

**Charakterisierung genetischer Aberrationen in T-Zell Neoplasien
und Einfluss der epigenetischen Modulatoren SETD2 und EZH2 auf
Tumorwachstum und Chemotherapeutikaresistenz**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt bei der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von
Frau Elisabeth Groß

Gutachter

1. Prof. Dr. Guido Posern
2. Prof. Dr. Ralf Benndorf
3. Prof. Dr. Marco Herling

Datum der öffentlichen Verteidigung: 30.04.2024

Für meine Familie

„Growth is life, and life is forever destined to make for light.”

Jack London – White Fang

Zusammenfassung

In der vorgelegten Arbeit wurden in einer Kohorte von monomorphen epitheliotropen intestinalen T-Zell Lymphomen, die sich innerhalb der Entitäten peripherer T-Zell Lymphome durch besonders schlechte Überlebensdaten und hohe Chemotherapieresistenz auszeichnen, genomische Veränderungen analysiert. Dabei habe ich entitätstypische Aberrationen im proliferationsstrebenden Signalweg der Januskinasen (JAK) und *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT) Transkriptionsfaktoren sowie Mutationen, die zu einem Verlust von *Suppressor of variegation 3-9, Enhancer of zeste, and Trithorax Domain Containing 2, Histone Lysine Methyltransferase* (SETD2) führen, gefunden. Der SETD2 Verlust ist in einigen Tumorentitäten bekannt und das Protein gilt als Tumorsuppressor mit Einfluss auf die DNA-Reparatur. Es ist bisher keine mechanistische Aufklärung der hohen Entitätsspezifität, insbesondere in Hinsicht auf mögliche nötige zweite treibende Mutationen erfolgt. In der vorliegenden Arbeit konnte ich in Zelllinienmodellen zeigen, dass es durch den Verlust von SETD2 zu einer Modulation der Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika durch gestörte Reparatur von DNA-Schäden kommt. Allerdings führte ein isolierter SETD2 zu einer verlangsamten Proliferation und stellt damit abhängig vom Zellhintergrund einen Nachteil dar. Mittels gezielter Aktivierung des JAK/STAT Signalweges habe ich gezeigt, dass der Proliferationsnachteil des SETD2 Verlusts durch die proliferationsfördernde Signalkaskade *in vitro* überwunden werden kann und somit demonstriert, wie der Verlust von SETD2 abhängig vom zellulären Hintergrund zur Tumorentwicklung in bestimmten Entitäten beitragen kann. Ein weiterer epigenetischer Modulator, für den in verschiedenen Tumorentitäten Alterationen bekannt sind, die zum Tumorwachstum beitragen, ist die Histonmethyltransferase *Enhancer of Zeste Homolog 2* (EZH2). Es wurden verschiedene Inhibitoren entwickelt, die bisher nicht hinsichtlich möglicher negativer Effekte analysiert wurden. In der vorgelegten Arbeit habe ich gezeigt, dass EZH2 in T-Zell Neoplasien hoch exprimiert und funktional ist. Das bietet die Rationale des Einsatzes spezifischer Inhibitoren. Ich habe jedoch aufgedeckt, dass die EZH2 Inhibition oder der Verlust von EZH2 keinen Einfluss auf die Zellproliferation in Tumorzelllinien mit T-Zell Hintergrund haben. Zudem habe ich gezeigt, dass unter EZH2 Inhibition mittels *S*-Adenosylmethionin (SAM) kompetitiver Inhibitoren eine Erhöhung der Resistenz gegenüber dem typischen Medikament Oxaliplatin induziert wird. Ich konnte beweisen, dass es sich um einen EZH2-unabhängigen Nebeneffekt handelt, der spezifisch für SAM-kompetitive EZH2 Inhibitoren ist. Die Resistenz wurde auf einen verstärkten Efflux durch die Erhöhung der Expression der *Sterol Regulatory Element Binding Factor 1 und 2* sowie der *ATP Binding Cassette* Transporter G1 und 2 zurückgeführt. Durch eine gleichzeitige Inhibition ebendieser wurde die Induktion der Resistenz gegenüber Oxaliplatin mittels SAM-kompetitiver EZH2 Inhibitoren verringert und somit ein Mechanismus, der zur Erhöhung der Oxaliplatinresistenz mittels SAM-kompetitiver EZH2 Inhibitoren führt, demonstriert.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1 Periphere T-Zell Lymphome und T-Zell Leukämien.....	1
1.2 Regulation der Transkription eukaryotischer Gene.....	3
1.2.1 Transkriptionsfaktoren.....	3
1.2.2 Epigenetische Modulation	4
1.2.2.1 DNA-Methylierung.....	5
1.2.2.2 Histonmodifikationen.....	5
1.3 SETD2	6
1.4 EZH2	7
1.5 Zielsetzung	9
2. Material.....	11
2.1 Chemikalien, Puffer und Kits.....	11
2.2 Allgemeine Materialien.....	13
2.3 Oligodesoxynukleotide.....	13
2.4 Zelllinien	15
2.5 Antikörper	15
2.6 Geräte und Software.....	16
2.7 Datenbanken	18
3. Methoden.....	19
3.1 Zellkulturmethoden	19
3.1.1 Suspensionszellkultur	19
3.1.2 Zellkultur adhärenter Zellen	19
3.1.3 Gewinnung von Zellproben	19
3.1.4 Zellviabilitätsassay	20
3.1.5 Inkubationen zur Expressionsanalyse	20
3.1.5 Wachstumskinetik.....	21

3.1.7 Transduktion	21
3.2 Molekularbiologische Methoden	22
3.2.1 <i>Next Generation</i> Sequenzierung und Expressionsanalyse von Proben aus Formalinfixiertem, Paraffin-eingebettetem Gewebe	22
3.2.2 Analyse kurzer Insertionen und Deletionen der MEITL Kohorte	23
3.2.3 Verifikation von Mutationen mittels Sangersequenzierung	23
3.2.4 Datenbankanalyse des Mutationsstatus von Zelllinien	24
3.2.5 <i>Next Generation</i> mRNA-Sequenzierung.....	24
3.2.6 Reverse Transkription-quantitative Polymerasekettenreaktion	25
3.2.7 Proteinisolationmethoden, SDS-PAGE und Westernblot	27
3.2.8 Expressionsanalyse von Patientenproben.....	28
3.3 Durchflusszytometrische Verfahren.....	28
3.3.1 Analyse der DNA-Damage-Response	28
3.3.2 Validierung der GFP-Positivität transduzierter Zelllinien	30
3.3.3 Analyse von Apoptose und Nekrose	30
3.3.4 Zellzyklusanalyse	31
3.4 Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma	32
3.5 Statistische Analysen	32
4. Ergebnisse.....	33
4.1 Mutationsanalyse MEITL.....	33
4.2 SETD2	38
4.2.1 Mutationsstatus, SETD2 mRNA Expression und basale H3K36 Trimethylierung in Zelllinienpanel von T-Zell Neoplasien.....	38
4.2.2 Einfluss von SETD2 Verlust auf das Wachstum von T-Zell Neoplasien.....	41
4.2.3 Einfluss von SETD2 Verlust auf Chemotherapieansprechen von T-Zell Neoplasien....	43
4.2.4 Einfluss von SETD2 Verlust auf Funktionalität der <i>DNA-Damage-Response</i>	44
4.2.5 Zusätzliche Aktivierung proliferationstreibender Signalwege verschiebt den Einfluss des SETD2 Verlusts zum potenziellen Wachstumsvorteil	47
4.3 EZH2	52
4.3.1 Mutationsstatus und basale mRNA- und Proteinexpression von EZH1, EZH2 und H3K27 Trimethylierung in Zelllinienpanel von T-Neoplasien	52

4.3.2 Einfluss von EZH2 Inhibition und Knockdown auf Wachstum von T-Zell Neoplasien ..	55
4.3.3 Einfluss von EZH2 Inhibition und Knockdown auf Chemotherapieansprechen von T-Zell Neoplasien.....	57
4.3.4 Mechanistische Analyse der Erhöhung der Oxaliplatinresistenz unter EZH2 Inhibition	62
4.3.5 Analyse transkriptioneller Veränderungen.....	65
4.3.6 Zusätzliche Inhibition von <i>Sterol Regulatory Element</i> Bindenden Proteinen oder ABC Transporter verringert die Erhöhung der Oxaliplatinresistenz unter EZH2 Inhibition.....	69
5. Diskussion	71
5.1 SETD2	72
5.2 EZH2	77
5.3 Limitationen und Ausblick	84
7. Literaturverzeichnis.....	88
Anhang	VIII

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin
ABCG1/2	ATP- <i>Binding Cassette</i> Subfamilie G 1/2
ABL1/2	<i>Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene</i> Homolog 1/2
Adj. p-Wert	Adjustierter p-Wert (Überschreitungswahrscheinlichkeit)
ALCL, ALK+/-	Anaplastisches Großzelliges Lymphom, Anaplastische Lymphomkinase positiv/negativ
AML	Akute Myeloische Leukämie
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
BMI1	<i>B Lymphoma Mo-MLV Insertion Region 1</i> Homolog
BSA	Bovines Serumalbumin
CBX2/4/6/7/8	<i>Chromobox Protein</i> Homolog 2/4/6/7/8
CCLE	<i>Cancer Cell Line Encyclopedia</i>
ccRCC	Klarzelliges Nierenzellkarzinom
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CHO(E)P	Cyclophosphamide, Doxorubicin/ Hydroxydaunorubicin, Vincristin/ Oncovin, (Etoposid,) Prednisolon
chr	Chromosom
Cosmic	<i>Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer</i>
CTCL	Kutanes T-Zell Lymphom
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenyl-indol
dbSNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism Database</i>
DLBCL	Diffuses Großzelliges B-Zell Lymphom
dNTPs	desoxyNukleosidTriPhosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
DZ	Durchflusszytometrie
DZNep	3-Deazaneplanocin A
EATL	Enteropathie-assoziierte Intestinale T-Zell Lymphome
EED	<i>Embryonic Ectoderm Development</i>
ETP	<i>Early T-Cell Precursor</i>
EZH1/2	<i>Enhancer of Zeste</i> Homolog 1/2
FBS	Fetales Bovines Serum
FFPE	Formalin-fixiertes, Paraffin-eingebettetes Gewebe
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

FS	<i>Frameshift</i> Mutation
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
γH2AX	Histon H2AX, an Serin 139 phosphoryliert
GoF	<i>Gain-of-function</i> Mutation
H3	Histon 3
H3K27me3	Trimethylierung des Lysin 27 von Histon 3
H3K36me3	Trimethylierung des Lysin 36 von Histon 3
hg19	Humanes Referenzgenom 19
HSA	<i>Highest Single Agent</i>
HSTCL	Hepatosplenisches T-Zell Lymphom
IC ₁₀	Konzentration bei 10 %iger Reduktion der Zellviabilität
IC ₅₀	Konzentration bei halbmaximaler Reduktion der Zellviabilität
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma
IHC	Immunhistochemie
ITK	Interleukin 2 induzierbaren T-Zell Kinase
JAK1/3	Januskinase 1/3
KD	Knockdown
KRAS	Kirsten <i>Rat Sarcoma</i> Virus
LoF	<i>Loss-of-function</i> Mutation
MEITL	Monomorphes Epitheliotropes Intestinales T-Zell Lymphom
MLL1	<i>Mixed Lineage Leukemia</i> 1
NK	Natürlichen Killerzellen
MMLV RT	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i> Reverse Transkriptase
NCBI	<i>National Center for Biotechnology</i>
n.m.	nicht messbar
n.s.	nicht signifikant
NS	<i>Nonsense</i> Mutation
RBBP4	<i>Retinoblastoma-Binding Protein</i> 4
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBST	PBS mit 0,1 % Tween® 20
PCGF2	<i>Polycomb Group RING Finger Protein</i> 2
PCR	Polymerasekettenreaktion
PHC1/2/3	<i>Polyhomeotic-like Protein</i> 1/2/3
PTCL	Periphere T-Zell Non-Hodgkin Lymphome
RING1/2	<i>Really Interesting New Gene</i> 1/2
RIPA	Radioimmunopräzipitation Assay
PRC2	<i>Polycomb Repressive Complex</i> 2

RT-qPCR	Reverse Transkription quantitative Polymerasekettenreaktion
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
SCMH1	<i>Sex Comb on Midleg</i> Homolog 1
SCML2	<i>Sex Comb on Midleg-like</i> 2
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
SETD2	<i>Suppressor of variegation 3-9, Enhancer of zeste, and Trithorax Domain Containing 2, Histone Lysine Methyltransferase</i>
shRNA	<i>Short hairpin</i> RNA
SREBF1/2	<i>Sterol Regulatory Element Binding Factor</i> 1/2
SREBP1/2	<i>Sterol Regulatory Element Binding Protein</i> 1/2
STAT1/3/5	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i> 1/3/5
SUZ12	<i>Suppressor of Zeste</i> 12 Homolog
SYK	<i>Spleen</i> Tyrosinkinase
T-ALL	T-Zell Akute Lymphatische Leukämie
TBST	Tris-gepufferter Salzlösung mit 0,1 % Tween® 20
TEL	Translokation-ETS-Leukämie
TIA-1	T-Zell intrazelluläres Antigen 1
TP53	<i>Tumor Protein</i> P53
VAF	Variante Allelfrequenz
VHL	von Hippel-Lindau
WB	Westernblot
WES	Exomsequenzierung
WT	Wildtypisch

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Chemikalienliste.	11
Tabelle 2	Liste allgemeiner Materialien.	13
Tabelle 3	Primersequenzen zur Sangersequenzierung.	13
Tabelle 4	Zielsequenzen der shRNA für SETD2 oder EZH2 Knockdown.	14
Tabelle 5	RT-qPCR Primersequenzen.	14
Tabelle 6	Quelle und RRID der genutzten Zelllinien.	15
Tabelle 7	Antikörperliste.	15
Tabelle 8	Geräteliste und verwendete Software.	16
Tabelle 9	Liste genutzter Datenbanken.	18
Tabelle 10	Oxaliplatinkonzentration bei 10 %iger Reduktion der Zellviabilität unter Monotherapie.	21
Tabelle 11	Reaktionsansatz inklusive Programm der PCR zur Sangersequenzierung.	23
Tabelle 12	Reaktionsansatz inklusive Programm der reversen Transkription.	25
Tabelle 13	Reaktionsansatz der quantitativen PCR zur Amplifikation spezifischer cDNA-Fragmente.	26
Tabelle 14	Programm der quantitativen PCR zur Amplifikation spezifischer cDNA-Fragmente.	26
Tabelle 15	Doxorubicinkonzentration bei halbmaximaler Reduktion der Zellviabilität unter Monotherapie.	29
Tabelle 16	Oxaliplatinkonzentration bei halbmaximaler Reduktion der Zellviabilität unter Monotherapie.	30
Tabelle 17	Charakteristika der MEITL Kohorte.	33
Tabelle 18	Mutationsanalyse des SETD2 Hintergrundes und des JAK/STAT Signalweges der genutzten Zelllinien.	39
Tabelle 19	Mutationsanalyse der Zelllinie Caki2.	40
Tabelle 20	Mutationsanalyse der PRC2 Komponenten der genutzten Zelllinien.	52
Tabelle 21	Chromosomenabschnitte und korrespondierende Gene der zielgerichteten Sequenzierung.	VIII
Tabelle 22	Mutations- und Expressionsanalyse der genutzten Zelllinien.	XIX
Tabelle 23	Signifikant regulierte Gene der RNA Sequenzierung unter GSK126 im Vergleich zu Oxaliplatin behandelte Zellen.	XXVII
Tabelle 24	Signifikant regulierte Signalwege der RNA Sequenzierung unter GSK126 im Vergleich zu Oxaliplatin behandelte Zellen.	XXIX

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schematische Darstellung epigenetischer Modifikationen mit den zugehörigen verantwortlichen Proteinklassen.	4
Abbildung 2	Mutationsanalyse der MEITL Kohorte.	34
Abbildung 3	H3K36me3 Expression in der MEITL Kohorte.	35
Abbildung 4	Korrelation von EZH2 und H3K27me3 Expression in der MEITL Kohorte.	36
Abbildung 5	Lokalisation und Art der gefundenen Mutationen in der MEITL Kohorte.	37
Abbildung 6	Basale Charakterisierung des SETD2 Hintergrundes.	40
Abbildung 7	Basale Charakterisierung des SETD2 Hintergrundes von Caki2.	41
Abbildung 8	Etablierung des SETD2 Knockdowns.	42
Abbildung 9	Verdopplungszeiten unter SETD2 Knockdown.	43
Abbildung 10	SETD2 Knockdown beeinflusst die Sensitivität gegenüber Doxorubicin und Etoposid.	44
Abbildung 11	Analyse der Anzahl der Mutationen und kurzer Insertionen und Deletionen unter SETD2 Verlust.	45
Abbildung 12	Analyse der DNA-Damage-Response unter SETD2 Knockdown.	46
Abbildung 13	Analyse der Zellzyklusveränderungen unter SETD2 Knockdown.	46
Abbildung 14	Etablierung des SETD2 Knockdowns der ITK- und TEL-SYK getriebenen Zelllinien.	47
Abbildung 15	Validierung der ITK- und TEL-SYK Expression und STAT5 Aktivierung.	48
Abbildung 16	Verdopplungszeiten unter SETD2 Knockdown der ITK- und TEL-SYK getriebenen Zelllinien.	49
Abbildung 17	SETD2 Knockdown erhöht die Resistenz gegenüber Doxorubicin und Etoposid der ITK- und TEL-SYK getriebenen Zelllinien.	50
Abbildung 18	Analyse der DNA-Damage-Response unter SETD2 Knockdown der ITK- und TEL-SYK getriebenen Zelllinien.	51
Abbildung 19	Basale Charakterisierung des EZH2 Hintergrundes.	54
Abbildung 20	Einfluss der EZH2 Inhibition auf die Zellviabilität.	56
Abbildung 21	Etablierung des EZH2 Knockdowns.	57
Abbildung 22	Verdopplungszeit unter EZH2 Knockdown.	57
Abbildung 23	Der SAM-kompetitive EZH2 Inhibitor GSK126 moduliert die Sensitivität gegenüber in der Behandlung von PTCL eingesetzten Therapeutika.	58

Abbildung 24	SAM-kompetitive EZH2 Inhibitoren erhöhen die Resistenz gegenüber Oxaliplatin.	59
Abbildung 25	Die Reduktion der Oxaliplatinsensitivität durch den SAM-kompetitive EZH2 Inhibitor GSK126 bleibt bei längerer Inkubation bestehen.	60
Abbildung 26	Syngiematrices für Oxaliplatin und entweder GSK126 oder EPZ6438.	61
Abbildung 27	EZH2 Knockdown beeinflusst die Sensitivität gegenüber Oxaliplatin nicht.	62
Abbildung 28	Analyse der Deregulation des Zellzyklus unter pharmakologischer EZH2 Inhibition.	63
Abbildung 29	Analyse der Induktion von Apoptose und Nekrose unter pharmakologischer EZH2 Inhibition.	64
Abbildung 30	Analyse des intrazellulären Platingehalts.	65
Abbildung 31	Analyse transkriptioneller Veränderungen unter pharmakologischer EZH2 Inhibition mittels mRNA-Sequenzierung.	66
Abbildung 32	Validierung der mittels mRNA-Sequenzierung gefundener Gene sowie Analyse transkriptioneller Veränderungen unter EZH2 Knockdown.	68
Abbildung 33	Konsequente GSK126 Inkubation und Oxaliplatinviabilitätsassay.	69
Abbildung 34	Verringerung der GSK126-induzierten Effekte durch simultane Inhibition SRE bindender Proteine oder ABC Transporter.	70
Abbildung 35	Zelluläre Veränderungen unter SETD2 Verlust.	76
Abbildung 36	Aufgedeckter Mechanismus der Induktion der Oxaliplatinresistenz unter pharmakologischer EZH2 Inhibition.	83
Abbildung 37	Validierung der Funktionalität und Spezifität der Primer zur Sangersequenzierung.	XXX
Abbildung 38	Lokalisation und Art der gefundenen SETD2, JAK und STAT Mutationen in den Zelllinien.	XXXI
Abbildung 39	Validierung der Funktionalität und Spezifität der Primer zur SETD2 Expressionsanalyse mittels qPCR.	XXXI
Abbildung 40	Biologische Replikate der basalen Expressionsanalyse auf Proteinebene.	XXXII
Abbildung 41	Biologische Replikate des SETD2 Knockdown Nachweises auf Proteinebene.	XXXII

Abbildung 42	Beispielhafte Darstellung der Gatingstrategie der DNA-Damage-Response.	XXXIII
Abbildung 43	Biologische Replikate des SETD2 Knockdown Nachweises auf Proteinebene der ITK- und TEL-SYK getriebenen Zelllinien.	XXXIV
Abbildung 44	Beispielhafte Darstellung der Gatingstrategie der Validierung der GFP-Positivität.	XXXIV
Abbildung 45	Beispielhafte Darstellung der durchflusszytometrischen Ergebnisse der Validierung der GFP-Positivität.	XXXV
Abbildung 46	Biologische Replikate des Nachweises der STAT5 Aktivierung ITK- und TEL-SYK getriebener Zelllinien.	XXXVI
Abbildung 47	Verdopplungszeiten der ITK- und TEL-SYK getriebenen Zelllinien im Vergleich zur GFP-Kontrollzelllinie.	XXXVI
Abbildung 48	Lokalisation und Art der gefundenen Mutationen von PRC2 Komponenten in den Zelllinien.	XXXVII
Abbildung 49	Validierung der Funktionalität und Spezifität der Primer zur EZH1/2 Expressionsanalyse mittels qPCR.	XXXVII
Abbildung 50	Korrelation zwischen Ansprechen auf GSK126 und EZH1 Expression oder H3K27me3.	XXXVIII
Abbildung 51	Biologische Replikate des EZH2 Knockdown Nachweises auf Proteinebene.	XXXVIII
Abbildung 52	Biologische Replikate des Nachweises der Funktionalität der pharmakologischen EZH2 Inhibition auf Proteinebene.	XXXIX
Abbildung 53	Detaillierte Analyse des Screenings zur Sensitivitätsmodulation mittels pharmakologischer EZH2 Inhibition.	XXXIX
Abbildung 54	Beispielhafte Darstellung der Gatingstrategie der Zellzyklusanalyse.	XL
Abbildung 55	Beispielhafte Darstellung der Gatingstrategie der Analyse von Apoptose und Nekrose.	XLI
Abbildung 56	Validierung der Funktionalität und Spezifität der Primer zur SREBF1/2 und ABCG1/2 Expressionsanalyse mittels qPCR.	XLII
Abbildung 57	Biologische Replikate des Nachweises der Regulation von Zielproteinen durch den pharmakologischen EZH2 Inhibitor GSK126 auf Proteinebene.	XLII
Abbildung 58	Regulation des intrazellulären Platingehalts unter Fatostatin oder Glibenclamide Inkubation.	XLII

1. Einleitung

1.1 Periphere T-Zell Lymphome und T-Zell Leukämien

T-Zell Neoplasien umfassen eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, die sich stark im Reifungsgrad der zugrundeliegenden Zellen sowie in ihrer klinischen Präsentation, Pathobiologie und Prognose unterscheiden können (Alaggio et al. 2022). Unreife zellige T-Zell Leukämien beschreiben Tumorentitäten, die auf T-Zell Vorläuferzellen zurückzuführen sind und somit noch keine thymische Reifung durchlaufen haben. Reife zellige T-Zell Lymphome hingegen umfassen transformierte T-Zellen, die nach der thymischen Reifung entstanden sind. T-Zell Akute Lymphatische Leukämien (T-ALL) werden in mehrere Subentitäten unterteilt, die ein aggressives Wachstumsverhalten zeigen und anhand des Immunphänotyps und genetischer Aberrationen wie dem Vorhandensein verschiedener Fusionsproteine, die zur Deregulation des Homeobox A Transkriptionsfaktors führen, unterschieden werden (Arber et al. 2022). Im Erwachsenenalter umfassen T-ALL etwa 25 % aller lymphatischen Leukämien (Swerdlow et al. 2008). Neben der kortikalen T-ALL wird besonders die Subentität der *Early T-Cell Precursor* (ETP) ALL unterschieden. Letztere hat mit einer 5-jährigen Überlebensrate von etwa 13 bis 34 % im Vergleich zu 62 % eine deutlich schlechtere Prognose (Ma et al. 2012; Marks et al. 2009; van Vlierberghe et al. 2013).

Periphere T-Zell Non-Hodgkin Lymphome (PTCL) sind eine Gruppe seltener Tumorentitäten, die eine ungünstige Prognose aufgrund begrenzter Therapiemöglichkeiten haben (Alaggio et al. 2022; Gisselbrecht et al. 1998). Es werden nodale, extranodale und leukämische Subtypen unterschieden, wobei etwa zwei Drittel durch primär-nodale und ein Drittel durch primär-extranodale Typen gebildet werden (Feller u. Diebold 2004b; Feller u. Diebold 2004a). Diese unterscheiden sich zum Teil stark in ihrer Prognose sowie dem Ansprechen auf etablierte Chemotherapeutika und müssen deshalb detailliert als Entitäten betrachtet werden.

Die am häufigsten in der Haut auftretenden Lymphome sind kutane T-Zell Lymphome (CTCL) (Rangoonwala u. Cascella 2022). Die Prognose ist vergleichsweise gut mit einer 5-jährigen Überlebensrate von etwa 52 bis 74 % (Agar et al. 2010; Scarisbrick et al. 2015).

Eine der häufigsten primär nodalen PTCL sind Anaplastisch-großzellige Lymphome (ALCL). Es werden verschiedene Subtypen unterschieden. Neben den Typen primär kutane ALCL und Brustimplantat-assoziierte ALCL gibt es systemische ALCL, welche weiterhin abhängig vom Vorhandensein einer aktivierend wirkenden Translokation im Anaplastische Lymphomkinase (ALK) Gen in ALCL, ALK positiv (ALCL, ALK+) und ALCL, ALK negativ (ALCL, ALK-) unterteilt wird. ALCL umfassen etwa 2 % aller Lymphome und haben mit einer 70 %igen 5-jährigen Überlebensrate eine relativ gute Prognose (Ferreri et al. 2013; Alotaibi et al. 2021; Vose et al. 2008). Die Prognose der Unterpopulation der ALCL, ALK- hingegen ist mit einem 5-jährigen Überleben von 49 % geringer (Vose et al. 2008).

Zu den primär extranodalen, nicht primär leukämischen und nicht primär kutanen PTCL gehört unter anderem das Hepatosplenische T-Zell Lymphom (HSTCL). Sie gehören weiterhin zu einer Subgruppe von peripheren T-Zell Lymphomen, die einen $\gamma\delta$ T-Zell Rezeptor tragen. Es handelt sich um eine seltene Art Lymphom, die hauptsächlich junge Patienten betrifft, ein schnelles Tumorwachstum zeigt und eine schlechte Prognose mit einem 5-jährigen Überleben von weniger als 10 % hat (Nosari et al. 1999; Pro et al. 2020; Vose et al. 2008).

Eine seltene Entität von extranodalen PTCL, die im Intestinum auftritt, mit Zöliakie in Verbindung steht und vermehrt in Nordeuropa auftritt, ist der Subtyp der Enteropathie-Assoziierten Intestinalen T-Zell Lymphome (EATL) (Delabie et al. 2011; Gough et al. 1962; Verbeek et al. 2008). Die mediane Überlebensrate umfasst zehn Monate und das 5-jährige Überleben 20 % (Delabie et al. 2011). Seit der Neuklassifikation peripherer T-Zell Lymphome durch die *World Health Organisation* 2016 wurden die vormals als EATL Typ I und Typ II bezeichneten Entitäten in Enteropathie-Assoziierte Intestinale T-Zell Lymphome und Monomorphe Epitheliotrope Intestinale T-Zell Lymphome (MEITL) aufgeteilt (Swerdlow et al. 2016). Da MEITL keinen Bezug zur Zöliakie haben und vermehrt im asiatisch stämmigen Raum auftreten, wurden sie als eigenständige Entität anerkannt (Tse et al. 2012). Die Prognose ist mit einer medianen Überlebensrate von sieben Monaten schlecht (Tan et al. 2013). Dies ist unter anderem auf das rasche Tumorwachstum und die hohe primäre Resistenz gegenüber etablierte Chemotherapeutika zurückzuführen (Muramoto et al. 2022; Cavalieri et al. 2021; Stojanoski et al. 2022).

Die MEITL Tumorzellen haben ein monomorphes Auftreten und exprimieren typischerweise die Oberflächenmarkern *Cluster of Differentiation* (CD) 8 und CD56 sowie den $\gamma\delta$ T-Zell Rezeptor häufiger als den $\alpha\beta$ T-Zell Rezeptor (Deleeuw et al. 2007; Chan et al. 2011). Auch Doppelnegativität für $\gamma\delta$ T-Zell Rezeptor und $\alpha\beta$ T-Zell Rezeptor wurden beschrieben (Afzal et al. 2020). Weiterhin können die Tumorzellen immunophänotypisch anhand der Positivität für die typischen Marker CD3 und T-Zell intrazelluläres Antigen 1 (TIA-1) sowie der Kombination $CD4^{\text{negativ}}CD8^{\text{positiv}}$ erkannt werden (Tse et al. 2012; Kasinathan 2021; Veloza et al. 2023). MEITL zeigen zudem charakteristische Mutationsmuster. Dazu zählen unter anderem Mutationen in *Ataxia Telangiectasia Mutated* (ATM), G-Protein gekoppelten Rezeptoren, sowie verschiedenen Vertretern des Januskinase (JAK)/ *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT) Signalwegs, welche das Tumorwachstum beeinflussen (Nairismägi et al. 2016; Roberti et al. 2016; Tomita et al. 2020).

Obwohl sich die Überlebensraten bei peripheren T-Zell Lymphomen verbessert haben, ist das 5-jährige Überleben weiterhin gering. Die Verbesserung der Prognose ist auch auf den Einsatz neuer Wirkstoffe wie spezifische Inhibitoren onkogener Proteine zurückzuführen (Ma et al. 2020b).

Die Erstlinientherapie umfasst meist das CHO(E)P Behandlungsregimen, welches sich aus Cyclophosphamide (C), Doxorubicin/ Hydroxydaunorubicin (H), Vincristin/ Oncovin (O), und Prednisolon (P) mit optionalem Etoposid (E) zusammengesetzt (Wilhelm et al. 2016). Bei transplantationsgeeigneten Patienten erfolgt meist eine konsolidierende autologe Stammzelltransplantation (d'Amore et al. 2012; Kim et al. 2007). Die Zweitlinientherapie hingegen basiert hauptsächlich auf Platinanaloga. Ein häufig in der Lymphomtherapie genutztes Medikament ist Oxaliplatin, ein Platinderivat der dritten Generation, welches von Cisplatin abgeleitet wurde (Kidani et al. 1978; Houot et al. 2022; Yao et al. 2013; Mounier et al. 2013). Obwohl es sich bei Oxaliplatin um ein seit mehr als 20 Jahren ursprünglich zur Anwendung bei kolorektalem Karzinom zugelassenes Medikament handelt, wird der Wirkmechanismus diskutiert (Ibrahim et al. 2004). Es wurden sowohl Hinweise für einen Mechanismus analog zu Cisplatin über DNA-Plattinierung sowie einen unabhängigen Mechanismus über ribosomalen Stress gefunden (Hah et al. 2007; Bruno et al. 2017). Biologisch junge Patienten erhalten bei identifiziertem geeigneten Spender eine konsolidierende allogene Stammzelltransplantation (Hopfinger et al. 2021).

1.2 Regulation der Transkription eukaryotischer Gene

Die Transkription eukaryotischer Gene wird in weiten Teilen durch Modulation der Initiation der RNA-Polymeration durch die RNA-Polymerase II bestimmt, welche für die Transkription Protein-kodierender Gene verantwortlich ist. Diese Regulation hat meist mehrere Ebenen von aktivierenden und reprimierenden Mechanismen.

Einen wichtigen Bestandteil bilden dabei die Promotoren Goldberg-Hogness-Box oder TATA-Box sowie Initiatorelement, die für eine erhöhte Bindungsaffinität der Untereinheit Transkriptionsfaktor IID des RNA-Polymerase II Präinitiationskomplex an die DNA sorgen (Lifton et al. 1978; Xi et al. 2007; Sawadogo u. Roeder 1985). Sequenzen eukaryotischer DNA, die zu einer Verstärkung der Transkription führen, werden *Enhancer* genannt. Diese liegen zum Teil weit vor dem Start der Transkription, können die Transkription jedoch ebenfalls regulieren. Dafür wird *DNA-Looping*, das Formen von DNA-Schleifen, um regulatorische Einheiten und Transkriptionstartsequenzen in räumliche Nähe zu bringen, verwendet (Matthews 1992; Cooper 2000).

1.2.1 Transkriptionsfaktoren

Sowohl Promotoren als auch Enhancer bilden Ansatzpunkte für Proteine, die die Aktivität der RNA-Polymerase II beeinflussen können. Diese werden Transkriptionsfaktoren genannt. Die Proteine erkennen exakte regulatorische Gensequenzen und wirken so nur auf spezifische Zielgene. Innerhalb der Transkriptionsfaktoren existieren sowohl aktivierend als auch reprimierend wirkende Proteine.

Transkriptionelle Aktivatoren haben aufgrund ihrer zentralen Rolle einen hohen Stellenwert in der Forschung. Sie bestehen mindestens aus einer DNA-Bindedomäne sowie einer Domäne, die über Interaktion mit dem RNA-Polymerase II Präinitiationskomplex zur Modulation der Aktivität der Polymerase II führt. Die DNA-Bindedomäne wird gebildet aus wiederkehrenden Motiven wie beispielsweise dem Zink-Finger-Motiv oder dem Helix-turn-Helix-Motiv (Brown et al. 1985; Qian et al. 1992). Die Aktivierungsdomänen hingegen sind weniger gut charakterisiert, können aber beispielsweise über eine hohe Anzahl negativ geladener Aminosäuren oder Prolin- und Glutaminresten für die Protein-Protein-Interaktion sorgen. Reprimierend wirkende Transkriptionsfaktoren wirken entweder indirekt, indem die Bindung des Aktivators oder der RNA-Polymerase II blockiert wird oder direkt über Protein-Protein-Interaktion analog zu transkriptionelle Aktivatoren. Auch in diesem Fall besteht eine große Variation von Motiven, beispielsweise Alanin-reiche oder Prolin-reiche Motive sowie Motive mit einer hohen Anzahl negativ geladener Reste (Licht et al. 1990; Kuhn et al. 2001).

1.2.2 Epigenetische Modulation

Epigenetische Modifikationen bewirken eine Verstärkung oder Erniedrigung der Transkriptionsrate und damit das Vorhandensein bestimmter Proteine in der Zelle, ohne dass genetische Mutationen auftreten oder Transkriptionsfaktoren die Aktivität der RNA-Polymerase II verändern. Stattdessen bewirken chemische Veränderungen an der DNA oder den DNA-assoziierten Histonen eine veränderte Transkription. Somit bilden sie eine zweite wichtige Instanz der Transkriptionskontrolle, die in der aktuellen Krebsforschung von wachsendem Interesse ist (Holliday 2006). Für die epigenetische Modulation sind verschiedene Mechanismen bekannt von denen eine Auswahl in Abbildung 1 gezeigt ist.

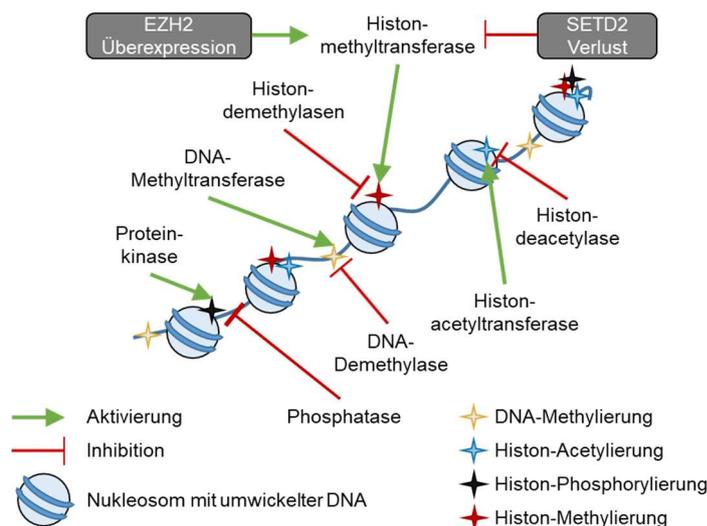


Abbildung 1 Schematische Darstellung epigenetischer Modifikationen mit den zugehörigen verantwortlichen Proteinklassen. Die Abbildung zeigt eine exemplarische Auswahl der bekannten epigenetischen Veränderungen. Der Einfluss der in der Arbeit analysierten, in Tumoren veränderten Histonmethyltransferasen SETD2 und EZH2 ist gekennzeichnet. Adaptiert nach Lai und Wang (Lai u. Wang 2021).

