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mr. Frosty Gefrierbehälter	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Muse® Cell Analyzer	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NanoDrop™ 2000 Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Opiplex 780 Desktop PC	Dell, Texas, USA
peqSTAR Thermocycler	VWR International, Radnor, USA
Plattformschüttler Polymax 1040	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Power-Pac 200/300	Bio Rad, Hercules, USA
QIAxcel Advanced System	Qiagen, Hilden, Deutschland
VWR® Incubating Orbital Shaker	VWR International, Radnor, USA
Sicherheitswerkbank HeraSafe	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
SystekVX-100 Autoklav	Systec, Linden, Deutschland
Tecan Plate Reader Infinite M200pro	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge Eppendorf 5417R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Geräte	Hersteller
Zentrifuge Eppendorf 5430R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Eppendorf 5804	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Perfect Spin Mini	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

2.1.9 Software

Software	Hersteller
BD FACSDiva Software	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
GraphPad Prism 8	GraphPad Software, La Jolla, USA
Fusion	Vilber Lourmat, Collégien, Frankreich
i-control™	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Magellan™	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellen und Zellkultur

2.2.1.1 1889c

Die 1889c-Thymuskarzinomzellen entstammen einem undifferenzierten Thymuskarzinom im Masaoka Stadium III (Ehemann et al. 2008). Die Zellen wurden in 75 ml Kulturflaschen in RPMI Medium in Kultur genommen und verdünnt, wenn die Zellen konfluent waren. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 1,5 ml Trypsin für 3 Minuten bei 37 °C trypsinisiert. Anschließend wurde das Trypsin mit 4,5 ml Medium gestoppt und 3 ml der Zellsuspension in eine neue Kulturflasche gegeben.

Vor Beginn der Versuche zur Untersuchung der Bedeutung unterschiedlicher Proteinkonzentrationen von Cyclin B1 und FoxM1 in der 1889c-Zellreihe wurde eine Cisplatin-resistente Zelllinie der 1889c-Zellen kultiviert. Dazu wurde ein Teil der parentalen Zelllinie in eine neue Kulturflasche überführt und mit steigenden Konzentrationen Cisplatin behandelt, angefangen bei 0,15 µg/ml. Nach 72 h wurde das Medium gewechselt, die Zellen mit PBS gewaschen und dann wurde für die nächsten 72 h Cisplatin-freies Medium auf die Zellen gegeben, damit sie sich regenerieren konnten. Bei Konfluenz der Zellen wurden sie wie oben beschrieben

verdünnt. Die gleiche Konzentration Cisplatin wurde mindestens zweimal appliziert, bevor sie in Schritten von 0,05 µg/ml erhöht wurde. Ab der Konzentration von 0,5 µg/ml bis 1 µg/ml wurde die Konzentration um 0,1 µg/ml erhöht. Anschließend wurden die Zellen in Intervallen von 96 und 72 h abwechselnd mit Chemotherapie freiem Medium und 0,5 µg/ml Cisplatin behandelt. Vor Experimenten wurden die Zellen in Cisplatin freiem Medium inkubiert.

2.2.1.2 IU-TAB1

Die Zelllinie IU-TAB-1 stammt von einem Patienten mit Stadium II Thymom des Typs AB (Gökmen-Polar et al. 2012). Die Zellen wurden auf gleiche Weise in Kultur genommen wie die 1889c-Zellen (siehe 2.2.1.1).

Bei den IU-TAB1-Zellen wurde eine Resistenz gegen Sunitinib induziert. Dazu wurde ein Teil der Zellen auf 6-Well Platten ausgesät. Nach 1 h Inkubationszeit bei 37 °C wurden jeweils zwei Wells mit 0,1 µM, 0,5 µM und 1 µM Sunitinib behandelt. 72 h später wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 gesplittet, erneut auf 6-Well Platten ausgesät und 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Sunitinib Konzentration wurde jeweils auf 0,2 µM, 1 µM und 2 µM verdoppelt. Das wurde 72 h später wiederholt. Nach weiteren 72 h wurden die Zellen erneut gesplittet und mit doppelten Konzentrationen (0,4 µM, 2 µM und 4 µM) Sunitinib behandelt. Im nächsten Schritt wurden die Konzentrationen jeweils auf 1 µM, 3 µM und 4 µM erhöht. Nach 24 h wurden die Zellen in kleine Kulturflaschen (25 ml) überführt und mit gleichen Konzentrationen Sunitinib weiter behandelt. Nach 72 h wurde das Medium gewechselt. Sobald die Zellen konfluent waren, wurden sie in größere Zellkulturflaschen (75 cm²) überführt. Die Zellen unter 1 und 3 µM Sunitinib wurden 72 h später eingefroren (siehe 2.2.1.3), die Zellen unter 4 µM Sunitinib wurden dagegen mit 5 µM weiterbehandelt. Das Medium wurde spätestens nach 72 h gewechselt und die Zellen verdünnt. Mit den 5 µM Sunitinib resistenten Zellen wurden die weiteren Experimente durchgeführt. Die eingefrorenen Zellen dienten als Backup.

2.2.1.3 Zellen einfrieren

Um Zellen längerfristig zu lagern wurden diese bei -80 °C eingefroren. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsiniert und mit Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und dieses dann 5 Minuten bei 1200 rpm (Umdrehungen pro Minute) zentrifugiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt. Zu dem Pellet wurden dann 3 ml Einfriermedium gegeben. Nun wurden die Zellen in Kryoröhrchen überführt und diese im Mr. Frosty Gefrierbehälter bei -80 °C eingefroren.

2.2.1.4 Zellen auftauen

Die Zellen aus der -80 °C Gefriertruhe wurden mittels Handwärme aufgetaut, in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit 3-5 ml Medium resuspendiert. Dann wurden die Zellen für 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert und anschließend das Medium abgesaugt. Das Pellet wurde mit 3-5 ml neuem Medium resuspendiert, in eine Kulturflasche überführt und mit weiterem Medium auf 12-15 ml aufgefüllt. Wenn nach 24 h nur wenige Zellen adhärent waren, wurden etwa 400 µl Natriumpyruvat-Lösung zum Medium gegeben.

2.2.2 Zellen zählen

Die Zellen wurden trypsiniert und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Von der Zellsuspension wurden 20 µl zu 380 µl Muse Count&Viability in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und für 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) stehen gelassen. Anschließend wurde die Zellen mit Hilfe des Muse Cell Analyzer gezählt.

2.2.3 siRNA-Knockdown

Vor dem ersten Gebrauch der siRNA wurden 250 µl RNase-freies Wasser in das Gefäß der siRNA gegeben, um eine 20 µM Lösung zu erhalten.

Für die Versuche wurde zunächst ein Master-Mix hergestellt. Hierfür wurden für 100 µl Gesamtvolumen 12 µl HiPerFect, 2,4 µl siRNA und 85,6 µl FCS-freies RPMI-Medium vermischt und bei RT für mindestens 20 Minuten stehen gelassen. Erst danach wurde der Master-Mix in einem Verhältnis 1:23 zu den Zellen gegeben; das bedeutet, zu 2,3 ml Zellsuspension wurden 100 µl Master-Mix gegeben, um eine finale Konzentration von 20 nM siRNA zu erhalten. Anschließend wurden die Zellen auf 6-, 9- oder 96-Well-Platten ausgesät. Nach 24 h wurde das siRNA-Medium wieder entfernt. Im Anschluss konnten Versuche mit den Zellen gestartet werden. Der Knockdown wurde mithilfe eines Western Blots verifiziert (siehe 2.2.5).

2.2.4 Bestimmung der Zellviabilität mittels MTS-Assay

Der MTS-Test ist ein kolorimetrisches Verfahren und misst die metabolische Aktivität der Zellen. Die ursprünglich gelbe Tetrazoliumverbindung wird von vitalen Zellen zum violetten Formazan reduziert. Die metabolische Aktivität korreliert mit der Zellviabilität und kann daher als Test für die Zellviabilität herangezogen werden.

Die Zellen wurden zunächst trypsiniert, gezählt und auf 125.000 Zellen pro ml verdünnt. Danach wurden 96-Well-Platten vorbereitet, indem die außenliegenden Wells mit jeweils 200 µl PBS befüllt wurden. Anschließend konnten die Zellen mit einer Konzentration von 12.500 Zellen pro Well (also 100 µl der Zellsuspension) ausgesät werden. Für Versuche mit siRNA-Knockdowns wurde wie oben beschrieben der Master-Mix zu der Zellsuspension gegeben, bevor die Zellen ausgesät wurden.

Nach 24 h Inkubationszeit bei 37 °C wurde das Medium abgesaugt und durch verschiedene Konzentrationen Cisplatin (0, 0,1, 0,5, 1 und 2 µg/ml) bei den 1889c Zellen und Sunitinib (0, 1, 2,5, 5 und 10 µM) bei der TAB-1-Zelllinie ersetzt. Danach wurden die Platten für 48 h (TAB-1) oder 72 h (1889c) bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 20 µl CellTiter 96® A_{Q_{ueous}} One Solution Cell Proliferation Assay (MTS oder 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-H-tetrazolium)) in jedes Well gegeben. Die 96-Well-Platten wurden nun für 45-60 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend mit dem Tecan-Reader bei einer Wellenlänge von 490 nm ausgelesen.

Bei der Auswertung der Ergebnisse wurde zunächst jeder Wert durch den Mittelwert der unbehandelten Kontrollgruppe dividiert. So ist die relative Viabilität = 1 bei der Kontrollgruppe ohne Cisplatin- oder Sunitinib-Behandlung. Die relative Viabilität wurde auf Graphen oder Balkendiagrammen dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Zelllinien wurden mittels t-Test ermittelt.

2.2.5 Western Blot

2.2.5.1 Proteinisolierung

Für die Proteinisolierung wurden die Zellen aus den Kulturflaschen trypsinisiert, gezählt und auf 125.000/ml verdünnt. Anschließend wurden die Zellen auf 12-Well-Platten ausgesät (1,8 ml bei 1889c und 1,2 ml bei TAB-1) und für 24 h (bei siRNA Knockdown) oder 48 h (bei Überexpression) bei 37 °C inkubiert.

Dann wurde das Medium abgenommen und jeweils in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden mit 50 µl Trypsin vom Boden gelöst. Das Trypsin wurde mit dem zuvor gesammelten Medium gestoppt und anschließend wurde die Zellsuspension wieder in die Zentrifugenröhrchen pipettiert. Dann wurden die Zellen bei 1200 rpm für zwei Minuten zentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt und durch 1 ml PBS ersetzt. Danach wurden die Zellen gut resuspendiert, in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und erneut zentrifugiert. Danach wurde das PBS abgesaugt. Zu den Zellen wurden 37 µl RIPA-Lysepuffer (*Radioimmuno-precipitation assay buffer*) gegeben und diese dann 30 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen 30 Minuten lang bei 4 °C 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und wieder auf Eis, bzw. für dauerhaft Lagerung in die -80 °C Gefriertruhe gestellt.

2.2.5.2 Protein-Konzentrationsbestimmung mittels DC Protein Assay

Um genauere Ergebnisse zu erzielen, wurde die Messung in Triplets durchgeführt.

Zunächst wurden dreimal 2 µl des Proteinlysats auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Anschließend wurden jeweils 200 µl von Lösung A, 20 µl von Lösung B und 2 µl der Lösung S hinzugegeben. Nach 10 Minuten Inkubationszeit wurde die Absorption mit dem Tecan-Reader bei

einer Wellenlänge von 560 nm gemessen und dann die Proteinkonzentration mithilfe einer hinterlegten Standardkurve ermittelt.

2.2.5.3 Elektrophorese und Transfer

Für die Elektrophorese wurde zunächst das Mini Protean TGX Gel vorbereitet. Dazu wurde der Kamm vorsichtig entfernt und der grüne Abschluss entfernt. Danach wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt. Die Kammer wurde mit 0,5 l (für zwei Gele) oder 1 l (für vier Gele) Laufpuffer aufgefüllt. Die Taschen des Gels wurden gespült und mit dem Volumen für 15 µg Protein beladen. Die Tasche für den Marker wurde mit 3 µl *Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder* beladen. Zunächst 10 min bei 80 V gestartet, dann lief es bei 170 V für ungefähr 30 min weiter. Anschließend wurde das Gel vorsichtig aufgebrochen.

Für den Transfer wurde das Trans-Blot® Turbo™ Transfer System nach Herstellerangaben verwendet.

Im Anschluss wurde alles bis auf die Membran verworfen. Um zu überprüfen, ob die Proteine vom Gel auf die Membran übertragen wurden, wurde die Membran kurz mit Ponceau-Puffer angefärbt und anschließend mit Aqua dest. entfärbt. Danach wurde die Membran zum Blocken in 5 % Magermilch gegeben und für 30 - 60 min bei RT geschüttelt. Dann wurde die Milch verworfen und die Membran kurz mit 1x TBST gewaschen.

2.2.5.4 Antikörperbindung und Belichtung

Die Membran wurde in den Primärantikörper gegeben und über Nacht bei 4 °C geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal 15 min mit 1x TBST bei RT auf der Schüttelplatte gewaschen. Danach wurde der passende Sekundärantikörper auf die Membran gegeben und 1 h bei RT geschüttelt. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal mit 1x TBST gewaschen.

Für die Aufnahmen wurden 500 µl „Western Lightning Plus ECL“ im Verhältnis 1:1 angesetzt und mit einer Pipette auf der Membran verteilt. Nach 5 min wurde die Membran mit der Fusion Analysekamera fotografiert.

2.2.6 X-Gal Seneszenz-Färbung

In diesem Versuch wurden parentale und Cisplatin-resistente Zellen verglichen. Des Weiteren wurden HeLa-Zellen* als Kontrollgruppe verwendet. Die Zellen wurden mit einer Konzentration von 250.000 pro Well auf einer 6-Well Zellkulturplatte ausgesät und 24 h später mit 0,5 µM Cisplatin behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 72 h wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen für 10 Minuten mit 4 % Formalin fixiert und anschließend wieder mit PBS gewaschen. Schließlich wurde für 24 h die X-Gal-Lösung auf die Zellen gegeben und durch das Mikroskop Fotos von den Zellen gemacht.

*HeLa: humane Zervixkarzinomzelle, erworben vom Leibniz Institut DSMZ; wurden auf gleiche Weise in Kultur genommen, wie die 1889c

2.2.7 Zellzyklus Assay

Für die Zellzyklus-Untersuchung wurden Zellen mit einer Konzentration von 250.000 pro Well auf einer 6-Well Zellkulturplatte ausgesät. Pro Zelllinie wurden dabei zwei 6-Well-Platten benötigt. Jeweils eine Platte wurde mit Kontroll- und CCNB1-siRNA behandelt (siehe siRNA-Knockdown 2.2.3). Nach 24 h wurde das Medium entfernt, die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurde auf jeder Platte ein Triplet mit 0,5 μ M Cisplatin behandelt und in die übrigen drei Wells Chemotherapie-freies Medium gegeben. 48 h später wurde das Medium abgesaugt, die Zellen wurden mit PBS gewaschen, trypsinisiert und mit Medium gestoppt. Anschließend wurden die Zellen gezählt und 100.000 – 1.000.000 Zellen in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen gegeben. Nun wurden die Zellen 5 Minuten lang bei 300 rcf (relative Zentrifugationskraft) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, ohne das Pellet zu stören, und dann wurden die Zellen mit etwa 1 ml PBS resuspendiert. Danach wurde die Suspension erneut bei gleicher Geschwindigkeit 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Dabei verblieben etwa 50 μ l des PBS im Röhrchen. Die Zellen wurden dann mit dem vorhandenen PBS resuspendiert und tröpfchenweise in 1 ml eisgekühltes Ethanol gegeben. Dabei wurde das Röhrchen mit dem Ethanol leicht geschüttelt, sodass die Zellen einzeln fixiert werden konnten. Anschließend wurde die Zellsuspension für mindestens 3 h bei -20 °C inkubiert. Die fixierten Zellen bleiben bei -20 °C zwei bis drei Monate stabil.

200 μ l der fixierten Zellen wurden in ein Polystyrol Röhrchen gegeben und bei 300 rcf für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit etwa 0,5 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension erneut 5 Minuten bei 300 rcf zentrifugiert und der Überstand entfernt. Dann wurden 200 μ l des MuseTM Cell Cycle Reagent zu den Zellen gegeben, durchmischt und bei RT im Dunkeln für 30 Minuten inkubiert. Schließlich wurde die Zellsuspension in 1,5 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und mit dem Muse Cell Analyzer ausgewertet.

2.2.8 Plasmidvermehrung und Präparation

Für die Plasmidvermehrung wurde zunächst 1 μ l Plasmid zu 50 μ l Bakterien (*E.coli DH5a*) in ein Eppendorfgefäß gegeben und anschließend für 30 min auf Eis gestellt. Danach wurden die Bakterien für 30 s bei 42 °C geschockt, um anschließend für 2 min zurück auf Eis gestellt zu werden. Dann wurde das Eppendorfgefäß mit 1 ml LB-Medium) aufgefüllt und bei 37 °C für 1 h bei 400 rpm geschüttelt. Derweil wurde 50 ml LB-Medium in einen Erlenmeyerkolben gegeben und 100 μ g/ml Ampicillin hinzugefügt. Anschließend wurden die Bakterien in den Erlenmeyerkolben gegen und über Nacht bei 37 °C bei 220 rpm geschüttelt.

Für die Plasmidpräparation wurde das Reaktionskit Midi-Prep von Qiagen nach Herstellerangaben verwendet. Die über Nacht inkubierten Bakterien wurden in zwei Zentrifugenröhrchen überführt und bei 4000 rcf für 15 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgegossen und verworfen. Das Pellet wurde mit 4 ml Puffer P1 (Qiagen Plasmid Midi-Kit) resuspendiert. Anschließend wurden 4 ml von Puffer P2 (Qiagen Plasmid Midi-Kit) hinzu-

gegeben, durch mehrmaliges Wenden des Gefäßes gut vermengt und 5 min bei RT inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 4 ml von Puffer P3 hinzugegeben und wieder durch mehrmaliges Wenden vermengt. Anschließend wurde die Suspension für 15 min auf Eis gestellt und danach für 30 min bei 4 °C Highspeed zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und erneut 15 min lang bei 4 °C Highspeed zentrifugiert. Nachdem 4 ml QBT-Puffer (Qiagen Plasmid Midi-Kit) in eine Qiagen-Säule (Qiagen Plasmid Midi-Kit) gegeben wurden und der Puffer durchgelaufen war, wurde der Überstand aus dem zentrifugierten Röhrchen in die Qiagen-Säule gegeben. Auch hier musste zunächst die Flüssigkeit abfließen. Anschließend wurde die Säule zweimal mit QC-Puffer (Qiagen Plasmid Midi-Kit) gewaschen, indem der Puffer langsam abfloss. Danach wurde die DNA mit 5 ml QF-Puffer (Qiagen Plasmid Midi-Kit) aus der Qiagen-Säule in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Im nächsten Schritt wurde die DNA ausgefällt, indem 3,5 ml Isopropanol hinzugegeben, gut vermengt und bei 15.000 rcf für 30 min bei 4 °C zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde abgossen. 1,5 ml 70 % Ethanol wurden zum Pellet gegeben und diese gut resuspendiert. Das DNA-Ethanol-Gemisch wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt und für 10 min bei 4 °C bei 15.000 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet etwa 10 min stehen gelassen, um an der Luft zu trocknen. Anschließend wurden 40 µl *Aqua dest.* hinzugegeben.

Vor der Konzentrationsbestimmung wurde die DNA entweder für 1 h bei 65 °C erhitzt oder über Nacht bei 4 °C gelagert.

Für die langfristige Lagerung wurde die DNA bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.9 Konzentrationsbestimmung

Für die Konzentrationsbestimmung der DNA wurde das NanoDrop™ 2000 Spektralphotometer mit zugehöriger Software laut Herstellerangaben verwendet.

2.2.10 Plasmid-Transfektion

Für die Transfektion der präparierten DNA in die Zellen wurde zunächst ein Transfektionsreagenz hergestellt. Dazu wurden 100 µl FCS-freies Medium mit 1 µg DNA gut vermengt. Anschließend wurde 1 µl X-tremeGENE HP DNA Transfektionsreagenz hinzugegeben. Das Transfektionsreagenz wurde bei -20 °C gelagert und zunächst für 20 Minuten bei RT stehen gelassen. Erst danach wurde das Transfektionsreagenz in einem Verhältnis 1:23 zu den Zellen gegeben. In diesem Fall wurden 2,3 ml Zellsuspension 100 µl Transfektionsreagenz zugeführt. Die Zellen wurden mit einer Konzentration von 125.000/ml auf 6- oder 96-Well-Platten ausgesät.

2.2.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurden mit Hilfe der Software GraphPad Prism 8 vorgenommen. Um signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen zu ermitteln, wurde der

t-Test verwendet. Eine Signifikanz wurde ab $p \leq 0,05$ angenommen. Im Folgenden werden signifikante Unterschiede mit * gekennzeichnet. Dabei ist $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,005$ (**), $p \leq 0,0005$ (***) usw.

3 Ergebnisse

3.1 Auswirkungen von FoxM1 und Cyclin B1 auf die Resistenzbildung gegenüber Cisplatin in 1889c-Zellen

3.1.1 Induktion der Cisplatin-Resistenz in 1889c-Zellen

Um eine Cisplatin-resistente Zelllinie zu induzieren wurden parentale 1889c-Zellen mit steigenden Konzentrationen Cisplatin behandelt, bis eine Konzentration von 1 μM Cisplatin erreicht wurde (siehe 2.2.1.1). Die Resistenz wurde mittels MTS-Tests überprüft.