1.2.2.1 DNA-Methylierung

Die DNA kann an Kohlenstoff 5 des Cytosinrests durch DNA-Methyltransferasen methyliert werden, wodurch 5-Methylcytosin gebildet wird (Abb. 1). Dies tritt besonders gehäuft auf an Cytosin, das vor Guanin auftritt. Diese Struktur wird CpG-Dinukleotid genannt. Die DNA-Methylierung sorgt für verminderte Transkription, wenn sie in der Nähe des Promotors auftritt, da dort das Methyl-CpG-Bindende Protein 2 bindet und dadurch die Transkription unterdrückt. Ein Zusammenhang von aberranter DNA-Methylierung mit psychiatrischen und Autoimmunerkrankungen und Krebswachstum wurde gefunden, wobei die Relevanz des Mechanismus' abhängig vom beispielsweise zellulären Kontext unklar bleibt (Labonté et al. 2013; Greger et al. 1989; Quddus et al. 1993; Sutter u. Doerfler 1980; Sapozhnikov u. Szyf 2021; Pacis et al. 2019; Mutskov u. Felsenfeld 2004).

1.2.2.2 Histonmodifikationen

Die DNA eukaryotischer Zellen liegt gebunden an Vertreter der Proteinfamilie der Histone vor. Dabei werden 146 bp DNA um je zwei Moleküle Histon 2A, Histon 2B, Histon 3 und Histon 4 gewickelt und bilden so ein Nukleosom. An der DNA-Eintrittsstelle bindet zudem ein zusätzliches Molekül des Histon 1 (Kornberg 1977; Luger et al. 1997). Nukleosome werden weiter zu höheren Strukturen kondensiert, wodurch Chromatin gebildet wird. Modulation der Zugänglichkeit des Chromatins beeinflusst die Aktivität der RNA-Polymerase II deutlich, da Transkription nur an aufgelockertem Chromatin stattfinden kann.

Es existieren verschiedene Mechanismen der Histonmodifikationen (Abb. 1). Dazu zählen beispielsweise die Acetylierung oder Phosphorylierung. Diese können die Transkriptionsstärke durch Veränderung der Kondensation der DNA modulieren (Allfrey et al. 1964; Zhang et al. 2002; Dion et al. 2005; Chadee et al. 1999). Neben transkriptionellen Veränderungen kann auch die *DNA-Damage-Response* beeinflusst werden (Luo et al. 2000). Ein gut charakterisiertes Beispiel ist die Phosphorylierung des Serin 139 von Histon 2AX (γ H2AX). Diese Modifikation wird für verschiedene Arten der DNA-Reparatur wie homologe Rekombination oder der Reparatur von Doppelstrangbrüchen durch die Rekrutierung verschiedener Proteine, die für die Reparatur erforderlich sind, benötigt (Downs et al. 2000; Xie et al. 2007; Stucki et al. 2005). Aufgrund der weitreichenden Einflüsse werden Veränderungen der Histonacetylierung oder -Phosphorylierung mit maligner Transformation von Zellen in Zusammenhang gebracht (Ungerstedt et al. 2005; Lau et al. 2011; Strelkov u. Davie 2002; Skaland et al. 2007).

Ein weiterer Mechanismus zur Modulation der Zugänglichkeit des Chromatins ist die Histonmethylierung. Diese kann an Lysin- und Argininresten der Histone auftreten und abhängig von der Position des veränderten Rests kann mit der Methylierung sowohl Aktivierung, beispielsweise Lysin 4 an Histon 3, als auch Repression, beispielsweise Lysin 27 an Histon 3, der Transkription einhergehen. Lysinreste können mono-, di- oder trimethyliert

vorliegen, was unterschiedliche Auswirkungen auf die Transkription haben kann (Abbas et al. 2010; Shoaib et al. 2021; Schotta et al. 2004). Vertreter der Proteinfamilie der Protein Arginin Methyltransferasen sind für die Argininmethylierung und Histone Methyltransferasen für Lysinmethylierung verantwortlich. Aberrante Histonmethylierung wurde in Zusammenhang beispielsweise mit der Entwicklung von degenerativen Erkrankungen des Nervensystems, Herzkreislauferkrankungen und Neoplasien gebracht (Zheng et al. 2019; Wierda et al. 2015; Wang et al. 2007).

1.3 SETD2

Suppressor of variegation 3-9, Enhancer of zeste, and Trithorax Domain Containing 2, Histone Lysine Methyltransferase (SETD2) ist eine Histon Lysin Methyltransferase, die für die Trimethylierung des Lysin 36 des Histon 3 (H3K36me3) verantwortlich ist (Edmunds et al. 2008). Diese Histonmodifikation bewirkt die Aktivierung der Transkription von Zielgenen. SETD2 wurde erstmals als Interaktionspartner von Huntingtin beschrieben (Faber et al. 1998). Seine Funktion umfasst die Regulation der *DNA-Damage-Response* über die Aktivierung des Proteins ATM und die Bildung von präsynaptischen RAD51 Filamenten, sowie die Prozessierung von prä-mRNA über die Regulation des alternativen Spleißens (Carvalho et al. 2014; Simon et al. 2014).

SETD2 kann zudem Funktionen unabhängig von H3K36me3 übernehmen. Es ist erforderlich für die Aufrechterhalten der genomische Stabilität, die Interferonantwort durch direkte Methylierung von STAT1, sowie die stressinduzierte Apoptose über *Tumor Protein P53* (TP53) (Chiang et al. 2018; Chen et al. 2017; Carvalho et al. 2014).

Physiologisch ist eine hohe SETD2 Expression in hämatopoetischen und lymphoiden Vorläuferzellen nötig, da SETD2 für die T-Zell Rezeptor Umlagerung in Thymozyten sowie die Umlagerung der schweren Kette des Immunglobulins in B-Zellen benötigt wird (Ji et al. 2019). In malignen Zellen ist SETD2 als Tumorsuppressor beschrieben. Diese Funktion ist jedoch stark abhängig von der Tumorentität und dem genomischen Kontext. In akuter myeloischer Leukämie (AML) wirkt sich ein Verlust von SETD2 beispielsweise nachteilig auf das Tumorstadium durch Beförderung der Differenzierung aus (Skucha et al. 2018), aber in einem AML-Subtyp mit einem aktivierend wirkenden Fusionsprotein der Lysine Methyltransferase *Mixed Lineage Leukemia 1* (MLL1) führen SETD2 Mutationen mit Funktionsverlust hingegen zu einem verstärktem Tumorstadium und Chemotherapieresistenz (Zhu et al. 2014; Dong et al. 2019). Innerhalb der Gruppe der peripheren T-Zell Lymphome ist für die Entität HSTCL bekannt, dass ein SETD2 Verlust die Proliferation sowie die Bildung von Kolonien verstärkt und das Tumorstadium dementsprechend begünstigt (McKinney et al. 2017). In dieser Entität tritt der SETD2 Verlust in etwa 25 % aller Fälle auf (Pro et al. 2020). In der Literatur ist der Verlust von SETD2 und die subsequente Verringerung der H3K36 Trimethylierung auch in MEITL in bis zu 91 % aller

analysierten Fälle wiederholt beschrieben worden (Roberti et al. 2016; Moffitt et al. 2017; Huang et al. 2020; Tomita et al. 2020). Aufgrund der Häufung der SETD2 Mutationen wurde der Einfluss auf die MEITL Prognose evaluiert und SETD2 Verlust mit der Pathogenese von MEITL in Verbindung gebracht (Veloza et al. 2023). In soliden Tumoren wird der SETD2 Verlust ausschließlich im klarzelligen Nierenzellkarzinom (ccRCC) in etwa 13 % der Fälle beschrieben. Dieser SETD2 Verlust entsteht entweder durch den Verlust des Chromosomarms 3p³ oder durch somatische Mutationen im SETD2 Gens (The Cancer Genome Atlas Research Network 2013; Hsieh et al. 2018). Der SETD2 Verlust steht im Zusammenhang mit einer schlechteren Prognose und verstärkte Metastasierung (González-Rodríguez et al. 2020; Xie et al. 2022).

Es existieren zahlreichen deskriptiven sowie korrelativen Arbeiten zum SETD2 Verlust in den beschriebenen Tumorentitäten. Dennoch bleibt der molekulare Einfluss des SETD2 Verlusts auf die Entwicklung von Tumoren und besonders die hohe Entitätsspezifität unzureichend analysiert und bedarf detaillierter Analysen. Da im AML-Subtyp das proliferationstreibende MLL1 Fusionsprotein, in HSTCL und MEITL aktivierende JAK/STAT-Mutationen und in ccRCC der Verlust des Proteins von Hippel–Lindau (VHL), welcher ebenfalls zu vermehrter Proliferation führt, bekannt sind, kann man die Hypothese ableiten, dass eine zweite treibende Mutation zur Etablierung von Entitäten mit SETD2 Verlust nötig ist (Paulsen 2001).

1.4 EZH2

Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) ist eine der katalytisch aktiven Untereinheiten des *Polycomb Repressive Complex 2* (PRC2) (Cao et al. 2002). Seine als kanonisch bezeichnete Funktion umfasst die Trimethylierung des Lysin 27 des Histon 3 (H3K27me₃), die zur Inaktivierung der Transkription bestimmter Zielgene führt (Richly et al. 2011; McCabe et al. 2012). Des Weiteren ist für EZH2 eine PRC2-unabhängige, als nicht-kanonisch bezeichnete Funktion beschrieben, die die direkte Methylierung einzelner Zielproteine zur Folge hat (Lee et al. 2011). Die kanonische Signalweiterleitung von EZH2 kann teilweise durch das verwandte Protein *Enhancer of Zeste* Homolog 1 (EZH1) übernommen werden (Margueron et al. 2008). Neben dem PRC2 Komplex existiert auch der *Polycomb Repressive Complex 1* (PRC1), welcher ebenfalls eine reprimierende Wirkung auf die Gentranskription hat, jedoch andere Mechanismen nutzt (Wang et al. 2004). Die Bestandteile des PRC1 Komplexes sind weniger konserviert als die des PRC2 Komplexes (Levine et al. 2002). Der PRC2 Komplex besteht aus den Proteinen *Suppressor of Zeste 12* Homolog (SUZ12), *Embryonic Ectoderm Development* (EED), EZH1/2 und *Retinoblastoma-Binding Protein 4* (RBBP4) (Kuzmichev et al. 2002). Der PRC1 Komplex unterdrückt die Transkription von Zielgenen durch Monoubiquitylierung des Histon 2A, sowie durch die Inhibition des Umbaus des Nukleosoms und die Verdichtung des Chromatins (Pengelly et al. 2015; Francis et al. 2004; Shao et al. 1999). Der PRC2 Komplex hingegen bewirkt die Unterdrückung der Transkription von Zielgenen durch die Trimethylierung

des H3K27 und der Wirkmechanismus entspricht demnach der kanonischen EZH2 Funktion (Cao et al. 2002; Nekrasov et al. 2007). Diese Funktion steht auch in Zusammenhang mit dem Auftreten von Tumoren (Cao et al. 2008). Die Komplexe PRC1 und PRC2 führen nicht nur beide zur Repression der Transkription von Zielgenen, es wurde auch gezeigt, dass die *Polycomb Repressive* Komplexe bei der Ausübung der Funktion zusammenarbeiten und zum Teil voneinander abhängen (Kahn et al. 2016).

Im Kontext maligner Zellen verschiedener Entitäten wurde eine Überexpression, erhöhte Genkopiezahl von EZH2 oder aktivierende Punktmutationen wie *EZH2*^{Y641N} beschrieben (Kleer et al. 2003; Bachmann et al. 2006; Saramäki et al. 2006; Bödör et al. 2013). Des Weiteren steht das Protein im Verdacht, in die Tumorprogression von T-Zell Leukämien involviert zu sein (D'Angelo et al. 2015). Darüber hinaus wurde auch in reifzelligen T-Zell Lymphomen eine Überexpression von EZH2 beschrieben, die mit schlechteren Überlebensraten korreliert war (Zhang et al. 2020; Schümann et al. 2021). Dementsprechend wird auch die Inhibition von EZH2 als potentielle neue Therapie in T-Zell Lymphomen untersucht (Fiskus et al. 2009; Lue et al. 2019).

Da es sich bei EZH2 Inhibition aufgrund der Überexpression in PTCL um einen vielversprechenden Ansatzpunkt handelt, wurden verschiedene Arten von EZH2 Inhibitoren entwickelt, die sich auch zum Teil bereits in klinischen Studien befinden und sich in vier verschiedene Untergruppen einteilen lassen (Gulati et al. 2018). Der erste entwickelte EZH2 Inhibitor ist der *S*-Adenosylhomocystein (SAH) Hydrolaseinhibitor 3-Deazaneplanocin A (DZNep). Da dieser jedoch zu einer globalen Inhibition der Methyltransferaseaktivität durch die Erhöhung des intrazellulären SAH-Gehalts führt, handelt es sich nicht um eine EZH2-spezifische Inhibition (Glazer et al. 1986; Miranda et al. 2009). Eine weitere Möglichkeit der EZH2 Inhibition umfasst die Gruppe der EZH2-EED-Disruptoren, welche kompetitiv an der H3K27 Bindungstasche des PRC2 Komplexes binden, wodurch es zu einer Dissoziation des Komplexes kommt (He et al. 2017). Die dritte Gruppe besteht aus Inhibitoren, welche kompetitiv die *S*-Adosylmethionin (SAM) Bindungstasche des EZH2 binden. Diese Inhibitoren können weiterhin in EZH2-spezifische und EZH1/2-Inhibitoren unterteilt werden (Verma et al. 2012; Knutson et al. 2012; Konze et al. 2013). Die SAM-kompetitiven EZH2 Inhibitoren befinden sich bereits in klinischen Studien, weil für verschiedene Zellhintergründe, darunter auch reifzellige T-Zell Lymphome, eine vielversprechende Reduktion der Zellviabilität nachgewiesen werden konnte (Italiano et al. 2018; Yamagishi et al. 2019). Der EZH1/2-Inhibitor DS-3201, beispielsweise, zeigt eine erstmalige Studie bei menschlichen Patienten allgemeine Ansprechraten von 55,6 % und vollständige Ansprechraten von 24,4 % (Ishitsuka et al. 2021). Da diese drei Gruppen der EZH2 Inhibitoren ausschließlich in die kanonische Wirkweise des Proteins eingreifen, wurden zudem Wirkstoffe entwickelt, die selektiv zu einem

Abbau von EZH2 führen und neben der kanonischen auch die nicht-kanonische Funktion des Proteins inhibieren können (Ma et al. 2020a).

Neben der EZH2 Inhibition als Monotherapie besteht auch der Ansatz neue epigenetische Modulatoren mit etablierten Chemotherapeutika zu kombinieren, um die Sensitivität der einzelnen Komponenten zu erhöhen (Sun et al. 2019; Xu et al. 2019). Damit einhergehend ist bereits in der Literatur beschrieben worden, dass EZH2 Inhibition zu einer Sensitivierung gegenüber DNA-Schäden mittels Doxorubicin oder Strahlentherapie in verschiedenen getesteten Geweben führt (Kuser-Abali et al. 2018) Jedoch ist eine genaue Analyse der Sensitivitätsmodulation nötig, um mögliche nachteilige Effekte auszuschließen, da in der Akuten Myeloischen Leukämie eine Erhöhung der Resistenz gegenüber Cytarabin unter EZH2 Inhibition nachgewiesen wurde (Göllner et al. 2017). Weiterhin wurde auch der Verlust von PRC2 Komponenten in T-ALL mit einer Erhöhung der Chemotherapieresistenz assoziiert (Ariès et al. 2018).

1.5 Zielsetzung

Ziel der Arbeit war es, das Auftreten von Veränderungen der epigenetischen Modulatoren SETD2 und EZH2 in einer MEITL-Patientenkohorte sowie in einer repräsentativen Auswahl von Zelllinien prä-thymischer und reifzelliger T-Zell Neoplasien auf genetischer, mRNA- und Proteinebene zu charakterisieren. In der Patientenkohorte sollten sowohl charakteristische, aus der Literatur bekannte Mutationen beschrieben und Lokalisation und Auswirkungen der genetischen Aberrationen charakterisiert werden. Durch Analysen der der Histontrimethylierungsstärke der jeweiligen Ziellysinreste des Histon 3 in der MEITL-Kohorte und in den Zelllinienmodellen sollte die Funktionalität der analysierten Genprodukte abgeleitet werden. In den Zelllinienmodellen sollte anhand einer vom zellulären Ursprung unabhängigen, etablierten Zelllinie genetische oder Expressionsveränderungen von SETD2 oder EZH2 in Zelllinien mit T-Zell Neoplasiehinterrgrund aufgedeckt werden, um eine Rationale für an diese Alterationen ansetzende Therapien zu evaluieren.

Aufgrund der in der Literatur beschriebenen Zweitmutationen bei Neoplasien mit SETD2 Verlust wurde die Hypothese aufgestellt, dass proliferationstreibende Aberrationen nötig sind, damit aus dem SETD2 Verlust ein Wachstumsvorteil entsteht. Dies wäre ein Ansatzpunkt für die Entitätsspezifität. Zur mechanistischen Analyse sollte mittels *short hairpin* RNA (shRNA) vermitteltem Knockdown (KD) der Verlust von SETD2 in passende Zelllinienmodelle ohne oder mit JAK/STAT Signalweg aktivierender Mutation eingebracht und der Einfluss des Proteinverlusts auf das Zellwachstum sowie das Ansprechen auf gängige, in der Lymphomtherapie genutzte Erstlinientherapiemedikamente Etoposid und Doxorubicin evaluiert werden.

Aufgrund des bekannten Einflusses von EZH2 auf das Tumorwachstum wurde die Hypothese aufgestellt, dass in der klinischen Forschung etablierte EZH2 Inhibitoren auch in T-Zell

Neoplasien zu einer verringerten Proliferation führen und man daher einen möglichen Therapieansatz ableiten könnte. Zur Bestätigung der EZH2 Spezifität sollte ebenfalls ein shRNA vermittelter KD etabliert werden. Der Einfluss der EZH2 Inhibitoren oder des EZH2 Verlust auf Proliferation und Chemotherapiesensitivität gegenüber Medikamenten der Erst- und Zweitlinientherapie sollte analysiert werden.

Die aufgedeckten Veränderungen der Chemotherapiesensitivität und SETD2 Knockdown bzw. pharmakologischer EZH2 Inhibition sollten mechanistisch aufgeklärt werden, wofür Durchflusszytometrie-basierte Prüfung der DNA-Reparaturmechanismen und Zellzyklusprogression für SETD2 Verlust und Zellzyklusprogression, Apoptose- und Nekroseinduktion sowie des Wirkstoffeffluxes, mRNA-Sequenzierung und Beweis der Abhängigkeit der Expressionsveränderungen für Analysen des EZH2 Verlusts verwendet wurden.

2. Material

2.1 Chemikalien, Puffer und Kits

Tabelle 1 Chemikalienliste.

Chemikalie	Hersteller	Kat #
4x NuPAGE™ LDS-Probenpuffer	Invitrogen	NP0007
5-Azacytidin	Sigma-Aldrich	A2385
5x First Strand Buffer	Thermo Fisher Scientific	28025013
6x DNA Ladepuffer	Thermo Fisher Scientific	R0611
7x Proteaseinhibitor Mix	Roche	11836170001
10x Taq Polymerase Puffer	Thermo Fisher Scientific	AB0301B
20x NuPAGE™ MES SDS Laufpuffer	Invitrogen	NP0002
Agarose	Biozym	840006
AllHuman V5 Kit	Agilent	
Benzonase	Sigma-Aldrich	E1014-24KU
Bond Polymer Refine Detektionskit	Leica	DS9800
Bradford Reagenz	Bio-Rad	5000006
Cytarabin	MedChemExpress	HY-13605
DAPI	Sigma-Aldrich	268298
Destilliertes Wasser	Fresenius Kabi	1088811
dNTP (25 mM)	Thermo Fisher Scientific	R1121
Doxorubicin	Apotheke des Universitätsklinikums Halle (Saale)	
DTT (0,1 M)	Thermo Fisher Scientific	P2325
DZNep	Biomol	Cay-13828
ECL™ Prime Western Blotting Detektionsreagenz	GE Healthcare	GERPN2236
EDTA	Carl Roth	8040.3
EPZ6438	MedChemExpress	HY-13803
Essigsäure	Carl Roth	3738.4
Ethidiumbromid	Carl Roth	2218.1
Etoposid	Sigma-Aldrich	341205
Fatostatin	MedChemExpress	HY-14452
FBS	Biowest	S181B-500
FITC Annexin V Apoptosis Detektionskit with 7-AAD	Biologend	640922
GeneRead DNA FFPE Kit	Qiagen	180134

Gene Ruler 50 bp Leiter	Thermo Fisher Scientific	SM0372
Gene Ruler 100 bp Leiter	Thermo Fisher Scientific	SM1153
Glibenclamide	MedChemExpress	HY-15206
GSK126	MedChemExpress	HY-13470
Haloplex ^{HS} Custom Panel	Agilent	
Histone Extraktionskit	abcam	ab113476
IL-2	Peptotech	200-02
Intercept® Protein-Free Blocking Puffer	LI-COR	927-80001
MgCl ₂	Thermo Fisher Scientific	R0971
Milchpulver	Carl Roth	68514-61-4
MMLV RT	Thermo Fisher Scientific	28025013
MycroRAZOR® Eliminierungsreagenz	Biontex	M040
MycosPY® Master Mix	Biontex	M020
NaCl	Carl Roth	9265.2
NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina	NEB	E7760
Nukleasefreies Wasser	Carl Roth	T143.3
Oxaliplatin	Apotheke des Universitätsklinikums Halle (Saale)	
PBS	Sigma-Aldrich	D1408
PhosSTOP™	Roche	4906845001
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich	P0781
Polybrene	Santa Cruz Biotechnology	sc-134220
Ponceau S	Santa Cruz Biotechnology	sc-301558
Puromycin	Sigma-Aldrich	P9620-10ML
Qubit RNA Kit	Agilent Technologies	DNF-471
Random Hexamer Primer (50 mM)	Invitrogen	N8080127
Resazurin	Thermo Fisher Scientific	R12204
RIPA Puffer	Sigma-Aldrich	R0278
RNAse A	Thermo Fisher Scientific	EN0531
RNAse Out	Thermo Fisher Scientific	10777-019
RPMI-1640 Medium	Sigma-Aldrich	R8758
Salpetersäure (1 N)	Merck	1.00630.1000
SeeBlue™ Plus2 Pre-stained	Invitrogen	LC5925
SYBR™ Select Master Mix for CFX	Applied Biosystems	4472952
Taq DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific	EP0402
TriFast™	VWR	30-2010DE

Tris Base	Carl Roth	5429.5
Tris-HCl	Carl Roth	9090.3
Trypanblau	Sigma-Aldrich	T8154
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich	T4174
Tween® 20	Sigma-Aldrich	P1379

2.2 Allgemeine Materialien

Tabelle 2 Liste allgemeiner Materialien.

Material	Hersteller	Kat #
Amersham™ Protran® 0,2 µm	GE Healthcare	10600001
Deckgläser	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH	K12424
Filterspitzen (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1250 µl)	Biozym	VT0200, VT0220, VT0230, VT0240 VT0270
Hard-Shell® 384-well PCR Plates, thin wall, skirted, clear/white	Bio-Rad	HSP3805
Microseal 'B' PCR Plate Sealing Film	Bio-Rad	msb1001
Neubauer Zählkammer 0,1 mm	Kisker	140515
Novex™ 4-20% Bis-Tris-Gradientengel (10-, 12-, 15-well)	Invitrogen	NP0321BOX NP0322BOX NP0323BOX
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Greiner bio-one	E0141529, E0140038, E0140625, E0145748
XCell SureLock™ Mini-Cell Modul	Thermo Fisher Scientific	EI0002
Zellkulturflasche (25 cm², 75 cm², 175 cm² (adhärent und nicht-adhärent))	Sarstedt	20010166, 20010168, 20010169, 20010167, 20010362, 20010363
Zellkulturplatte (6-, 12-, 24-, 96F-well (adhärent))	Sarstedt	20010266, 20010263, 20010265, 20010264

2.3 Oligodesoxynukleotide

Tabelle 3 Primersequenzen zur Sangersequenzierung.

SETD2 hg 19	5'-forward Primer-3'	5'-reverse Primer-3'
chr3:47084139	GCCCATACAGCTCCTCTTACC	GGGCTATTTTGTCTATTCAGC
chr3:47098908 #1	CCAAGAGAGTCATAGGGCAGT	TGTGTCTATGATTTAGGGAGCAACT
chr3:47098908 #2	ACCAAGAGAGTCATAGGGCAG	ATAGGGTTTGATGTGGTTAGTGTT

Tabelle 4 Zielsequenzen der shRNA für SETD2 oder EZH2 Knockdown. SETD2 KD in Jurkat ohne oder mit transduziertem GFP, ITK-SYK oder TEL-SYK beziehen sich auf dieselben Bezeichnungen.

shRNA	Sigma-Aldrich TRC-Klon ID	Zielsequenz
Caki2 <i>mock</i> shRNA	SHC002	CAACAAGATGAAGAGCACCAA
Caki2 SETD2 KD1	TRCN0000237837	AGTAGTGCTTCCCGTTATAAA
Caki2 SETD2 KD2	TRCN0000237836	TGATAGCCATGATAGTATTAA
HH EZH2 KD1	TRCN0000040077	CCCAACATAGATGGACCAAAT
HH EZH2 KD2	TRCN0000353069	TATGATGGTTAACGGTGATCA
HH <i>mock</i> shRNA	SHC002	CAACAAGATGAAGAGCACCAA
Jurkat EZH2 KD1	TRCN0000040075	CCAACACAAGTCATCCCATTA
Jurkat EZH2 KD2	TRCN0000353069	TATGATGGTTAACGGTGATCA
Jurkat <i>mock</i> shRNA	SHC002	CAACAAGATGAAGAGCACCAA
Jurkat SETD2 KD1	TRCN0000237837	AGTAGTGCTTCCCGTTATAAA
Jurkat SETD2 KD2	TRCN0000237836	TGATAGCCATGATAGTATTAA
Jurkat SETD2 KD3	TRCN0000237835	TTCCGACGAGGGTCATCATAT
SR786 <i>mock</i> shRNA	SHC002	CAACAAGATGAAGAGCACCAA
SR786 SETD2 KD1	TRCN0000237837	AGTAGTGCTTCCCGTTATAAA
SR786 SETD2 KD2	TRCN0000237836	TGATAGCCATGATAGTATTAA
SR786 SETD2 KD3	TRCN0000237835	TTCCGACGAGGGTCATCATAT

Tabelle 5 RT-qPCR Primersequenzen. Das Primerpaar SETD2 I wurde für alle SETD2 mRNA-Analysen genutzt und das Primerpaar SETD2 II zur Validierung des SETD2 Knockdowns in SR786.

Zielgen	5'-forward Primer-3'	5'-reverse Primer-3'
<i>ABCG1</i>	CGCTTTCTCGGTCGGCA	CTGGGCTTCCGTGAGGTTAT
<i>ABCG2</i>	TCAGGAGGCCTTGGGATACT	AGGCTCTATGATCTCTGTGGC
<i>EZH1</i>	AACCCAACACTTCCCCTTGC	ACTGAACAGGTTGGACACGA
<i>EZH2</i>	GCAATTATTCTTTTCATGCAACACC	TTGGTGGGGTCTTTATCCGC
<i>SETD2 I</i>	CGACCCCTGAAGAAGAAGAAAATGA	GGGCAAAATCGACTAGAAGCA
<i>SETD2 II</i>	CCCAAGACAGCAGAAGCAGA	TCAGGCACTGGACGATGAAC
<i>SREBF1</i>	AGGGCGGGCGCAGAT	GGTTGTTGATAAGCTGAAGCATGT
<i>SREBF2</i>	GGCTGAAGAATAGGAGTTGCC	AACGGTCATTCACCCAGGTC
<i>TBP</i>	AGGAGCCAAGAGTGAAGAACAG	AGGAGAACAATTCTGGGTTTGA

2.4 Zelllinien

Tabelle 6 Quelle und RRID der genutzten Zelllinien. Wildtypische Zelllinien wurden von der Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) oder *American Type Culture Collection* (ATCC) bezogen. GFP-, ITK-SYK- und TEL-SYK-transduzierte Jurkat wurden von der Arbeitsgruppe von Frau Professorin Christine Dierks übernommen. Die Zellzahl gibt die genutzte Zelldichte je 100 μ l je well in Viabilitätsassays und Wachstumskinetiken an; HeLa Zellen wurden in diesen Assays nicht genutzt.

Zelllinie	Quelle	Kat #	RRID	Zellzahl
Caki2	DSMZ	ACC 54	RRID:CVCL_0235	1250
Daudi	DSMZ	ACC 78	RRID:CVCL_0008	7000
DERL2	DSMZ	ACC 531	RRID:CVCL_2016	75000
HH	DSMZ	ACC 707	RRID:CVCL_1280	5000
HeLa	DSMZ	ACC 57	RRID:CVCL_0030	-
Jurkat	DSMZ	ACC 282	RRID:CVCL_0065	10000
Loucy	ATCC	CRL-2629	RRID:CVCL_1380	10000
OciLy1	DSMZ	ACC 722	RRID:CVCL_1879	20000
SR786	DSMZ	ACC 369	RRID:CVCL_1711	20000
SUP-T11	DSMZ	ACC 605	RRID:CVCL_2210	15000

2.5 Antikörper

Tabelle 7 Antikörperliste. Die Antikörper wurden für Durchflusszytometrie (DZ), Immunhistochemie (IHC) oder Westernblot (WB) genutzt.

Primärantikörper	Hersteller	Kat #	Verdünnung	RRID
Alexa Fluor® 488 anti- γ H2AX	Biologend	613406	1:50 (DZ)	RRID: AB_2248011
Alexa Fluor® 647 anti- γ H2AX	Biologend	613408	1:50 (DZ)	RRID: AB_2295046
anti-ABCG1 rabbit-anti-human	Novus Biologicals	NB400-132	1:500 (WB)	RRID: AB_10125717
anti-ABCG2 rabbit-anti-human	abcam	ab207732	1:1000 (WB)	
anti-EZH1 rabbit-anti-human	abcam	ab137693	1:100 (IHC) 1:1000 (WB)	
anti-EZH2 mouse-anti-human	Cell Signaling	3147	1:100 (IHC) 1:1000 (WB)	RRID: AB_10694383
anti-GAPDH rabbit-anti-human	Cell Signaling	14C10	1:10000 (WB)	RRID: AB_561053
anti-H3K27me3 rabbit-anti-human	Cell Signaling	9733	1:200 (IHC) 1:2000 (WB)	RRID: AB_2616029

anti-H3K36me3 rabbit-anti-human	abcam	4909	1:2000 (WB)	<u>RRID:</u> <u>AB 1950412</u>
anti-H3 rabbit-anti- human	abcam	ab1791	1:10000 (WB)	<u>RRID:</u> <u>AB 302613</u>
anti-phosphoSTAT5 (Y694) rabbit-anti- human	Cell Signaling	4322	1:1000 (WB)	<u>RRID:</u> <u>AB 10544692</u>
anti-SREBP1 mouse- anti-human	BD Biosciences	557036	1:1000 (WB)	<u>RRID:</u> <u>AB 396559</u>
anti-SREBP2 mouse- anti-human	BD Biosciences	557037	1:1000 (WB)	<u>RRID:</u> <u>AB 396560</u>
anti-STAT5 rabbit- anti-human	Cell Signaling	94205	1:1000 (WB)	<u>RRID:</u> <u>AB 2737403</u>
Sekundärantikörper	Hersteller	Kat #	Verdünnung	RRID
Peroxidase-goat-anti- mouse IgG	Jackson Immuno- research	115-036- 062	1:5000 (WB)	<u>RRID:</u> <u>AB 2307346</u>
Peroxidase-goat-anti- rabbit IgG	Jackson Immuno- research	111- 036-047	1:5000 (WB)	<u>RRID:</u> <u>AB 2337945</u>

2.6 Geräte und Software

Tabelle 8 Geräteliste und verwendete Software.

Gerät / Software	Hersteller / Entwickler	Kat # / RRID
820-MS ICP Massenspektrometer	Bruker Daltonik	
Agilent 5300 Fragment Analyzer	Agilent Technologies	
appreci8	(Sandmann et al. 2018)	
Axioscope 5 Mikroskop	Carl Zeiss Mikroskopie GmbH	
bcl2fastq v2.20	Illumina	<u>RRID:SCR 015058</u>
biomaRt	(Durinck et al. 2009)	<u>RRID:SCR 019214</u>
BioPhotometer® D30	Eppendorf	035994
Bond-III IHC-Färbesystem	Leica	
BWA-MEM	(Li u. Durbin 2010)	<u>RRID:SCR 010910</u>
cBioPortal Mutation Mapper	(Cerami et al. 2012) (Gao et al. 2013)	<u>RRID:SCR 014555</u>
CFX Manager Software v3.1	Bio-Rad	<u>RRID:SCR 017251</u>
CFX384 Touch Real-Time PCR Detektionssystem	Bio-Rad	1855484

ChemiDoc Imager Detektionssystem	Bio-Rad	17001401
Counts Subread package v1.5.2	(Liao et al. 2019) (Liao et al. 2014)	RRID:SCR_009803
deseq2	(Love et al. 2014)	RRID:SCR_015687
DOTS-Finder	(Melloni et al. 2014)	
Enhanced Volcano	(Blighe et al. 2021)	RRID:SCR_018931
enrichR	(Kuleshov et al. 2016)	RRID:SCR_001575
FlowJo™ v10.6.1	BD Life Sciences	RRID:SCR_008520
Fortessa™ Cell Analyzer	BD Biosciences	
<i>Genome Analysis Toolkit</i>	(DePristo et al. 2011)	RRID:SCR_001876
Heraeus™ Biofuge fresco	Thermo Fisher Scientific	75003326
Heraeus™ HERAcell Brutschrank	Th. Geyer	9536020
Heraeus™ HERAsafe KSP	Thermo Fisher Scientific	107923606
ICP-MS Expert Software v2.1	Agilent	
ImageJ v1.51	National Institutes of Health	RRID:SCR_003070
Integrated Genomics Viewer v2.5.3	(Robinson et al. 2011)	RRID:SCR_011793
Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad	1703930
MutSig	(Lawrence et al. 2013)	RRID:SCR_010779
NovaSeq 6000 Sequencer	Illumina	
Prism software v8.4.3	Graphpad	RRID:SCR_002798
Qubit 4.0 Fluorometer	Life Technologies	
RStudio with R v4.1.2	(RStudio Team 2021)	RRID:SCR_000432
Spark® <i>Microplate Reader</i>	Tecan	
STAR aligner v2.5.2b	(Dobin et al. 2013)	RRID:SCR_004463
Surecall	Agilent Technologies	
Synergy Finder	(Zheng et al. 2022)	RRID:SCR_019318
T100™ Thermal Cycler	Bio-Rad	1861096
ThermoMixer F1.5	Eppendorf	5384000012
Trim Galore	(Krueger et al. 2021)	RRID:SCR_011847
Trimmomatic v0.36	(Bolger et al. 2014)	RRID:SCR_011848
UVP UVsolo <i>touch</i> Detektionssystem	Analytik Jena	849-97-0765-02
VarScan	(Koboldt et al. 2012)	RRID:SCR_006849
Vortex Genie 2	Thermo Fisher Scientific	SI-0256

2.7 Datenbanken

Tabelle 9 Liste genutzter Datenbanken.