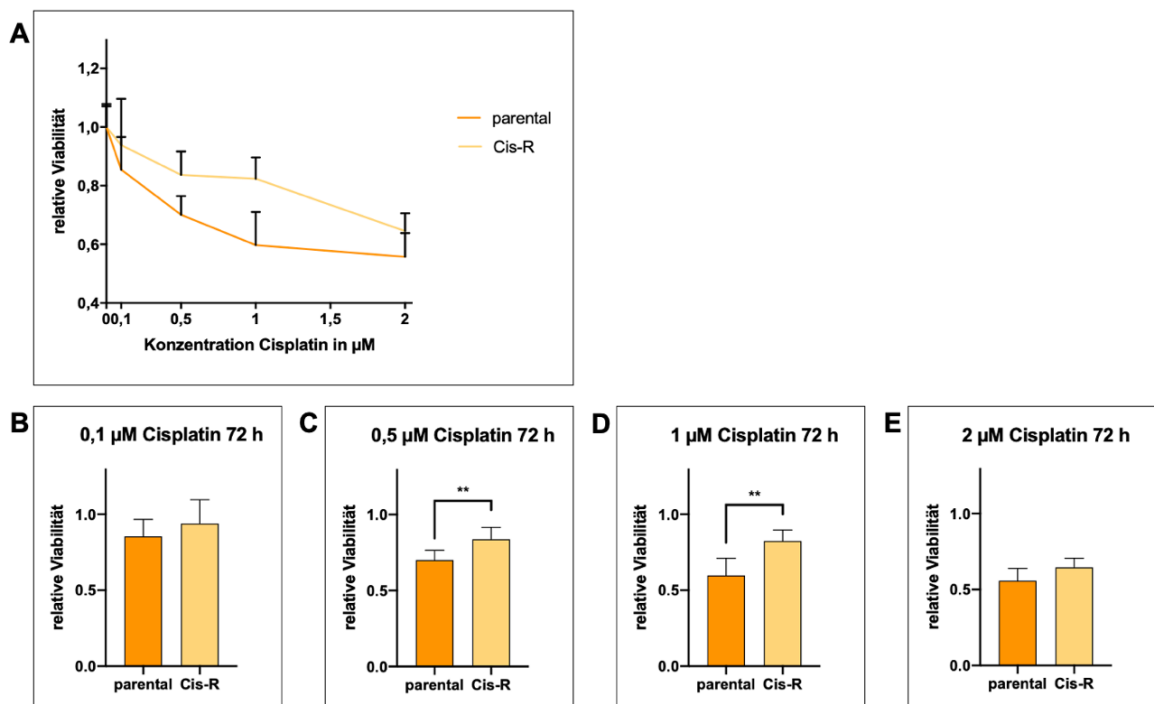


Abbildung 1: Cisplatin-Behandlung parentaler und Cisplatin-resistenter 1889c-Zellen

A. parentale und Cisplatin-resistente 1889c-Zellen unter verschiedenen Konzentrationen Cisplatin über 72 h. **B. – E.** Balkendiagramme parentaler und Cisplatin-resistenter Zellen unter einzelnen Cisplatin-Konzentrationen; Cis-R: Cisplatin-resistente 1889c-Zellen; **: signifikanter Unterschied ($p < 0,005$)

Zunächst wurde die unterschiedliche Viabilität parentaler und Cisplatin-resistenter Zellen unter verschiedenen Konzentrationen Cisplatin untersucht (Abbildung 1). Der Lebendzellanteil parentaler Zellen sank unter höheren Cisplatin-Konzentrationen (Abbildung 1A). Auch die Cisplatin-resistenten Zellen waren mit steigenden Konzentrationen weniger viabel, allerdings war der Lebendzellanteil im Vergleich zu den parentalen Zellen höher. Bei Cisplatin-

Konzentrationen von 0,5 μM und 1 μM war die Viabilität Cisplatin-resistenter Zellen signifikant größer als in der parentalen Vergleichsgruppe (Abbildung 1C und 1D). Die Konzentrationen von 0,1 μM und 2 μM riefen keinen signifikanten Unterschied hervor (Abbildung 1B und 1E).

3.1.2 Konzentrationen von Cyclin B1 und FoxM1 in 1889c-Zellen

Um zu untersuchen ob und wie sich die Proteinkonzentration der Proteine Cyclin B1 und FoxM1 in parentalen und Cisplatin-resistenten Zellen unterscheiden, wurden Western Blots angefertigt. Sowohl der FoxM1- als auch der Cyclin B1-Spiegel waren in Cisplatin-resistenten Zellen höher als in den parentalen Zellen (Abbildung 2A). Nach 72 h unter 0,5 μM Cisplatin zeigte sich ein leichter FoxM1-Anstieg in den Cisplatin-resistenten Zellen. Ebenso erhöhte sich der Cyclin B1-Spiegel unter einer Behandlung mit Cisplatin in Cisplatin-resistenten Zellen (Abbildung 2B).

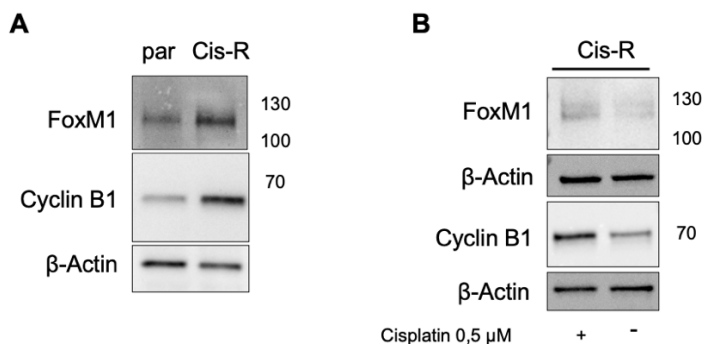


Abbildung 2: FoxM1- und Cyclin B1-Spiegel in 1889c-Zelllinien

A. Vergleich der FoxM1- und Cyclin B1-Konzentrationen in parentalen und Cisplatin-resistenten Zellen. **B.** FoxM1- und Cyclin B1-Spiegel in Cisplatin-resistenten Zellen mit und ohne Cisplatin-Behandlung. Die Cisplatin-Behandlung erfolgte über 72 h; +: 0,5 μM Cisplatin; -: kein Cisplatin; par ctrl: parentale Zelllinie mit Kontroll-siRNA; Cis-R ctrl: Cisplatin-resistente Zelllinie mit Kontroll-siRNA

3.1.3 Einfluss von FoxM1- und Cyclin B1-Knockdowns auf die Cisplatin-Resistenz

Die Zellviabilität der verschiedenen 1889c-Zelllinien unter steigenden Konzentrationen Cisplatin (0, 0,1, 0,5, 1 und 2 μM) wurde mittels MTS-Assay ermittelt (Abbildung 3A). Die Cisplatin-resistente Zelllinie zeigte eine deutlich höhere Viabilität unter höheren Konzentrationen Cisplatin als die anderen Zelllinien. Die parentalen Zellen reagierten ab einer Cisplatin-Konzentration von 1 μM mit einem deutlichen Absinken der Lebendzellzahl auf das Medikament. Die Zellviabilität der Cisplatin-resistenten Zellen mit Knockdown von FoxM1 und/oder Cyclin B1 sank ab einer Cisplatin-Konzentration von 1 μM signifikant im Vergleich zur Cisplatin-resistenten Kontrollgruppe (Abbildung 3D). Das Ansprechen der Cisplatin-resistenten Zellen mit Knockdown von FoxM1 und/oder Cyclin B1 ähnelte dem der parenta-

len 1889c-Zellen. Dabei sank die Lebendzellzahl der Cisplatin-resistenten Zelllinien mit FoxM1- und mit Doppelknockdown so weit ab, dass kein signifikanter Unterschied zu den parentalen Zellen zu verzeichnen war. Die Viabilität der Zellen mit Cyclin B1-Knockdown war dagegen noch signifikant höher als die der parentalen Zellen.

Die unterschiedlichen Konzentrationen der Proteine FoxM1 und Cyclin B1 in den verschiedenen Zelllinien wurden per Western Blot visualisiert (Abbildung 3B). Die Konzentrationen von FoxM1 und Cyclin B1 waren in den Cisplatin-resistenten Zellen höher als in den parentalen. Unter siRNA-Knockdown von FoxM1 und/oder Cyclin B1 in Cisplatin-resistenten Zellen sanken die Proteinspiegel deutlich ab.

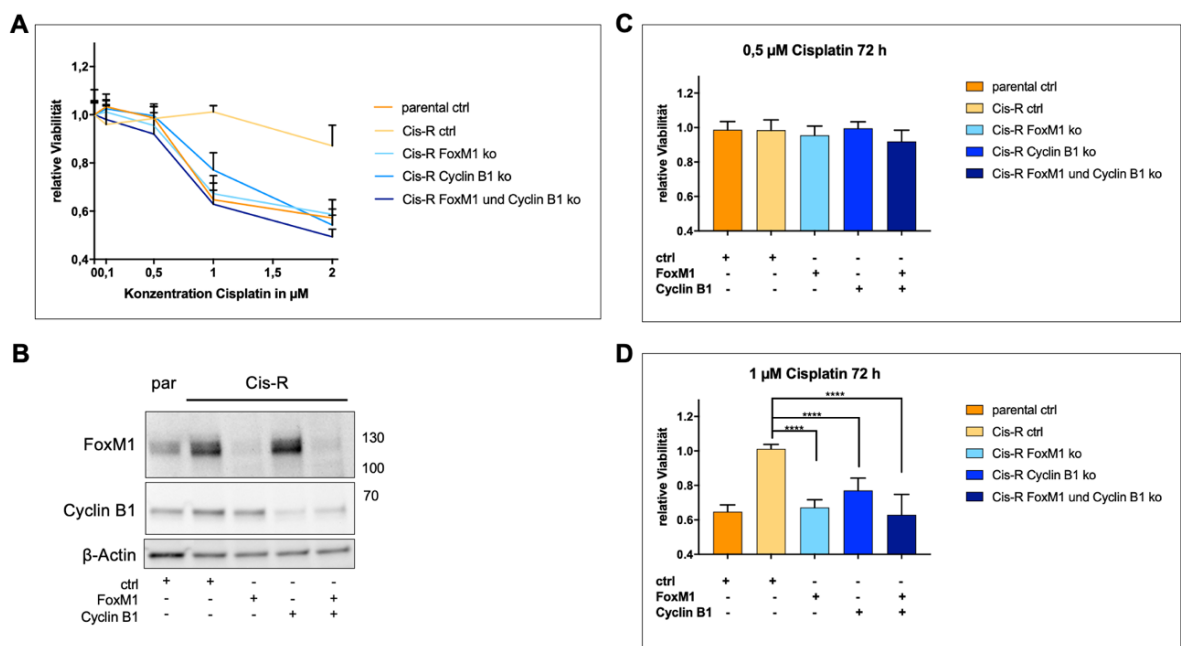


Abbildung 3: Einfluss von FoxM1- und Cyclin B1-Knockdowns auf die Zellviabilität verschiedener Zelllinien der 1889c-Zellreihe unter steigenden Konzentrationen Cisplatin

A. relative Zellviabilität von Cisplatin-resistenten Zellen im Vergleich zu parentalen Zellen und Cisplatin-resistenten Zellen mit siRNA-Knockdowns von FoxM1 und Cyclin B1 unter verschiedenen Konzentrationen Cisplatin über 72 h. **B.** Die Expressionslevel von FoxM1 und Cyclin B1 in den verschiedenen Zelllinien wurden mittels Western Blot bestimmt. **C.** Relative Viabilität unter 0,5 μM Cisplatin **D.** Relative Viabilität unter 1 μM Cisplatin; par ctrl: parentale 1889c-Zelllinie mit Kontroll-siRNA; Cis-R ctrl: Cisplatin-resistente 1889c-Zelllinie mit Kontroll-siRNA; Cis-R FoxM1 ko: Cisplatin-resistente 1889c-Zelllinie mit FoxM1-Knockdown; Cis-R Cyclin B1 ko: Cisplatin-resistente 1889c-Zelllinie mit Cyclin B1-Knockdown; Cis-R FoxM1 und Cyclin B1 ko: Cisplatin-resistente 1889c-Zelllinie mit FoxM1- und Cyclin B1-Knockdown; *: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$)

3.1.4 Seneszenzfärbung

Bei der Seneszenzfärbung mit X-Gal werden Zellen, die sich im Zellteilungsarrest befinden, blau angefärbt. In diesem Versuch wurden die Zellen vorher 24 Stunden lang mit 0,5 μM Cisplatin behandelt. Bei der Kontrollzelllinie HeLa war eine deutliche Blaufärbung zu erkennen. Auch die parentalen 1889c-Zellen wiesen mitunter eine starke Färbung auf. Dagegen waren bei der Cisplatin-resistenten Zelllinie nur wenige blau gefärbte Zellen zu erkennen.