Datenbank	Entwickler	RRID
1000 genomes	(Auton et al. 2015)	<u>RRID:SCR_006828</u>
ClinicalTrials.gov	<i>National Library of Medicine</i> (National Center of Biotechnology Information (NCBI) 1988)	<u>RRID:SCR_002309</u>
Cosmic	(Tate et al. 2019)	<u>RRID:SCR_002260</u>
dbSNP	(Sherry et al. 2001) (National Center of Biotechnology Information (NCBI) 1988)	<u>RRID:SCR_002338</u>
CCLC	(Barretina et al. 2012)	<u>RRID:SCR_017655</u>
OncoKB™	(Chakravarty et al. 2017)	<u>RRID:SCR_014782</u>
Pubmed	(National Center of Biotechnology Information (NCBI) 1988) (Sayers et al. 2022)	<u>RRID:SCR_004846</u>
The Human Protein Atlas v23.0	(Uhlén et al. 2015) (Uhlen et al. 2019)	<u>RRID:SCR_006710</u>

3. Methoden

3.1 Zellkulturmethoden

Alle Zellen wurden in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und nicht häufiger als zehnmal nach dem Auftauen passagiert. Mycoplasmennegativität wurde wiederholt mit MycoSPY® Master Mix überprüft und im Fall von Mycoplasmenpositivität mittels MycoRAZOR® Eliminierungsreagenz entsprechend Herstellerangaben bis zur Bestätigung der Negativität behandelt.

3.1.1 Suspensionszellkultur

Die T-Zell Akute Lymphatische Leukämie (T-ALL) Zelllinien Jurkat, SUPT11 und Loucy, die Kutanes T-Zell Lymphom (CTCL) Zelllinie HH, die Anaplastisches Großzelliges Lymphom, Anaplastische Lymphomkinase positiv (ALCL, ALK+) Zelllinie SR786 und die Burkitt Lymphom Zelllinie Daudi wurden in RPMI-1640 Medium supplementiert mit 10 % fetalem bovines Serum (FBS) und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Die diffuses großzelliges B-Zell Lymphom (DLBCL) Zelllinie OciLy1 wurde in RPMI-1640 Medium mit 20 % FBS and 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Die Hepatosplenisches T-Zell Lymphom (HSTCL) Zelllinie DERL2 wurde in RPMI-1640 Medium mit 20 % FBS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 0,02 ng/µl rekombinantem humanen IL-2 kultiviert. Ich habe die Zellen alle zwei bis drei Tage mikroskopisch auf Dichte und Kontaminationen überprüft, in Medium durch Auf- und Abpipettieren durchmischt und auf eine entsprechende Zelldichte passagiert.

3.1.2 Zellkultur adhärenter Zellen

Die Zelllinien HeLa mit Zervixkarzinom und Caki2 mit ccRCC Hintergrund wurden in RPMI-1640 Medium supplementiert mit 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Ich habe die Zellen alle zwei bis drei Tage mikroskopisch auf Dichte und Kontaminationen überprüft. Das Medium wurde verworfen, die Flasche einmal mit PBS gewaschen und die Zellen 5 min trypsinisiert, bis sich die Zellen vom Flaschenboden gelöst haben. Die Reaktion wurde durch Zugabe des doppelten Volumens Medium abgestoppt, die Zellen durch Auf- und Abpipettieren durchmischt und auf eine entsprechende Zelldichte passagiert.

3.1.3 Gewinnung von Zellproben

Ich habe Zellproben gewonnen, indem ich bei adhärenenten Zellen das Medium verworfen, die Flasche einmal mit PBS gewaschen, die Zellen 5 min trypsinisiert und anschließend durchmischt habe. Suspensionszellen habe ich im Kulturmedium durchmischt. Es wurden 10 µl Zellsuspension entnommen und 1:1 mit Trypanblau gemischt, um tote Zellen anzufärben. Ich habe die Zelldichte mittels Neubauer Zählkammer bestimmt. Es wurden folgende Zellzahlen für verschiedene Zwecke mittels Zentrifugation für 5 min bei 300 xg zentrifugiert,

der Überstand wurde verworfen und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert: RNA-Isolation 2×10^6 Zellen, Protein-Volllyse 4×10^6 Zellen, Histon-Lyse 8×10^6 Zellen.

3.1.4 Zellviabilitätsassay

Ich habe die Zellen mit entsprechender Dichte / $100 \mu\text{l}$ / *well* im 96-*well* Format in 8 Replikaten ausgesät. Die optimalen Zelldichten wurden entsprechend 3.1.5 bestimmt und sind detailliert in Tabelle 6 unter 2.4 angegeben. Nach 24 h habe ich die Zellen für 72 h, 96 h oder 7 d mit Inhibitoren, und/ oder Chemotherapeutika entsprechend der angegebenen Konzentrationen inkubiert. Bei Kombinationsansätzen wurden Inhibitoren mit konstanten Konzentrationen verwendet und simultan zum Chemotherapeutikum auf die Zellen gegeben: $4 \mu\text{M}$ GSK126, $4 \mu\text{M}$ EPZ6438, 125 nM 3-Deazaneplanocin A (DZNep), $1 \mu\text{M}$ Fatostatin oder $30 \mu\text{M}$ Glibenclamide. Die Zellviabilität habe ich indirekt gemessen, indem die Zellen 2 h mit $30 \mu\text{g/ml}$ Resazurin inkubiert und der Umsatz von Resazurin zu Resarufin über Fluoreszenzmessung mit Spark® *Microplate Reader* durch Anregung bei 492 nm und Emissionsmessung bei 595 nm bestimmt wurde. Die Werte habe ich dabei jeweils auf eine simultan mitgeführte, unbehandelte Kontrolle normiert. Die Fluoreszenzmessung dient als Maß der Viabilität, da nur viable Zellen zum Umsatz von Resazurin in der Lage sind, weshalb im Folgenden der Ausdruck Viabilität genutzt wird (Ahmed et al. 1994). Experimente wurden dreimal durchgeführt mit Ausnahme der Oxaliplatin Monotherapie, die sechsmal durchgeführt wurde. Ich habe Graphpad Prism Software v8.4.3 zur Berechnung von IC_{50} - oder IC_{10} -Werten genutzt. Diese wurden weiterführend wie in 3.1.4, 3.3.1, 3.3.2 und 3.3.3 beschrieben für funktionelle Analysen genutzt. Zur Berechnung von *Synergy Scores* und der Visualisierung von 3D Matrices wurde Synergy Finder genutzt (Zheng et al. 2022).

Im Fall der konsekutiven Expressionsanalyse und Analyse der Zellviabilität wurden Zellen zunächst entsprechend 3.1.5 für 72 h mit $4 \mu\text{M}$ GSK126 inkubiert und im Anschluss 2×10^6 Zellen für die Reverse Transkription mit quantitativer Polymerasekettenreaktion entsprechend 3.2.4 aufgearbeitet. Die restlichen Zellen wurden nach der Inkubation wie zuvor beschrieben für den Zellviabilitätsassay verwendet.

3.1.5 Inkubationen zur Expressionsanalyse

Ich habe die Zellen mit einer Dichte von 500.000 Zellen / ml ausgesät und mit $4 \mu\text{M}$ GSK126, Oxaliplatin bei 10 %iger Reduktion der Zellviabilität (IC_{10}) oder simultan für 72 h inkubiert. Die IC_{10} -Werte wurden anhand der mittels 3.1.4 ermittelten Konzentrationskurven berechnet. Für die getesteten Zelllinien ergaben sich folgende Oxaliplatinkonzentrationen:

Tabelle 10 Oxaliplatinkonzentration bei 10 %iger Reduktion der Zellviabilität unter Monotherapie.

Zelllinie	IC ₁₀ (Oxaliplatin) [µM]
DERL2	0,7582
HH	0,2845
Jurkat	0,2365
Loucy	0,0031

Nach der Inkubation wurden die Zellen für 5 min bei 300 xg zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde einmal mit PBS gewaschen. Es wurde bis zur Aufarbeitung bei -80 °C gelagert.

3.1.5 Wachstumskinetik

Ich habe die Zellen mit entsprechender Dichte / 100 µl / well im 96-well Format in 8 Replikaten ausgesät. Die detaillierten Zelldichten sind in Tabelle 6 unter 2.4 angegeben. Nach 0, 24, 48 oder 72 h habe ich das Wachstum über die Zellviabilität indirekt über Fluoreszenzmessung mit dem Spark® *Microplate Reader* gemessen. Dafür wurden die Zellen 2 h mit 30 µg/ml Resazurin inkubiert und der Umsatz von Resazurin zu Resarufin durch Anregung bei 492 nm und Emissionsmessung bei 595 nm bestimmt. Ich habe die Experimente fünfmal durchgeführt und Graphpad Prism Software v8.4.3 zur Berechnung der Verdopplungszeit genutzt. Die Verdopplungszeiten wurden je Experiment auf die zugehörige Kontrollzelllinie normiert und eine Verlangsamung auf die 1,5-fache bzw. eine Beschleunigung auf die 0,5-fache Verdopplungszeit als Grenzen festgesetzt.

3.1.7 Transduktion

Ich habe Suspensionszellen mit einer Dichte von 200.000 Zellen / 500 µl / well und adhärente Zellen mit einer Dichte von 50.000 Zellen / 500 µl / well im 24-well Format in RPMI-1640 Medium mit 10 % FBS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 10 µg/ml Polybrene ausgesät. Adhärente Zellen wurden zunächst 24 h kultiviert, während Suspensionszellen direkt nach der Aussaat transduziert wurden. Viruspartikel zum shRNA-basierten Knockdown der Zielproteine wurden von Sigma-Aldrich bezogen. Die shRNA Zielsequenzen sind in Tabelle 4 unter 2.3 aufgelistet. Pro well wurden 3 µl Virus zugegeben. Die Zellen wurden für 45 min bei 600 xg zentrifugiert. Nach 24 h habe ich das Medium zu Kulturmedium gewechselt und nach 48 h die Zellen mit 1 µg/ml Puromycin selektiert.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 *Next Generation* Sequenzierung und Expressionsanalyse von Proben aus Formalin-fixiertem, Paraffin-eingebettetem Gewebe

Die Bereitstellung der *Next Generation* Sequenzierung Ergebnisse entstand als Basis der Doktorarbeit aus Vorarbeiten von Mitgliedern der Arbeitsgruppe Klinik für Innere Medizin IV der Universitätsmedizin Halle (Saale). Genomische DNA wurde von der technischen Assistentinnen Katrin Nerger und Jenny Wehde aus Formalin-fixiertem, Paraffin-eingebettetem Gewebe (FFPE) extrahiert und mit der Uracil DNA Glycosylase des GeneRead DNA FFPE Kits behandelt, um FFPE-induzierte Artefakte zu minimieren. Nachdem das Agilent AllHuman V5 Kit verwendet wurde, erfolgte die Exomsequenzierung (WES) der Proben auf einer Illumina Sequenzierplattform mit endgepaarten 100 Basenpaar *reads* als Service von Omega Bioservices (Norcross, Georgia, USA). Die bioinformatischen Analysen erfolgten durch Dr. Christian Rohde und PD Dr. Sarah Sandmann. *Single Nucleotide* Polymorphismen (SNP) und Veränderungen der Genkopienzahl wurden mittels einer für FFPE-Gewebe optimierten Analysepipeline analysiert. SNPs, welche im sequenzierten Normalgewebe auftraten, in den Datenbanken Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP) oder 1000 genomes mit einer Frequenz größer 1 % aufgeführt waren oder eine Allelfrequenz kleiner 10 % zeigten, wurden ausgeschlossen (Sherry et al. 2001; Auton et al. 2015). Die Algorithmen MutSig und DOTS-*Finder* wurden zur Identifikation der Mutationen mit der höchsten funktionellen Relevanz verwendet (Lawrence et al. 2013). Auf Basis der WES-Daten wurde die zielgerichtete Sequenzierung an der WES-Kohorte sowie 22 zusätzlichen MEITL-Fällen durch das deutsche Krebszentrum (Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurde ein anhand der WES-Ergebnisse gewähltes, individuelles Haloplex^{HS} Custom Panel gegen 71 Gene, Exome oder Hotspots von T-Zell Neoplasien für die Mutationsanalyse genutzt (Tabelle 21). Die Bibliotheken wurden mittels eines Illumina Systems sequenziert. SNPs wurden mittels *appreci8* analysiert (Sandmann et al. 2018).

Im Anschluss an die bioinformatische Analyse habe ich alle gefundenen Mutationen händisch mittels Integrated Genomics Viewer v2.5.3 und Surecall v.4.2 hinsichtlich ihrer Echtheit überprüft. Als Ausschlusskriterien habe ich eine Abdeckung durch nur einen Sequenzierprimer, eine Lesetiefe kleiner 20, eine Anzahl varianter Allele kleiner 5 und minimalen varianten Allelfrequenz (VAF) kleiner 5 % sowie ein Auftreten in den Datenbanken dbSNP oder 1000 genomes mit einer Wahrscheinlichkeit größer 1 % gewählt (Sherry et al. 2001; Auton et al. 2015). Zudem habe ich bei passenden Paaren die Übereinstimmung der Mutationen von WES und zielgerichteter Sequenzierung überprüft. Im Falle weiterbestehender Fraglichkeit der Validität wurden Mutationen mittels Sangersequenzierung wie unter 3.2.3 beschrieben analysiert. Im Anschluss habe ich genomische und Expressionsanalysen mittels

Graphpad Prism Software v8.4.3 und [cBioPortal Mutation Mapper](#) visualisiert und hinsichtlich möglicher Korrelationen analysiert (Cerami et al. 2012; Gao et al. 2013).

3.2.2 Analyse kurzer Insertionen und Deletionen der MEITL Kohorte

Die Analyse kurzer Insertionen und Deletionen erfolgte anhand der *Binary Alignment Map* Dateien der MEITL WES durch Herrn Christoph Bartenhagen vom Institut für Medizinische Informatik der Universität Münster. Adapter wurden mittels Trim Galore getrimmt und das Sequenzalignment erfolgte mittels BWA-MEM (Li u. Durbin 2010). Duplikate wurden dabei beibehalten. Der lokale Sequenzabgleich und das Abrufen der SNPs erfolgte mittels *Genome Analysis Toolkit* (DePristo et al. 2011). VarScan wurde zum Berechnen des log₂-Verhältnisses, zum Normalisieren und zum Filtern verwendet (Koboldt et al. 2012). Als Bezugspunkt diente dabei eine gesunde Kontrollprobe.

3.2.3 Verifikation von Mutationen mittels Sangersequenzierung

Isolierte genomische DNA von 3.2.1 wurde bei Proben mit unklarer Validität der gefundenen Mutationen genutzt. Ich habe spezifische Primer für fragliche Mutationen designt und mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) entsprechend *Thermus aquaticus* (Taq) Polymerase Herstellerprotokoll sequenzspezifisch genomische DNA amplifiziert:

Tabelle 11 Reaktionsansatz inklusive Programm der PCR zur Sangersequenzierung.

Schritt	Volumen	Programm
1 DNA	1,0 µl	
MgCl ₂ (50 mM)	2,0 µl	
10x Taq Polymerase Puffer	2,0 µl	
dNTPs (25 mM)	0,5 µl	
Taq Polymerase	0,1 µl	
sense Primer (10 mM)	0,5 µl	
antisense Primer (10 mM)	0,5 µl	
Nukleasefreies Wasser	ad 20 µl	
2 Initiale Template Denaturierung		5 min bei 95 °C
3 Template Denaturierung		30 s bei 95 °C
4 Primer Hybridisierung		30 s bei 66 °C
5 Elongation		1 min bei 72 °C
6 Taq Deaktivierung		10 min bei 72 °C

34 Zyklen
Schritte 3 – 5

Primersequenzen sind in Tabelle 3 unter 2.3 gelistet. Den Erfolg der Polymerasekettenreaktion habe ich mittels Auftrennung der DNA in einem 1,5 % Agarosegel bestätigt. Dafür wurden 1,5 Masseprozent Agarose in TAE Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA) unter

0,5 µg/ml Ethidiumbromid zum Lösen der Agarose aufgekocht und durch Abkühlen polymerisiert. PCR-Produkte wurden mit DNA Ladepuffer gemischt und bei 120 V im Agarosegel mit TAE Puffer aufgetrennt. Die Signale wurden mittels UVP UVsolo *touch* Detektionssystem aufgenommen.

Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) entsprechend des *Light Run Tube* Protokolls. Dafür wurden 5 µl PCR-Produkt, 2,5 µl des *sense* oder *antisense* Primers und 2,5 µl nukleasefreies Wasser gemischt und mittels Sangersequenzierung analysiert. Es wurden jeweils sowohl *sense* als auch *antisense* Sequenzierungen überprüft und insofern möglich 2 unterschiedliche Primerpaare je Mutationen genutzt.

3.2.4 Datenbankanalyse des Mutationsstatus von Zelllinien

Ich habe den Mutationsstatus der Zelllinien für die aufgeführten Gene anhand der Datenbanken *Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer (Cosmic)* und *Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE)* bestimmt (Tate et al. 2019; Barretina et al. 2012). Für die Zelllinie OciLy1 existiert kein Eintrag in den Datenbanken und die Analyse wurde anhand von in der Literatur zugänglichen Mutationsdaten durchgeführt (Morin et al. 2013; Wright et al. 2020).

3.2.5 Next Generation mRNA-Sequenzierung

Ich habe die mRNA mittels peqGOLD TriFast™ nach Angaben des Herstellers isoliert und die Proben wurden von der Firma Genewiz (Leipzig, Deutschland) aus zwei unabhängigen Lysaten sequenziert. Qualitätskontrolle, Sequenzierung und basale bioinformatische Auswertungen wurden von Genewiz übernommen. Die mRNA wurde mittels Qubit 4.0 Fluorometer quantifiziert und die mRNA-Integrität mittels RNA-Kit für Agilent 5300 Fragment Analyzer analysiert. Die mRNA hatte eine mittlere Qualität von 35.95. Die Bibliothek der mRNA-Sequenzierung wurde mittels NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep-Kit für Illumina nach Herstellervorgaben vorbereitet. Die Bibliotheken wurden mit NGS-Kit am Agilent 5300 Fragment Analyzer validiert, am Qubit 4.0 Fluorometer quantifiziert, über Multiplexverfahren gebündelt und auf das Illumina NovaSeq 6000 Instrument geladen. Proben wurden mittels endgepaarter Konfiguration v1.5 sequenziert. Dabei hatten 93.95 % der Basen eine Lesetiefe von mindestens 30. Image Analyse und Aufrufen der Basen wurde mit NovaSeq Control Software v1.7 am NovaSeq Instrument durchgeführt. Unbearbeitete Sequenzierdaten wurden in fastq Dateien konvertiert und das Multiplexverfahren wurde mit bcl2fastq v2.20 aufgehoben. Adaptersequenzen und Nukleotide mit geringer Qualität wurden mit Trimmomatic v0.36 entfernt und die Reads mit STAR aligner v.2.5.2b dem *Homo sapiens* Referenzgenom von ENSEMBL zugeordnet (Bolger et al. 2014; Dobin et al. 2013). Die Genquantifikation wurde mit der Funktion Counts Subread package v1.5.2 berechnet (Liao et al. 2014; Liao et al. 2019).

Die weitergehende bioinformatische Analyse erfolgte durch die Bioinformatikerin der Klinik für Innere Medizin IV der Universitätsmedizin Halle (Saale) Edith Willscher. Unbearbeitete *Counts* wurden zu einer Matrix zusammengefasst und die Gennamen wurden mit *biomaRt* annotiert (Durinck et al. 2009). Gene mit gemittelten *Counts* von 0 wurden ausgeschlossen. Die Daten wurden mit *deseq2* normalisiert und zu \log_2 -Werten der Expressionsveränderungen (*Fold Change*) transformiert (Love et al. 2014). Die differenzielle Genexpression wurde anhand der \log_2 -transformierten Daten mit *lfcshrink* berechnet. Zur Visualisierung im *Volcano Plot* wurde das Paket *Enhanced Volcano* genutzt (Blighe et al. 2021). Die Analyse der Signalweganreicherung (*Gene Set Enrichment Analysis*) wurde mittels *enrichR* durchgeführt (Kuleshov et al. 2016). Alle Schritte wurden mit RStudio mit R v4.1.2 analysiert (RStudio Team 2021).

3.2.6 Reverse Transkription-quantitative Polymerasekettenreaktion

Ich habe die RNA mittels *peqGOLD TriFast™* nach Angaben des Herstellers isoliert und bis zur Weiterverwendung bei -80 °C gelagert. Mittels reverser Transkription (RT) wurde ausgehend von $2\text{ }\mu\text{g}$ RNA entsprechend *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase* (MMLV RT) Herstellerprotokoll cDNA synthetisiert:

Tabelle 12 Reaktionsansatz inklusive Programm der reversen Transkription.

Schritt	Volumen	Programm
1 RNA	x μl (2 μg)	
Random Hexamer (50 mM)	1,0 μl	
dNTPs (25 mM)	1,0 μl	
Nukleasefreies Wasser	ad 10 μl	
2 Primer Hybridisierung		5 min bei 65 °C
3 Auflösen von Sekundärstrukturen		1 min bei 4 °C
4 RNase OUT	1,0 μl	
DTT (0,1 M)	2,0 μl	
5x-First Strand Buffer	3,0 μl	
5 Nuklease Deaktivierung		2 min bei 37 °C
6 MMLV RT	1,0 μl	
7 Primer Verlängerung		10 min bei 25 °C
8 Elongation		50 min bei 37 °C
9 MMLV RT Deaktivierung		15 min bei 70 °C

Nach abgeschlossener reverser Transkription wurden die Ansätze 1:5 in nukleasefreiem Wasser verdünnt und bis zur Weiterverwendung bei -20 °C gelagert. Die Expression der

gewählten Gene habe ich anhand eines standardisierten Protokolls für quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) analysiert:

Tabelle 13 Reaktionsansatz der quantitativen PCR zur Amplifikation spezifischer cDNA-Fragmente.

Komponente	Volumen je Probe
SYBR™ Select Master Mix for CFX	5,0 µl
sense Primer (10 mM)	0,25 µl
antisense Primer (10 mM)	0,25 µl
cDNA	3,0 µl (entspricht 60 ng)
Nuklease-freies Wasser	1,5 µl

Primersequenzen sind in Tabelle 5 unter 2.3 gelistet. Für die Amplifikation wurde das nachfolgende Programm durchgeführt:

Tabelle 14 Programm der quantitativen PCR zur Amplifikation spezifischer cDNA-Fragmente.

Schritt	Temperatur	Dauer
1 Uracil N-Glycosylase Aktivierung zur Verringerung von Fremd-DNA Kontaminationen	50 °C	2 min
2 Initiale Denaturierung	95 °C	2 min
3 Denaturierung	95 °C	5 s
4 Hybridisierung und Elongation	60 °C	30 s
5 Schmelzkurve	65 – 95 °C	Erhöhung alle 5 s je 0,5 °C

45 Zyklen
Schritte 3 – 4

Die Daten wurden mittels CFX384 Touch Real-Time PCR Detektionssystem mit Bio-Rad CFX Manager Software v3.1 erzeugt. Zur Normalisierung wurde das *housekeeping* Gen TBP verwendet. Die Ergebnisse wurden quantifiziert, indem der TBP-Ct Wert vom Zielgen-Ct Wert abgezogen und die $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode wie beschrieben angewendet wurde (Livak u. Schmittgen 2001):

$$\text{Quantifikation (Zielgen}_Z) = 2^{-((Ct(\text{Zielgen}_Z) - Ct(\text{TBP}_Z)) - (Ct(\text{Zielgen}_K) - Ct(\text{TBP}_K)))}$$

Z – Zielzelllinie
K – Kontrollzelllinie

Ich habe die Experimente anhand von drei unabhängigen Zelllysaten durchgeführt. Die Validität der genutzten Primer habe ich mittels Auftrennung der DNA in einem 1,5 % Agarosegel bestätigt. Dafür wurden 1,5 Masseprozent Agarose in TAE Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA) unter 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zum Lösen der Agarose aufgekocht und durch Abkühlen polymerisiert. PCR-Produkte wurden mit DNA Ladepuffer

gemischt und bei 120 V im Agarosegel mit TAE Puffer aufgetrennt. Die Signale wurden mittels UVP UVsolo *touch* Detektionssystem aufgenommen.

Eine Erhöhung auf das 1,5-fache bzw. eine Erniedrigung auf das 0,5-fache wurden bei den Expressionsanalysen als Grenzen für Hoch- bzw. Herunterregulation festgesetzt. Wenn in mindestens zwei von drei Experimenten kein Messwert erzeugt werden konnte, wurden der Datenpunkt als nicht messbar (n.m.) eingeordnet.

3.2.7 Proteinisolationmethoden, SDS-PAGE und Westernblot

Ich habe Protein-Volllysate mittels Radioimmunopräzipitation Assay (RIPA) Puffer isoliert, der mit 1x Protease Inhibitor Mix und 250 Units/ml Benzonase supplementiert wurde. Zur Analyse von phosphorylierten Proteinen wurde zusätzlich 1x PhosSTOP™ supplementiert. Histonlysate habe ich mit abcam Histone Extraktionskit entsprechend den Herstellervorgaben unter Supplementierung von 1x Protease Inhibitor Mix und 250 Units/ml Benzonase isoliert. Die jeweiligen Lyseansätze wurden 1 h auf Eis inkubiert und anschließend für 15 min bei 16.000 xg zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und die Proteinkonzentration des Überstandes mittels Bradfordassay ermittelt. Dafür habe ich Proteinlysat, destilliertes Wasser und Bradford Reagenz im Verhältnis 1:400:100 gemischt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Konzentration anhand einer vorgegebenen Standardkurve bestimmt. Für Histonlysate habe ich 2 µg Protein, für Protein-Volllysaten 20 µg Protein und für die Analyse phosphorylierter Proteine 100 µg Protein je gewünschter Auftragung pro Probe in 1x NuPAGE™ LDS-Probenpuffer für 10 min bei 70 °C denaturiert.

Ich habe die Lysate mittels SDS-PAGE über Novex™ Bis-Tris Gradientengele mit 1x Novex™ NuPAGE™ MES SDS Laufpuffer bei 80 – 120 V aufgetrennt und im Anschluss bei 80 V mittels Transferpuffer (33,3 mM Tris, 185,9 mM Glycin, 20 % Methanol) auf eine Amersham™ Protran® 0,2 µm Nitrocellulosemembran übertragen. Unspezifische Bindungen wurden mittels 2 % bovines Serumalbumin (BSA) für Histonauftrennungen oder 5 % Magermilch für Auftrennungen von Protein-Volllysaten in PBS mit 0,1 % Tween® 20 (PBST) blockiert. Zur Analyse von phosphorylierten Proteinen wurden die Membranen in Intercept® Protein-Free Blocking Puffer in Tris-gepufferter Salzlösung (150 mM NaCl, 3,5 mM Tris Base, 16,5 mM Tris-HCl) mit 0,1 % Tween® 20 (TBST) blockiert. Membranzuschnitte wurden über Nacht bei 4 °C in Primärantikörperlösungen unter Schwenken inkubiert. Zur Verdünnung der Antikörper anti-H3K27me3 rabbit-anti-human, anti-H3K36me3 rabbit-anti-human und anti-H3 rabbit-anti-human wurde 2 % BSA (PBS), zur Verdünnung von anti-phosphoSTAT5 (Y694) rabbit-anti-human wurde Intercept® Protein-Free Blocking Puffer (TBS) und zur Verdünnung aller anderen Antikörper 5 % Magermilch (PBS) genutzt. Ich habe die Membranen dreimal für 10 min in PBST gewaschen, bevor sie 1 h bei Raumtemperatur in Sekundärantikörperlösung unter Schwenken inkubiert wurden. Alle genutzten Antikörper sind inklusive der genutzten Verdünnungen in Tabelle 7 unter 2.5 aufgelistet. Ich habe die Membranen erneut dreimal für

10 min in PBST gewaschen und mit ECL™ Prime Western Blotting Detektionsreagenz entwickelt. Zur Analyse von phosphorylierten Proteinen wurden die Membranen bei den jeweiligen Waschschriften in TBST gewaschen. Die Signale wurden mittels ChemiDoc Imager Detektionssystem aufgenommen.

Zur quantitativen Analyse habe ich die Intensitäten mittels *National Institutes of Health ImageJ* v1.51 bestimmt. Zur Normalisierung der Protein-Volllysate wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und für Histonlysate globales H3 als *housekeeping* Protein verwendet. Die Ergebnisse wurden quantifiziert, indem das Verhältnis von Intensität des Zielproteins zu Intensität des *housekeeping* Proteins gebildet wurde. Im Anschluss wurde das jeweilige Verhältnis zur Kontrollzelllinie gebildet:

$$\text{Quantifikation (Zielprotein}_Z) = \frac{\frac{\text{Intensität (Zielprotein}_Z)}{\text{Intensität (housekeeping Protein}_Z)}}{\frac{\text{Intensität (Zielprotein}_K)}{\text{Intensität (housekeeping Protein}_K)}} \\ Z - \text{Zielzelllinie} \\ K - \text{Kontrollzelllinie}$$

Ich habe Westernblots von drei oder fünf unabhängigen Proteinlysaten angefertigt und einen repräsentativen Blot gezeigt. Die entsprechenden Blots aller Replikate sind in den Abbildungen 40, 41, 43, 46, 51, 52 und 57 im Anhang abgebildet. In die Quantifikation wurden alle vorhandenen Blots einbezogen. Eine Erhöhung auf das 1,5-fache bzw. eine Erniedrigung auf das 0,5-fache wurden bei den Expressionsanalysen als Grenzen für Hoch- bzw. Herunterregulation festgesetzt. Wenn es bei den Analysen kein Signal über dem Hintergrund gab, wurde die Quantifizierung mit nicht messbar (n.m.) ausgewertet.

3.2.8 Expressionsanalyse von Patientenproben

Die Expressionsanalyse der MEITL Patientenkohorte erfolgte mittels Immunhistochemie (IHC) durch die medizinische Doktorandin der Klinik für Innere Medizin IV der Universitätsmedizin Halle (Saale) Franziska Lea Schümann sowie in Kooperation mit dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Halle (Saale) durch den Pathologen Dr. Marcus Bauer mittels Standardprotokoll des Bond Polymer Refine Detektionskit am automatisierten Leica Bond-III IHC-Färbesystems. Die Färbung wurde verblindet, mittels Axioscope 5 Mikroskop ausgewertet und mittels H-Score Methode quantifiziert. Der H-Score gibt das Produkt aus Färbeintensität und Anteil positiver Zellen an und wurde je Patient aus dem Mittelwert zweier analysierter Proben errechnet (Detre et al. 1995).

3.3 Durchflusszytometrische Verfahren

3.3.1 Analyse der DNA-Damage-Response

Ich habe Suspensionszellen mit einer Dichte von 500.000 Zellen / ml und adhärenente Zellen mit einer Dichte von 500.000 Zellen / well im 6-well Format mit einem well je Zeitpunkt der

Fixierung und Behandlung bzw. Kontrolle in RPMI-1640 Medium mit 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin ausgesät. Adhärente Zellen wurden 24 h vor Beginn der Behandlung je Analysezeitpunkt ausgesät, während Suspensionszellen direkt nach der Aussaat behandelt wurden. Zur Induktion von Doppelstrangbrüchen habe ich die Zellen für 1 h mit der 25-fachen (Jurkat) bzw. der 50-fachen (Caki2) halbmaximalen Reduktion der Zellviabilität (IC_{50}) mit Doxorubicin inkubiert. Als Kontrolle wurde das Volumenäquivalent PBS verwendet. Die IC_{50} -Werte wurden anhand der mittels 3.1.5 an den jeweiligen wildtypischen Zelllinien ermittelten Konzentrationskurven berechnet. Für die getesteten Zelllinien ergaben sich folgende Konzentrationen:

Tabelle 15 Doxorubicinkonzentration bei halbmaximaler Reduktion der Zellviabilität unter Monotherapie. Zusätzlich ist der 25-fache (Jurkat) bzw. 50-fache (Caki2) IC_{50} angegeben, der als Behandlungskonzentration zur Induktion von Doppelstrangbrüchen genutzt wurde.

Zelllinie	IC_{50} (Doxorubicin) [μ M]	Behandlungskonzentration [μ M]
Caki2	0,0513	2,56
Jurkat	0,0689	3,45

Nach der Inkubation habe ich für adhären Zellen die Ansätze des ersten Zeitpunktes (0 h) einmal mit PBS gewaschen, 5 min trypsinisiert und anschließend die Trypsinierung mittels Zugabe von Kulturmedium abgestoppt und die gesamten Zellen der Kontroll- bzw. Behandlungsansätze fixiert. Suspensionszellen habe ich im Kulturmedium durchmischt und 1×10^6 Zellen Kontroll- bzw. Behandlungsansätze fixiert. Dafür wurden die Zellen für 5 min bei 300 xg zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden für mindestens 24 h bei 4 °C mit eiskaltem 70 %igem Ethanol fixiert. Die Kontroll- bzw. Behandlungsansätze für die folgenden Analysezeitpunkte von Suspensionszellen habe ich für 5 min bei 300 xg zentrifugiert, den Überstand verworfen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in Kulturmedium neu gesetzt. Das Medium der restlichen Kontroll- bzw. Behandlungsansätze von adhären Zellen habe ich entfernt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und das Medium zu Kulturmedium gewechselt. Die Ansätze wurden weitere 5 h, 10 h oder 24 h inkubiert, bevor ich sie wie zuvor beschrieben fixiert habe. Im Anschluss an die Fixierung wurde das Ethanol durch Zentrifugation für 5 min bei 300 xg entfernt und das Zellpellet einmal mit PBS gewaschen. Die Pellets habe ich 10 min in PBS bei Raumtemperatur rehydriert und im Anschluss den Überstand durch Zentrifugation für 5 min bei 300 xg entfernt. Die Zellen wurden 45 min bei 4 °C 1:50 mit Alexa Fluor® 488 anti- γ H2AX in PBS mit 1 % FKS inkubiert und anschließend einmal mit PBS gewaschen. Zur Analyse von Zellen mit Expression des Grün Fluoreszierenden Proteins (GFP) wurden die Zellen 45 min bei 4 °C 1:50 mit Alexa Fluor® 647 anti- γ H2AX in PBS mit 1 % FKS inkubiert und anschließend ebenfalls einmal mit PBS gewaschen. Ich habe die Pellets für 30 min in 1 mg/ml RNase bei

37 °C inkubiert, 1:50 mit 4',6-Diamidino-2-phenyl-indol (DAPI) angefärbt, direkt am BD LSR Fortessa™ Cell Analyzer analysiert und mit BD Life Sciences FlowJo™ v10.6.1 ausgewertet. Die Gatingstrategie der γ H2AX-positiven Zellen ist beispielhaft anhand des Alexa Fluor® 488-gekoppelten γ H2AX-Antikörpers für Jurkat nach 5 h nach Mediumwechsel für die Proben unbehandelt und Doxorubicin-behandelt in der Abbildung 42 im Anhang gezeigt. Bei der Färbung mittels des Alexa Fluor® 647-gekoppelten γ H2AX-Antikörpers wurde analog vorgegangen. Nicht-vitale Zellen (Schritt 1) und Dubletten (Schritt 2) wurden vom Gating ausgeschlossen. Die Positivität für γ H2AX (Schritt 3) wurde bestimmt und bereits in der unbehandelt-Kontrolle vorhandene γ H2AX-positive Zellen wurden vom prozentualen Anteil γ H2AX-positiver Doxorubicin-behandelter Zellen desselben Zeitpunkts abgezogen. Das Gating der simultan analysierten Zellzyklusveränderungen wurde wie in 3.3.3 durchgeführt. Die Experimente wurden jeweils dreimal durchgeführt.

3.3.2 Validierung der GFP-Positivität transduzierter Zelllinien

Ich habe transduzierte Suspensionzellen im Kulturmedium durchmischt und 1×10^6 Zellen für 5 min bei 300 xg zentrifugiert, den Überstand verworfen und das Zellpellet zweimal mit PBS gewaschen. Ich habe die Zellen auf 1 ml verdünnt, direkt am BD LSR Fortessa™ Cell Analyzer analysiert und mit BD Life Sciences FlowJo™ v10.6.1 ausgewertet.

Die Gatingstrategie ist beispielhaft für Jurkat GFP *mock* shRNA in der Abbildung 44 im Anhang gezeigt. Nicht-vitale Zellen (Schritt 1) und Dubletten (Schritt 2) wurden vom Gating ausgeschlossen. Die Positivität für GFP wurde anhand untransduzierter Jurkat als Kontrolle bestimmt (Schritt 3). Die Experimente wurden regelmäßig zur Validierung der anhaltenden Positivität durchgeführt.

3.3.3 Analyse von Apoptose und Nekrose

Ich habe die Zellen mit einer Dichte von 500.000 Zellen / ml ausgesät und mit 4 μ M GSK126, Oxaliplatin bei IC₅₀ oder simultan für 24, 48, 72 oder 96 h inkubiert. Die IC₅₀-Werte wurden anhand der mittels 3.1.5 an den jeweiligen wildtypischen Zelllinien ermittelten Konzentrationskurven berechnet. Für die getesteten Zelllinien ergaben sich folgende Oxaliplatinkonzentrationen:

Tabelle 16 Oxaliplatinkonzentration bei halbmaximaler Reduktion der Zellviabilität unter Monotherapie.

Zelllinie	IC ₅₀ (Oxaliplatin) [μ M]
DERL2	2,022
HH	1,916
Jurkat	1,682
Loucy	0,4238

Um den kompletten Verbrauch des Mediums zu verhindern, habe ich die 72 und 96 h Ansätze nach 48 h Inkubation für 5 min bei 300 xg zentrifugiert, den Überstand verworfen und das Zellpellet in Kontroll- bzw. Inkubationsmedium neu ausgesät. Nach der Inkubation habe ich jeweils 2×10^6 Zellen für 5 min bei 300 xg zentrifugiert, den Überstand verworfen und das Zellpellet einmal mit PBS gewaschen. Ich habe die Proben mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) Annexin V Apoptose Detektionskit mit 7-Aminoactinomycin (7-AAD) nach Vorgaben des Herstellers gefärbt, direkt am BD LSR Fortessa™ Cell Analyzer analysiert und mit BD Life Sciences FlowJo™ v10.6.1 ausgewertet.

Die Gatingstrategie ist beispielhaft für Jurkat nach 48 h Inkubation für die Proben unbehandelt und Oxaliplatin-behandelt in der Abbildung 55 im Anhang gezeigt. Bereits in der unbehandelt-Kontrolle vorhandene nicht-vitale Zellen (Schritt 1) und Dubletten (Schritt 2) wurden vom Gating ausgeschlossen. Die Positivität für 7AAD oder FITC Annexin V wurde anhand ungefärbter, 7AAD-gefärbter, FITC Annexin V-gefärbter und doppeltgefärbter unbehandelt-Kontrollen bestimmt (Schritt 3). Die Experimente wurden dreimal durchgeführt. Annexin V-positive, 7-AAD-negative Zellen wurden als apoptotisch und Annexin V-positive, 7-AAD-positive Zellen wurden als spät nekrotisch eingeordnet.

3.3.4 Zellzyklusanalyse

Ich habe die Zellen mit einer Dichte von 500.000 Zellen / ml ausgesät und mit 4 μ M GSK126, Oxaliplatin bei IC_{50} oder simultan für 24, 48, 72 oder 96 h inkubiert. Die IC_{50} -Werte wurden anhand der mittels 3.1.5 an den jeweiligen wildtypischen Zelllinien ermittelten Konzentrationskurven berechnet und sind in Tabelle 16 unter 3.3.2 aufgelistet. Um den kompletten Verbrauch des Mediums zu verhindern, habe ich die 72 und 96 h Ansätze nach 48 h Inkubation für 5 min bei 300 xg zentrifugiert, den Überstand verworfen und das Zellpellet in Kontroll- bzw. Inkubationsmedium neu ausgesät. Nach der Inkubation habe ich jeweils 2×10^6 Zellen für 5 min bei 300 xg zentrifugiert, den Überstand verworfen und das Zellpellet einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden für mindestens 24 h bei 4 °C mit eiskaltem 70 %igem Ethanol fixiert. Im Anschluss habe ich das Ethanol durch Zentrifugation für 5 min bei 300 xg entfernt und das Zellpellet einmal mit PBS gewaschen. Die Proben wurden für 30 min in 1 mg/ml RNase bei 37 °C inkubiert und 1:50 mit DAPI angefärbt. Im Anschluss habe ich die Proben direkt am BD LSR Fortessa™ Cell Analyzer analysiert und mit BD Life Sciences FlowJo™ v10.6.1 ausgewertet.

Die Gatingstrategie ist beispielhaft für Jurkat nach 48 h Inkubation für die Proben unbehandelt und Oxaliplatin-behandelt in der Abbildung 54 im Anhang gezeigt. Die gesamten Zellen wurden erfasst (Schritt 1) und Dubletten vom Gating ausgeschlossen (Schritt 2). Nicht-vitale Zellen wurden zur Bestimmung der Sub- G_0G_1 -Phase in Schritt 1 nicht ausgeschlossen. Die Zuordnung der Zellzyklusphasen erfolgte mittels *Watson (Pragmatic)* Modell (Watson et al. 1987). Die Experimente wurden jeweils dreimal durchgeführt.

3.4 Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma

Ich habe die Zellen mit einer Dichte von 500.000 Zellen / ml ausgesät und mit Oxaliplatin bei IC_{50} oder Oxaliplatin mit 4 μ M GSK126 simultan für 6, 24, 48 oder 72 h inkubiert. Die IC_{50} -Werte wurden anhand der mittels 3.1.5 an den jeweiligen wildtypischen Zelllinien ermittelten Konzentrationskurven berechnet und sind in Tabelle 16 unter 3.3.2 aufgelistet. Zur zusätzlichen Inhibition von *Sterol Regulatory Element* bindenden Proteinen und *ATP-Binding Cassette* Transportern wurden die Zellen zusätzlich mit 1 μ M Fatostatin oder 30 μ M Glibenclamide für 24, 48 oder 72 h inkubiert. Um den kompletten Verbrauch des Mediums zu verhindern, habe ich die 72 h Ansätze nach 48 h Inkubation für 5 min bei 300 xg zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in Kontroll- bzw. Inkubationsmedium neu ausgesät. Nach der Inkubation habe ich jeweils 2×10^6 Zellen für 5 min bei 300 xg zentrifugiert, den Überstand verworfen und die Pellets in flüssigem Stickstoff schockgefrosten, um Degradationsprozesse zu stoppen. Ich habe die Pellets in 1 %iger Salpetersäure resuspendiert und für 18 h bei 70 °C inkubiert.

Der Platingehalt wurde in Kooperation mit der Abteilung Innere Klinik (Tumorforschung) des Universitätsklinikums Essen durch Dr. Ralf-Axel Hilger mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) an einem Bruker 820-MS ICP Massenspektrometer mit Agilent ICP-MS Expert Software v2.1 bestimmt und als ng_{Platin} je 1×10^6 Zellen angegeben. Für eine ICP-MS Messung wurden 5 Replikate mit je 20 Scans derselben Probe analysiert. Die Quantifizierung erfolgte durch Dr. Hilger anhand von Standardkurven mit Ausgangslösungen, die auf das *National Institute of Standards and Technology* zurückgehen. Zum Vergleich verschiedener Ansätze habe ich die Werte anschließend auf die jeweilige zugehörige Oxaliplatinmonotherapie zum jeweiligen Zeitpunkt normiert. Das Experiment der Oxaliplatin/GSK126 Kombinationstherapie wurde fünfmal und die Experimente mit zusätzlicher Inhibition von *Sterol Regulatory Element* bindenden Proteinen und *ATP-Binding Cassette* Transportern oder EZH2 Knockdown wurden dreimal durchgeführt.

3.5 Statistische Analysen

Graphpad Prism Software v8.4.3 wurde für basale statistische Analysen wie signifikante Unterschiede und Korrelation genutzt. Wenn nicht anders spezifiziert, habe ich zur Berechnung von Signifikanzen den ungepaarten Student t-Test und bei der Analyse normierter Daten den Welch-Test verwendet. Alle Berechnungen der Signifikanz wurden zweiseitig durchgeführt. Signifikanz wurde bei einem p-Wert von $<0,05$ angenommen. Bioinformatische Analysen sind unter 3.2.1 und 3.2.6 beschrieben.

4. Ergebnisse

4.1 Mutationsanalyse MEITL

In einer Kohorte von 33 durch Referenzpathologen bestätigten Monomorphen Intestinalen T-Zell Lymphomen (MEITL) Fällen wurden elf Fälle mittels Exomsequenzierung (WES) durch Omega Bioservices (Norcross, Georgia, USA) und alle Fälle mittels zielgerichteter Sequenzierung durch das deutsche Krebszentrum Heidelberg analysiert. Die Patienten der Kohorte hatten ein medianes Alter von 62 Jahren (38 bis 92 Jahre). Die Kohorte bestand zu 49 % aus weiblichen und zu 36 % aus männlichen Patienten. In 15 % der Fälle war das Geschlecht unbekannt. Der Expressionsstatus des T-Zell Rezeptors ist in Tabelle 17 zusammengefasst mit einem höheren Anteil von $\gamma\delta$ T-Zell Rezeptor positiven (45 %) im Vergleich zum $\alpha\beta$ T-Zell Rezeptor positiven MEITL (30 %). Für die MEITL Kohorte sind keine klinisch-pathologischen Parameter erhoben worden. Die immunhistochemischen Analysen wurde in Kooperation mit dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Halle (Saale) durch den Pathologen Dr. Marcus Bauer durchgeführt und zeigten die in Tabelle 17 aufgeführte Markerexpression.

Tabelle 17 Charakteristika der MEITL Kohorte. n=33. Der T-Zell Rezeptorstatus war für eine Probe unbekannt.

Geschlecht	Weiblich	n=16 (49 %)
	Männliche	n=12 (36 %)
	Keine Angabe	n=5 (15 %)
Alter	Median	62 Jahre
T-Zell Rezeptorstatus	$\alpha\beta^{\text{positiv}}$	n=10 (30 %)
	$\gamma\delta^{\text{positiv}}$	n=15 (45 %)
	Doppelt negativ	n=7 (21 %)
Proteinexpression	CD3 ^{positiv}	n=33 (100 %)
	CD4 ^{positiv}	n=2 (6 %)
	CD56 ^{positiv}	n=31 (94 %)
	TIA-1/ Perforin ^{positiv}	n=19 (58 %)

Auffällig häufig traten mit 25 Fällen (76 %) Mutationen in mindestens einem der analysierten Vertreter des JAK/STAT Signalweges auf, wobei 73 % der Mutationen aktivierende Funktionen zeigten (Abb. 2A). Weiterhin wurden in 28 Fällen (85 %) Mutationen der Histon Methyltransferase *SETD2* gefunden, von denen 75 % zu einem Funktionsverlust von *SETD2* führten. Die Validität der gefundenen Mutationen habe ich bei Diskrepanzen der händischen und bioinformatischen Analyse zunächst mittels Sangersequenzierung überprüft. Beispielhafte Sequenzierungen wildtypischer bzw. *SETD2* mutierter Proben sind in Abbildungen 2B-C

gezeigt. So wurde die mittels Next Generation Sequenzierung identifizierte SETD2 Mutationen der MEITL Probe 25 mit einer Allelfrequenz von 20,6 % an Position 47084139 des humanen Referenzgenoms 19 (hg19) Chromosom 3 (chr3) widerlegt (Abb. 2B). Die SETD2 Insertion der MEITL Probe 33 mit einer Allelfrequenz von 30,6 %, welche durch Verschiebung des Leserahmens zu einem Funktionsverlust führt, wiederum wurde durch die bioinformatische Analyse zunächst als Artefakt erkannt. Diese Mutation konnte ich mittels Sangersequenzierung jedoch validieren (Abb. 2C). Zum Abgleich wurde jeweils der hg19 Datensatz des *National Center for Biotechnology* (NCBI) der *National Library of Medicine* (USA) genutzt (National Center of Biotechnology Information (NCBI) 1988; Sayers et al. 2022). Die Funktionalität und Spezifität der genutzten Primer wurde mittels gelelektrophoretischer Auftrennung validiert (Abb. 37).

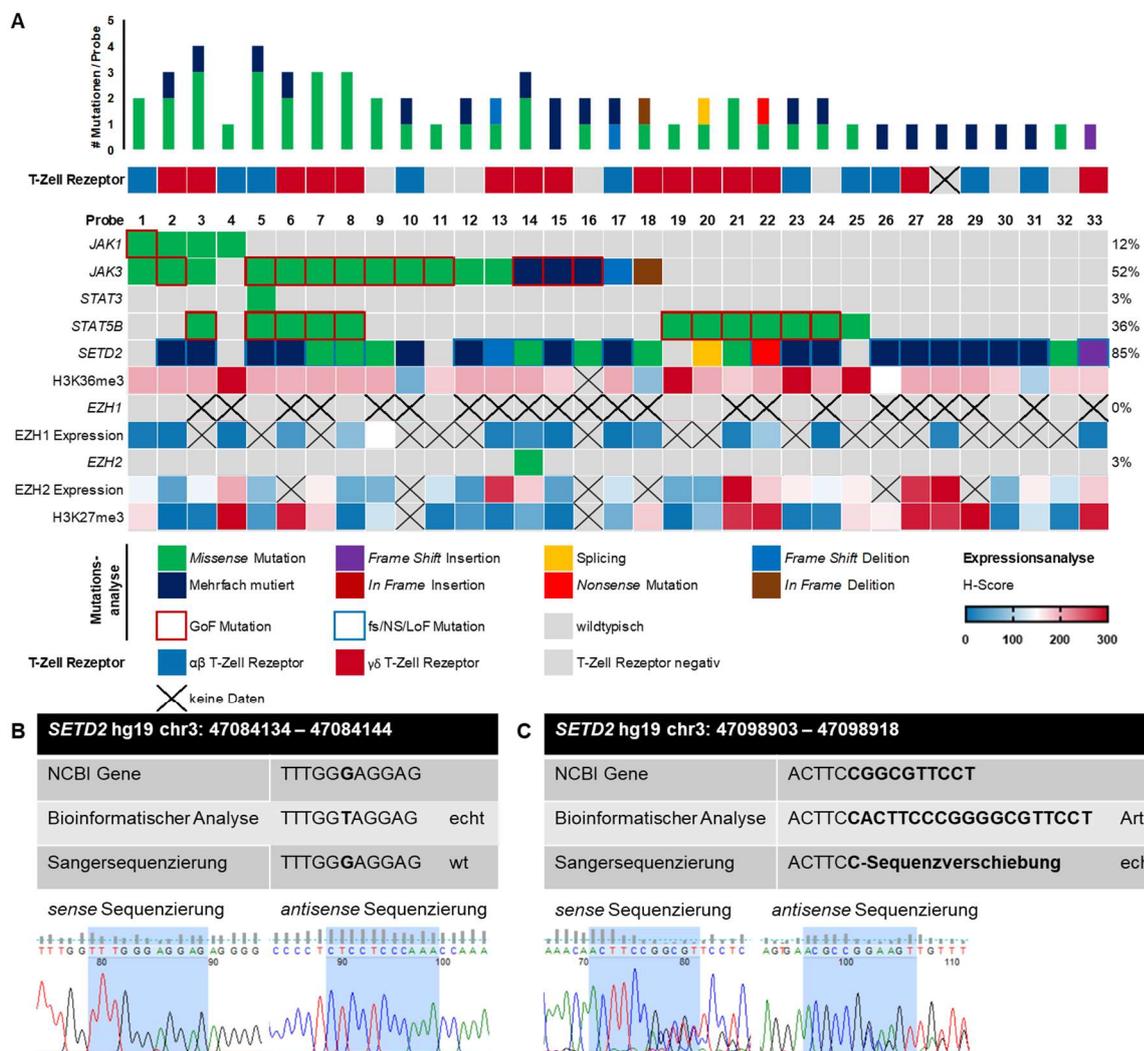


Abbildung 2 Mutationsanalyse der MEITL Kohorte. A Werte unter T-Zell Rezeptor werden unter T-Zell Rezeptor Status und Mutationsdaten unter Mutationsstatus beschrieben. Bioinformatische Analysen wurden durch PD Dr. Sarah Sandmann durchgeführt und ich habe die Validität mittels händischer Analyse überprüft. Zusätzlich sind Expressions- und Trimethylierungsdaten unter H-Score inkludiert. Die Färbungen wurden von Franziska Lea Schümann und Dr. Marcus Bauer erzeugt und quantifiziert. GoF – *gain-of-function* Mutation, FS – *frameshift* Mutation, NS – *nonsense* Mutation, LoF – *loss-of-function* Mutation. Beispielhafte *sense* und *antisense* Sequenzierung einer (B) wildtypischen (wt) oder (C) SETD2 mutierten Sequenz.

Ausgehend von den bestimmten Mutationen der MEITL Kohorte habe ich anhand der in Abbildung 3B gezeigten H-Scores immunhistochemischer Färbungen, die durch die medizinische Doktorandin der Klinik für Innere Medizin IV der Universitätsmedizin Halle (Saale) Franziska Lea Schümann sowie in Kooperation mit dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Halle (Saale) durch den Pathologen Dr. Marcus Bauer erzeugt und quantifiziert wurden, validiert, dass Fälle mit wildtypischem *SETD2* eine stärkere H3K36 Trimethylierung als Fälle mit mutiertem *SETD2* zeigten. Beispielhafte Färbungen der H3K36 Trimethylierung sind in Abbildung 3A gezeigt.

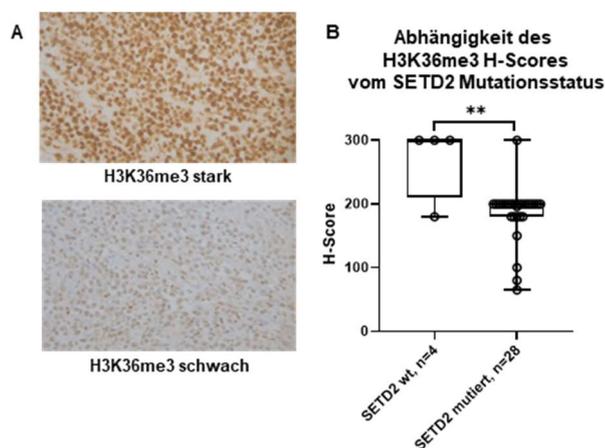


Abbildung 3 H3K36me3 Expression in der MEITL Kohorte. **A** Beispielhafte H3K36me3 Färbung der bereitgestellten IHC Färbungen. Die Färbungen wurden von Franziska Lea Schümann und Dr. Marcus Bauer in 400-facher Vergrößerung erzeugt und quantifiziert. **B** Ich habe die Abhängigkeit des H3K36me3 H-Scores vom SETD2 Mutationsstatus bestimmt. Statistik nach Mann-Whitney-Test. wt – wildtypisch; ** $p < 0,005$.

Neben SETD2 wurden auch die häufig in verschiedenen Tumorentitäten alterierte Histon Methyltransferasen EZH2 sowie das eng verwandte Paralog EZH1 analysiert, für die keine Daten in der Literatur für MEITL vorlagen. Es zeigten sich für *EZH1* in keinem der elf analysierten Fälle Mutationen. Für *EZH2* wurde in einem Fall (3 %) eine Mutation in der Kohorte gefunden. Die Analyse der immunhistochemischen Auswertungen der EZH2 Expression und H3K27 Trimethylierung zeigten eine moderate und signifikante Korrelation der Variablen ($r = 0,659$, $p = 0,002$) (Abb. 4C) (Mukaka 2012). Beispielhafte Färbungen der EZH2 Expression und H3K27 Trimethylierung sind in Abbildung 4A-B gezeigt.

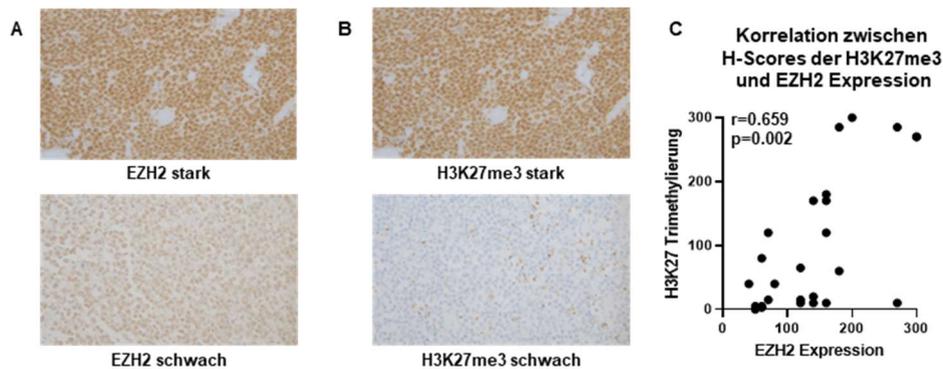


Abbildung 4 Korrelation von EZH2 und H3K27me3 Expression in der MEITL Kohorte. Beispielhafte (A) EZH2 und (B) H3K27me3 Färbung der bereitgestellten IHC Färbungen. Die Färbungen wurden von Franziska Lea Schümann und Dr. Marcus Bauer in 400-facher Vergrößerung erzeugt und quantifiziert. C Ich habe die Korrelation zwischen H3K27me3 und EZH2 Expression bestimmt.

Die Mutationen der analysierten Vertreter des JAK/STAT Signalweges und der Gene der Histon Methyltransferasen *SETD2* und *EZH2* habe ich mittels [cBioPortal Mutation Mapper](#) lokalisiert (Abb. 5) (Cerami et al. 2012; Gao et al. 2013).

In den Genen *JAK1* und *JAK3* wurden Mutationen hauptsächlich in den Protein Tyrosin Kinase Domänen gefunden. Von den vier *Missense* Mutationen des *JAK1* Gens ist L910P als aktivierend publiziert (Gordon et al. 2010). Die häufigste Mutation des *JAK3* Gens war mit sieben Fällen (21 %) die aktivierende *Missense* Mutation M511I (Degryse et al. 2014). Weitere gefundene aktivierende Mutationen des *JAK1* Gens waren A573V mit sechs Fällen (18 %) sowie R657W und V678L mit jeweils einem Fall (Degryse et al. 2014; Vicente et al. 2015). Eine Probe zeigte eine inaktivierende Funktion durch eine *frameshift* Mutation in der ersten Protein Tyrosin Kinase Domäne. Ein weiterer Fall mit einer *in-frame* Mutation an derselben Position des *JAK1* Gens war von unklarer Signifikanz. Das *STAT3* Gen war mit zwei Mutationen selten und ausschließlich in der DNA-Bindedomäne mutiert, während *STAT5B* die aktivierende N642H Mutation in der Src Homology 2 Domäne in neun Fällen (27 %) zeigte (Bandapalli et al. 2014). In zwei weiteren Fällen (6 %) wurde die aktivierende V712E Mutation in der Transaktivierungsdomäne gefunden (Roberti et al. 2016).

In der MEITL Kohorte zeigte *SETD2* über die ganze Sequenz des Gens Mutationen. Das Auftreten von Mutationen mit *loss-of-function* Charakter war auf keine bestimmte Genregion eingegrenzt. Die für die Proteinaktivität kritische Position H2514 war in drei Fällen (9 %) mutiert (Li et al. 2005).

Die einzige Mutation des *EZH2* Gens wurde in der katalytisch aktiven SET Domäne gefunden. Die Mutation war von unklarer Signifikanz.

Artuso et al. 1995; Hartman et al. 2012; Salles et al. 2011; Sos et al. 2009). Veränderungen der Genkopiezahl wurden an zehn MEITL Proben mittels WES ermittelt. Verluste der Genkopiezahl wurden für die Gene *ATM* in sechs Fällen (60 %) und für *TP53* in fünf Fällen (50 %) gefunden. Erhöhung der Genkopiezahl wurde für *ABL1* in fünf Fällen (50 %) und für *ABL2* in zwei Fällen (20 %) aufgezeigt.

Aufgrund der hohen Anzahl an *SETD2* Mutationen in der MEITL Kohorte sowie des bekannten Einflusses hoher EZH2 Expression auf die Tumorprogression wurde der Einfluss der Histon Methyltransferasen auf Wachstum und Chemotherapiesensitivität in Zelllinienmodellen mit T-Zell Leukämie- und Lymphomhintergrund analysiert.

4.2 SETD2

4.2.1 Mutationsstatus, SETD2 mRNA Expression und basale H3K36 Trimethylierung in Zelllinienpanel von T-Zell Neoplasien

Der genetische Hintergrund für *SETD2*, *JAK1*, *JAK3*, *STAT3* und *STAT5B*, die *SETD2* mRNA-Expression sowie die H3K36 Trimethylierung wurden für die T-Zell Akute Lymphatische Leukämie (T-ALL) Zelllinien Jurkat, SUPT11 und Loucy, die Kutanes T-Zell Lymphom (CTCL) Zelllinie HH, die Hepatosplenisches T-Zell Lymphom (HSTCL) Zelllinie DERL2, die Anaplastisches Großzelliges Lymphom, Anaplastische Lymphomkinase positiv (ALCL, ALK+) Zelllinie SR786, die Burkitt Lymphom Zelllinie Daudi, die Diffuses Großzelliges B-Zell Lymphom (DLBCL) Zelllinie OciLy1 und die Vergleichszelllinie HeLa bestimmt. Das Gen *SETD2* war in OciLy1 (I1792M) mutiert, diese Mutation war laut Datenbankanalyse aber von unklarer Signifikanz (Morin et al. 2013). Es zeigte sich in keiner der Zelllinien eine Mutation im *JAK1* Gen. *JAK3* und *STAT3* waren nur in der Zelllinie Jurkat mutiert (K885E bzw. L78F und R729FS). Diese Mutationen waren ebenfalls von unklarer Signifikanz. Für das *STAT5B* Gen wurden Mutationen in den Zelllinien Jurkat (L142P und T724M), DERL2 (N642H) und Daudi (V46I) gefunden (Tabelle 18). Während es sich bei der *STAT5B*^{N642H} Mutation um eine bekannte aktivierende Mutation handelt, waren die anderen Mutationen von unklarer Signifikanz (Bandapalli et al. 2014). Eine umfassende Darstellung der analysierten Mutationen findet sich im Anhang in Abbildung 38.

Tabelle 18 Mutationsanalyse des SETD2 Hintergrundes und des JAK/STAT Signalweges der genutzten Zelllinien. Mutationsdaten wurden von Cosmic (03.06.2022) für Jurkat, Loucy, HH, SR786 und Daudi, von CCLE (20.09.2022) für SUPT11, DERL2 und HeLa sowie von Morin *et al.* und Wright *et al.* für OciLy1 bezogen (Morin *et al.* 2013; Wright *et al.* 2020; Tate *et al.* 2019; Barretina *et al.* 2012).

	<i>SETD2</i>	<i>JAK1</i>	<i>JAK3</i>	<i>STAT3</i>	<i>STAT5B</i>
Jurkat	wt	wt	K885E	L78F R729FS	L142P T724M
SUPT11	wt	wt	wt	wt	wt
Loucy	wt	wt	wt	wt	wt
HH	wt	wt	wt	wt	wt
DERL2	wt	wt	wt	wt	N642H
SR786	wt	wt	wt	wt	wt
Daudi	wt	wt	wt	wt	V46I
OciLy1	I1792M	wt	wt	wt	wt
HeLa	wt	wt	wt	wt	wt

Zur Analyse der Veränderungen der *SETD2* mRNA-Expression wurde eine Erhöhung auf das 1,5-fache der Expression in HeLa als hochreguliert und eine Erniedrigung auf das 0,5-fache der Expression in HeLa als herunterreguliert definiert (Abb. 6A). Eine Hochregulation wurde in der Zelllinien SUPT11 (1,7-fach; $p = 0,003$) gefunden. Die Zelllinien Jurkat (0,6-fach; $p = 0,032$), Loucy (1,3-fach; $p = 0,310$), DERL2 (0,7-fach; $p = 0,087$), Daudi (1,0-fach; $p = 0,815$), und OciLy1 (1,1-fach, $p = 0,373$) zeigten keine Unterschiede. In den Zelllinien HH (0,2-fach; $p = 0,00002$) und SR786 (0,5-fach; $p = 0,011$) wurde eine erniedrigte *SETD2* mRNA-Expression gefunden (Abb. 6B). Die Funktionalität und Spezifität der genutzten Primer wurde stichprobenartig mittels gelelektrophoretischer Auftrennung validiert (Abb. 39).

Für das Protein SETD2 ist kein valide funktionierender Antikörper kommerziell erhältlich. Dementsprechend habe ich auf Proteinebene die Trimethylierung von H3K36 analysiert. Da SETD2 die Histonmethyltransferase ist, die diesen Histonrest primär trimethylieren kann, kann man indirekt anhand der H3K36me3 auf die SETD2 Proteinexpression und Funktionalität schließen (Edmunds *et al.* 2008). Erneut wurde eine Erhöhung auf das 1,5-fache der Expression in HeLa als hochreguliert und eine Erniedrigung auf das 0,5-fache der Expression in HeLa als herunterreguliert definiert (Abb. 6B). Es wurde eine erhöhte H3K36 Trimethylierung für die Zelllinien SUPT11 (1,8-fach; $p = 0,026$), Loucy (2,1-fach; $p = 0,112$), HH (1,8-fach; $p = 0,175$) und DERL2 (2,4-fach; $p = 0,007$) gefunden. Die Zelllinien Jurkat (1,2-fach; $p = 0,305$), SR786 (1,2-fach; $p = 0,018$), Daudi (1,4-fach, $p = 0,164$) und OciLy1 (1,0-fach, $p = 0,990$) zeigten eine mit HeLa vergleichbare Stärke der H3K36 Trimethylierung.

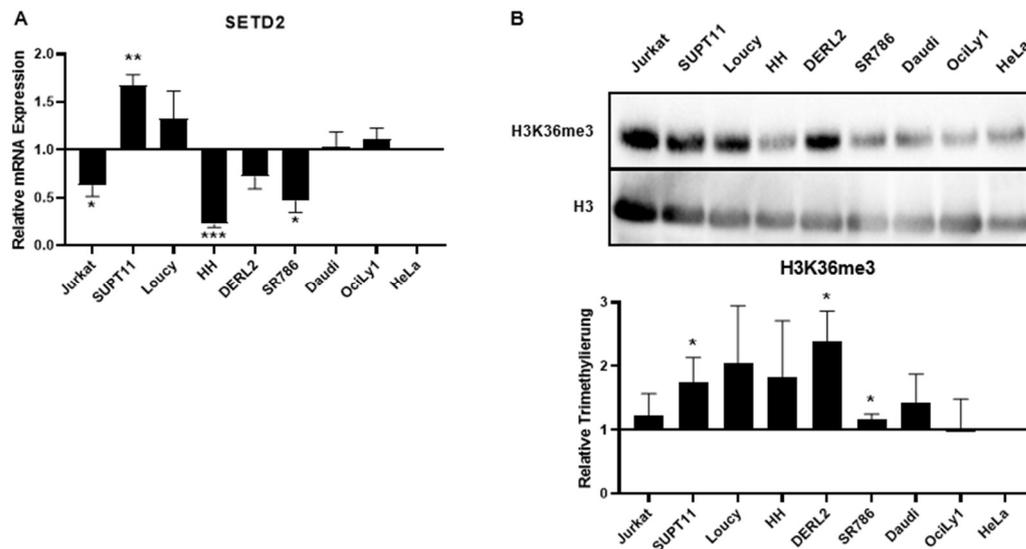


Abbildung 6 Basale Charakterisierung des SETD2 Hintergrundes. Es wurden **(A)** *SETD2* mRNA-Expression und **(B)** H3K36 Trimethylierung analysiert. Analysen der mRNA-Expression zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler (SEM), $n=3$ und Analysen der Trimethylierung zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung (SD), $n=3$. Die Werte der Quantifizierungen wurden jeweils auf die Vergleichszelllinie HeLa bezogen. * $p<0,05$; ** $p<0,005$; *** $p<0,001$.

Für MEITL existieren keine kommerziell erhältlichen Zelllinienmodelle. Die $\gamma\delta$ T-Zell Lymphom Zelllinie DERL2, deren zellulärer Hintergrund den MEITL am nächsten kommt, konnte wiederholt nicht transduziert werden, weshalb sie für weitere Analysen nicht verwendet werden konnte.

Deshalb wurde ein verfügbares Zelllinienmodell einer anderen Entität, für welche ein SETD2 Verlust bekannt ist, genutzt (Gerlinger et al. 2012). Es wurde die klarzelligem Nierenzellkarzinomzelllinie (ccRCC) Caki2 gewählt. Auf genetischer Ebene ist für diese Zelllinie keine Mutation in *SETD2*, *JAK1*, *JAK3*, *STAT3* oder *STAT5B* bekannt (Tabelle 19).

Tabelle 19 Mutationsanalyse der Zelllinie Caki2. Mutationsdaten wurden von [CCLE](#) (20.09.2022) bezogen (Barretina et al. 2012).

	<i>SETD2</i>	<i>JAK1</i>	<i>JAK3</i>	<i>STAT3</i>	<i>STAT5B</i>
Caki2	wt	wt	wt	wt	wt

Die mRNA-Expression von *SETD2* war im Vergleich zu HeLa nicht verändert (0,8-fach; $p = 0,534$), während die H3K36 Trimethylierung auf Proteinebene im Vergleich zu HeLa auf das 0,4-fache ($p = 0,0003$) der HeLa H3K36me3 verringert war (Abb. 7A-B). Die umfassenden Ergebnisse der basalen Mutations- und Expressionsanalyse aller genutzten Zelllinien sind in der Tabelle 22 im Anhang zusammengefasst.

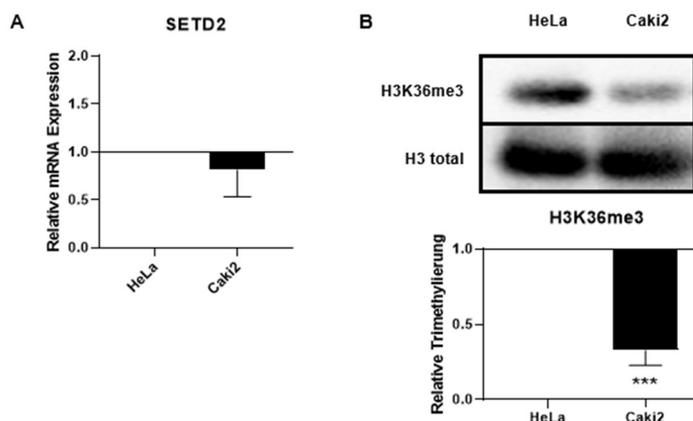


Abbildung 7 Basale Charakterisierung des SETD2 Hintergrundes von Caki2. Es wurden (A) *SETD2* mRNA-Expression und (B) H3K36 Trimethylierung analysiert. Analysen der mRNA-Expression zeigen den Mittelwert \pm SEM, n=3 und Analysen der Trimethylierung zeigen den Mittelwert \pm SD, n=3. Die Werte wurden jeweils auf die Vergleichszelllinie HeLa bezogen. *** p<0,001.

4.2.2 Einfluss von SETD2 Verlust auf das Wachstum von T-Zell Neoplasien

Zur funktionellen Analyse habe ich in der T-ALL Zelllinie Jurkat, der ALCL, ALK+ Zelllinie SR786 und der ccRCC Zelllinie Caki2 einen shRNA vermittelter SETD2 Knockdown erzielt. Der SETD2 Verlust wurde auf Proteinebene durch verringerte H3K36 Trimethylierung (Abb. 8A) und auf mRNA-Ebene durch verringerte *SETD2* Expression (Abb. 8B) im Vergleich zur jeweiligen *mock* Kontrolle nachgewiesen. Für die Zelllinie SR786 SETD2 KD3 ($p = 0,121$) konnte dabei auf mRNA-Ebene keine Signifikanz erzielt werden. Dementsprechend wurde für SR786 mit einem zweiten SETD2 Primerpaar die *SETD2* Expression evaluiert, wobei für alle SR786 SETD2 Knockdownzelllinien eine signifikante *SETD2* mRNA-Herunterregulation nachgewiesen werden konnte (Abb. 8C). Dementsprechend und da alle Zelllinien eine signifikante Herunterregulation der SETD2-Zielmethylierung H3K36me3 zeigten, wurde der Knockdown als etabliert eingestuft.