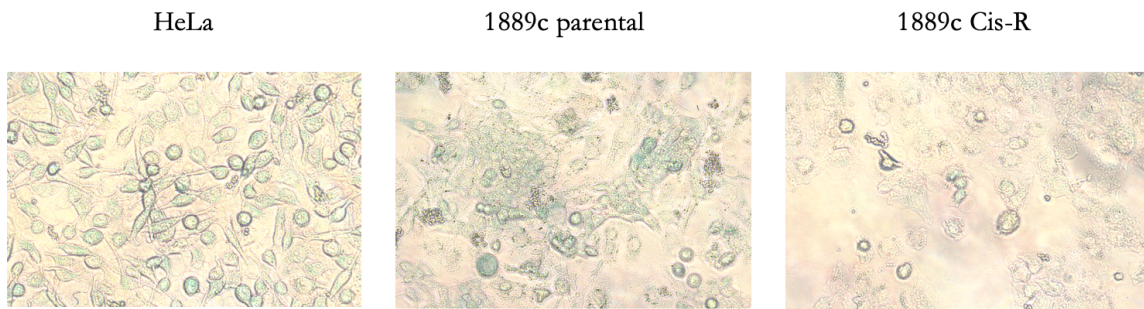


Abbildung 4: Seneszenzfärbung mit X-Gal bei drei Zelllinien nach 24 h Inkubation mit 0,5 μM Cisplatin; HeLa: menschliche Zervixkarzinomzellen

3.1.5 Einfluss von Cisplatin auf den Zellzyklus

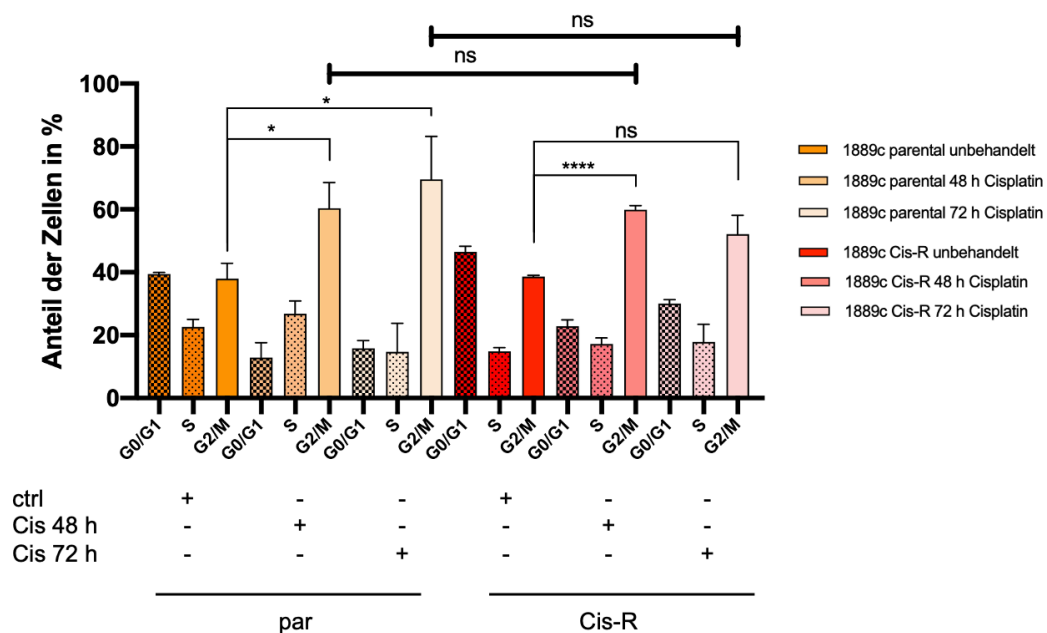


Abbildung 5: Zellzyklus-Assay mit 1889c parentalen und Cisplatin-resistenten Zellen ohne oder mit 0,5 μM Cisplatin über 48 h und 72 h

Für die Zellzyklus-Analyse wurden die parentalen und Cisplatin-resistenten 1889c-Zellen unterschiedlich lang mit 0,5 μM Cisplatin behandelt (0, 48 und 72 h). Ohne Behandlung befanden sich die parentalen Zellen zu etwa gleichen Teilen in der G0/G1- und in der G2/M-Phase. Eine kleinere Population befand sich in der S-Phase. Je länger die parentalen Zellen

dem Cisplatin ausgesetzt waren, desto mehr Zellen befanden sich in der G2/M-Phase. Nach 48 h Behandlung waren deutlich weniger parentale Zellen in der G0/G1-Phase. Dagegen war der Anteil an Zellen in der G2/M-Phase signifikant gestiegen. Nach 72 h unter Cisplatin Einfluss befanden sich ähnlich wenig parentale Zellen in der G0/G1-Phase wie nach 48h. Allerdings war der Anteil aus der S-Phase weniger geworden, sodass sich der Großteil der Zellen in der G2/M-Phase befand.

Bei den Cisplatin-resistenten Zellen war das Verteilungsmuster der Zellen ohne Cisplatin Behandlung ähnlich wie bei den parental Zellen. Nach 48 h unter Cisplatin war der Anteil an Zellen aus der G0/G1-Phase signifikant gesunken. Mehr Zellen verblieben in der G2/M-Phase. Nach der 72-stündigen Behandlung war der Anteil an Zellen in G0/G1-Phase wieder signifikant gestiegen und der Anteil aus G2/M-Phase gesunken. Zellen in der S-Phase waren unter den drei Bedingungen zu einem ähnlichen Anteil vertreten.

Der Vergleich des Anteils von parental und Cisplatin-resistenten Zellen in der G2/M Phase nach 48 h zeigte keinen signifikanten Unterschied. Auch nach 72 h war kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen.

3.2 Veränderung der Resistenz von TAB-1 gegenüber Sunitinib unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen von TYRO3 und IGF-I-R

3.2.1 Induktion der Sunitinib-Resistenz in TAB-1-Zellen

Zunächst sollte eine Sunitinib-resistente TAB-1-Zelllinie etabliert werden. Dazu wurden parentale TAB-1-Zellen mit steigenden Konzentrationen Sunitinib behandelt, bis eine Konzentration von 5 μM erreicht wurde (siehe 2.2.1.2). Anschließend wurde untersucht, wie die parental und Sunitinib-resistenten TAB-1-Zellen auf 5 μM Sunitinib reagierten (Abbildung 6). Dabei wurden die Zellen 0, 24 oder 48 Stunden mit Sunitinib inkubiert (Abbildung 6A). Der Unterschied der Viabilität zwischen parental und Sunitinib-resistenter Zellen war bereits nach 24 Stunden unter 5 μM Sunitinib signifikant. Dabei sprachen die parental Zellen nach 24 Stunden signifikant auf das Medikament an (Abbildung 6B), dagegen war die Viabilität der Sunitinib-resistenter Zellen nach 24 Stunden nicht signifikant gesunken (Abbildung 6C). Erst die Messung nach 48 Stunden unter Behandlung zeigte ein signifikantes Absinken der Viabilität von Sunitinib-resistenter Zellen.

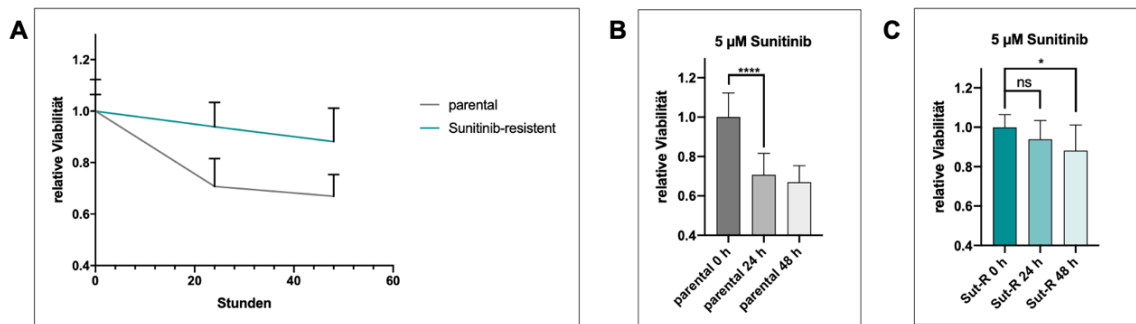


Abbildung 6: TAB-1-Zellen unter 5 μM Sunitinib

A. Viabilität parentaler und Sunitinib-resistenter TAB-1-Zellen unter 5 μM Sunitinib über 24 h und 48 h. **B./C.** Balkendiagramme parentaler und Sunitinib-resistenter Zellen nach unterschiedlicher Inkubationszeit unter 5 μM Sunitinib; Sut-R: Sunitinib-resistente TAB-1-Zellen; *: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$)

3.2.2 Konzentrationen von TYRO3 und IGF-I-R in TAB-1-Zellen

Im nächsten Schritt wurde ein Western Blot mit den zu untersuchenden Proteinen TYRO3 und IGF-I-R angefertigt (Abbildung 7). Dabei wurden parentalen TAB-1-Zellen Sunitinib-resistente Zellen unter verschiedenen Konzentrationen Sunitinib gegenübergestellt. Die parentalen TAB-1-Zellen zeigten eine erhöhte Konzentration von TYRO3 sowie IGF-I-R im Vergleich zu den Sunitinib-resistenten Zelllinien. Die steigenden Sunitinib-Konzentrationen zeigten allerdings keinen eindeutigen Effekt auf das Absinken der Protein-Konzentration in den Sunitinib-resistenter Zellen.

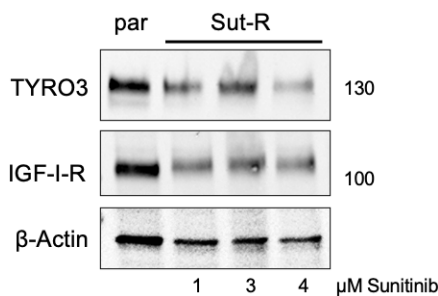


Abbildung 7: TYRO3- und IGF-I-R-Spiegel in TAB-1-Zelllinien

Anschließend wurde mittels Western Blots gezeigt, dass durch Hinzugabe spezifischer siRNA die Proteinlevel sanken (Abbildung 8). Diesen Effekt sieht man sowohl bei den parentalen als auch bei den Sunitinib-resistenten Zellen. Auch hier zeigt sich erneut eine höhere Konzentration beider Protein in den parentalen TAB-1-Zellen.