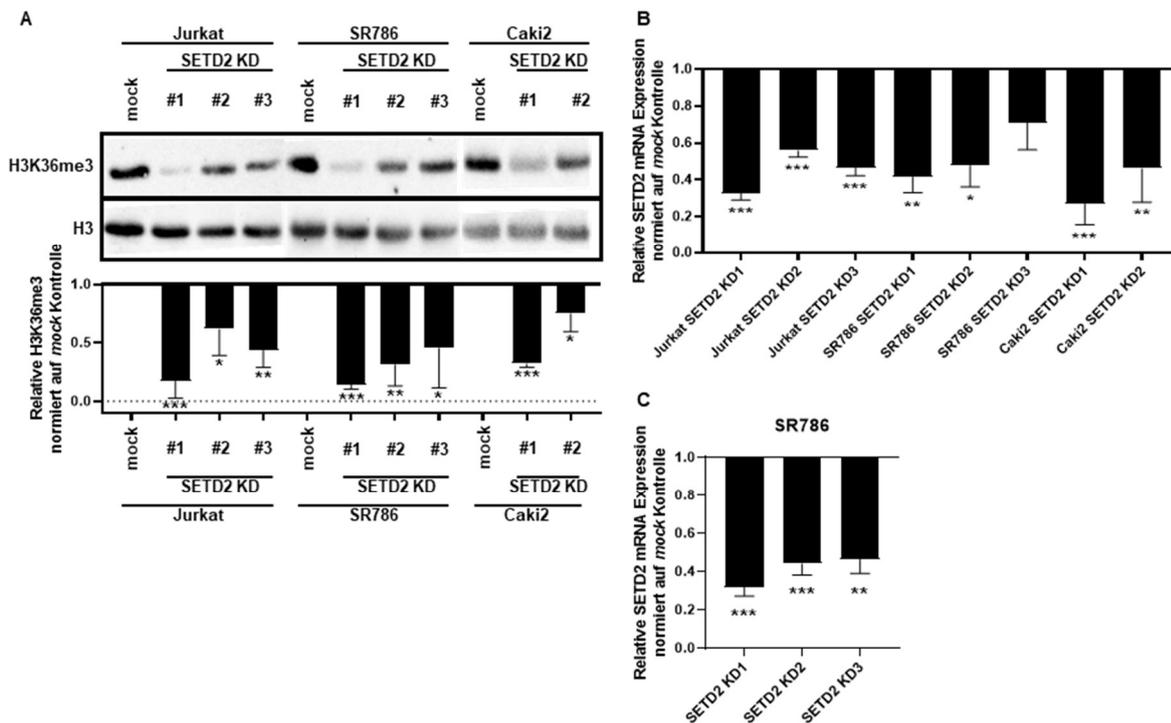


Abbildung 8 Etablierung des SETD2 Knockdowns. **A** Der SETD2 Knockdown wurde in den Zelllinien Jurkat, SR786 und Caki2 mittels Westernblot validiert. Die jeweilige zugehörige Quantifizierung wird darunter gezeigt. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD, $n=3$. **B** Die Reduktion der *SETD2* mRNA wurde mittels qPCR überprüft. **C** Für SR896 SETD2 Knockdownzelllinien wurde die *SETD2* mRNA-Expression mit einem zweiten Primerpaar ("SETD2 II") bestätigt. Die Balken in (**B**) und (**C**) zeigen den Mittelwert \pm SEM, $n=3$. Die quantitativen Analysen von Westernblot und qPCR wurden auf die jeweilige *mock* Kontrolle normiert. * $p<0,05$; ** $p<0,005$; *** $p<0,001$.

Der Einfluss des SETD2 Knockdowns auf das Zellwachstum wurde anhand der Verdopplungszeit analysiert (Abb. 9). Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Werte jeweils auf die Verdopplungszeit der simultan mitgeführte *mock* Kontrolle normiert. Für die Bestimmung des Einflusses auf die Proliferation wurde eine Verlangsamung auf die 1,5-fache bzw. eine Beschleunigung auf die 0,5-fache Verdopplungszeit als Grenze gewählt. Die T-ALL Zelllinie Jurkat und die ALCL, ALK+ Zelllinie SR786 zeigten dabei eine Verlangsamung des Zellwachstums. Für die Jurkat SETD2 Knockdowns ergab sich eine Verlangsamung des Wachstums auf das 2,1- (SETD2 KD1, $p = 0,075$), 1,4- (SETD2 KD2, $p = 0,003$) bzw. 1,5-fache (SETD2 KD3, $p = 0,014$). Das Wachstum der SR786 SETD2 Knockdowns war auf das 1,3- (SETD2 KD1, $p = 0,033$), 3,5- (SETD2 KD2, $p = 0,068$) und 1,3-fache (SETD2 KD3, $p = 0,036$) verlangsamt. Damit ergab sich für beide Zelllinien in wenigstens einer Knockdownzelllinie eine Verlangsamung auf das mindestens 1,5-fache und die anderen SETD2 Knockdownlinien zeigten dieselbe Tendenz im Vergleich zur *mock* Kontrolle. Für die ccRCC Zelllinie Caki2 wurde hingegen keine Verlangsamung im Vergleich zur *mock* Kontrolle gefunden (SETD2 KD1 1,1-fach; $p = 0,748$) (SETD2 KD2 1,4-fach; $p = 0,007$).

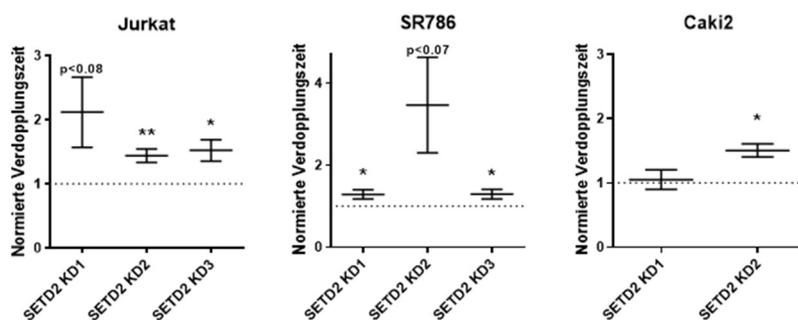


Abbildung 9 Verdopplungszeiten unter SETD2 Knockdown. Die ermittelte Verdopplungszeit über 72 h wurde für Jurkat, SR786 und Caki2 auf die jeweilige zugehörige *mock* Kontrollzelllinie normiert. Die Werte zeigen den Mittelwert \pm SEM, n=5. * p<0,05 ** p<0,005.

4.2.3 Einfluss von SETD2 Verlust auf Chemotherapieansprechen von T-Zell Neoplasien

Es wurde unter SETD2 Knockdown analysiert, welchen Einfluss der SETD2 Verlust auf die Sensitivität gegenüber den in der Erstlinienbehandlung von Peripheren T-Zell Lymphomen (PTCL) etablierten Chemotherapeutika Doxorubicin und Etoposid hat (Abb. 10). Die Analysen erfolgten an der T-ALL Zelllinie Jurkat, der ALCL, ALK+ Zelllinie SR786 und der ccRCC Zelllinie Caki2 im Vergleich mit der jeweiligen zugehörigen *mock* Kontrollzelllinie.

In den Analysen zeigte sich eine höhere Resistenz gegenüber Doxorubicin in Jurkat für die getesteten shRNAs. Der Effekt war für SETD2 KD3 (maximale Differenz +24,2 % Viabilität; p = 0,00007) stärker als für SETD2 KD1 (maximale Differenz +13,4 % Viabilität; p = 0,0001) und SETD2 KD2 (maximale Differenz +18,4 % Viabilität; p = 0,000002). Unter Etoposid wurde in Jurkat SETD2 KD2 (maximale Differenz +10,2 %; p = 0,033) und SETD2 KD3 (maximale Differenz +17,1 % Viabilität; p = 0,0002) ebenfalls eine Erhöhung der Resistenz gefunden, während SETD2 KD1 keine Veränderung der Sensitivität aufwies (maximale Differenz +3,9 % Viabilität; p = 0,340).

Die Erhöhung der Resistenz wurde nicht in SR786 gefunden. Es zeigte sich unter einer hohen getesteten Doxorubicinkonzentration für SETD2 KD1 (maximale Differenz -11,8 % Viabilität; p = 0,216) und SETD2 KD3 (maximale Differenz -15,4 % Viabilität; p = 0,108) eine Tendenz der Sensitivierung. Die Zelllinie zeigte unter einer niedrigen getesteten Etoposidkonzentration eine Sensitivierung (SETD2 KD1 maximale Differenz -15,6 % Viabilität; p = 0,039) (SETD2 KD2 maximale Differenz -12,0 % Viabilität; p = 0,098) (SETD2 KD3 maximale Differenz -19,4 % Viabilität; p = 0,026). Unter SETD2 KD2 wurden keine Veränderungen der Sensitivität im Vergleich mit der *mock* Kontrolle gefunden (maximale Differenz -1,2 % Viabilität; p = 0,950). In der Zelllinie Caki2 wurde für SETD2 KD1 eine Sensitivierung unter Doxorubicin (maximale Differenz -13,6 % Viabilität; p = 0,029) gefunden. Unter Etoposid war für diese Knockdownlinie eine Tendenz der Sensitivierung erkennbar (maximale Differenz -7,2 % Viabilität; p = 0,178). In Caki2 SETD2 KD2 zeigte sich hingegen eine Erhöhung der Resistenz unter Doxorubicin

(maximale Differenz +12,9 % Viabilität; $p = 0,041$) und Etoposid (maximale Differenz +18,5 % Viabilität; $p = 0,002$).

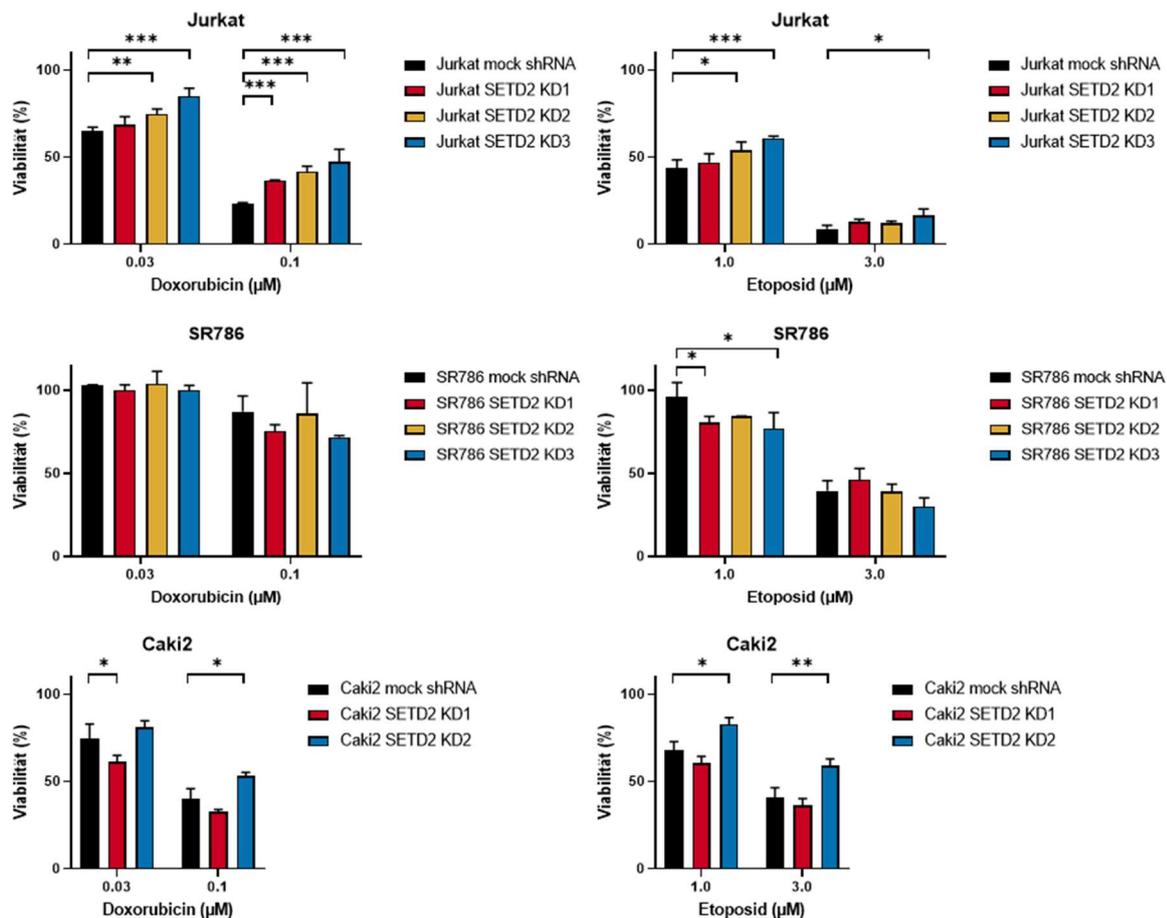


Abbildung 10 SETD2 Knockdown beeinflusst die Sensitivität gegenüber Doxorubicin und Etoposid. Es wurde die Sensitivität gegenüber Doxorubicin oder Etoposid nach 72 h gemessen. Jeder Balken zeigt den Mittelwert \pm SEM, $n=3$. * $p<0,05$; ** $p<0,005$; *** $p<0,001$.

4.2.4 Einfluss von SETD2 Verlust auf Funktionalität der *DNA-Damage-Response*

Die Anzahl auftretender Mutationen sowie kurzer Insertionen und Deletionen wurde in der WES-Analyse der MEITL Kohorte als Maß einer funktionierenden *DNA-Damage-Response* durch den Bioinformatiker Christoph Bartenhagen vom Institut für Medizinische Informatik der Universität Münster analysiert (Abb. 11). Anhand meiner statistischen Analyse konnte kein Unterschied der Anzahl von Mutationen insgesamt oder Insertionen und Deletionen zwischen SETD2 wildtypischen und Proben mit SETD2 Verlust gefunden werden. Die Aussagekraft der Analyse wird jedoch bedingt durch eine hohe Abweichung sowie die sehr geringe Probenzahl.

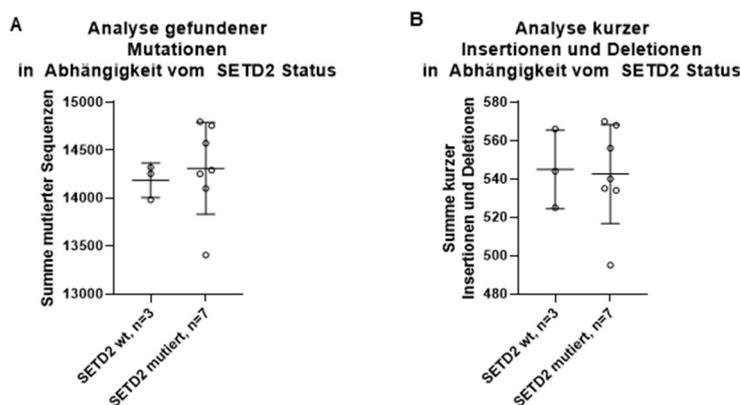


Abbildung 11 Analyse der Anzahl von Mutationen und kurzer Insertionen und Deletionen unter SETD2 Verlust. Das Auftreten von (A) Mutationen oder (B) kurzer Insertionen und Deletionen als Maß der Funktionalität der *DNA-Damage-Response* wurde in der MEITL Kohorte durch den Bioinformatiker Christoph Bartenhagen vom Institut für Medizinische Informatik der Universität Münster bestimmt. Ich habe statistisch die Abhängigkeit des SETD2 Mutationsstatus analysiert. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD.

Da der Aussagegehalt der Analyse der Funktionalität der DNA-Reparatur in der MEITL Kohorte durch die sehr geringe Probenzahl bei hoher Abweichung nur gering ist, habe ich den Einfluss des SETD2 Verlusts auf *DNA-Damage-Response* Mechanismen auch in Zelllinienmodellen analysiert. In den Zelllinien Jurkat und Caki2, für die Veränderungen der Doxorubicinsensitivität unter SETD2 Knockdown gefunden wurden, wurde die Funktionalität der *DNA-Damage-Response* anhand der Serin 139 Phosphorylierung des Histon 2AX (γ H2AX) analysiert (Abb. 12). Dafür wurden durch eine einstündige Hochdosisbehandlung DNA-Schäden induziert und der Verlauf der γ H2AX-positiven Zellen nach anschließender 0 h, 5 h, 10 h und 24 h Inkubation in Kulturmedium gemessen.

Initial waren nach der einstündigen Hochdosisbehandlung noch kein γ H2AX nachweisbar, 5 h nach dem Mediumwechsel wurde ein Maximum des Markers für DNA-Schäden erreicht. Zu diesen Zeitpunkten wurden keine Unterschiede zwischen den *mock* Kontrollzelllinien und den SETD2 Knockdownzelllinien gefunden. In Jurkat zeigte sich ein steter mit der DNA-Reparatur einhergehender Abfall der γ H2AX-positiven Zellen, welcher in Zellen unter SETD2 Knockdown langsamer und weniger effektiv ablief. Nach 24-stündiger Reparatur war dieser Unterschied für die beiden getesteten SETD2 Knockdownzelllinien Jurkat SETD2 KD1 (Differenz +13,0 %; $p = 0,032$) und Jurkat SETD2 KD3 (Differenz +12,3 %; $p = 0,045$) signifikant. In Caki2 erreichte die *mock* Kontrollzelllinie bereits nach 10 h Reparatur Normalniveau, während die SETD2 Knockdownzelllinien erneut einen verlangsamten Abfall der γ H2AX-positiven Zellen zeigten. Dementsprechend war die Differenz zwischen der *mock* Kontrollzelllinie und Caki2 SETD2 KD1 (Differenz +14,2 %; $p = 0,043$) bzw. Caki2 SETD2 KD2 (Differenz +16,2 %; $p = 0,028$) an diesem Zeitpunkt signifikant unterschiedlich. Während die SETD2 Knockdownzelllinien nach 24 h auch in dieser Zelllinie auf hohem Niveau verblieben, kam es in der *mock* Kontrollzelllinie

zu starken Abweichungen, wodurch zu diesem Zeitpunkt kein Unterschied mehr festgestellt werden konnte.

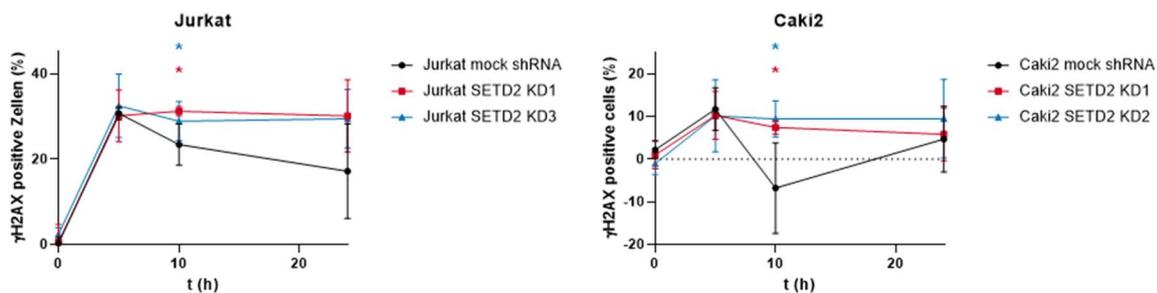


Abbildung 12 Analyse der DNA-Damage-Response unter SETD2 Knockdown. Es wurde der Verlauf der durch Doxorubicin induzierten Doppelstrangbrüche, gemessen am Anteil γ H2AX-positiver Zellen, über die Zeit bestimmt. Die Werte zeigen den Mittelwert \pm SD, n=3. * p<0,05.

In einer simultan zur *DNA-Damage-Response* analysierten Studie der Zellzyklusprogression habe ich die DNA der fixierten Zellen mittels DAPI angefärbt (Abb. 13). Es wurde der initiale Einfluss des SETD2 Knockdowns auf den Zellzyklus anhand des 0 h Zeitpunkts durch den Vergleich von SETD2 Knockdownzelllinien und *mock* Kontrollzelllinie ermittelt. Zudem wurde analysiert, ob im Verlauf der DNA-Reparatur nach Induktion von Doppelstrangbrüchen Veränderungen unter SETD2 Verlust auftreten. Weder initial noch im Verlauf der Behandlung zeigten sich Verschiebungen des Zellzyklus unter SETD2 Knockdown im Vergleich zur *mock* Kontrolle unabhängig vom zellulären Hintergrund oder den genutzten shRNAs.

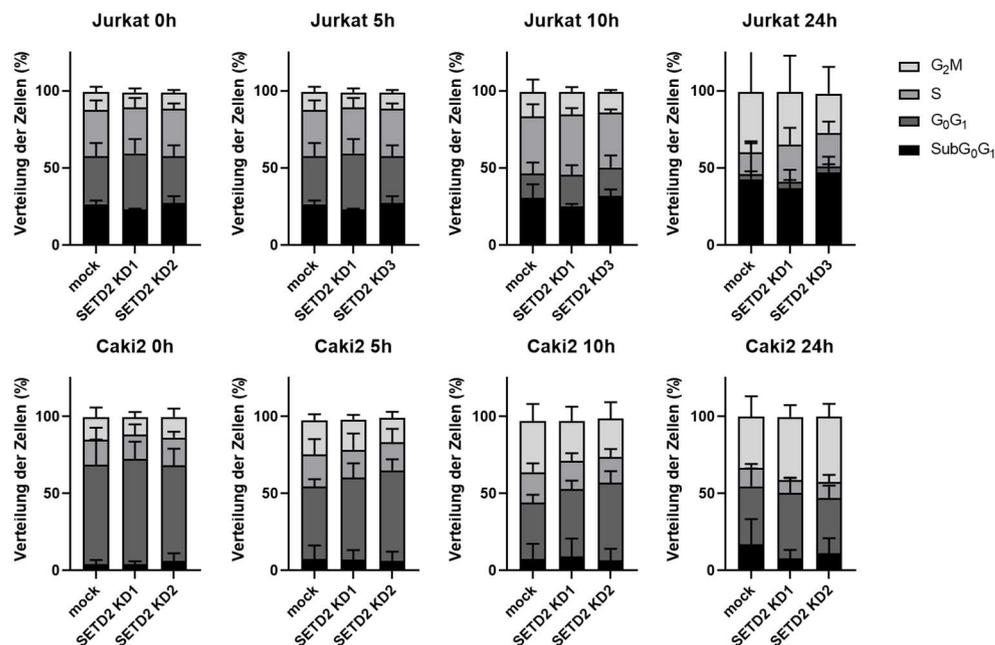


Abbildung 13 Analyse der Zellzyklusveränderungen unter SETD2 Knockdown. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD, n=3.

4.2.5 Zusätzliche Aktivierung proliferationsstreibender Signalwege verschiebt den Einfluss des SETD2 Verlusts zum potenziellen Wachstumsvorteil

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die nachteiligen Auswirkungen des SETD2 Verlusts durch eine zusätzliche Aktivierung proliferationsstreibender Mechanismen, wie zum Beispiel der Aktivierung des JAK/STAT Signalweges, ausgeglichen werden können und so die tumorpropagierenden Eigenschaften des SETD2 Verlusts zum Tragen kommen. Dafür wurde in der bereits in vorherigen Versuchen genutzten Zelllinie Jurkat zur besseren Vergleichbarkeit entweder ein Fusionsprotein der Interleukin 2 induzierbaren T-Zell Kinase (ITK) oder des Translokation-ETS-Leukämie (TEL) Proteins mit der *Spleen* Tyrosinkinase (SYK) eingebracht. Für diese ist eine konstitutionelle Aktivierung des JAK/STAT Signalweges beschrieben (Fathi et al. 2018; Zhang et al. 2019; Kanie et al. 2004; Sprissler et al. 2014). Als Kontrollzelllinie dient in allen folgenden Analysen eine Jurkat Zelllinie, die denselben Vektor mit GFP trägt. Die erzeugten Zelllinien wurden dankenswerterweise von der Arbeitsgruppe von Frau Professorin Christine Dierks erzeugt und die genutzten Vektoren wurden zuvor beschrieben (Pear et al. 1998; Dierks et al. 2010; Wossning et al. 2006). Ich konnte den shRNA-vermittelten SETD2 KD direkt einbringen und habe die erfolgreiche Transduktion auf Protein- und mRNA-Ebene nachgewiesen (Abb. 14A-B).

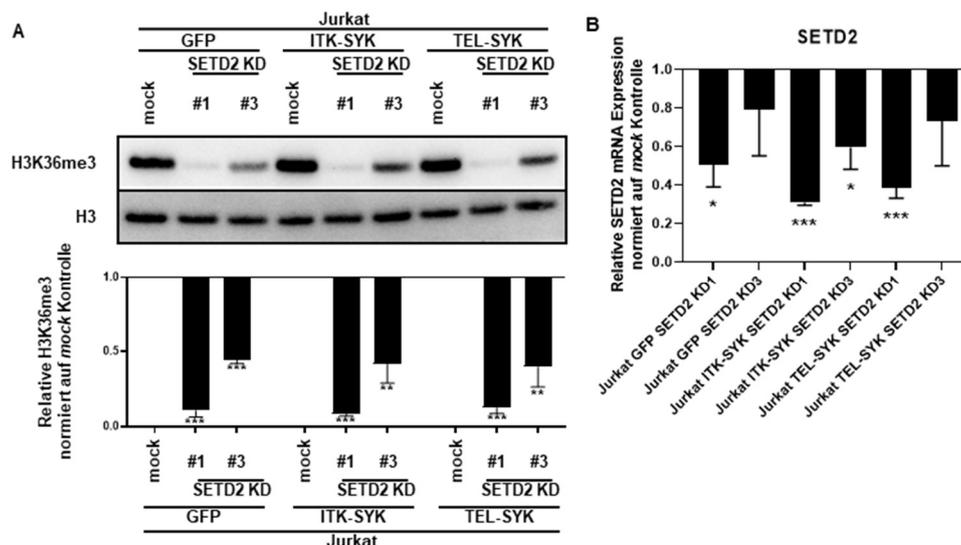


Abbildung 14 Etablierung des SETD2 Knockdowns der ITK- und TEL-SYK getriebenen Zelllinien. **A** Der SETD2 Knockdown wurde in den Zelllinien Jurkat GFP, Jurkat ITK-SYK und Jurkat TEL-SYK mittels Westernblot validiert. Die jeweilige zugehörige Quantifizierung wird darunter gezeigt. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD, $n=3$. **B** Die Reduktion der *SETD2* mRNA wurde mittels qPCR überprüft. Die Balken in zeigen den Mittelwert \pm SEM, $n=3$. Die quantitativen Analysen von Westernblot und qPCR wurden auf die jeweilige *mock* Kontrolle normiert. * $p<0,05$; ** $p<0,005$; *** $p<0,001$.

Zudem habe ich die Expression der SYK-Fusionsproteine Durchflusszytometrie-basiert anhand der Expression des Markerproteins GFP (exemplarisch Abb. 15A) sowie anhand der aktivierenden Phosphorylierung von Tyrosin 694 von STAT5 (phosphoSTAT5 (Y694)) bestätigt (Abb. 15B). Die Gatingstrategie (Abb. 44) und die Diagramme (Abb. 45) aller weiter

genutzten Linien der Durchflusszytometrie sowie die biologischen Replikate des Nachweises der STAT5 Phosphorylierung (Abb. 46) sind im Anhang aufgeführt.

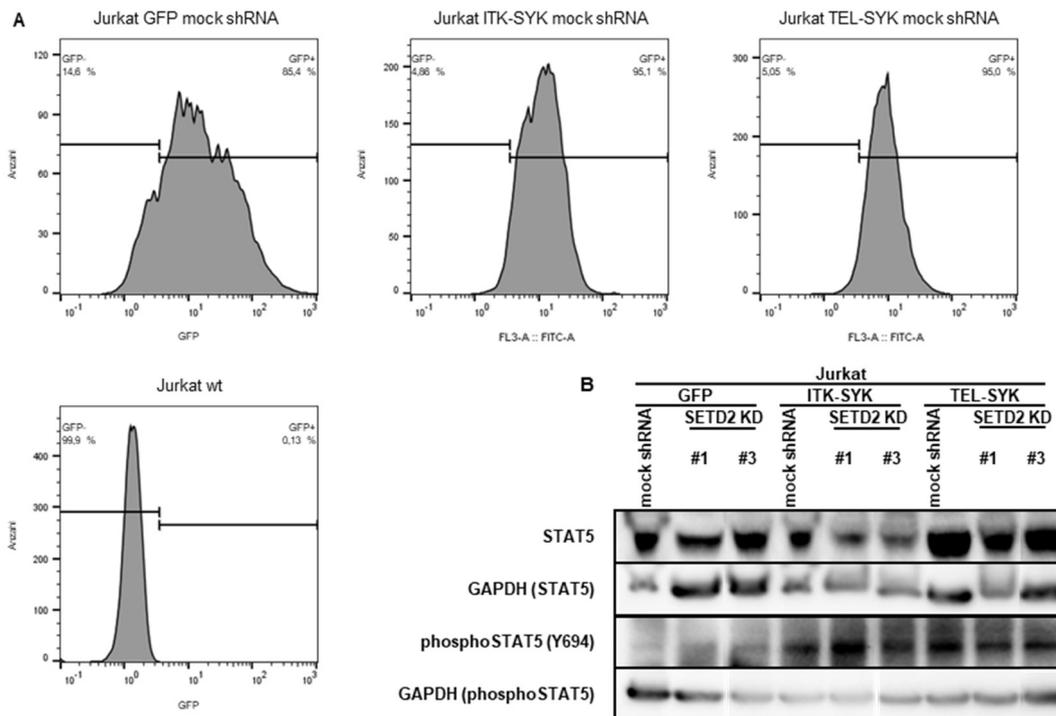


Abbildung 15 Validierung der ITK- und TEL-SYK Expression und STAT5 Aktivierung. **A** Die Expression der ITK- und TEL-SYK Fusionsproteine sowie der Kontrolllinie wurde anhand der GFP-Expression regelmäßig validiert. **B** Die STAT5-Aktivierung wurde anhand der Phosphorylierung des Tyrosin 694 bestätigt.

Davon ausgehend habe ich einzelne phänotypische Veränderungen wie der Verdopplungszeit unter SETD2 Knockdown bei gleichzeitiger Aktivierung des JAK/STAT Signalweges analysiert (Abb. 16). Für die Bestimmung des Einflusses auf die Proliferation wurde eine Verlangsamung auf die 1,5-fache bzw. eine Beschleunigung auf die 0,5-fache Verdopplungszeit als Grenze gewählt. Während die Jurkat GFP Kontrollzelllinie unter SETD2 Verlust weiterhin eine Verlangsamung der Proliferation im Vergleich zur zugehörigen *mock* Zelllinie zeigte (SETD2 KD1 2,9-fach; $p = 0,023$) (SETD2 KD3 1,9-fach; $p = 0,005$), wurde dieser Effekt in den Jurkat Zelllinien mit STAT5 Aktivierung nur noch vermindert oder gar nicht gefunden: Jurkat ITK-SYK SETD2 KD1 1,4-fach ($p = 0,014$), Jurkat ITK-SYK SETD2 KD3 1,1-fach ($p = 0,311$), Jurkat TEL-SYK SETD2 KD1 1,2-fach ($p = 0,224$) und Jurkat TEL-SYK SETD2 KD3 1,1-fach ($p = 0,336$). Die alleinige Expression der Fusionsproteine hatte keinen Einfluss auf die Proliferation (Abb. 47).

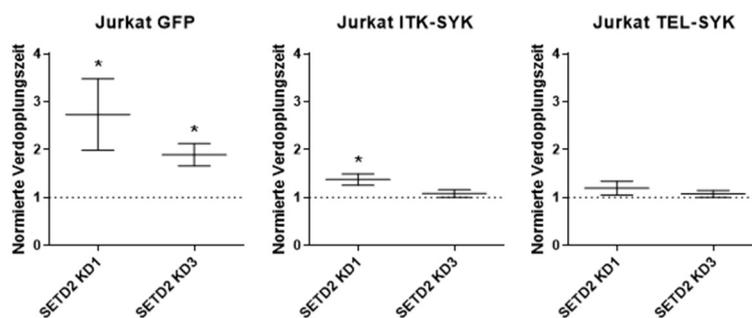


Abbildung 16 Verdopplungszeiten unter SETD2 Knockdown der ITK- und TEL-SYK getriebenen Zelllinien. Die ermittelte Verdopplungszeit über 72 h wurde für Jurkat GFP, Jurkat ITK-SYK und Jurkat TEL-SYK auf die jeweilige zugehörige *mock* Kontrollzelllinie normiert. Die Werte zeigen den Mittelwert \pm SEM, $n=5$. * $p<0,05$.

Ich habe in den ITK- und TEL-SYK getriebenen Jurkat Zelllinien analysiert, ob unter SETD2 Knockdown weiterhin Einfluss ein Einfluss auf die Sensitivität gegenüber den etablierten interkalierenden bzw. Topoisomerase II hemmenden Chemotherapeutika Doxorubicin und Etoposid besteht (Abb. 17). Die Analysen erfolgten im Vergleich mit der jeweiligen zugehörigen *mock* Kontrollzelllinie. Es zeigte sich eine höhere Resistenz gegenüber Doxorubicin unter SETD2 KD: Jurkat GFP SETD2 KD1 maximale Differenz +16,9 % Viabilität ($p = 0,047$) und KD3 maximale Differenz +5,8 % Viabilität ($p = 0,219$), Jurkat ITK-SYK SETD2 KD1 maximale Differenz +10,6 % Viabilität ($p = 0,013$) und KD3 maximale Differenz +10,9 % Viabilität ($p = 0,022$), sowie Jurkat TEL-SYK SETD2 KD1 maximale Differenz +10,9 % ($p = 0,019$) und KD3 maximale Differenz +7,8 % Viabilität ($p = 0,027$). Unter Etoposid wurde in ebenfalls eine Erhöhung der Resistenz gefunden: Jurkat GFP SETD2 KD1 maximale Differenz +10,4 % ($p = 0,026$), Jurkat GFP SETD2 KD3 maximale Differenz +8,8 % Viabilität ($p = 0,0007$), Jurkat ITK-SYK SETD2 KD1 maximale Differenz +17,6 % Viabilität ($p = 0,008$), Jurkat ITK-SYK SETD2 KD3 maximale Differenz +7,2 % Viabilität ($p = 0,016$) und Jurkat TEL-SYK SETD2 KD1 maximale Differenz +6,8 % ($p = 0,005$). Ausschließlich die Zelllinie Jurkat TEL-SYK SETD2 KD3 zeigte keine Veränderung der Sensitivität (maximale Differenz +1,8 % Viabilität; $p = 0,148$).

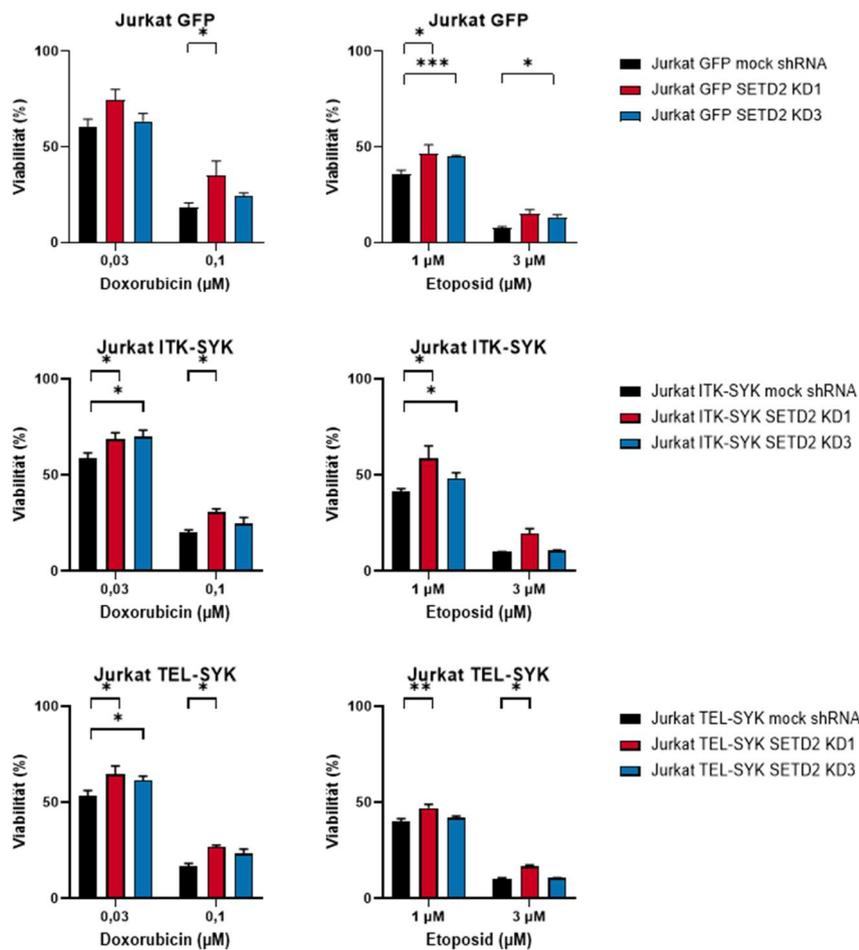


Abbildung 17 SETD2 Knockdown erhöht die Resistenz gegenüber Doxorubicin und Etoposid der ITK- und TEL-SYK getriebenen Zelllinien. Es wurde die Sensitivität gegenüber Doxorubicin oder Etoposid nach 72 h gemessen. Jeder Balken zeigt den Mittelwert \pm SEM, $n=3$. * $p<0,05$; ** $p<0,005$; *** $p<0,001$.

Weiterhin habe ich anhand der Färbung γ H2AX-positiver Zellen validiert, dass auch in den ITK- und TEL-SYK getriebenen Jurkat Zelllinien gestörte DNA-Reparaturmechanismen nach einer Doxorubicinbehandlung auftreten (Abb. 18). Nach einstündiger Hochdosisbehandlung mit Doxorubicin konnte erneut keine Serin 139 Phosphorylierung des Histon 2AX nachgewiesen werden, 5 h nach dem Mediumwechsel wurde ein Maximum des Markers für DNA-Schäden erreicht, welches auf bis 10 h nach dem Beginn der Reparatur bestehen blieb. Zu diesen Zeitpunkten wurden erneut keine Unterschiede zwischen den *mock* Kontrollzelllinien und den SETD2 Knockdownzelllinien gefunden. Anschließend zeigte sich in den jeweiligen *mock* Kontrollzelllinien ein mit der DNA-Reparatur einhergehender Abfall der γ H2AX-positiven Zellen. In Zellen unter SETD2 Knockdown konnte nahezu kein Abfall der γ H2AX-positiven Zellen nachgewiesen werden, wodurch es nach 24-stündiger Reparatur zu einem maximalen Unterschied zur jeweiligen Kontrollzelllinie kam: Jurkat GFP SETD2 KD1 Differenz +17,8 % ($p = 0,008$), Jurkat GFP SETD2 KD3 Differenz +18,2 % ($p = 0,001$), Jurkat ITK-SYK SETD2 KD1 Differenz +16,6 % ($p = 0,001$), Jurkat ITK-SYK SETD2 KD3 Differenz +14,7 %

($p = 0,0001$), Jurkat TEL-SYK SETD2 KD1 Differenz +11,7 % ($p = 0,055$) und Jurkat TEL-SYK SETD2 KD3 Differenz +10,6 % ($p = 0,046$).

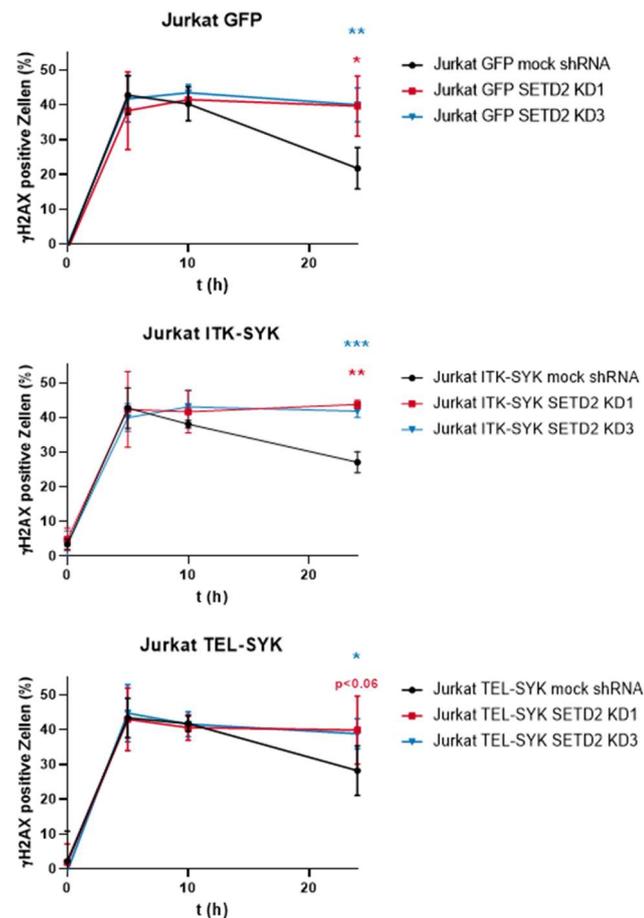


Abbildung 18 Analyse der DNA-Damage-Response unter SETD2 Knockdown der ITK- und TEL-SYK getriebenen Zelllinien. Es wurde der Verlauf der durch Doxorubicin induzierten Doppelstrangbrüche, gemessen am Anteil γ H2AX-positiver Zellen, über die Zeit bestimmt. Die Werte zeigen den Mittelwert \pm SD, $n=3$. * $p < 0,05$.

4.3 EZH2

4.3.1 Mutationsstatus und basale mRNA- und Proteinexpression von EZH1, EZH2 und H3K27 Trimethylierung in Zelllinienpanel von T-Neoplasien

Der genetische Hintergrund für die *Polycomb Repressive Complex 2* (PRC2) Komponenten *EZH1*, *EZH2*, *EED*, *SUZ12* und *RBBP4*, die *EZH1* und *EZH2* mRNA-Expression sowie die *EZH1* und *EZH2* Proteinexpression und H3K27 Trimethylierung wurden für die T-ALL Zelllinien Jurkat, SUPT11 und Loucy, die CTCL Zelllinie HH, die HSTCL Zelllinie DERL2, die ALCL, ALK+ Zelllinie SR786, die Burkitt Lymphom Zelllinie Daudi, die DLBCL Zelllinie OciLy1 und die Vergleichszelllinie HeLa bestimmt. Die reifzelligen B-Zell Neoplasiezelllinien wurden gewählt, da für diesen Hintergrund *EZH2* Überexpressionen oder aktivierende Mutationen bekannt sind, sodass sie sich besonders bei dieser Fragestellung als Positivkontrolle eignen (Tian et al. 2016; McCabe et al. 2012).

Das Gen *EZH1* war ausschließlich in der Zelllinie Jurkat mutiert (R557H). Diese Mutation war laut Datenbankanalyse von unklarer Signifikanz. Für das *EZH2* Gen wurde eine Mutation in der Zelllinien OciLy1 (Y641N) gefunden (Morin et al. 2010). Diese ist als aktivierend beschrieben (Yap et al. 2011). Während das *EED* Gen in allen Zelllinien wildtypisch war, waren die Gene *SUZ12* und *RBBP4* nur in der Zelllinie Jurkat (R516H und Q737FS bzw. A294T) mutiert (Tabelle 20). Während die *SUZ12* Leserastermutation laut Datenbankanalyse onkogenes Potential haben könnte, ist die *SUZ12* Missensemutation von unklarer Signifikanz und die *RBBP4* Mutation als benigne eingestuft (Chakravarty et al. 2017). Eine umfassende Darstellung der analysierten Mutationen findet sich im Anhang in Abbildung 48.

Tabelle 20 Mutationsanalyse der PRC2 Komponenten der genutzten Zelllinien. Mutationsdaten wurden von [Cosmic](#) (03.06.2022) für Jurkat, Loucy, HH, SR786 und Daudi, von [CCLE](#) (20.09.2022) für SUPT11, DERL2 und HeLa sowie von Morin *et al.* und Wright *et al.* für OciLy1 bezogen (Tate et al. 2019; Barretina et al. 2012; Morin et al. 2013; Wright et al. 2020).

	<i>EZH1</i>	<i>EZH2</i>	<i>EED</i>	<i>SUZ12</i>	<i>RBBP4</i>
Jurkat	R557H	wt	wt	R516H Q737FS	A294T
SUPT11	wt	wt	wt	wt	wt
Loucy	wt	wt	wt	wt	wt
HH	wt	wt	wt	wt	wt
DERL2	wt	wt	wt	wt	wt
SR786	wt	wt	wt	wt	wt
Daudi	wt	wt	wt	wt	wt
OciLy1	wt	Y641N	wt	wt	wt
HeLa	wt	wt	wt	wt	wt

Für die Expressionsanalyse habe ich erneut eine Erhöhung auf das 1,5-fache der Expression in HeLa als hochreguliert und eine Erniedrigung auf das 0,5-fache der Expression in HeLa als herunterreguliert definiert. Die *EZH1* mRNA-Expression war in den Zelllinien Jurkat (1,6-fach; $p = 0,060$), SUPT11 (2,0-fach; $p = 0,056$), Loucy (1,5-fach; $p = 0,070$), DERL2 (1,8-fach; $p = 0,086$), Daudi (2,0-fach; $p = 0,029$) und OciLy1 (4,3-fach; $p = 0,007$) erhöht (Abb. 19A). In den Zelllinien HH (0,6-fach, $p = 0,0002$) und SR786 (0,9-fach, $p = 0,465$) gab es keinen Unterschied in der *EZH1* mRNA-Expression. Die *EZH2* mRNA-Expression war in Jurkat (1,7-fach, $p = 0,154$), SUPT11 (3,0-fach, $p = 0,027$), DERL2 (3,5-fach, $p = 0,007$), Daudi (1,6-fach, $p = 0,022$) und OciLy1 (2,2-fach, $p = 0,014$) erhöht. HH (0,7-fach, $p = 0,078$) und SR786 (1,0-fach, $p = 0,883$) zeigten keinen Unterschied. Die *EZH2* mRNA-Expression war in Loucy (0,003-fach, $p < 0,000001$) erniedrigt. Die Funktionalität und Spezifität der genutzten Primer habe ich stichprobenartig mittels gelelektrophoretischer Auftrennung validiert (Abb. 49).

Auf Proteinebene wurde für nahezu alle untersuchten T- und B-Zell Zelllinien eine verringerte EZH1 Expression gefunden: Jurkat 0,4-fach ($p = 0,044$), SUPT11 0,5-fach ($p = 0,032$), Loucy 0,2-fach ($p = 0,0001$), DERL2 0,1-fach ($p = 0,000003$), SR786 0,1-fach ($p = 0,00004$), Daudi 0,3-fach ($p = 0,0004$), OciLy1 0,2-fach ($p = 0,0008$) (Abb. 19B). Eine Ausnahme bildete die Zelllinie HH (1,2-fach; $p = 0,571$), die eine zu HeLa gleiche EZH1 Expression zeigte. Die EZH2 Proteinexpression war in nahezu allen Zelllinien im Vergleich zu HeLa erhöht: Jurkat (7,3-fach, $p = 0,005$), SUPT11 (3,1-fach, $p = 0,219$), HH (4,7-fach; $p = 0,00008$), DERL2 (4,5-fach; $p = 0,009$), SR786 (8,0-fach; $p = 0,033$), Daudi (11,9-fach, $p = 0,095$) und OciLy1 (6,8-fach, $p = 0,129$). Die einzige Zelllinie mit einer erniedrigten EZH2 Expression war Loucy, für die kein Signal über dem Hintergrund aufgenommen werden konnte. Es zeigte sich eine erhöhte H3K27 Trimethylierung für die Zelllinien Jurkat (2,3-fach; $p = 0,418$), HH (3,4-fach; $p = 0,354$), SR786 (2,0-fach; $p = 0,038$) und OciLy1 (11,3-fach; $p = 0,152$), während die Zelllinie SUPT11 (0,9-fach; $p = 0,867$) keinen Unterschied in der H3K27 Trimethylierung zu HeLa hatte. Für Loucy und DERL2 wurde kein Signal über dem Hintergrund aufgenommen. Die umfassenden Ergebnisse der basalen Mutations- und Expressionsanalyse aller genutzten Zelllinien sind in der Tabelle 22 im Anhang zusammengefasst.

Ich habe keine Korrelation zwischen der Intensität der EZH1 ($r = 0,0359$; $p = 0,933$) oder EZH2 ($r = 0,3685$; $p = 0,369$) Proteinexpression und dem kanonischen Ziel H3K27 Trimethylierung statistisch nachweisen können (Abb. 19C) (Mukaka 2012).

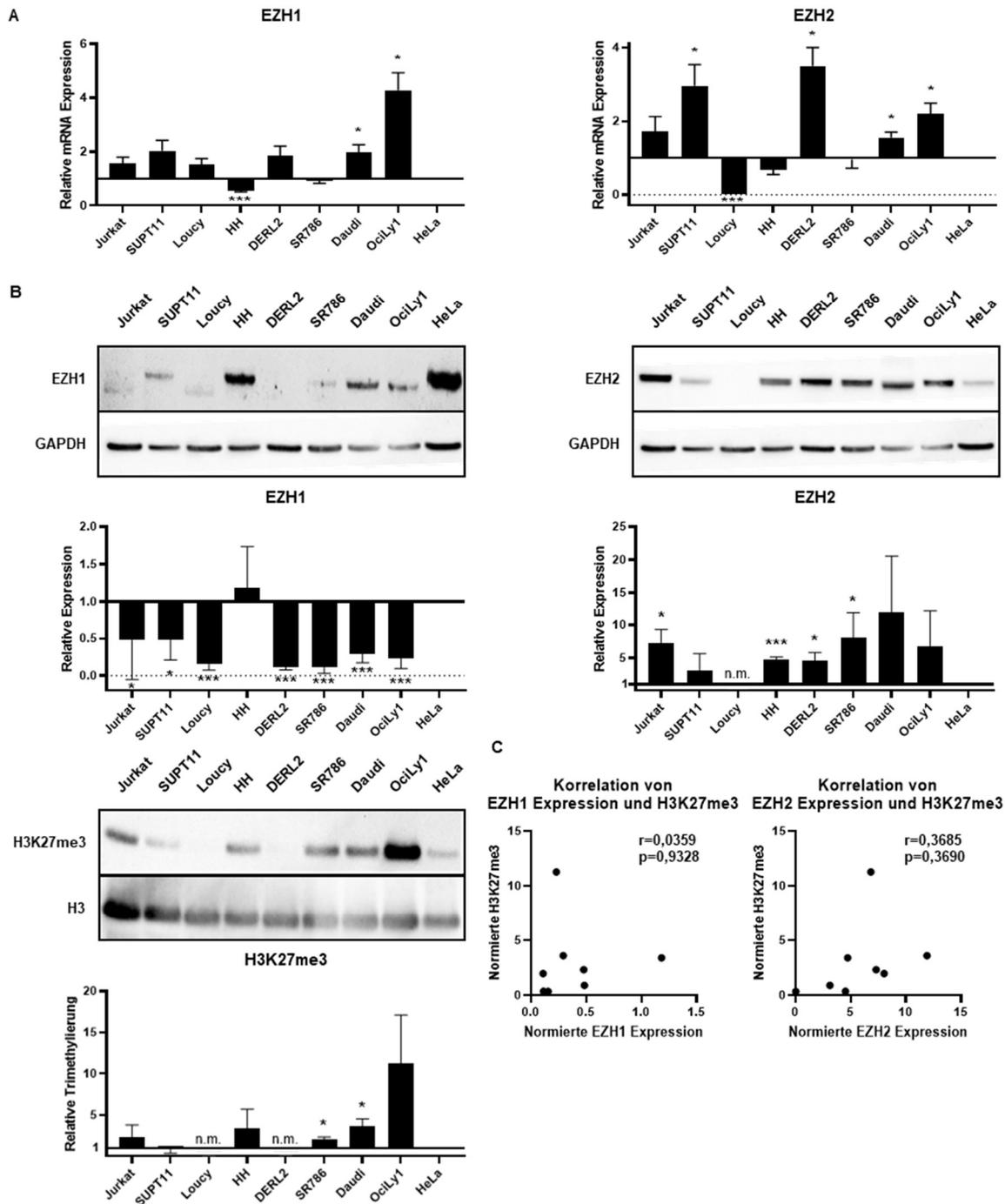


Abbildung 19 Basale Charakterisierung des EZH2 Hintergrundes. Es wurden (A) *EZH1* und *EZH2* mRNA-Expression und (B) *EZH1* und *EZH2* Proteinexpression sowie H3K27me3 analysiert. Analysen der mRNA-Expression zeigen den Mittelwert \pm SEM, $n=3$ und Analysen der Proteinexpression und Trimethylierung zeigen den Mittelwert \pm SD, $n=3$. Die Werte der Quantifizierungen in (A) und (B) wurden jeweils auf die Vergleichszelllinie HeLa bezogen. Wenn es bei den Analysen der Proteinexpression und Trimethylierung kein Signal über dem Hintergrund gab, wurde die Quantifizierung mit nicht messbar (n.m.) ausgewertet. C Anhand der quantifizierten Proteinexpression von *EZH1* und *EZH2* wurde die Korrelation zur quantifizierten H3K27me3 bestimmt. * $p<0,05$; *** $p<0,001$.

4.3.2 Einfluss von EZH2 Inhibition und Knockdown auf Wachstum von T-Zell Neoplasien

Die Reduktion der Zellviabilität unter pharmakologischer EZH2 Inhibition wurde für das zuvor beschriebene Zelllinienpanel mit T-Zell Neoplasie Hintergrund analysiert. Die Zelllinien Daudi und OciLy1 mit B-Zell Lymphom Hintergrund wurden als Vergleichszelllinien genutzt. Ich habe den Einfluss auf das Zellwachstum unter den EZH2 spezifischen S-Adenosylmethionin (SAM) kompetitiven Inhibitoren GSK126 und EPZ6438 analysiert. Es zeigte sich nur bei hohen Konzentrationen von mindestens 3 μM EZH2 Inhibitor in Zelllinien mit T-ALL Hintergrund, von mindestens 10 μM EZH2 Inhibitor in Zelllinien mit PTCL Hintergrund und von mindestens 0,3 μM EZH2 Inhibitor in Zelllinien mit B-NHL Hintergrund eine signifikante Reduktion der Zellviabilität. GSK126 war dabei effektiver als EPZ6438 mit einer über alle getesteten Zelllinien gemittelt, höheren maximalen Reduktion der Zellviabilität (-37,3 % vs. -4,4 % Viabilität; jeweils $n=8$; $p = 0,013$) (Abb. 20A).

Ich habe weiterhin analysiert, ob Zusammenhänge zwischen dem Ansprechen auf EZH2 Inhibition und EZH2 Expression bzw. H3K27 Trimethylierung bestehen. Dafür wurde für alle getesteten Zelllinien die Korrelation zwischen $\log_{10}(\text{IC}_{50}) \pm \text{SD}$ ($n=30$) von GSK126 und der jeweiligen normierten Proteinexpression $\pm \text{SD}$ ($n=3$) bestimmt. Da keine der Zelllinien im getesteten Konzentrationsbereich ein unteres Plateau der Viabilität erreicht hat, wurde es zur Berechnung des $\log_{10}(\text{IC}_{50})$ auf 0 festgelegt. Es wurde eine moderate negative Korrelation zwischen EZH2 Expression und Ansprechen auf GSK126 ($r = -0,6867$; $p = 0,060$) gefunden (Abb. 20B) (Mukaka 2012). Zwischen der EZH1 Expression ($r = -0,2636$; $p = 0,528$) oder der H3K27 Trimethylierung ($r = -0,3852$; $p = 0,346$) und dem Ansprechen auf GSK126 wurde hingegen keine Korrelation gefunden (Abb. 50).

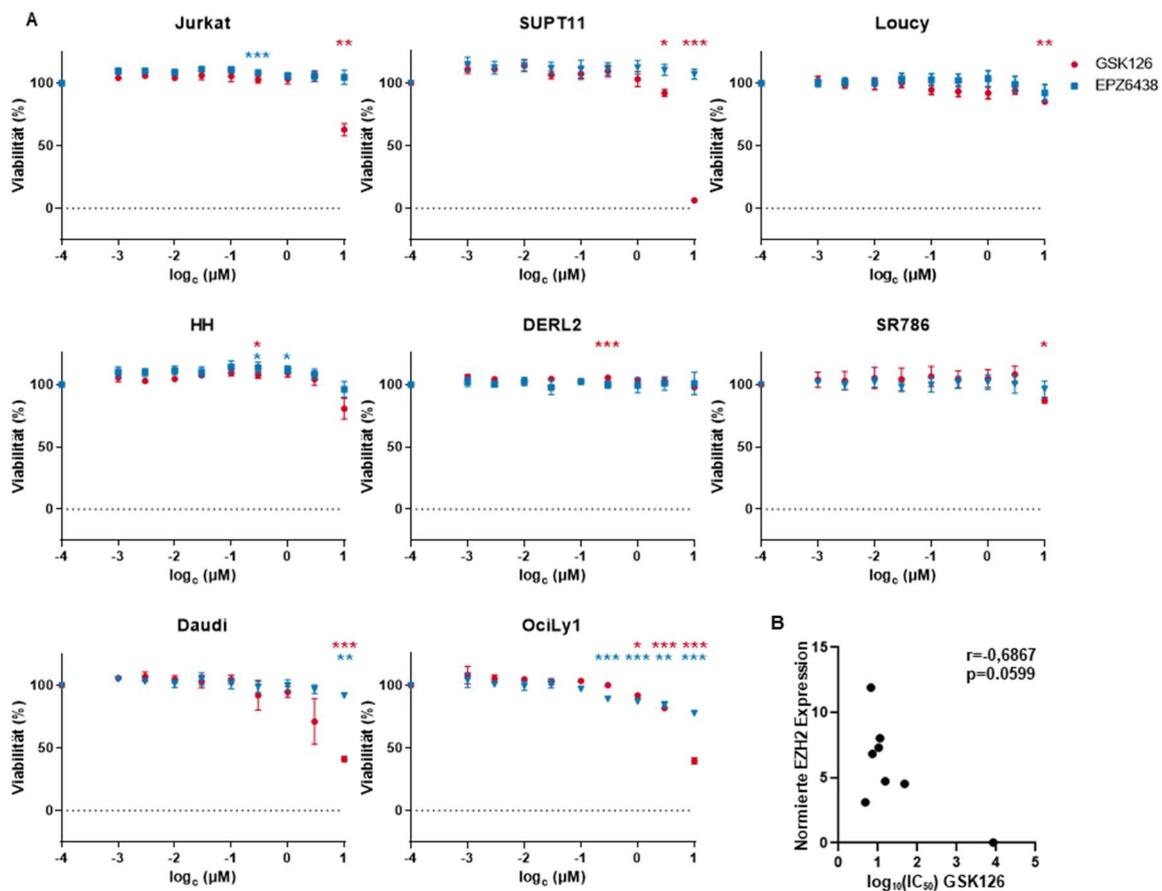


Abbildung 20 Einfluss der EZH2 Inhibition auf die Zellviabilität. **A** Die Zellviabilität wurde über 72 h für die Zelllinien Jurkat, SUPT11, Loucy, HH, DERL2, SR786, Daudi und OciLy1 für die EZH2 Inhibitoren GSK26 und EPZ6438 ermittelt. Sternchen zeigen signifikante Unterschiede von GSK126 (rot) bzw. EPZ6438 (blau) zur Behandlungskontrolle an. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$. **B** Die Korrelation zwischen $\log_{10}(\text{IC}_{50})$ von GSK126 und normierter EZH2 Proteinexpression wurde bestimmt.

Zur funktionellen Analyse habe ich in der T-ALL Zelllinie Jurkat und der CTCL Zelllinie HH einen shRNA vermittelter EZH2 Knockdown erzielt. Der EZH2 Verlust wurde auf Proteinebene durch verringerte EZH2 Expression sowie H3K27 Trimethylierung (Abb. 21A) und auf mRNA-Ebene durch verringerte *EZH2* Expression (Abb. 21B) im Vergleich zur jeweiligen *mock* Kontrolle nachgewiesen. Für die Zelllinie Jurkat EZH2 KD1 konnte dabei aufgrund der schwächeren Effizienz des Knockdowns für H3K27 Trimethylierung und EZH2 mRNA-Expression keine Signifikanz erzielt werden ($p = 0,054$). Da die EZH2 Proteinexpression jedoch auch in dieser Zelllinie signifikant herunterreguliert war, wurde auch dieser Knockdown als erfolgreich eingestuft.

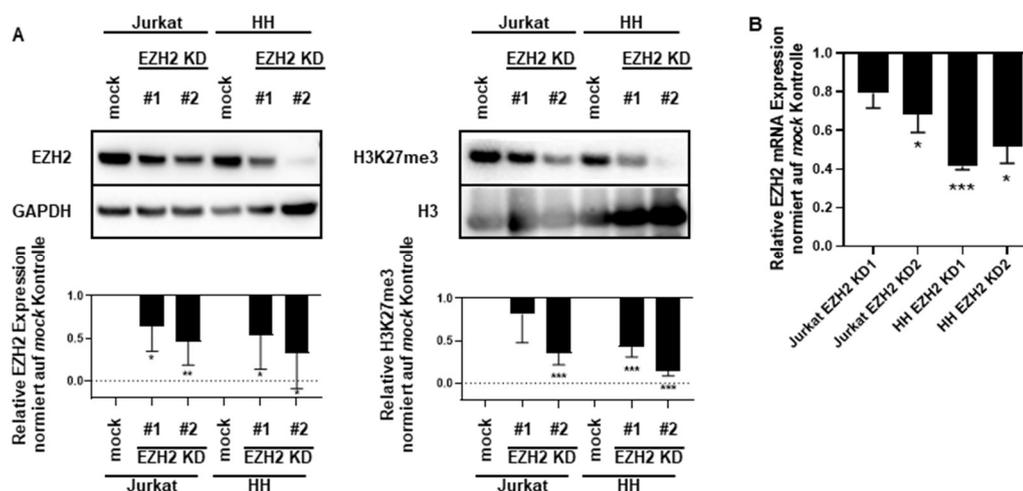


Abbildung 21 Etablierung des EZH2 Knockdowns. **A** Der EZH2 Knockdown wurde in den Zelllinien Jurkat und HH mittels Westernblot validiert. Die jeweilige zugehörige Quantifizierung wird darunter gezeigt. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD, $n=5$. **B** Die Reduktion der *EZH2* mRNA wurde mittels qPCR validiert. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SEM, $n=3$. Die quantitativen Analysen von Westernblot und qPCR wurden auf die jeweilige *mock* Kontrolle normiert. * $p<0,05$; ** $p<0,005$; *** $p<0,001$.

Der Einfluss des EZH2 Knockdowns auf das Zellwachstum habe ich anhand der Verdopplungszeit analysiert (Abb. 22). Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Werte jeweils auf die Verdopplungszeit der simultan mitgeführte *mock* Kontrolle normiert. Es wurde eine Verlangsamung auf die 1,5-fache bzw. eine Beschleunigung auf die 0,5-fache Verdopplungszeit als Grenze gewählt. Für die T-ALL Zelllinie Jurkat zeigten die EZH2 Knockdownzellen keine Veränderung der Proliferation (EZH2 KD1 1,2-fach; $p = 0,032$) (EZH2 KD2 1,0-fach; $p = 0,334$). Die CTCL Zelllinie HH zeigte ebenfalls unter EZH2 Knockdown kein verändertes Proliferationsverhalten (EZH2 KD1 1,1-fach; $p = 0,038$) (EZH2 KD2 1,0-fach; $p = 0,782$).

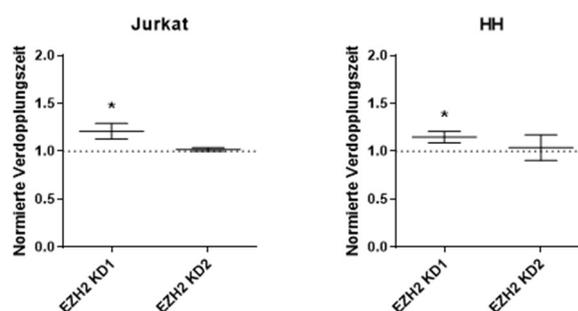


Abbildung 22 Verdopplungszeiten unter EZH2 Knockdown. Die ermittelte Verdopplungszeit über 72 h wurde für Jurkat und HH auf die jeweilige zugehörige *mock* Kontrollzelllinie normiert. Die Werte zeigen den Mittelwert \pm SEM, $n=5$. * $p<0,05$.

4.3.3 Einfluss von EZH2 Inhibition und Knockdown auf Chemotherapieansprechen von T-Zell Neoplasien

Ich habe den Einfluss des spezifischen EZH2 Inhibitors GSK126 auf die Sensitivität gegenüber den in T-Zell Leukämien und Lymphomen gebräuchlichen Erst- und

Zweitlinientherapiemedikamenten Doxorubicin, Oxaliplatin, 5-Azacytidin und Cytarabin in einer reduzierten Anzahl Zelllinien in einem Screening analysiert (Abb. 23). Dafür wurde die maximale Differenz der Viabilität zwischen Monotherapie und in Kombination mit GSK126 ermittelt. Negative Werte geben eine Erhöhung der Resistenz an, während positive Werte eine Sensitivierung widerspiegeln. Dabei fiel besonders die über alle Zelllinien aufgedeckte Erniedrigung der Sensitivität gegenüber Oxaliplatin auf, die im weiteren Verlauf detaillierter analysiert wurde. Die detaillierten Ergebnisse des Screenings sind in der Abbildung 53 im Anhang zusammengefasst.

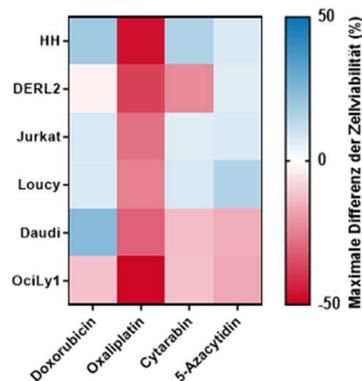


Abbildung 23 Der SAM-kompetitive EZH2 Inhibitor GSK126 moduliert die Sensitivität gegenüber in der Behandlung von PTCL eingesetzten Therapeutika. Es wurde der Mittelwert der Differenz der Viabilität bei maximaler Modulation der Sensitivität gegenüber Doxorubicin, Oxaliplatin, 5-Azacytidin und Cytarabin unter GSK126 Inkubation im Vergleich zur jeweiligen Monotherapie nach 72 h gemessen. n=3.

Zur eingehenden Analyse der Erhöhung der Resistenz gegenüber Oxaliplatin habe ich die Sensitivität unter Inkubation mit verschiedenen EZH2 Inhibitoren analysiert. Durch 72 h simultane Inkubation von Oxaliplatin und entweder GSK126 oder EPZ6438 wurde die Sensitivität gegenüber Oxaliplatin signifikant erniedrigt (Abb. 24). Dieser Effekt wurde für die SAM-kompetitiven EZH2 Inhibitoren im ganzen Panel bestehend aus T-Zell Leukämie, T-Zell Lymphom und B-Zell Lymphom Zelllinien gefunden. Es wurde stichprobenartig in einem reduzierten Panel aus T-Zell Leukämie und T-Zell Lymphom Zelllinien der Einfluss des S-Adenosylhomocystein (SAH) Inhibitors DZNep auf die Oxaliplatinsensitivität analysiert, aber keine Veränderung gefunden.

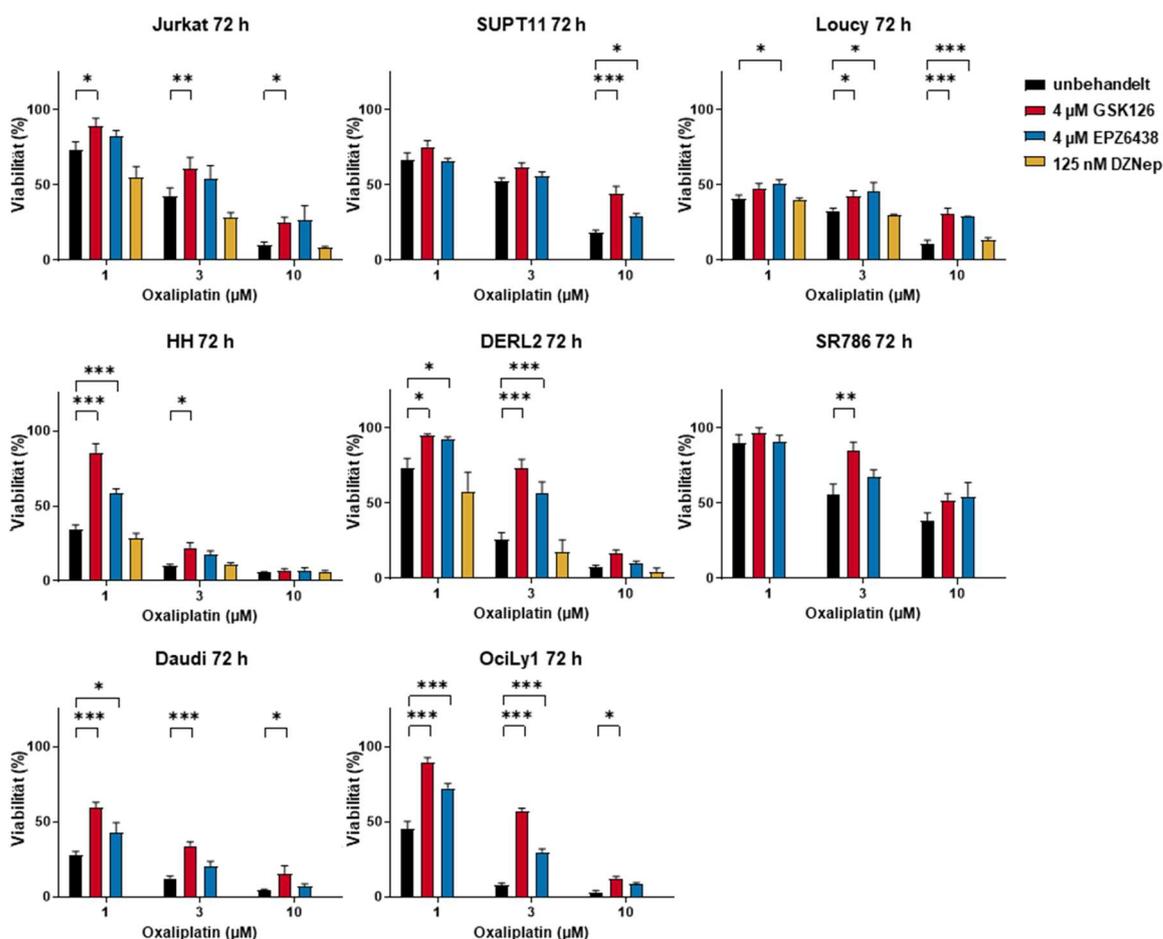


Abbildung 24 SAM-kompetitive EZH2 Inhibitoren erhöhen die Resistenz gegenüber Oxaliplatin. Die Sensitivität gegenüber Oxaliplatin als Monotherapie oder unter zusätzlicher Inkubation mit GSK126, EPZ6438 oder DZNep wurde nach 72 h gemessen. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SEM, $n=3$ mit Ausnahme der unbehandelt-Kontrolle von Jurkat, Loucy, HH und DERL2, welche den Mittelwert \pm SEM, $n=6$ zeigen. * $p<0,05$; ** $p<0,005$; *** $p<0,001$.

Ich habe überprüft, ob die Reduktion der Oxaliplatinempfindlichkeit auch bei längerer simultaner Inkubation nachweisbar ist. Die Induktion der Resistenz durch GSK126 blieb nach 96 h (Abb. 25A) und 7 d (Abb. 25B) bestehen.