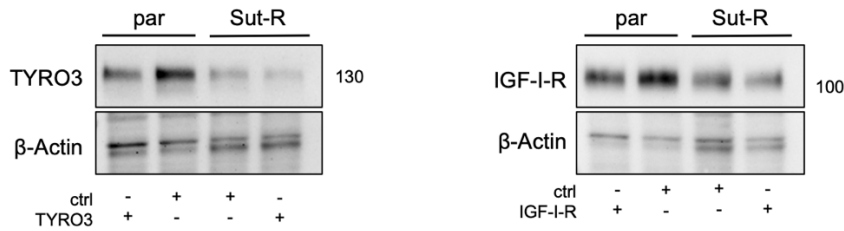
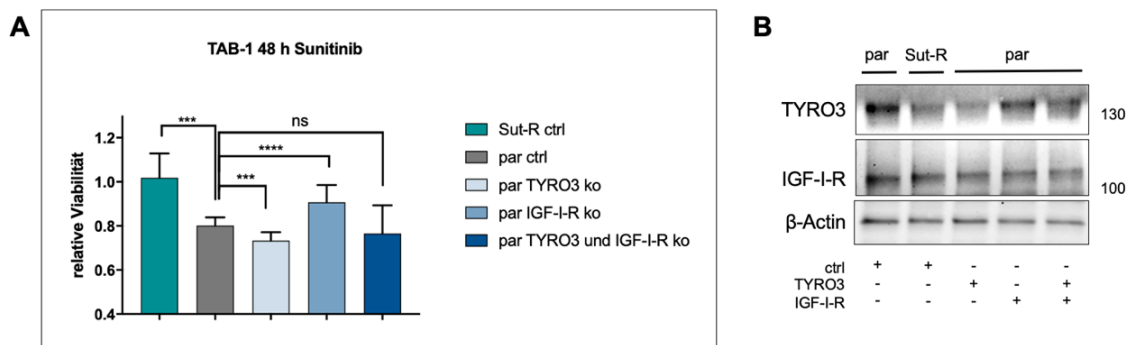


Abbildung 8: siRNA-Knockdowns von TYRO3 und IGF-I-R in TAB-1-Zellen

3.2.3 Einfluss von TYRO3- und IGF-I-R-Knockdowns auf die Sunitinib-Resistenz

Die Zellviabilität der TAB-1-Zellreihe mit und ohne Knockdowns unter 5 μ M Sunitinib wurde mittels MTS-Assay untersucht. In diesem Versuch wurde in TAB-1 parental Zellen ein Knockdown von TYRO3 und IGF-I-R induziert. Nach 48 Stunden unter 5 μ M Sunitinib war die Zellviabilität der parental Zellen signifikant niedriger als die der Sunitinib-resistenten Zellen (Abbildung 9A). Im Western Blot zeigten sich höhere Konzentrationen an TYRO3 und IGF-I-R in den parental Zellen im Vergleich zu den Sunitinib-resistenten Zellen (Abbildung 9B). Ebenfalls dem Western Blot zu entnehmen ist, dass die Proteinkonzentration von TYRO3 mit siRNA-Knockdown niedriger war. Auch die Level von IGF-I-R fielen unter Zugabe der siRNA. Die Viabilität der Zelllinie mit TYRO3-Knockdown war signifikant niedriger als die der parental Kontrolllinie. Dagegen stieg die Viabilität der Zellen mit IGF-I-R-Knockdown signifikant. Der Doppelknockdown zeigte keinen signifikanten Unterschied der Lebendzellzahl.

Abbildung 9: Einfluss von TYRO3- und IGF-I-R-Knockdowns auf die Zellviabilität von TAB-1-Zellen unter 5 μ M Sunitinib

A. Auswirkungen von TYRO3- und IGF-I-R-Knockdowns in parental TAB-1-Zellen auf die Viabilität unter 5 μ M Sunitinib; **B.** Western Blot zur Bestimmung der Expressionsspiegel von IGF-I-R und TYRO3

3.2.4 TYRO3- und IGF-I-R-Überexpression in TAB-1-Zellen

Die Auswirkungen von TYRO3- und IGF-I-R-Überexpression auf die Viabilität Sunitinib-resistenter Zellen nach Sunitinib-Behandlung wurde mittels MTS-Assay ermittelt (Abbildung 10). Dem Western Blot (Abbildung 10B) ist zu entnehmen, dass die Konzentration von IGF-I-R in Sunitinib-resistenten Zellen durch die Plasmidtransfektion stark anstieg. Die Viabilität der Sunitinib-resistenten Zellen mit IGF-I-R-Überexpression war nach der Behandlung mit Sunitinib signifikant geringer als die der parentalen Zellen (Abbildung 10A). Der Western Blot zeigte darüber hinaus eine stark erhöhte TYRO3-Konzentration in den Sunitinib-resistenten Zellen mit Überexpression (Abbildung 10B). Die Viabilität der Zellen mit Überexpression von TYRO3 war nach der Behandlung mit Sunitinib signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe.



Abbildung 10: Einfluss der TYRO3- und IGF-I-R-Überexpression auf die Zellviabilität von TAB-1 unter 5 µM Sunitinib

A. Auswirkungen von TYRO3 und IGF-I-R Überexpression auf die Viabilität von TAB-1-Zellen unter 5 µM Sunitinib; **B./C.** Western Blot zur Bestimmung der Expressionspiegel von IGF-I-R und TYRO3

4 Diskussion

Thymome und Thymuskarzinome sind seltene epitheliale Tumore des Thymus, die vor allem im höheren Erwachsenenalter auftreten (Engels und Pfeiffer 2003; Travis et al. 2004). Ihr seltenes Vorkommen erschwert es, große klinische Studien zur Verbesserung der Therapie durchzuführen. Bislang gilt die chirurgische Resektion als Goldstandard und Grundpfeiler der Therapie (Detterbeck 2010). Da die Tumore bei bis zu einem Drittel der Patienten nicht resezierbar sind, finden auch Chemo- und Radiotherapie als Therapiemodalitäten Verwendung. Die Erstlinientherapie mit Cisplatin hat eine Ansprechrate von etwa 70 % (siehe Tabelle 1). Ungefähr 50 % der Patienten mit malignen Thymomen und Thymuskarzinomen sprechen allerdings nicht auf die platinbasierte Therapie an oder leiden im Verlauf unter Rezidiven und benötigen dann eine Zweitlinientherapie (Ströbel et al. 2010b). In einigen Quellen wird der RTK-Inhibitor Sunitinib als mögliche Zweitlinientherapie genannt (Ströbel et al. 2010a; Cabezón-Gutiérrez et al. 2018). Ein besseres Verständnis der molekularbiologischen Resistenzmechanismen kann dabei helfen, das Ansprechen einer Therapie vorauszusagen und langfristig zu wirkungsvolleren Therapieansätzen führen.

Eine veränderte Expression von Cyclin B1 und FoxM1 ist ein häufiges Ereignis in Tumorzellen (Soria et al. 2000; Zona et al. 2014). Die Hochregulierung eines oder beider Proteine wurde beispielsweise in gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumoren (Briest et al. 2015), Ovarialkarzinomen (Zhou et al. 2014), Mammakarzinomen (Kwok et al. 2010), Zervixkarzinomen (Chan et al. 2008), NSCLC (Soria et al. 2000), Ösophagus-Plattenepithelkarzinom (Ou et al. 2013) und kolorektalen Tumoren (Fang et al. 2014) beobachtet. Dabei sind erhöhte FoxM1- und Cyclin B1-Konzentrationen prognostisch ungünstige Faktoren, die mit Wachstumsförderung, hohem Tumorstadium, einer erhöhten Wahrscheinlichkeit der Metastasierung und schlechtem Gesamtüberleben einhergehen (Soria et al. 2000; Chan et al. 2008; Aaltonen et al. 2009; Ou et al. 2013; Fang et al. 2014). Beide Proteine nehmen eine wichtige Rolle in der Regulierung des Zellzyklus ein. Die FoxM1-Konzentration steigt in der G2/M-Phase des Zellzyklus an und induziert damit die Expression von Cyclin B1 (Otto und Sicinski 2017). FoxM1 aktiviert das DNA-Reparatursystem, indem es bei DNA-Schäden als Transkriptionsfaktor für viele Reparaturgene fungiert (Kwok et al. 2010; Zona et al. 2014). Cyclin B1 ist wesentlicher Wegbereiter für den Übergang von der G2-Phase in die Mitose (Soria et al. 2000). Darüber hinaus scheint die Überexpression von Cyclin B1 die zytotoxische Wirkung von Cisplatin in verschiedenen Tumorentitäten zu verringern (Kawamoto et al. 1997; Ou et al. 2013). Auch erhöhte FoxM1-Konzentrationen führen zu einem schlechteren Ansprechen von Tumorzellen auf genotoxische Substanzen (Zhao und Lam 2012). Kwok et al. (2010) beobachteten in Cisplatin-resistenten Brustkrebszellen eine gesteigerte FoxM1-Konzentration im Vergleich zu den Cisplatin-sensiblen parental Zellen. Weitere Ergebnisse zeigten eine erhöhte Expression von FoxM1 in Cisplatin-resistenten Zellen nach Cisplatin-Behandlung

(Kwok et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich analog zu den Ergebnissen von Kwok et al. eine erhöhte FoxM1-Konzentration in Cisplatin-resistenten 1889c-Thymuskarzinomzellen im Vergleich zu den parentalen 1889c-Zellen (Abbildung 2). Ebenso erhöhte sich nach Behandlung mit Cisplatin die FoxM1-Konzentration in den Cisplatin-resistenten 1889c-Zellen. Mit der Cyclin B1-Konzentration verhielt es sich gleichermaßen. In Cisplatin-resistenten Brustkrebszellen generierte die Herunterregulierung von FoxM1 durch siRNA-Knockdowns eine Sensitivität (Kwok et al. 2010). Ähnliche Ergebnisse lieferte die vorliegende Arbeit bei Cisplatin-resistenten Thymuskarzinomzellen mit siRNA-Knockdowns von Cyclin B1 und FoxM1 (Abbildung 3).

Die Konzentrationen von FoxM1 und Cyclin B1 stellten sich also bei Thymuskarzinomen als prognostische Marker heraus, die ggf. ein Ansprechen auf die platinbasierte Therapie vorausagen können. Eine Inhibition der Proteine könnte die Therapie mit Cisplatin unterstützen. In anderen Studien wurden bereits FoxM1-Inhibitoren vorgestellt und deren Wirkung auf das Ansprechen der Tumorzellen auf Cisplatin getestet. Dabei waren sowohl Thiostrepton als auch Siomycon A vielversprechende Ko-Therapeutika (Radhakrishnan et al. 2006; Kwok et al. 2010; Zhou et al. 2014; Briest et al. 2015). Siomycin hat den Vorteil, dass es selektiv auf entartete Zellen wirkt, während in normalen Zellen der apoptotische Effekt ausbleibt (Radhakrishnan et al. 2006). Die Wirkung der FoxM1-Inhibitoren auf das Ansprechen von Thymomen und Thymuskarzinomen bleibt weiterhin zu untersuchen.

Im Jahr 1998 wurde von Wang et al. eine Seneszenz-ähnliche Reaktion bei der nasopharyngealen Karzinomzelllinie CNE1 nach Behandlung mit Cisplatin beobachtet. Dabei zeigte sich, dass nach Behandlung mit subletalen Dosen Cisplatin der Seneszenzmarker Seneszenz-assoziierte Beta-Galactosidase (SA β -Gal) zwar zunächst exprimiert wurde, dieser Seneszenz-ähnliche Effekt jedoch reversibel zu sein schien (Wang et al. 1998). In den Versuchen der vorliegenden Arbeit zur Seneszenzfärbung färbten sich die parentalen 1889c-Zellen sowie die Kontrollzelllinie HeLa nach Exposition mit Cisplatin in der β -Galactosidase-Färbung blau (Abbildung 5). Das weist auf einen Eintritt der Zellen in die Seneszenz hin. Dagegen reagierten die Cisplatin-resistenten Zellen auf gleiche Behandlung nicht mit einer Blaufärbung. Man kann also davon ausgehen, dass die Cisplatin-resistenten Zellen Seneszenz vermeiden können. Dafür spricht auch, dass FoxM1 die zelluläre Seneszenz antagonisiert (Koo et al. 2012). Ein Eintreten in die Seneszenz wird daher für die Cisplatin-resistenten Zellen, die einen erhöhten FoxM1-Spiegel aufweisen, unwahrscheinlicher, was sich auch in der Seneszenzfärbung zeigte.

Um mögliche Unterschiede im Durchlauf des Zellzyklus von parentalen und Cisplatin-resistenten 1889c-Zellen nach Cisplatin-Behandlung zu untersuchen, wurde eine Zellzyklusanalyse durchgeführt (Abbildung 5). Von Interesse war dabei, ob sich der Anteil von Zellen beider Zelllinien in der G2/M Phase unterscheidet. Die Überlegung war, dass der DNA-schädigende Effekt von Cisplatin die Zellen am Übergang in die Mitose hindern würde und damit die Zellen an dieser Stelle im Zellzyklus arretieren. Wir erwarteten also eine Akkumulation von parentalen Zellen in der G2/M Phase nach Behandlung mit Cisplatin. Da Cyclin B1

ein Protein ist, das den Übergang in die Mitose fördert, gingen wir davon aus, dass die Cisplatin-resistenten Zellen, die eine erhöhte Konzentration von Cyclin B1 aufweisen, den Zellzyklus-arretierenden Effekt überwinden und nicht in der G2/M-Phase akkumulieren würden. Mueller et al. beschrieben eine potenzierte Wirkung von Cisplatin, sobald der Zellzyklus in der G2/M-Phase arretiert (Mueller et al. 2006). Umgekehrt dürfte eine Verkürzung der Phase zu einem verminderten Effekt des Medikamentes führen. Dann wäre dies ein weiterer Schutzmechanismus gegen Cisplatin. In dieser Arbeit konnten die vorangegangenen Überlegungen allerdings nicht eindeutig bestätigt werden. In beiden Zelllinien zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Zellen in der G2/M-Phase, nachdem sie für 48 Stunden mit Cisplatin behandelt wurden. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Zelllinien war sowohl nach 48 Stunden als auch nach 72 Stunden Behandlung nicht gegeben (Abbildung 5). Dennoch zeigten die Cisplatin-resistenten Zellen die Tendenz, dass sich im Vergleich zu den parentalen Zellen ein geringerer Anteil an Zellen in der G2/M-Phase befand. Eine Wiederholung des Experiments mit mehreren Durchläufen könnte zu eindeutigeren Ergebnissen führen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die Auswirkungen IGF-I-R und TYRO3 auf das Ansprechen von TAB-1-Thymomzellen auf Sunitinib untersucht. Die Überexpression von IGF-I-R ist ein bekanntes Phänomen in Tumoren (Yuan et al. 2018). Bereits in vorangegangenen Studien zeigte sich in Thymustumoren mit ungünstiger Prognose eine gesteigerte Expression von IGF-I-R (Girard et al. 2010; Zucali et al. 2010). Eine erhöhte IGF-I-R-Konzentration wird außerdem mit einem schlechteren Ansprechen auf Chemotherapeutika in Zusammenhang gebracht (Liefers-Visser et al. 2017). Umgekehrt wurde beobachtet, dass ein IGF-I-R-Knockdown die Chemosensitivität von Tumorzellen steigerte (Dong et al. 2008). In einer klinischen Studie stellte sich heraus, dass in Sunitinib-sensiblen Thymuskarzinomen bestimmte RTKs, darunter auch IGF-I-R, vermehrt aktiviert sind (Ströbel et al. 2010a). Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde in TAB-1-Thymomzellen zunächst eine Sunitinib-Resistenz induziert (siehe 2.2.1.2 und Abbildung 6). In Western Blots zeigte sich eine verringerte Expression von IGF-I-R in den Sunitinib-resistenten TAB-1-Zellen (Abbildung 7). Da angenommen wird, dass Sunitinib unter anderem IGF-I-R inhibiert (Shen et al. 2012), ist die Herunterregulation des Rezeptors in Sunitinib-resistenten Zellen durchaus eine logische Konsequenz. Der anschließende Knockdown von IGF-I-R in den parentalen TAB-1-Zellen führte zu einem geringeren Ansprechen auf die Behandlung mit Sunitinib (Abbildung 9). Analog dazu sprachen die Sunitinib-resistenten TAB-1-Zellen mit IGF-I-R-Überexpression besser auf die Therapie mit Sunitinib an als die Kontrollgruppe ohne Knockdown (Abbildung 10). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass IGF-I-R in hohem Maße an der Wirkung von Sunitinib beteiligt ist und eine verminderte Expression die Zellen vor der Behandlung mit Sunitinib schützt.

TYRO3 ist ein Protein der TAM-Familie und wird in einer Vielzahl von Krebsarten überexprimiert (Chien et al. 2016; Vouri und Hafizi 2017). Hohe Expressionsraten werden dabei mit einer schlechten Prognose in Zusammenhang gebracht (Chien et al. 2016). Darüber hinaus reduzierte die Hemmung von TYRO3 in Tiermodellen das Tumorwachstum und die Metas-

tasierung (Smart et al. 2018). Zudem werden die Proteine der TAM-Familie als Vermittler von Resistenz sowohl bei konventioneller Chemotherapie als auch bei zielgerichteter Therapie in Betracht gezogen (Vouri und Hafizi 2017; Smart et al. 2018). Daher wird die Inhibition von TYRO3 als unterstützende Therapie diskutiert (Hsu et al. 2019). Ströbel et al. (2010a) wiesen mittels Phospho-Protein-Arrays eine hohe Aktivierung von TYRO3 in Zellen eines metastasierten Thymuskarzinoms nach, das auf die Behandlung mit Sunitinib ansprach. TYRO3 ist das bisher am wenigsten untersuchte Protein der TAM-Familie und bisher wurde nicht beschrieben, dass Sunitinib über TYRO3 wirkt. Allerdings sind Effekte von Sunitinib auf ein anderes Mitglied der TAM-Familie, nämlich Axl, bekannt (Vouri und Hafizi 2017). Darüber hinaus wurde beobachtet, dass Glioblastom-Zellen mit Axl-Silencing weniger sensibel auf die Behandlung mit Sunitinib reagierten, als die Kontrollzelllinie (Martinho et al. 2015). Analog dazu enthielten in der vorliegenden Arbeit die parentalen TAB-1-Zellen, die gut auf Sunitinib ansprachen, eine höhere Konzentration TYRO3 als die Sunitinib-resistenten Zellen (Abbildung 7). Mit der Annahme, dass Sunitinib als Multitarget-Tyrosinkinase-Inhibitor auch über TYRO3 wirkt, ist die Herunterregulation dieses Proteins ein möglicher Resistenzmechanismus. Um diese Theorie zu verifizieren wurde TYRO3 in parentalen TAB-1-Zellen mittels siRNA-Knockdown herunterreguliert (Abbildung 9). Jedoch war die Viabilität der parentalen Zellen mit Knockdown nach Sunitinib-Behandlung wider Erwarten niedriger und nicht höher. Die geringere Konzentration von TYRO3 hat die Zellen also in irgendeiner Weise anfälliger gemacht.

In einem Gegenversuch zeigten Marthino et al. (2015), dass eine Überaktivierung von Axl-Liganden in Glioblastom-Zellen, zu einem besseren Ansprechen auf Sunitinib führte. Ebenso führte eine TYRO3-Überexpression in TAB-1-Zellen mittels Plasmidtransfektion in Sunitinib-resistenten Zellen zu einer geringeren Viabilität nach Sunitinib-Behandlung (Abbildung 10). TYRO3 scheint also ebenfalls Angriffspunkt von Sunitinib zu sein. Allerdings scheint die Resistenzentstehung durch TYRO3 komplexer zu sein, als dass sie sich durch einfaches Hoch- bzw. Herunterregulieren entwickelt, da der TYRO3-Knockdown die parentalen TAB-1-Zellen nicht resistenter gemacht hat. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Resistenzentwicklung nicht hauptsächlich auf der Regulation von TYRO3 basiert. Die Sunitinib-resistenten Zellen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, wurden über mehrere Wochen durch Zugabe steigender Konzentrationen Sunitinib resistent gemacht. Denkbar ist, dass durch die lange Exposition von Sunitinib auch andere RTKs, wie zum Beispiel Axl, herunterreguliert und infolge dessen andere wachstumsfördernde Signalwege, auf die Sunitinib keine Wirkung hat, hochreguliert wurden. Dafür spricht auch, dass sich nach Axl-Silencing in Glioblastomzellen eine Hochregulation von EGFR zeigte (Martinho et al. 2015). EGFR, TYRO3 sowie Axl aktivieren alle die nachgeschalteten Signalwege MAPK und PI3/AKT (Scaltriti et al. 2016; Smart et al. 2018; Jiang et al. 2020). Auf diese Weise könnte durch Hochregulation des einen Rezeptors die verminderte Expression des anderen kompensiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde mit einem siRNA-Knockdown von TYRO3 in parentalen TAB1-Zellen jedoch nur an einer Stellschraube gedreht. Möglicherweise wurden bei dem TYRO3-Knockdown als

Gegenregulation vermehrt andere RTKs exprimiert, über die Sunitinib ggf. effektiver wirken konnte. So ließe sich die verminderte Viabilität der parentalen TAB-1-Zellen nach TYRO3 Knockdown erklären. TYRO3 wirkt überdies antiapoptotisch (Hsu et al. 2019). Ein plötzlicher Knockdown durch siRNA führt gegebenenfalls sogar zu einer höheren Anfälligkeit der Zelle. In Sunitinib-sensiblen Thymomen könnte daher eine zusätzliche spezifische TYRO3-Inhibition zu einem besseren Therapieerfolg führen. Diese Überlegungen müssten in weiteren Versuchen untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Maligne Thymome und Thymuskarzinome sind seltene Erkrankungen. Eine Cisplatin-basierte Chemotherapie ist häufig erster Therapieansatz bei inoperablen Tumoren. Dabei kommt es allerdings oft zu einem schlechten Ansprechen auf die Therapie oder zu rezidivierenden Tumoren. Sunitinib steht als Zweitlinientherapie zur Verfügung, zeigt aber auch längst nicht bei allen Patienten positive Effekte. Ein wichtiges Ziel der derzeitigen Forschung ist es, ein genaueres Verständnis der Resistenzmechanismen auf molekularbiologischer Ebene zu erlangen. Einerseits verspricht man sich hierdurch eine bessere Vorhersagbarkeit des Therapieerfolgs, andererseits könnten neue Therapieansätze entwickelt werden und zur personalisierten Medizin beitragen.

In dieser Arbeit wurden vier Proteine in den Vordergrund gestellt, die bereits in vorherigen Studien zu Resistenzen in der Tumorthherapie eine herausragende Rolle einnahmen. FoxM1 und Cyclin B1 sind Zellzyklus-regulierende Proteine, die den Übergang in die Mitose fördern. Dabei induziert FoxM1 die Expression von Cyclin B1. Beide Proteine werden in verschiedenen Tumoren überexprimiert und sind prognostisch ungünstige Faktoren. Auch in Cisplatin-resistenten 1889c-Thymuskarzinomzellen werden FoxM1 und Cyclin B1 überexprimiert. In MTS-Tests konnte gezeigt werden, dass siRNA-Knockdowns von FoxM1 und Cyclin B1 zu einem besseren Ansprechen auf Cisplatin führten. Eine Seneszenz-Färbung belegte, dass parentale Zellen im Vergleich zu Cisplatin-resistenten Zellen nach Cisplatin-Behandlung vermehrt in Seneszenz gehen. Effekte auf den Zellzyklus wurden mit einem Zellzyklus-Test untersucht. Hier konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen parentalen und Cisplatin-resistenten Zellen festgestellt werden, auch wenn es die Tendenz gab, dass Cisplatin-resistente Zellen nach Behandlung weniger in der G2/M-Phase akkumulierten als die parentalen Zellen. Insgesamt stellten sich die beiden Proteine als prognostische Marker und mögliche Angriffspunkte in der Therapie heraus.