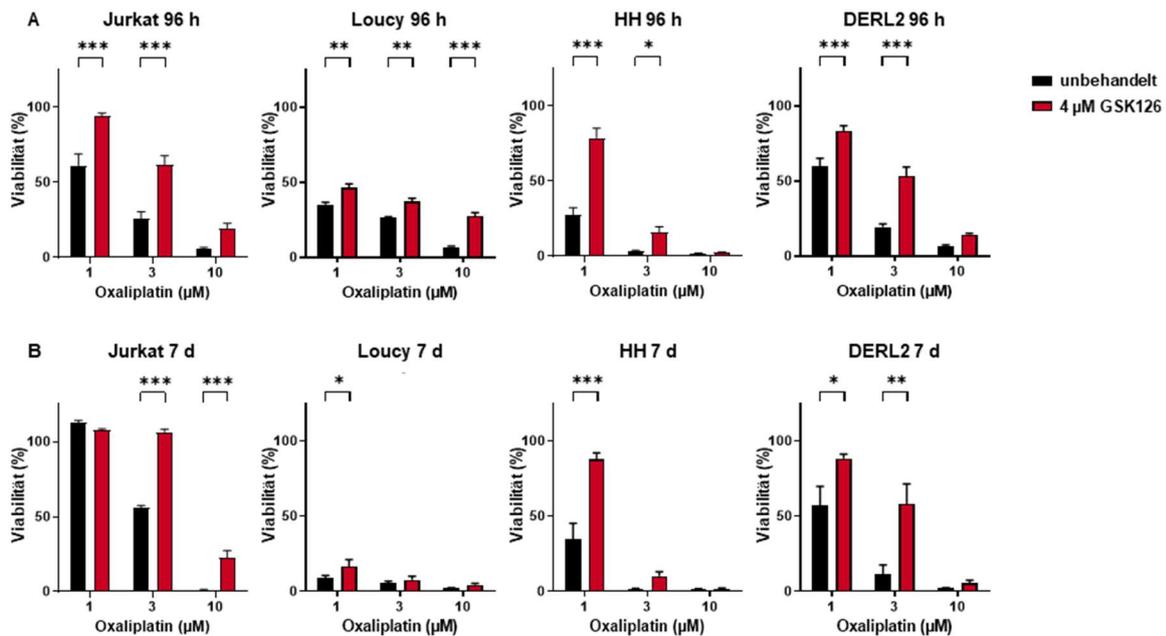
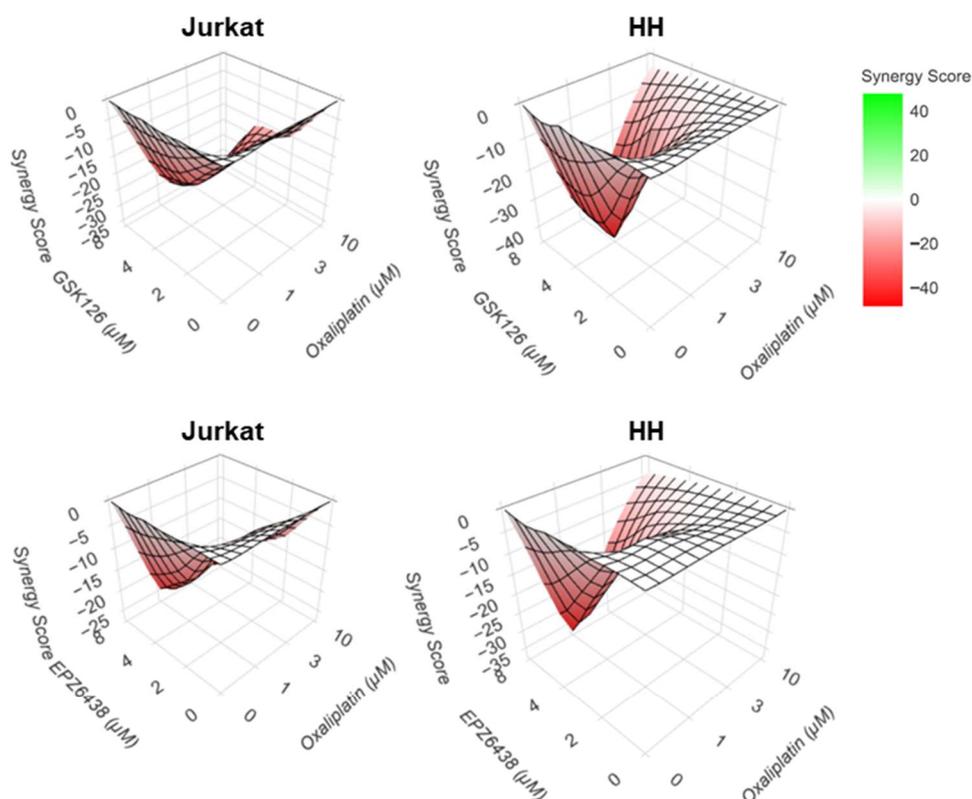


Abbildung 25 Die Reduktion der Oxaliplatinempfindlichkeit durch den SAM-kompetitiven EZH2 Inhibitor GSK126 bleibt bei längerer Inkubation bestehen. Die Sensitivität gegenüber Oxaliplatin als Monotherapie oder unter zusätzlicher Inkubation mit GSK126 wurde nach (A) 96 h und (B) 7 d bestimmt. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SEM, $n=3$. * $p<0,05$; ** $p<0,005$; *** $p<0,001$.

Anhand von jeweils vier Konzentrationen Oxaliplatin und entweder GSK126 oder EPZ6438 habe ich mittels Synergy Finder dreidimensionale Synergiematrizes für die T-Zell Leukämiezelllinie Jurkat und die T-Zell Lymphomzelllinie HH erstellt und *Synergy Scores* mittels *Highest Single Agent* (HSA) Modell errechnet (Abb. 26) (Zheng et al. 2022). *Synergy Scores* kleiner -10 wurden dabei als Antagonismen eingestuft. Somit unterstreichen die Synergiematrizes die Erhöhung der Oxaliplatinresistenz unter pharmakologischer EZH2 Inhibition mit GSK126 und EPZ6438.



Zelllinie	Inhibitor	Maximaler Synergy Score	Mittlerer Synergy Score	p-Wert
Jurkat	GSK126	-35,2	-21,4	$1,64 \times 10^{-3}$
	EPZ6438	-26,6	-16,2	$1,52 \times 10^{-2}$
HH	GSK126	-43,5	-15,9	$3,70 \times 10^{-18}$
	EPZ6438	-36,6	-9,97	$9,20 \times 10^{-11}$

Abbildung 26 Syngiematrices für Oxaliplatin und entweder GSK126 oder EPZ6438. Sie wurden mit Synergy Finder erstellt. Zur Berechnung der *Synergy Scores* wurde das HSA-Modell genutzt (Zheng et al. 2022).

Der Einfluss des EZH2 Verlusts unter EZH2 Knockdown auf die Oxaliplatinresistenz wurde im Vergleich zur jeweiligen *mock* Kontrolle für Jurkat und HH analysiert (Abb. 27). Während der EZH2 Knockdown nicht zu einer Erhöhung der Oxaliplatinresistenz führte, wurde die Resistenz gegenüber Oxaliplatin unter zusätzlicher GSK126 Inkubation sowohl für die *mock* Kontrolle als auch die EZH2 Knockdown Zellen erhöht.

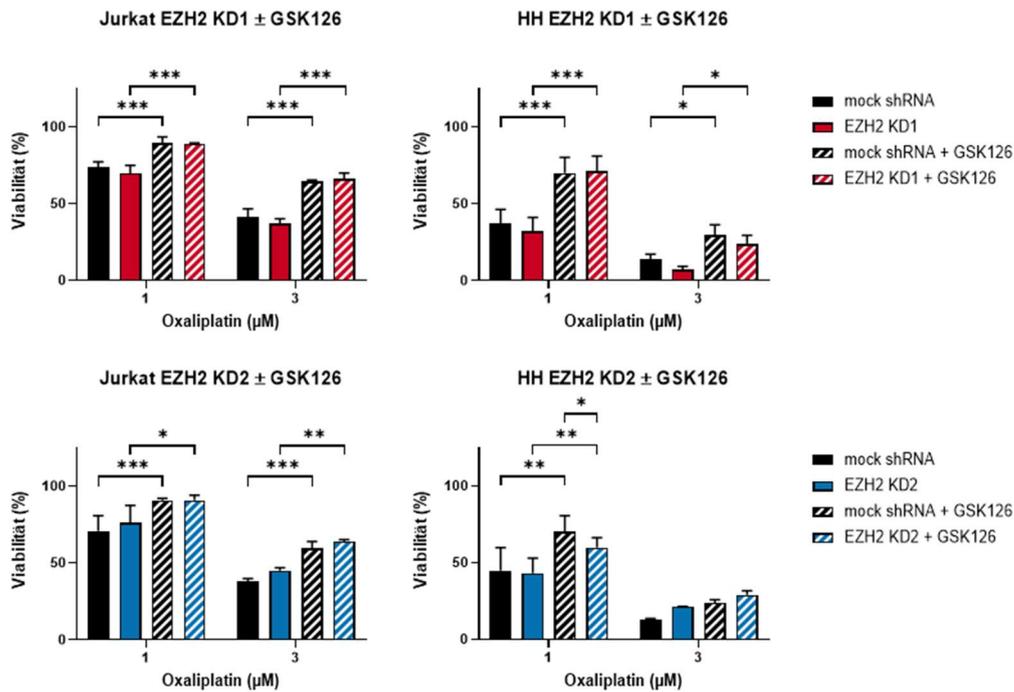


Abbildung 27 EZH2 Knockdown beeinflusst die Sensitivität gegenüber Oxaliplatin nicht. Es wurde die Sensitivität gegenüber Oxaliplatin als Monotherapie oder bei zusätzlicher Inkubation mit GSK126 nach 72 h gemessen. Jeder Balken zeigt den Mittelwert \pm SEM, n=3. * p<0,05; ** p<0,005; *** p<0,001.

4.3.4 Mechanistische Analyse der Erhöhung der Oxaliplatinresistenz unter EZH2 Inhibition
 Zellzyklusverschiebungen unter GSK126 Monotherapie, Oxaliplatinmonotherapie oder Oxaliplatin/GSK126 Kombinationstherapie habe ich für die T-Zell Leukämiezelllinien Jurkat und Loucy sowie die T-Zell Lymphomzelllinien HH und DERL2 analysiert (Abb. 28). Es zeigte sich keine Phasenverschiebung unter GSK126 Monotherapie im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Unter Oxaliplatinmonotherapie kam es zu einer schrittweisen Erhöhung der Sub-G₀G₁-Phase toter Zellen. In Jurkat arretierten die Zellen zunächst in der G₂M-Phase mit Zellen, die kurz vor der Zellteilung stehen, bevor sie in die Sub-G₀G₁-Phase übergangen. Loucy hingegen zeigten einen Arrest in der S-Phase der DNA-Synthese, bevor es zu einer Verlagerung zur Sub-G₀G₁-Phase kam. Die T-Zell Lymphomzelllinien HH und DERL2 zeigten keinen Arrest in anderen Phasen und die Zellen gingen direkt in die Sub-G₀G₁-Phase über. Die Effekte traten in den getesteten T-Zell Lymphomzelllinien eher und stärker als in den T-Zell Leukämiezelllinien auf. Unter zusätzlicher GSK126 Inkubation wurde für alle Zelllinien eine Verringerung der Oxaliplatin-induzierten Effekte gefunden. Signifikante Unterschiede zwischen Oxaliplatinmonotherapie und Oxaliplatin/GSK126 Kombinationstherapie traten zuerst nach 48 h Inkubation auf.

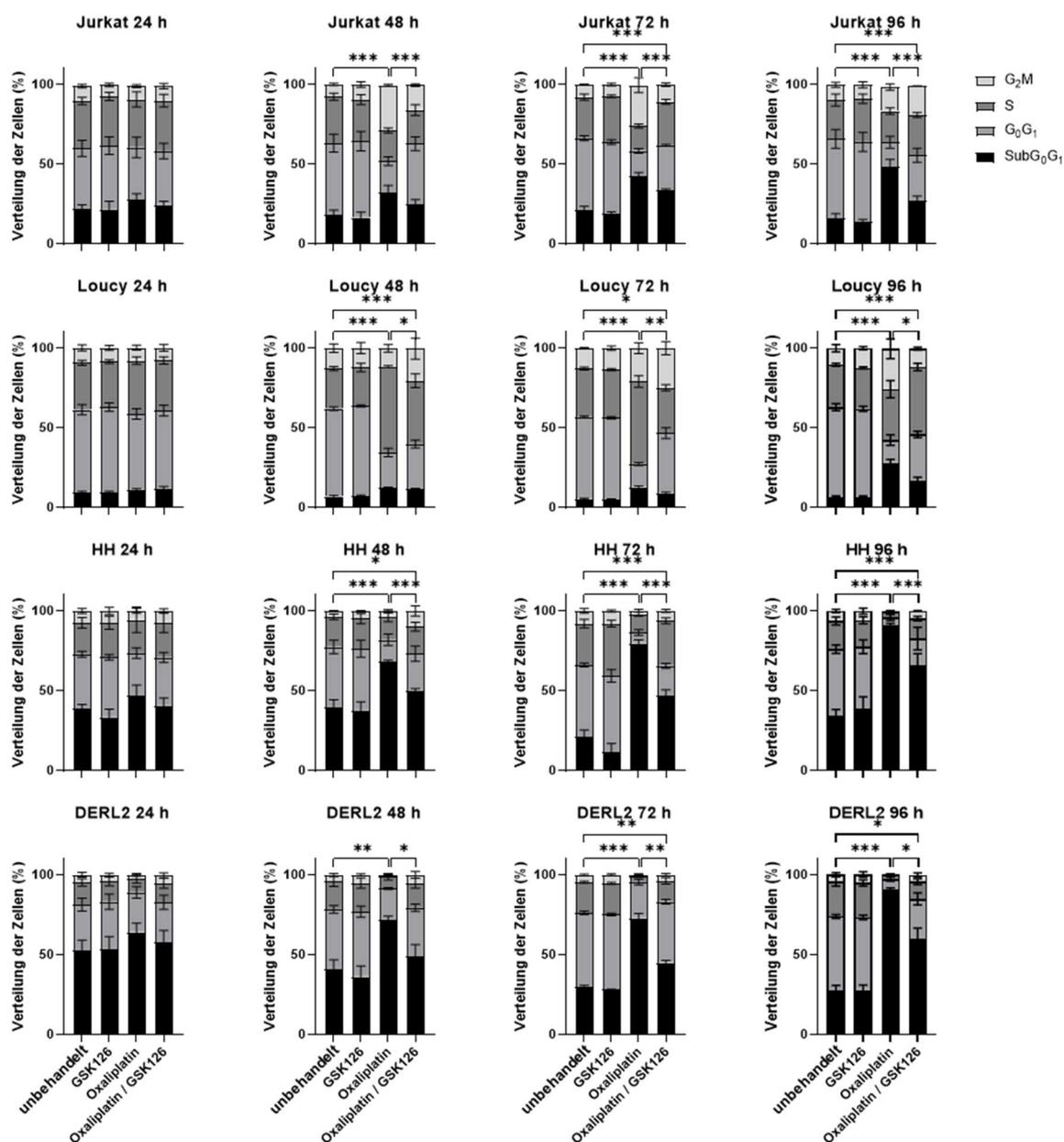


Abbildung 28 Analyse der Deregulation des Zellzyklus unter pharmakologischer EZH2 Inhibition. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD, $n=3$. * $p<0,05$; ** $p<0,005$; *** $p<0,001$.

Die Analyse von Apoptose und Nekrose habe ich simultan zur Zellzyklusanalyse durchgeführt (Abb. 29). Es zeigte sich erneut kein Einfluss der GSK126 Monotherapie. Unter Oxaliplatinmonotherapie kam es zu einem Anstieg apoptotischer und nekrotischer Zellen in allen getesteten Zelllinien. Erneut waren die Effekte stärker in den getesteten T-Zell Lymphomzelllinien als in den T-Zell Leukämiezelllinien. Durch zusätzliche GSK126 Inkubation wurden die Oxaliplatin-induzierten Effekte wie bei der Zellzyklusanalyse verringert, wodurch die Oxaliplatinresistenz widerspiegelt wurden.

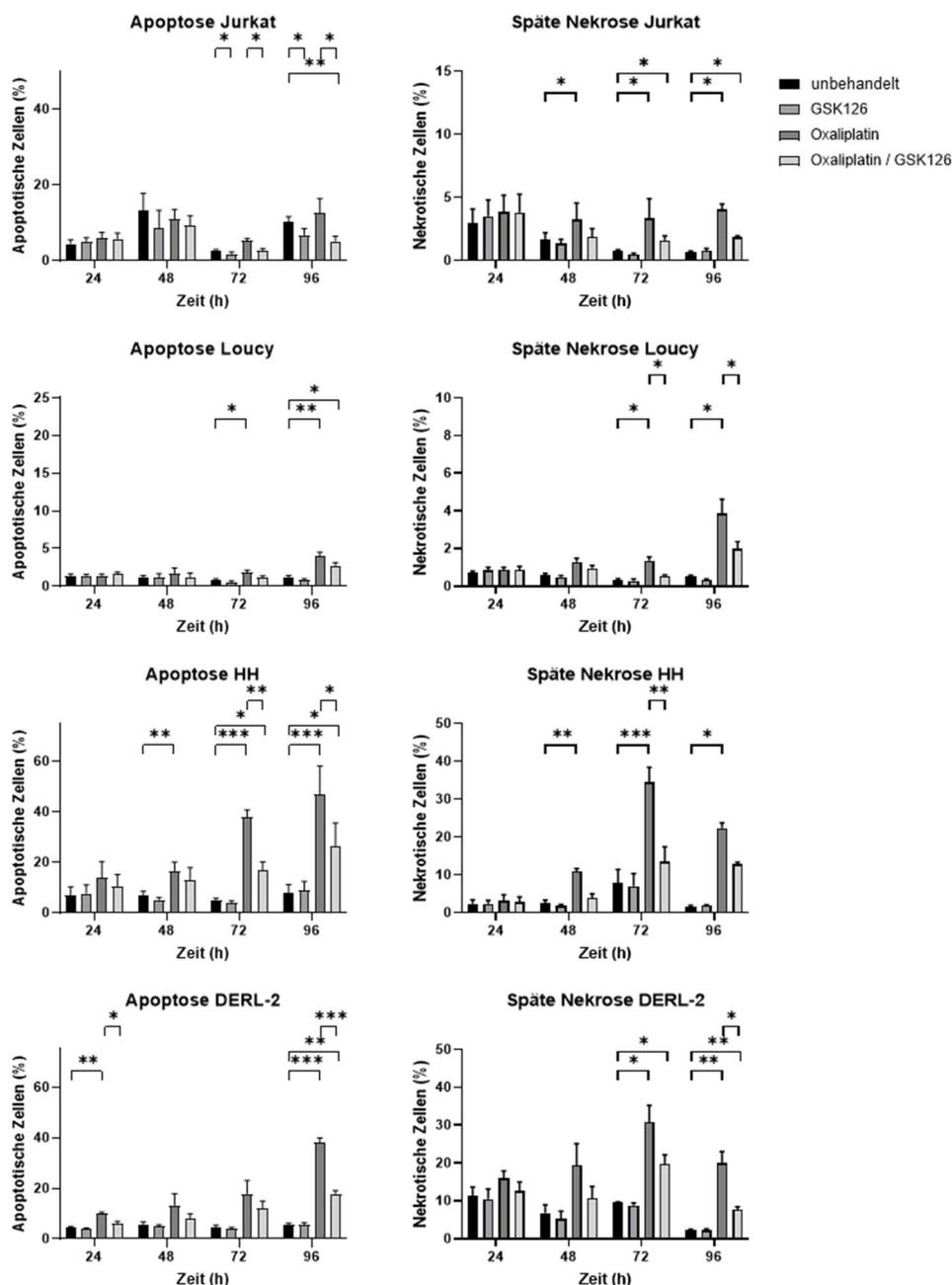


Abbildung 29 Analyse der Induktion von Apoptose und Nekrose unter pharmakologischer EZH2 Inhibition. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD, $n=3$. * $p<0,05$; ** $p<0,005$; *** $p<0,001$.

Der intrazelluläre Platingehalt wurde in Kooperation mit der Abteilung Innere Klinik (Tumorforschung) des Universitätsklinikums Essen durch Dr. Ralf-Axel Hilger mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) bestimmt. Dafür wurde die Oxaliplatin/GSK126 Kombinationstherapie auf die Oxaliplatinmonotherapie bzw. die Oxaliplatintherapie von EZH2 Knockdownzellen auf die jeweilige *mock* Kontrolle bezogen. Es wurde gezeigt, dass der intrazelluläre Platingehalt durch pharmakologische EZH2 Inhibition nach 48 h gemeinsamer Inkubation in Jurkat um 18,0 % ($p = 0,004$) und in HH um 22,9 % ($p = 0,005$) verringert wurde (Abb. 30A). Der Zeitpunkt war identisch mit dem Auftreten von Unterschieden zwischen der Oxaliplatinmonotherapie und der Oxaliplatin/GSK126

Kombinationstherapie der Zellzyklusanalyse. Der verringerte intrazelluläre Platingehalt wurde unter EZH2 Knockdown im Vergleich zur *mock* Kontrolle nicht nachgewiesen (Abb. 30B).

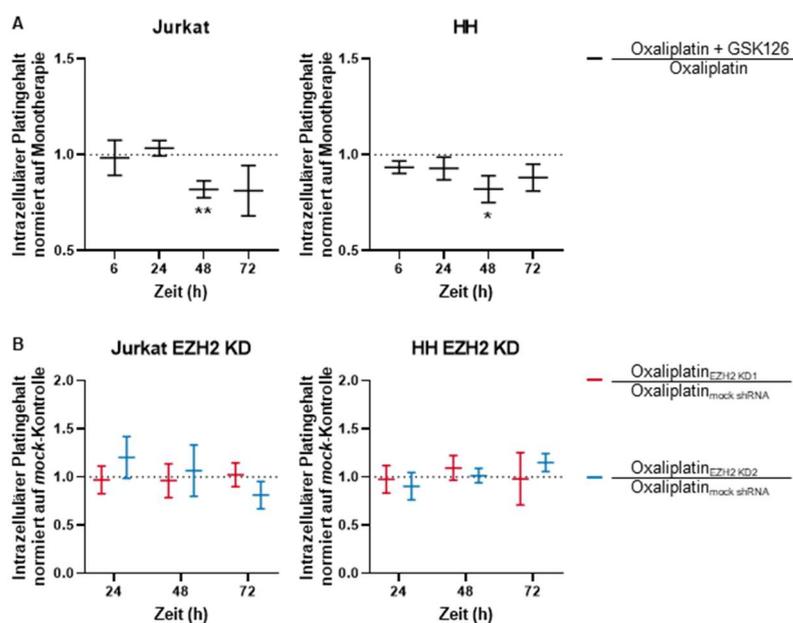


Abbildung 30 Analyse des intrazellulären Platingehalts. Mittels ICP-MS in Kooperation mit der Abteilung Innere Klinik (Tumorforschung) des Universitätsklinikums Essen durch Dr. Ralf-Axel Hilger wurde der intrazelluläre Platingehalt unter (A) pharmakologischer EZH2 Inhibition oder (B) EZH2 KD bestimmt. Ich habe die statistischen Analysen vorgenommen. Werte zeigen den Mittelwert \pm SEM, $n=3$ (EZH2 KD) oder $n=5$ (pharmakologische EZH2 Inhibition). * $p<0,05$; ** $p<0,005$.

4.3.5 Analyse transkriptioneller Veränderungen

Zum Aufdecken der in die Induktion der Oxaliplatinresistenz involvierten Mechanismen wurde eine mRNA-Sequenzierung durch Genewiz in Leipzig durchgeführt, um die durch pharmakologische EZH2 Inhibition alterierten Genexpressionsmuster zu identifizieren. Dafür habe ich die Zelllinien Jurkat und Loucy mit T-ALL Hintergrund und die Zelllinien HH und DERL2 mit PTCL Hintergrund jeweils entweder mit GSK126, Oxaliplatin oder GSK126 und Oxaliplatin simultan behandelt. Die Funktionalität des EZH2 Inhibitors sowie der Einfluss der Oxaliplatininkubation auf die H3K27 Trimethylierung habe ich anhand eines Westernblots überprüft (Abb. 52A). Die bioinformatischen Analysen wurden durch die Bioinformatikerin der Klinik für Innere Medizin IV der Universitätsmedizin Halle (Saale) Edith Willscher über alle getesteten Zelllinien berechnet, da die Induktion der Oxaliplatinresistenz in allen getesteten Zelllinien gefunden wurde und demnach nach Genen gesucht wurde, die in allen Zelllinien verändert waren. Die Berechnung wurde zwischen GSK126- gegen Oxaliplatin-behandelten Proben vorgenommen (Abb. 31A). Unter GSK126-Inkubation waren die Signalwege *Liver X Receptor*, *Transcriptional Cascade Regulating Adipogenesis*, *SREBF and miR33 in Cholesterol and Lipid Homeostasis* und *Adipogenesis* hochreguliert (Abb. 31B). Jeder dieser Signalwege beinhaltet das Gen *Sterol Regulatory Element Binding Factor 1 (SREBF1)*, welches für das Protein *Sterol Regulatory Element Binding Protein 1 (SREBP1)* kodiert und

selbst signifikant hochreguliert war (Abb. 31C). Neben SREBF1 gibt es das verwandte Gen *Sterol Regulatory Element Binding Factor 2* (*SREBF2*), welches für das Protein *Sterol Regulatory Element Binding Protein 2* (*SREBP2*) kodiert, jedoch in der mRNA-Sequenzierung nicht signifikant reguliert war. In der Literatur wurden Einflüsse der SRE bindende Proteine auf die Transporterfamilie der *ATP-Binding Cassette* Subfamilie G gefunden (Ecker et al. 2007). Bei der Analyse dieser Genfamilie wurde eine signifikante Hochregulation des Gens *ATP-Binding Cassette G2* (*ABCG2*) sowie eine nicht-signifikante Regulation des Gens *ATP-Binding Cassette G1* (*ABCG1*) in der mRNA-Sequenzierung gefunden.

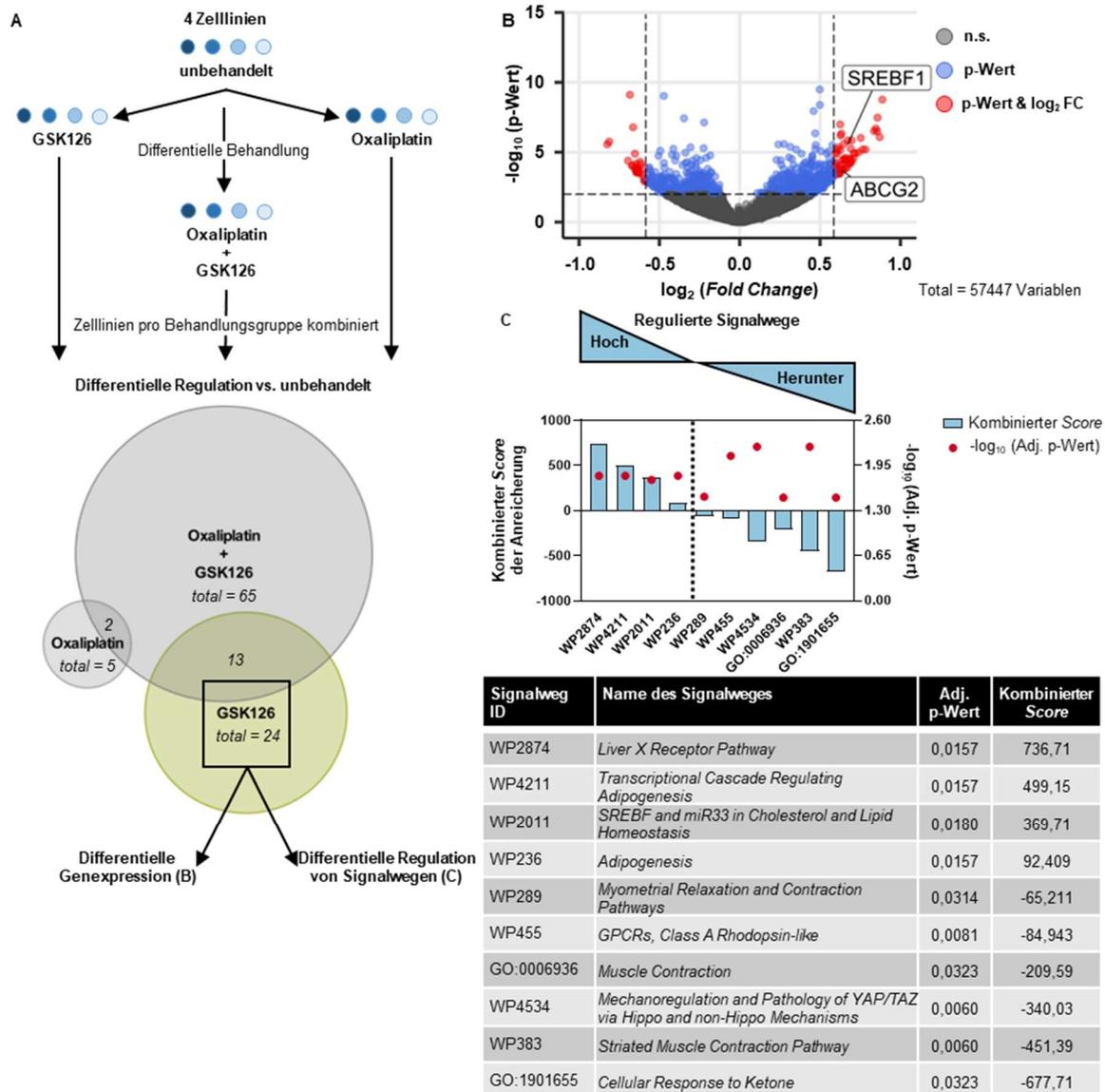


Abbildung 31 Analyse transkriptioneller Veränderungen unter pharmakologischer EZH2 Inhibition mittels mRNA-Sequenzierung. Ich habe die Proben erzeugt, die mRNA-Sequenzierung wurde durch Genewiz in Leipzig vorgenommen und die Edith Willscher hat die Daten analysiert. **A** Grafische Repräsentation der durchgeführten Analyse inklusive Venn-Diagramm der signifikant regulierten Gene in kursiv. Es wurden die Zelllinien Jurkat, Loucy, HH und DERL2 kombiniert und GSK126-regulierte Gene gegen Oxaliplatin-regulierte Gene berechnet. **B** *Vulcano Plot* der differenziell regulierten Gene. **C** Regulierte Signalwege mit kombiniertem Score der Anreicherung und adjustiertem p-Wert (Adj. p-Wert). Die IDs der Signalwege sind in der inkludierten Tabelle beschrieben. Die Ergebnisse aller regulierten Gene (Tabelle 23) und Signalwege (Tabelle 24) sind im Anhang zusammengefasst.

Die Expression der mittels mRNA-Sequenzierung aufgedeckten Gene *ABCG1*, *ABCG2*, *SREBF1* und *SREBF2* sowie der zugehörigen Proteine ABCG1, ABCG2, SREBP1 und SREBP2 habe ich unter demselben Versuchsaufbau wie für die mRNA-Sequenzierung auf mRNA-Ebene mittels qPCR (Abb. 32A) und auf Proteinebene mittels Westernblot (Abb. 32B) validiert. Auf mRNA-Ebene habe ich zudem zur Kontrolle der Hypothese die bereits in den Viabilitätsassays genutzte zweite SAM-kompetitive EZH2 Inhibitor EPZ6438 und der nicht-SAM-kompetitive EZH2 Inhibitor DZNep genutzt. Die Funktionalität und Spezifität der zusätzlichen genutzten Primer wurde stichprobenartig mittels gelelektrophoretischer Auftrennung validiert (Abb. 56). Die Funktionalität der EZH2 Inhibitoren habe ich erneut mittels Westernblotanalyse der H3K27 Trimethylierung bestätigt (Abb. 52B). Da in den Zelllinien Loucy und DERL2 keine H3K27me3 vorhanden ist und demnach keine Veränderung der Trimethylierung zu erwarten war, wurden diese Zelllinien nicht in das Experiment mit einbezogen und nur die H3K27me3-exprimierenden Zelllinien Jurkat und HH getestet.

Es zeigte sich auf mRNA-Ebene eine Hochregulation, welche für *SREBF1*, *ABCG1* und *ABCG2* unter GSK126 Monotherapie und Oxaliplatin/GSK126 Kombinationstherapie signifikant war. Bei der Analyse der Regulation von *SREBF2* unter GSK126 Monotherapie oder Oxaliplatin/GSK126 Kombinationstherapie konnte keine Signifikanz erzielt werden, es war jedoch tendenziell ebenfalls eine Erhöhung sichtbar. Unter EPZ6438 Monotherapie wurde für alle getesteten Gene eine Erhöhung der Expression gefunden, welche für *ABCG1* und *ABCG2* auch in Kombination mit Oxaliplatin bestätigt werden konnte. Zudem zeigten sich für das am stärksten regulierte Gen *ABCG2* auch beim Vergleich der Expression unter Oxaliplatin Monotherapie mit Oxaliplatin/GSK126 bzw. Oxaliplatin/EPZ6438 Kombinationstherapie signifikante Unterschiede mit einer erhöhten Expression unter pharmakologischer EZH2 Inhibition. Im Vergleich zu GSK126 Monotherapie oder Oxaliplatin/GSK126 Kombinationstherapie war die Regulation der analysierten Gene unter EPZ6438 Monotherapie oder Oxaliplatin/EPZ6438 Kombinationstherapie weniger stark. Im Gegensatz zu den beiden getesteten SAM-kompetitiven EZH2 Inhibitoren zeigte der nicht-SAM-kompetitive EZH2 Inhibitor DZNep weder unter Monotherapie noch in Kombination mit Oxaliplatin eine Regulation der analysierten Gene.

Auf Proteinebene wurde ABCG1 in Jurkat und HH und ABCG2 in DERL2 unter GSK126 Inkubation hochreguliert. Die Expression von protoSREBP1 war in allen Zelllinien unter GSK126 und protoSREBP2 in Loucy und HH erhöht. *Mature*SREBP1 wurde ebenfalls in allen Zelllinien durch GSK126 erhöht. Aufgrund der Schwäche der *mature*SREBP2 Banden konnte die Expression nicht ausgewertet werden. Die Westernblots aller biologischen Replikate sind in der Abbildung 57 im Anhang gezeigt.

Die Regulation der Gene *SREBF1*, *SREBF2*, *ABCG1* und *ABCG2* wurde auf mRNA-Ebene für die Zelllinien Jurkat und HH auch unter EZH2 Knockdown analysiert (Abb. 32C). Es zeigte sich

außer spezifisch für Jurkat EZH2 KD2 bei Analyse der Expression von *ABCG2* keine Hochregulation der analysierten Gene im Vergleich zur jeweiligen *mock* Kontrollzelllinie.

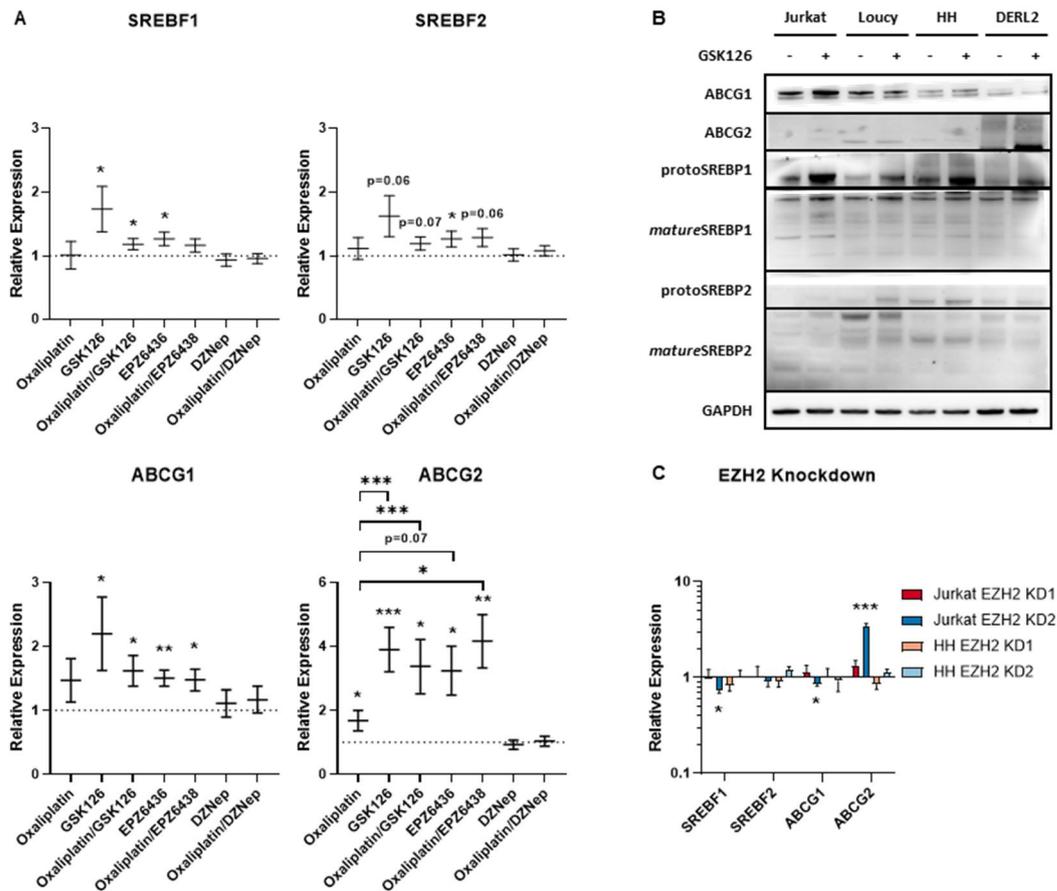


Abbildung 32 Validierung der mittels mRNA-Sequenzierung gefundenen Gene sowie Analyse transkriptioneller Veränderungen unter EZH2 Knockdown. Die Ergebnisse der mRNA-Sequenzierung wurden auf (A) mRNA-Ebene mittels qPCR und auf (B) Proteinebene mittels Westernblot validiert. Zur Berechnung der mRNA-Expression wurden die Daten der vier Zelllinien kombiniert. C Die mRNA-Expression unter EZH2 Knockdown wurde mittels qPCR analysiert und auf die jeweilige *mock* Kontrolle bezogen. Die Werte unter (A) zeigen den Mittelwert \pm SEM, $n=3$ je Zelllinie. Die Werte unter (C) zeigen den Mittelwert \pm SEM, $n=3$. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$; *** $p \leq 0,001$.