Darüber hinaus wurden die Effekte von TYRO3 und IGF-I-R auf das Ansprechen von TAB-1-Zellen gegenüber Sunitinib untersucht. Auch diese beiden Proteine weisen in verschiedenen Tumoren erhöhte Konzentrationen auf. In Sunitinib-resistenten Zellen war die Konzentration beider Proteine im Vergleich zu parentalen TAB-1-Zellen erniedrigt. Dies veranlasste zu Versuchen mit siRNA-Knockdowns in parentalen Zellen. Ein Knockdown von IGF-I-R in parentalen TAB-1-Zellen machte die Zellen resistenter gegenüber Sunitinib. Analog dazu zeigte sich in Versuchen mit Überexpression von IGF-I-R in Sunitinib-resistenten Zellen ein verbessertes Ansprechen auf die Sunitinib-Behandlung. Auch die Konzentration von TYRO3 war in Sunitinib-resistenten Zellen verändert. Dies deutet darauf hin, dass TYRO3 in der Entwicklung einer Sunitinib-Resistenz eine Rolle spielt. Allerdings zeigten Knockdown und Überexpression von TYRO3, dass diese spezifische RTK nicht alleine für die Resistenzbildung

verantwortlich sein kann. Wahrscheinlich muss man TYRO3 im Kontext mit anderen RTKs betrachten, um besser zu verstehen, was bei der Resistenzbildung passiert.

Weitere Untersuchungen werden nötig sein, um die Resistenzmechanismen tiefergehend zu verstehen. Die Ergebnisse dieser Arbeit in Zusammenschau mit Ergebnissen aus anderen Studien lassen jedoch den Schluss zu, dass die Proteine FoxM1, Cyclin B1, IGF-I-R sowie TYRO3 eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Resistenzen bei malignen Thymomen und Thymuskarzinomen einnehmen und damit in Zukunft prognostische Marker und Angriffspunkte in der Therapie sein könnten.

6 Literaturverzeichnis

Aaltonen K, Amini RM, Heikkilä P, Aittomäki K, Tamminen A, Nevanlinna H, Blomqvist C (2009): High cyclin B1 expression is associated with poor survival in breast cancer. *Br J Cancer* 100, 1055–1060

Ammann K, Möschel M, Wenzl E (2013): Thymom und Thymuskarzinom: Eine Übersicht. *Interdiszip Onkol* 5, 53–57

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

Berruti A, Borasio P, Gerbino A, Gorzegno G, Moschini T, Tampellini M, Ardisson F, Brizzi MP, Dolcetti A, Dogliotti L (1999): Primary chemotherapy with adriamycin, cisplatin, vincristine and cyclophosphamide in locally advanced thymomas: a single institution experience. *Br J Cancer* 81, 841–845

Briest F, Berg E, Grass I, Freitag H, Kaemmerer D, Lewens F, Christen F, Arsenic R, Altendorf-Hofmann A, Kunze A, et al. (2015): FOXM1: A novel drug target in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Oncotarget* 6, 8185–8199

Cabezón-Gutiérrez L, Khosravi-Shahi P, Custodio-Cabello S, García-Martos M, Palka-Kotłowska M, Franco-Moreno AI (2018): Metastatic Thymic Carcinoma with Long Survival After Treatment with Sunitinib. *Cureus* 10, e2982

Chan D, Yu S, Chiu P, Yao K, Liu V, Cheung A, Ngan H (2008): Over-expression of FOXM1 transcription factor is associated with cervical cancer progression and pathogenesis. *J Pathol* 215, 245–252

Chien CW, Hou PC, Wu HC, Chang YL, Lin SC, Lin SC, Lin BW, Lee JC, Chang YJ, Sun HS, et al. (2016): Targeting TYRO3 inhibits epithelial–mesenchymal transition and increases drug sensitivity in colon cancer. *Oncogene* 35, 5872–5881

Crosier KE, Crosier PS (1997): New insights into the control of cell growth; the role of the Axl family. *Pathology (Phila)* 29, 131–135

Dasari S, Tchounwou PB (2014): Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* 740, 364–378

den Bakker MA, Roden AC, Marx A, Marino M (2014): Histologic Classification of Thymoma: A Practical Guide for Routine Cases. *J Thorac Oncol* 9, 125–130

- Detterbeck FC (2010): Evaluation and Treatment of Stage I and II Thymoma. *J Thorac Oncol* 5, 318–322
- Dong A, Kong M, Ma Z, Qian J, Cheng H, Xu X (2008): Knockdown of insulin-like growth factor 1 receptor enhances chemosensitivity to cisplatin in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Acta Biochim Biophys Sin* 40, 497–504
- Douard R, Moutereau S, Pernet P, Chimingqi M, Allory Y, Manivet P, Conti M, Vaubourdolle M, Cugnenc PH, Loric S (2006): Sonic Hedgehog–dependent proliferation in a series of patients with colorectal cancer. *Surgery* 139, 665–670
- 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
- Engels EA, Pfeiffer RM (2003): Malignant thymoma in the United States: Demographic patterns in incidence and associations with subsequent malignancies. *Int J Cancer* 105, 546–551
- Faivre S, Demetri G, Sargent W, Raymond E (2007): Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development. *Nat Rev Drug Discov* 6, 734–745
- Fang Y, Yu H, Liang X, Xu J, Cai X (2014): Chk1-induced CCNB1 overexpression promotes cell proliferation and tumor growth in human colorectal cancer. *Cancer Biol Ther* 15, 1268–1279
- Fornasiero A, Daniele O, Ghiotto C, Piazza M, Fiore-Donati L, Calabró F, Rea F, Fiorentino MV (1991): Chemotherapy for invasive thymoma. A 13-year experience. *Cancer* 68, 30–33
- Giaccone G, Ardizzoni A, Kirkpatrick A, Clerico M, Sahmoud T, van Zandwijk N (1996): Cisplatin and etoposide combination chemotherapy for locally advanced or metastatic thymoma. A phase II study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Lung Cancer Cooperative Group. *J Clin Oncol* 14, 814–820
- Girard N, Teruya-Feldstein J, Payabyab EC, Riely GJ, Rusch VW, Kris MG, Zakowski MF (2010): Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor Expression in Thymic Malignancies. *J Thorac Oncol* 5, 1439–1446
- Girard N, Ruffini E, Marx A, Faivre-Finn C, Peters S (2015): Thymic epithelial tumours: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 26, v40–v55
- Gökmen-Polar Y, Sanders KL, Goswami CP, Cano OD, Zaheer NA, Jain RK, Kesler KA, Nelson RP, 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

- Hakuno F, Takahashi SI (2018): 40 years of IGF1: IGF1 receptor signaling pathways. *J Mol Endocrinol* 61, T69–T86
- Hsu PL, Jou J, Tsai SJ (2019): TYRO3: A potential therapeutic target in cancer. *Exp Biol Med* 244, 83–99
- Jiang W, Wang X, Zhang C, Xue L, Yang L (2020): Expression and clinical significance of MAPK and EGFR in triple-negative breast cancer. *Oncol Lett* 19, 1842–1848
- Kalinichenko VV, Major ML, Wang X, Petrovic V, Kuechle J, Yoder HM, Dennewitz MB, Shin B, Datta A, Raychaudhuri P, et al. (2004): Foxm1b transcription factor is essential for development of hepatocellular carcinomas and is negatively regulated by the p19ARF tumor suppressor. *Genes Dev* 18, 830–850
- Kawamoto H, Koizumi H, Uchikoshi T (1997): Expression of the G2-M Checkpoint Regulators Cyclin Bi and cdc2 in Nonmalignant and Malignant Human Breast Lesions. *Am J Pathol* 150, 15–23
- Kim ES, Putnam JB, Komaki R, Walsh GL, Ro JY, Shin HJ, Truong M, Moon H, Swisher SG, Fossella FV, et al. (2004): Phase II study of a multidisciplinary approach with induction chemotherapy, followed by surgical resection, radiation therapy, and consolidation chemotherapy for unresectable malignant thymomas: final report. *Lung Cancer* 44, 369–379
- Kim IM, Ackerson T, Ramakrishna S, Tretiakova M, Wang IC, Kalin TV, Major ML, Gusarova GA, Yoder HM, Costa RH, et al. (2006): The Forkhead Box m1 Transcription Factor Stimulates the Proliferation of Tumor Cells during Development of Lung Cancer. *Cancer Res* 66, 2153–2161
- Koizumi T, Takabayashi Y, Yamagishi S, Tsushima K, Takamizawa A, Tsukadaira A, Yamamoto H, Yamazaki Y, Yamaguchi S, Fujimoto K, et al. (2002): Chemotherapy for Advanced Thymic Carcinoma: Clinical Response to Cisplatin, Doxorubicin, Vincristine, and Cyclophosphamide (ADOC Chemotherapy). *Am J Clin Oncol* 25, 266–268
- Kondo K, Monden Y (2003): Therapy for thymic epithelial tumors: a clinical study of 1,320 patients from Japan. *Ann Thorac Surg* 76, 878–884
- Kondo K, Yoshizawa K, Tsuyuguchi M, Kimura S, Sumitomo M, Morita J, Miyoshi T, Sakiyama S, Mukai K, Monden Y (2004): WHO histologic classification is a prognostic indicator in thymoma. *Ann Thorac Surg* 77, 1183–1188
- Koo CY, Muir KW, Lam EWF (2012): FOXM1: From cancer initiation to progression and treatment. *Biochim Biophys Acta* 1819, 28–37
- Korver W, Roose J, Clevers H (1997): The winged-helix transcription factor Trident is expressed in cycling cells. *Nucleic Acids Res* 25, 1715–1719
- Kunitoh H, Tamura T, Shibata T, Nakagawa K, Takeda K, Nishiwaki Y, Osaki Y, Noda K,

- Yokoyama A, Saijo N (2009): A phase-II trial of dose-dense chemotherapy in patients with disseminated thymoma: report of a Japan Clinical Oncology Group trial (JCOG 9605). *Br J Cancer* 101, 1549–1554
- Kunitoh H, Tamura T, Shibata T, Takeda K, Katakami N, Nakagawa K, Yokoyama A, Nishiwaki Y, Noda K, Watanabe K, et al. (2010): A phase II trial of dose-dense chemotherapy, followed by surgical resection and/or thoracic radiotherapy, in locally advanced thymoma: report of a Japan Clinical Oncology Group trial (JCOG 9606). *Br J Cancer* 103, 6–11
- Kurup A, Loehrer PJ (2004): Thymoma and Thymic Carcinoma: Therapeutic Approaches. *Clin Lung Cancer* 6, 28–32
- Kwok JMM, Peck B, Monteiro LJ, Schwenen HDC, Millour J, Coombes RC, Myatt SS, Lam EWF (2010): FOXM1 Confers Acquired Cisplatin Resistance in Breast Cancer Cells. *Mol Cancer Res* 8, 24–34
- Laoukili J, Stahl M, Medema RH (2007): FoxM1: At the crossroads of ageing and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1775, 92–102
- Leung TWC, Lin SSW, Tsang ACC, Tong CSW, Ching JCY, Leung WY, Gimlich R, Wong GG, Yao KM (2001): Over-expression of FoxM1 stimulates cyclin B1 expression. *FEBS Lett* 507, 59–66
- Liefers-Visser JAL, Meijering RAM, Reyners AKL, van der Zee AGJ, de Jong S (2017): IGF system targeted therapy: Therapeutic opportunities for ovarian cancer. *Cancer Treat Rev* 60, 90–99
- Liu M, Dai B, Kang SH, Ban K, Huang FJ, Lang FF, Aldape KD, Xie T, Pelloski CE, Xie K, et al. (2006): FoxM1B Is Overexpressed in Human Glioblastomas and Critically Regulates the Tumorigenicity of Glioma Cells. *Cancer Res* 66, 3593–3602
- Loehrer PJ, Kim K, Aisner SC, Livingston R, Einhorn LH, Johnson D, Blum R (1994): Cisplatin plus doxorubicin plus cyclophosphamide in metastatic or recurrent thymoma: final results of an intergroup trial. *J Clin Oncol* 12, 1164–1168
- Loehrer PJ, Chen M, Kim K, Aisner SC, Einhorn LH, Livingston R, Johnson D (1997): Cisplatin, doxorubicin, and cyclophosphamide plus thoracic radiation therapy for limited-stage unresectable thymoma: an intergroup trial. *J Clin Oncol* 15, 3093–3099
- Lucchi M, Melfi F, Dini P, Basolo F, Viti A, Givigliano F, Angeletti CA, Mussi A (2006): Neoadjuvant Chemotherapy for Stage III and IVA Thymomas: A Single-Institution Experience with a Long Follow-up. *J Thorac Oncol* 1, 308–313
- Martinho O, Zucca LE, Reis RM (2015): AXL as a modulator of sunitinib response in glioblastoma cell lines. *Exp Cell Res* 332, 1–10
- Masaoka A (2010): Staging System of Thymoma. *J Thorac Oncol* 5, S304–S312

- 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
- Mueller S, Schittenhelm M, Honecker F, Malenke E, Lauber K, Wesselborg S, Hartmann J, Bokemeyer C, Mayer F (2006): Cell-cycle progression and response of germ cell tumors to cisplatin in vitro. *Int J Oncol* 29, 471–479
- Nakagawa K, Asamura H, Matsuno Y, Suzuki K, Kondo H, Maeshima A, Miyaoka E, Tsuchiya R (2003): Thymoma: a clinicopathologic study based on the new World Health Organization classification. *J Thorac Cardiovasc Surg* 126, 1134–1140
- Otto T, Sicinski P (2017): Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 17, 93–115
- Ou Y, Ma L, Ma L, Huang Z, Zhou W, Zhao C, Zhang B, Song Y, Yu C, Zhan Q (2013): Overexpression of cyclin B1 antagonizes chemotherapeutic-induced apoptosis through PTEN/Akt pathway in human esophageal squamous cell carcinoma cells. *Cancer Biol Ther* 14, 45–55
- Padda SK, Keijzers M, Wakelee HA (2016): Pretreatment biopsy for thymic epithelial tumors—does histology subtype matter for treatment strategy? *J Thorac Dis* 8, 1895–1900
- Pawlina W: *Histology: A Text and Atlas, International Edition*. 8. Auflage; Wolters Kluwer Health, Philadelphia 2019
- Pearson FG, Patterson GA (Hrsg.): *Pearson's thoracic & esophageal surgery*. 3. Auflage; Churchill Livingstone/Elsevier, Philadelphia 2008
- Pilarsky C, Wenzig M, Specht T, Saeger HD, Grützmann R (2004): Identification and Validation of Commonly Overexpressed Genes in Solid Tumors by Comparison of Microarray Data. *Neoplasia* 6, 744–750
- Pines J, Hunter T (1989): Isolation of a Human Cyclin cDNA: Evidence for Cyclin mRNA and Protein Regulation in the Cell Cycle and for Interaction with p34cdc2. *Cell* 58, 833–846
- Radhakrishnan SK, Bhat UG, Hughes DE, Wang IC, Costa RH, Gartel AL (2006): Identification of a Chemical Inhibitor of the Oncogenic Transcription Factor Forkhead Box M1. *Cancer Res* 66, 9731–9735
- Rea F, Marulli G, Girardi R, Bortolotti L, Favaretto A, Galligioni A, Sartori F (2004): Long-term survival and prognostic factors in thymic epithelial tumours. *Eur J Cardiothorac Surg* 26, 412–418
- Rechler MM, Nissley SP (1985): The Nature and Regulation of the Receptors for Insulin-Like Growth Factors. *Annu Rev Physiol* 47, 425–442
- Remon J, Girard N, Mazieres J, Dansin E, Pichon E, Grellier L, Dubos C, Lindsay CR,

- Besse B (2016): Sunitinib in patients with advanced thymic malignancies: Cohort from the French RYTHMIC network. *Lung Cancer* 97, 99–104
- Rena O, Papalia E, Maggi G, Oliaro A, Ruffini E, Filosso P, Mancuso M, Novero D, Casadio C (2005): World Health Organization histologic classification: An independent prognostic factor in resected thymomas. *Lung Cancer* 50, 59–66
- Ruffini E, Van Raemdonck D, Detterbeck F, Rocco G, Thomas P, Venuta F (2011): Management of Thymic Tumors: A Survey of Current Practice among Members of the European Society of Thoracic Surgeons. *J Thorac Oncol* 6, 614–623
- Scaltriti M, Elkabets M, Baselga J (2016): Molecular Pathways: AXL, a Membrane Receptor Mediator of Resistance to Therapy. *Clin Cancer Res* 22, 1313–1317
- Shen H, Fang Y, Dong W, Mu X, Liu Q, Du J (2012): IGF-1 receptor is down-regulated by sunitinib induces MDM2-dependent ubiquitination. *FEBS Open Bio* 2, 1–5
- Shin DM, Walsh GL, Komaki R, Putnam JB, Nesbitt J, Ro JY, Shin HJ, Ki KH, Wimberly A, Pisters KMW, et al. (1998): A Multidisciplinary Approach to Therapy for Unresectable Malignant Thymoma. *Ann Intern Med* 129, 100–104
- Siddik ZH (2003): Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 22, 7265–7279
- Smart S, Vasileiadi E, Wang X, DeRyckere D, Graham D (2018): The Emerging Role of TYRO3 as a Therapeutic Target in Cancer. *Cancers* 10, 474
- Soria JC, Jang SJ, Khuri FR, Hassan K, Liu D, Hong WK, Mao L (2000): Overexpression of Cyclin B1 in Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer and Its Clinical Implication. *Cancer Res* 60, 4000–4004
- Spaggiari L, Casiraghi M, Guarize J (2012): Multidisciplinary treatment of malignant thymoma. *Curr Opin Oncol* 24, 117–122
- Stewart CE, Rotwein P (1996): Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol Rev* 76, 1005–1026
- Ströbel P, Bauer A, Puppe B, Kraushaar T, Krein A, Toyka K, Gold R, Semik M, Kiefer R, Nix W, et al. (2004): Tumor Recurrence and Survival in Patients Treated for Thymomas and Thymic Squamous Cell Carcinomas: A Retrospective Analysis. *J Clin Oncol* 22, 1501–1509
- 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–S290

- Suk Park M, Young Chung K, Dong Kim K, Ick Yang W, Ho Chung J, Sam Kim Y, Chang J, Hang Kim J, Kyu Kim S, Kyu Kim S (2004): Prognosis of thymic epithelial tumors according to the new World Health Organization histologic classification. *Ann Thorac Surg* 78, 992–998
- 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 W, Brambilla E, Müller-Hermelink H, Harris C: World Health Organisation classification of tumors. Pathology and genetics of tumors of the lung, thymus and heart. IARC Press, Lyon 2004
- Travis W, Brambilla E, Burke A, Marx A, Nicholson A: WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. 4. Auflage; IARC Press, Lyon 2015
- Vella LA, Yu M, Phillips AB, Finn OJ (2009): Cyclin B1 Vaccine Delays Spontaneous Tumors: Immunity against Cyclin B1 Tumor Antigen Delays Development of Spontaneous Cyclin B1-Positive Tumors in p53^{-/-} Mice. *Ann N Y Acad Sci* 1174, 68–73
- Venuta F, Anile M, Diso D, Vitolo D, Rendina EA, De Giacomo T, Francioni F, Coloni GF (2010): Thymoma and thymic carcinoma. *Eur J Cardiothorac Surg* 37, 13–25
- Vouri M, Hafizi S (2017): TAM Receptor Tyrosine Kinases in Cancer Drug Resistance. *Cancer Res* 77, 2775–2778
- Wang X, Wong SCH, Pan J, Tsao SW, Fung KHY, Kwong DLW, Sham JST, Nicholls JM (1998): Evidence of Cisplatin-induced Senescent-like Growth Arrest in Nasopharyngeal Carcinoma Cells. *Cancer Res* 58, 5019–5022
- Wittekind C (Hrsg.): TNM Klassifikation maligner Tumore. 8. Auflage; Wiley-VCH, Weinheim 2017
- Wright CD, Wain JC, Wong DR, Donahue DM, Gaissert HA, Grillo HC, Mathisen DJ (2005): Predictors of recurrence in thymic tumors: Importance of invasion, World Health Organization histology, and size. *J Thorac Cardiovasc Surg* 130, 1413–1421
- Yamakawa Y, Masaoka A, Hashimoto T, Niwa H, Mizuno T, Fujii Y, Nakahara K (1991): A tentative tumor-node-metastasis classification of thymoma. *Cancer* 68, 1984–1987
- Yao KM, Sha M, Lu Z, Wong GG (1997): Molecular Analysis of a Novel Winged Helix Protein, WIN - Expressio pattern, DNA, binding property, and alternative splicing within the DNA binding domain. *J Biol Chem* 272, 19827–19836
- Yin H, Du J, Lu Z, Jiao X, Wang J, Zhou X (2009): The Correlation of the World Health Organization Histologic Classification of Thymic Epithelial Tumors and Its Prognosis: A Clinicopathologic Study of 108 Patients From China. *Int J Surg Pathol* 17, 255–261

- Yoh K, Goto K, Ishii G, Niho S, Ohmatsu H, Kubota K, Kakinuma R, Nagai K, Suga M, Nishiwaki Y (2003): Weekly chemotherapy with cisplatin, vincristine, doxorubicin, and etoposide is an effective treatment for advanced thymic carcinoma. *Cancer* 98, 926–931
- Yokoi K, Matsuguma H, Nakahara R, Kondo T, Kamiyama Y, Mori K, Miyazawa N (2007): Multidisciplinary Treatment for Advanced Invasive Thymoma with Cisplatin, Doxorubicin, and Methylprednisolone. *J Thorac Oncol* 2, 73–78
- Yuan J, Yin Z, Tao K, Wang G, Gao J (2018): Function of insulin-like growth factor 1 receptor in cancer resistance to chemotherapy (Review). *Oncol Lett* 15, 41–47
- Zhao F, Lam EWF (2012): Role of the forkhead transcription factor FOXO-FOXM1 axis in cancer and drug resistance. *Front Med* 6, 376–380
- Zhou J, Wang Y, Wang Y, Yin X, He Y, Chen L, Wang W, Liu T, Di W (2014): FOXM1 Modulates Cisplatin Sensitivity by Regulating EXO1 in Ovarian Cancer. *PLoS ONE* 9, e96989
- Zona S, Bella L, Burton MJ, Nestal de Moraes G, Lam EWF (2014): FOXM1: An emerging master regulator of DNA damage response and genotoxic agent resistance. *Biochim Biophys Acta* 1839, 1316–1322
- Zucali PA, Petrini I, Lorenzi E, Merino M, Cao L, Di Tommaso L, Lee HS, Incarbone M, Walter BA, Simonelli M, et al. (2010): Insulin-like growth factor-1 receptor and phosphorylated AKT-serine 473 expression in 132 resected thymomas and thymic carcinomas. *Cancer* 116, 4686–4695

Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Philipp Ströbel für die Bereitstellung des Themas sowie die Möglichkeit Einblicke in Forschung und Laborarbeit zu erhalten.

Darüber hinaus möchte ich Stefan Küffer danken, der mir als direkter Ansprechpartner im Labor jederzeit zur Seite stand.