Zur weitergehenden Überprüfung habe ich ein zweischrittiges Experiment genutzt. Zunächst wurden die Zelllinien Jurkat, Loucy und HH unter pharmakologischer EZH2 Inhibition mittels GSK126 inkubiert und nach 72 h ein Teil der Zellen für Zellpellets zur Expressionsanalyse auf mRNA-Ebene genutzt. Aus dem Rest der Zellen habe ich konsekutiv Viabilitätsassays angesetzt, um die Sensitivität gegenüber Oxaliplatin zu bestimmen. Die Erhöhung der *SREBF1/2* und *ABCG1/2* Expression konnte unter Einbeziehung der Expressionsdaten der drei getesteten Zelllinien bestätigt werden (Abb. 33A). Auch die Resistenz gegenüber Oxaliplatin war in allen getesteten Zelllinien weiterhin erhöht (Abb. 33B-C). Die Zelllinie DERL2 konnte in diesem Versuch nicht einbezogen werden, da die anspruchsvollen Kultivierungsbedingungen nicht suffizient im Verlauf des Experiments aufrechterhalten werden konnte, wodurch es zum Absterben der Zellen im Versuch kam.

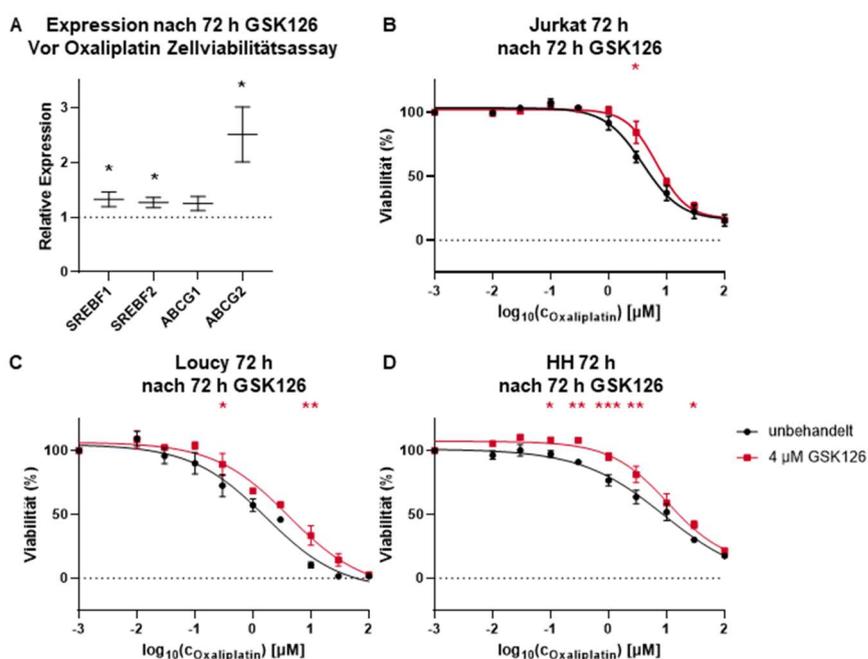


Abbildung 33 Konsekutive GSK126 Inkubation und Oxaliplatinviabilitätsassay. A Jurkat, Loucy und HH Zellen wurden für 72 h mit GSK126 inkubiert und die mRNA-Expression von *SREBF1/2* und *ABCG1/2* bestimmt. Zur Berechnung der mRNA-Expression wurden die Daten der vier Zelllinien kombiniert. Die Werte unter zeigen den Mittelwert \pm SEM, $n=3$ je Zelllinie. Anschließend wurde mittels Viabilitätsassays die Sensitivität gegenüber Oxaliplatin in (B) Jurkat, (C) HH und (D) Loucy bestimmt. Die Werte zeigen den Mittelwert \pm SEM, $n=3$. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$; *** $p \leq 0,001$.

4.3.6 Zusätzliche Inhibition von *Sterol Regulatory Element* Bindenden Proteinen oder ABC Transporter verringert die Erhöhung der Oxaliplatinresistenz unter EZH2 Inhibition

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass pharmakologische EZH2 Inhibition als Nebenwirkung zu einer Aktivierung der Expression SRE bindender Proteine und ABC Transporter führt und so die Induktion der Oxaliplatinresistenz beeinflusst. Zum Beweis habe ich zusätzlich zur pharmakologischen EZH2 Inhibition mit GSK126 die SRE bindenden Proteine mit Fatostatin und ABC Transporter mit Glibenclamide inhibiert und die Sensitivität gegenüber Oxaliplatin sowie der intrazelluläre Platingehalt in Kooperation mit der Abteilung Innere Klinik (Tumorforschung) des Universitätsklinikums Essen durch Dr. Ralf-Axel Hilger analysiert. Es zeigte sich, dass im Oxaliplatin Viabilitätsassay für die T-ALL Zelllinien Jurkat und Loucy, die CTCL Zelllinie HH und die HSTCL Zelllinie DERL2 eine zusätzliche Inhibition SRE bindender Proteine oder ABC Transporter weiterhin zu einer Erhöhung der Resistenz im Vergleich zur Oxaliplatinmonotherapie führte, diese jedoch im Vergleich zur Oxaliplatin/GSK126 Kombinationstherapie im Mittel um 9,9 % Viabilität in Kombination mit Fatostatin ($p = 0,0411$) und im Mittel um 12,4 % Viabilität in Kombination mit Glibenclamide ($p = 0,0282$) erniedrigt war (Abb. 34A). Diese Erniedrigung der maximal erreichten Oxaliplatinresistenz wurde mit einem zweiten SAM-kompetitiven EZH2 Inhibitor (EPZ6438) bestätigt (Abb. 34B). Dieses Ergebnis war mit einer mittleren Erniedrigung um 13,4 % Viabilität für die Kombination mit Fatostatin signifikant ($p = 0,0281$). Für die zusätzliche ABC

Transporter-inhibition mittels Glibenclamide wurde dieselbe Tendenz mit einer mittleren Erniedrigung um 8,1 % Viabilität gefunden, auch wenn keine Signifikanz erreicht werden konnte ($p = 0,1130$).

Zudem zeigte die Analyse mittels ICP-MS, dass unter zusätzlicher Inhibition SRE bindender Proteine und ABC Transporter der intrazelluläre Platingehalt nicht mehr erniedrigt war (Abb. 34C). In Jurkat wurde der intrazelluläre Platingehalt nach 24 h durch zusätzliche Glibenclamide Inkubation zunächst erhöht ($p = 0,008$), bevor es zu einer Angleichung auf Normalisierungsniveau kam. In HH wurde der intrazelluläre Platingehalt durch zusätzliche Fatostatin oder Glibenclamide Inkubation nicht über Normalisierungsniveau angehoben. Unter Glibenclamide wurde der intrazelluläre Platingehalt nach 24 h zunächst erniedrigt ($p = 0,001$), dieser Effekt wurde zu späteren Zeitpunkten jedoch nicht mehr gefunden. Es zeigten sich aber signifikante Unterschiede zwischen Oxaliplatin/GSK126 Kombinationstherapie und zusätzlicher Inkubation mit Fatostatin nach 48 h ($p = 0,049$) und mit Glibenclamide nach 72 h ($p = 0,035$). Fatostatin oder Glibenclamide ohne zusätzliche GSK126 Inkubation hatten keinen Einfluss auf die Oxaliplatinresistenz oder den intrazellulären Platingehalt (Abb. 58).

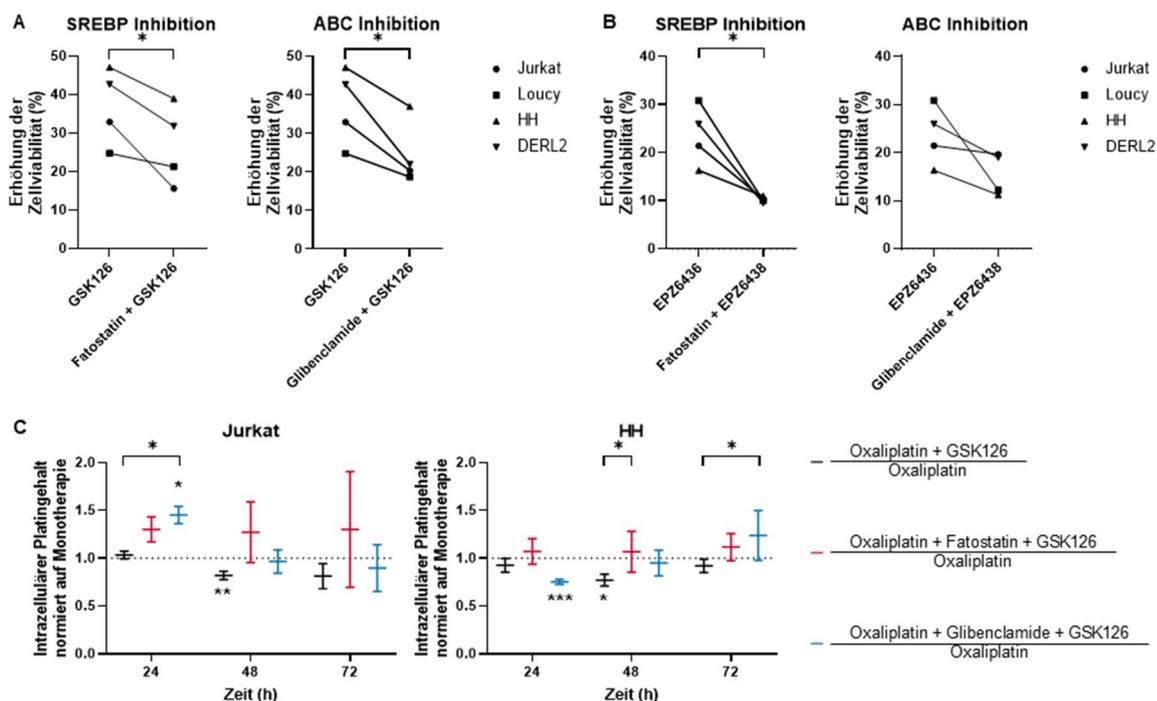


Abbildung 34 Verringerung der GSK126-induzierten Effekte durch simultane Inhibition SRE bindender Proteine oder ABC Transporter. Ich habe die Erhöhung der Oxaliplatinresistenz unter (A) GSK126 oder (B) EPZ6436 verglichen mit der zusätzlichen Inhibition SRE bindender Proteine mit Fatostatin oder ABC Transporter mit Glibenclamide. Zur Berechnung der Signifikanz wurde der zweiseitige gepaarte Student t-Test verwendet. C Einfluss pharmakologischer EZH2 Inhibition oder zusätzlicher Inhibition SRE bindender Proteine mit Fatostatin oder ABC Transporter mit Glibenclamide auf den intrazellulären Platingehalt in Kooperation mit der Abteilung Innere Klinik (Tumorforschung) des Universitätsklinikums Essen durch Dr. Ralf-Axel Hilger. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

5. Diskussion

In der vorgelegten Arbeit wurde gezeigt, dass Veränderungen epigenetischer Modulatoren in T-Zell Neoplasien auftreten und Einfluss auf die Proliferation und Sensitivität gegenüber verschiedenen etablierten Chemotherapeutika haben können. Dabei habe ich aufgezeigt, dass die epigenetischen Veränderungen wie am Beispiel des Verlusts der Histonmethyltransferase SETD2 nicht losgelöst, sondern in Kombination mit weiteren Aberrationen analysiert werden müssen, um den Einfluss auf die Tumorzelle besser zu verstehen. Dies wurde anhand der Überwindung nachteiliger Einflüsse des SETD2 Verlusts auf die Proliferation durch Aktivierung des JAK/STAT Signalweges bei gleichzeitiger Modulation der Sensitivität gegenüber etablierten Chemotherapeutika gezeigt. Des Weiteren habe ich die Eignung neuer Inhibitoren, die aufgrund der Überexpression der Histonmethyltransferase EZH2 zur zielgerichteten Therapie eingesetzt werden könnten, getestet. Es wurde offengelegt, dass die alleinige Inhibition von EZH2 mittels S-Adenosylmethionin (SAM) kompetitiver Inhibitoren bei klinisch relevanten Konzentrationen nicht zu einer effektiven Viabilitätsreduktion ausreicht und in Kombination mit dem etablierten Chemotherapeutikum Oxaliplatin sogar eine Erhöhung der Resistenz gegenüber ebendiesem entsteht. Ich konnte beweisen, dass dieser Effekt EZH2-unabhängig durch die Induktion *Sterol Regulatory Element Binding Proteins* (SREBPs) und *ATP-Binding Cassette* (ABC) Transporter entsteht, wodurch der intrazelluläre Platingehalt erniedrigt wird.

Epigenetische Aberrationen sind von wachsendem Interesse in der Krebsforschung, so auch in der Analyse von T-Zell Leukämien und Lymphomen. Dabei stehen besonders Prozesse der Histon Acetylierung im Fokus (34918 Einträge, 01.09.2023, Suche "HDAC" oder "*histon acetylation*" oder "*histon deacetylation*" in [Pubmed](#)) (National Center of Biotechnology Information (NCBI) 1988; Sayers et al. 2022). Aber auch Histon Methylierungen können nachweislich Einfluss auf die Entwicklung von Tumoren haben und werden dementsprechend aktuell intensiv erforscht (30914 Einträge, 01.09.2023, Suche "*histon methylation*" oder "*histon demethylation*" in [Pubmed](#)) (Sayers et al. 2022; National Center of Biotechnology Information (NCBI) 1988). Wichtige Schwerpunkte der Krebsforschung sind dabei Tumorwachstum und Einfluss auf die Chemotherapiesensitivität, weshalb diese in der vorgelegten Arbeit in T-Zell Neoplasien in Primärgewebeproben und Zelllinienmodellen analysiert wurden.

Als Basis diente dabei eine Patientenkohorte von Monomorphen Epitheliotropen Intestinalen T-Zell Lymphom (MEITL) Patientenproben, die hinsichtlich genetischer Aberrationen und ausgewählter Histon Methylierungen untersucht wurden. Die IHC bestätigte mit vorwiegend CD3^{positiv}, CD4^{negativ}, CD56^{positiv}, TIA-1^{positiv} und mehr T-Zell Rezeptorstatus $\gamma\delta$ als $\alpha\beta$ die Repräsentativität der Kohorte von MEITL-Proben (Tse et al. 2012). Neben Mutationen und Verlust der Genkopiezahl der Tumorsuppressoren *TP53* und *ATM* wurden auch Mutationen und Erhöhungen der Genkopiezahl der Onkogene *ABL1* und *ABL2* gefunden, die einen aus

der Literatur bekannten Einfluss auf Tumorwachstum und Invasivität, auch im Zusammenhang der Aktivierung des JAK/STAT Signalweges, haben (Wang et al. 2020; Gil-Henn et al. 2013; Wang et al. 2016). Die Veränderungen von *TP53* und *ATM* können zudem Einfluss auf die Chemotherapiesensitivität durch Veränderungen der Antwort auf DNA-Schäden haben, die zu einer Erhöhung der Chemotherapieresistenz und damit zu einer Verringerung der Prognose von Tumorpatienten führen können (Huang et al. 2019; Jiang et al. 2009). So kann zumindest in Teilen erklärt werden, dass MEITL primär refraktär gegenüber Chemotherapie sind (Gentile et al. 2017). Da *TP53* Verlust jedoch in einer Vielzahl von Tumoren auftritt, können diese genetischen Aberrationen nicht alleinig die hohe Resistenz dieser Entität gegenüber etablierten Chemotherapeutika erklären (Bouaoun et al. 2016).

Des Weiteren wurden genetische Aberrationen mit *gain-of-function* Auswirkungen des JAK/STAT Signalweges charakterisiert, die nachweislich das Tumorwachstum verschiedener Entitäten befördern (Flex et al. 2008; Haddad et al. 2013; Kan et al. 2013). Besonders das Auftreten der Hotspotmutationen *JAK3*^{M511I} und *STAT5B*^{N642H} ist in der MEITL Kohorte dabei aufgefallen, die in der Literatur für die Beförderung der Tumorprogression bekannt sind (Yamashita et al. 2010; Araujo et al. 2019). In gesunden Zellen werden Tyrosinkinaserzeptoren durch die Bindung von extrazellulären Botenstoffen wie Zytokinen aktiviert, wodurch es zur Dimerisierung und Phosphorylierung der gebundenen JAK Proteine kommt, die dadurch aktiviert werden (Leaman et al. 1996; Piu et al. 2002; Valdembri et al. 2002). Konsekutiv werden proliferationsfördernde und antiapoptotische Signalwege wie der *Phosphoinositid-3-Kinase* oder der *Mitogen-Activated-Protein Kinase* Signalweg aktiviert sowie die als Transkriptionsfaktoren wirkende STATs phosphoryliert und somit in den Nukleus transloziert (Winston u. Hunter 1995; Lu et al. 2008; Li 2008). Während es zunächst infrage gestellt wurde, ob die Aktivierung beispielsweise durch *STAT5B*^{N642H} zur Entwicklung von neoproliferativen Erkrankungen ausreicht, wurde inzwischen nachgewiesen, dass es durch *gain-of-function* Mutationen in diesen Genen zu vom Vorhandensein der Botenstoffe unabhängigen Aktivierung kommt, wodurch das Überleben und Wachstum der Tumorzellen befördert werden kann (Yamada et al. 2000; Rajala et al. 2013; Küçük et al. 2015; Pham et al. 2018).

5.1 SETD2

Der Verlust von SETD2 ist in der soliden Tumorentität des klarzelligigen Nierenzellkarzinoms (ccRCC) sowie den lymphoiden Neoplasmen Hepatosplenisches T-Zell Lymphom (HSTCL), MEITL und Akute Myeloische Leukämie (AML) mit aktivierend wirkendem Fusionsprotein MLL1 bekannt. Dieses Defizit der Histonmethyltransferase bedingt durch direkte angehäufte Mutationen mit Funktionsverlustcharakter oder Verlust des Chromosomarms 3p³ wurde bereits in zahlreichen Publikationen beschrieben, tritt jedoch nur äußerst spezifisch für ausgewählte Krebserkrankungen auf (Dalgliesh et al. 2010; Duns et al. 2010; Zhu et al. 2014; Moffitt et al.

2017; McKinney et al. 2017; Bu et al. 2018; Veloza et al. 2023). Die Besonderheit wurde aber bis zu diesem Zeitpunkt nicht ausreichend tiefgehend und vergleichend analysiert.

Während SETD2 ursprünglich als einzige Histonmethyltransferase, die an der Trimethylierung von H3K36 beteiligt ist, beschrieben wurde, zeigen neuere Publikationen, dass auch SETD5 diese Funktion teilweise übernehmen kann (Edmunds et al. 2008; Sessa et al. 2019). Da allerdings sowohl gezeigt wurde, dass die Trimethylierungskapazität von SETD5 deutlich geringer ist und mehrere Datensätze des Human Protein Atlas zeigen, dass SETD2 in verschiedenen zellulären Subtypen inklusive T-Zellen stärker exprimiert vorliegt, kann SETD2 weiterhin als die primär für H3K36me3 verantwortliche Histonmethyltransferase angesehen werden (Uhlén et al. 2015; Uhlen et al. 2019; Monaco et al. 2019; Schmiedel et al. 2018; Sessa et al. 2019).

In der vorgelegten Arbeit habe ich einen SETD2 Verlust in der analysierten MEITL Kohorte gezeigt, der auch in der Literatur beschrieben ist (Chen et al. 2020; Tomita et al. 2020; Hang et al. 2022). Den *loss-of-function* Charakter der Mutationen habe ich dabei anhand von Datenbanken und bereits publizierten charakterisierten Mutationen bestätigt und dieser ist ebenfalls aus der Literatur bekannt (Roberti et al. 2016; Moffitt et al. 2017). Die Mutationen traten dabei ohne auffällige Hotspotmutation über die komplette Länge des Gens verteilt auf, wobei eine Häufung mit drei Mutationen an der strukturegebenden Position H2514 auftrat (Li et al. 2005). Der mittels Immunhistochemie nachgewiesene Verlust der H3K36 Trimethylierung zeigt damit indirekt, dass die nachgewiesenen Mutationen zu einem Funktionsverlust des Proteins führen.

Da dieser Funktionsverlust tumorspezifisch auftritt, wurden bereits Therapieansätze durch Inhibition der *Mitosis Inhibitor* Proteinkinase gefunden. Diese setzt an den Verlust der Trimethylierung von H3K36 an, indem es zu einer Unterstützung des Verlusts der Untereinheit 2 der Ribonucleoside-diphosphate Reduktase kommt, wodurch Nucleosidtriphosphate depletiert werden und es zu einem Arrest in der S-Phase des Zellzyklus und die Apoptose induziert wird (Pfister et al. 2015). Aufgrund hoher Toxizität in klinischen Studien wird die Weiterentwicklung dieses Therapieansatzes jedoch erschwert (Kong u. Mehanna 2021).

In den Zelllinienmodellen wurde gezeigt, dass in T-Zell sowie B-Zell Zelllinien eine im Vergleich zur systemfremden Zelllinie HeLa schwankende aber trotzdem immer vorhandene *SETD2* mRNA-Expression sowie H3K36 Trimethylierung zeigen. Tendenziell war die H3K36 Trimethylierung für die meisten Zelllinien eher erhöht. Dementsprechend kann man ableiten, dass SETD2 in diesen Zelllinien exprimiert und funktionell ist. Obwohl die *SETD2* mRNA-Expression der ccRCC Zelllinie Caki2 im Vergleich zu HeLa keinen Unterschied zeigte, war auf Proteinebene die H3K36 Trimethylierung stark erniedrigt. Damit kann man ableiten, dass typisch für den zellulären Hintergrund ein SETD2 Verlust besteht, obwohl keine genomische

SETD2 Mutation in dieser Zelllinie bekannt ist. Dieser könnte beispielsweise durch posttranskriptionelle Modifikationen entstanden sein. Die hohe H3K36 Trimethylierung in den getesteten Zelllinien mit anderen Entitätshintergründen gibt einen ersten Hinweis, dass der für MEITL oder ccRCC charakteristische *SETD2* und H3K36me3 Verlust nicht vorrangig für andere Arten von Neoplasien zutrifft und *SETD2* demnach kein allgemeingültiger Tumorsuppressor ist. Dies macht die Analyse des Proteins aufgrund der Komplexität der Systeme sowie der verschiedenen Auswirkungen besonders interessant.

Die Analyse des Einflusses des *SETD2* Verlusts auf Zellproliferation und Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Auswahl eines passenden Zelllinienmodells erschwert. Der shRNA basierte *SETD2* Knockdown der HSTCL Zelllinie DERL2 war wiederholt nicht erfolgreich. Diese Zelllinie wäre aufgrund des $\gamma\delta$ T-Zell Lymphomhintergrunds sowie der aktivierenden *STAT5B* Mutation die kommerziell erhältliche Zelllinie, die einem MEITL-Modell am ähnlichsten wäre. Aufgrund von Problemen bei der Kultivierung, da die Transduktion oder Transfektion mit verschiedenen Vektoren zum Absterben der Zellen geführt hatte, wurde das Modell zu einer Entität ohne Lymphomhintergrund, dem klarzelligem Nierenzellkarzinom, gewechselt. Für diese Entität sind ebenfalls häufige *SETD2* Mutationen bekannt und auch die Verringerung der *SETD2* Expression ist zur spezifischen Identifikation von ccRCC Tumorgewebe geeignet (The Cancer Genome Atlas Research Network 2013; Ujfaludi et al. 2022).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass sich ein Verlust von *SETD2* abhängig vom Zellhintergrund unterschiedlich auf das Zellwachstum auswirkt. In den getesteten Zelllinien mit T-Zell Hintergrund Jurkat und SR786, für welche Entitäten kein *SETD2* Verlust publiziert ist, habe ich einen Wachstumsnachteil durch den *SETD2* Verlust nachgewiesen. Damit einhergehend ist aus der Literatur bekannt, dass ein *SETD2* Verlust das Zellwachstum durch Transkriptionskontrolle verlangsamen kann und auch das *SETD2* Homolog Set2 aus *Drosophila melanogaster* ist zur Zellzyklusprogression nötig (Li et al. 2019; Dronamraju et al. 2018). In der ccRCC Caki2 wurde hingegen keine Verlangsamung des Zellwachstums gefunden. In dieser Zelllinie ist wie für ccRCC typisch eine VHL Nonsensemutation bekannt, die zu einem verkürzten Proteinprodukt führt, wodurch es wahrscheinlich zu einem VHL Funktionsverlust durch den Verlust wichtiger C-terminaler Domänen kommt (Lewis u. Roberts 2004). Dies könnte sich proliferationstreibend auswirken (Yao et al. 2017).

Dies lässt den Schluss zu, dass in Entitäten, die einen bekannten Verlust von *SETD2* tragen, sekundäre Mechanismen haben, die dem Wachstumsnachteil, der mit *SETD2* Verlust einhergeht, entgegenwirken können. Ein mögliches publiziertes Beispiel hierfür könnte AML ohne oder mit einem aktivierend wirkenden MLL1 Fusionsprotein sein. Während sich ein *SETD2* Verlust in AML ohne das Fusionsprotein nachteilig auf das Zellwachstum auswirkt, erhöht der *SETD2* Verlust in AML mit dem Fusionsprotein sogar das Tumorwachstum (Skucha

et al. 2018; Zhu et al. 2014). Es ist bisher nicht aufgedeckt, welches Protein in klarzelligen Nierenzellkarzinomen oder MEITL als sekundärer Mechanismus wirken könnte. Bekannte Veränderungen, die möglich wären, sind der Verlust des Proteins VHL, welches ebenfalls vom Verlust des Chromosomarms 3p³ in klarzelligen Nierenzellkarzinomen betroffen ist und für welches bekannt ist, dass es mit einem verstärkten Tumorwachstum in Zusammenhang steht (Yao et al. 2017). In MEITL könnten die gängigen aktivierend wirkenden Mutationen des JAK/STAT Signalweges zum Überwinden des Wachstumsnachteils unter SETD2 Verlust führen (Araujo et al. 2019; Pham et al. 2018; Veloza et al. 2023). Diese Hypothesen habe ich in der vorgelegten Arbeit anhand zweier JAK/STAT-getriebener Jurkat Zelllinien analysiert. Während die Kontrollzelllinie weiterhin durch den SETD2 Verlust einen Wachstumsnachteil zeigte, konnte dieser in den Zelllinien mit ITK- bzw. TEL-SYK-Aktivierung nicht nachgewiesen werden. Obwohl der genaue Mechanismus, der zum Überwinden des Wachstumsnachteils führt, nicht aufgeklärt werden konnte, wurde ein Ansatz gefunden, weshalb SETD2 Verlust vornehmlich in Tumorentitäten mit proliferationstreibenden Mutationen gefunden wird. Eine Hypothese wäre, dass die Aktivierung des JAK/STAT Signalweges allein zu einer derart starken Erhöhung der Proliferation führt, dass der Proliferationsnachteil durch den SETD2 Verlust keinen Einfluss mehr hat. Da ich allerdings in der vorgelegten Arbeit nachgewiesen habe, dass die ITK- und TEL-SYK getriebenen Zelllinien keinen Wachstumsvorteil gegenüber der Kontrollzelllinie haben, kann diese Hypothese verworfen werden.

Ein weiterer Effekt, der in der vorliegenden Arbeit abhängig vom Zellhintergrund aufgetreten ist, waren verschiedene Einflüsse auf Chemotherapiesensitivität gegenüber Etoposid und Doxorubicin. Dies bestätigt Befunde aus der Literatur, dass SETD2 die *DNA-Damage-Response* und Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika beeinflusst (Mar et al. 2017). Es wurden in der vorgelegten Arbeit erneut zelltypabhängige Effekte gefunden wurden, die zum Teil auch innerhalb von Zelllinien gegensätzlich waren. Ich habe ausgeschlossen, dass isoformspezifische Bindungen der genutzten shRNAs auftreten, da alle shRNA Zielsequenzen gegen beide SETD2 Isoformen (NCBI Referenzsequenzen NM_001349370.3 und NM_014159.7) gerichtet sind (National Center of Biotechnology Information (NCBI) 1988; Sayers et al. 2022). Es wurde validiert, dass die Modulation der Sensitivität in den Zelllinien mit JAK/STAT Aktivierung in gleichem Maße auftritt.

Aufgrund der bekannten Abhängigkeit der *DNA-Damage-Response* von der SETD2 Funktionalität wurde analysiert, ob die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Modulation der Sensitivität gegenüber DNA-Schäden induzierenden Chemotherapeutika am Beispiel Doxorubicin unter SETD2 Knockdown mit aberranten DNA-Reparaturmechanismen einhergeht und die gegensätzlichen Effekte anhand dieses Mechanismus erklärt werden können. Die Alteration der DNA-Reparatur habe ich durch den verlangsamten Abbau des DNA-Schadenmarkers γ H2AX unter SETD2 Verlust nachgewiesen. Dies steht im Einklang mit

einer erhöhten genomischen Instabilität, die zu einer veränderten Sensitivität führen kann (Sun et al. 2021a; Jachimowicz et al. 2019). So wurde ein beteiligter Mechanismus ermittelt, der an der Induktion der Resistenz gegenüber Erstlinientherapiemedikamenten beteiligt ist. Den Effekt habe ich zudem ebenfalls in den ITK- bzw. TEL-SYK getriebenen Zelllinien nachgewiesen. Es konnte jedoch nicht aufgedeckt werden, in welchem Zusammenhang der aufgezeigte Mechanismus zur spezifischen Veränderung der Chemotherapiesensitivität steht. Ein weiterer Mechanismus mit Einfluss auf die Chemotherapiesensitivität ist Zellzyklusprogression. Es ist aus der Literatur bekannt, dass SETD2 Verlust zu Defekten der S- and G₂/M-Kontrollpunkte führen (Dong et al. 2019). Eine Veränderung der Zellzyklusprogression unter induziertem Stress konnte in der vorgelegten Arbeit jedoch nicht nachgewiesen und damit auch kein Zusammenhang zur Modulation der Sensitivität gegenüber Doxorubicin abgeleitet werden.

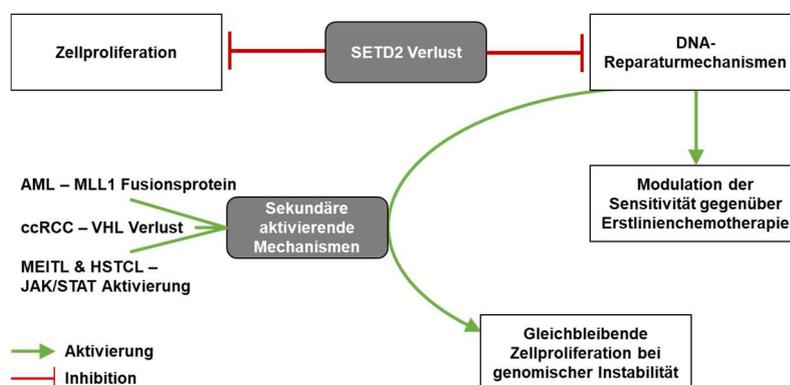


Abbildung 35 Zelluläre Veränderungen unter SETD2 Verlust.

Zusammengefasst, ist der SETD2 Verlust ein komplexes Phänomen, welches spezifisch für bestimmte Zelltyphintergründe auftritt und Funktionen einnehmen kann, die sich sowohl nachteilig als auch vorteilig auf Proliferation und Chemotherapieresistenz auswirken können (Abb. 35). In zellulären Kontexten ohne weitere proliferationstreibende Alterationen führt der Verlust von SETD2 zu einer verlangsamten Proliferation. Dementsprechend kann man ableiten, dass SETD2 zur Aufrechterhaltung der Proliferation nötig ist. Jedoch wurde auch nachgewiesen, dass SETD2 Verlust zu verringerten Reparaturmechanismen und dementsprechend zu genomischer Instabilität führt. Die genomische Instabilität kann durch vermehrte Entstehung weiterer genetischer Aberrationen die Tumorentwicklung begünstigen und die Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika modulieren. Dies wurde auch in der vorgelegten Arbeit nachgewiesen und könnte sich bei der Behandlung von Tumoren nachteilig auswirken. Diese Diskrepanz konnte in der vorgelegten Arbeit gelöst werden, indem gezeigt wurde, dass bei Vorhandensein sekundärer aktivierenden Mechanismen wie dem Verlust von VHL in ccRCC oder der Aktivierung des JAK/STAT Signalweges durch *STAT5B*^{NG42H} oder in den gezeigten Experimenten über ITK- bzw. TEL-SYK der verringerten Zellproliferation entgegengewirkt wird, wodurch der Wachstumsvorteil des SETD2 Verlusts überwiegt. Damit

wurde ein Ansatz für die Ursache der hohen Selektivität des Auftretens des SETD2 Verlusts geliefert.

5.2 EZH2

Die EZH2 Überexpression, aktivierende *EZH2* Mutationen oder erhöhte H3K27 Trimethylierung ist in verschiedenen Entitäten bekannt und mit der Tumorprogression assoziiert (Bödör et al. 2013; Kleer et al. 2003; Ngollo et al. 2014). Dementsprechend ist die pharmakologische EZH2 Inhibition ein vielversprechender Ansatzpunkt, der wiederholt in verschiedenen Zellhintergründen wie dem Diffusen Großzelligen B-Zell Lymphom (DLBCL) oder follikulärem Lymphom in klinischen Studien der Phase II als effektiv nachgewiesen wurde (Sarkozy et al. 2020; Morschhauser et al. 2020).

In der vorliegenden Arbeit konnte auch für Entitäten mit T-Zell Hintergrund eine hohe EZH2 Expression und H3K27 Trimethylierung im Zelllinienmodell nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich in der MEITL Patientenkohorte eine Assoziation zwischen EZH2 Expression und H3K27me₃, welche die funktionale kanonische EZH2 Signalweiterleitung widerspiegelt. Dieser Zusammenhang konnte in den untersuchten Zelllinienmodellen weder für die EZH1 noch für die EZH2 Expression nachvollzogen werden. Damit könnten zum einen Limitationen der Zelllinienmodelle und zum anderen Einflüsse anderer epigenetischer Modulatoren, wie beispielsweise die H3K27 Demethylasen *Lysine (K)-Specific Demethylase 6A* und *B*, die gegensätzlich zum *Polycomb Repressive Complex 2* (PRC2) wirken und in der vorgelegten Arbeit nicht analysiert wurden, sichtbar werden (Agger et al. 2007). Mutationen im *EZH2* Gen waren bei Entitäten mit T-Zell Hintergrund sowohl in der MEITL Kohorte als auch in den Zelllinienmodellen hingegen selten. Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass EZH2 in Entitäten mit T-Zell Hintergrund funktional und stark exprimiert ist, die kanonische Signalweiterleitung über den PRC2 Komplex jedoch gestört sein könnte.

Aufgrund der hohen EZH2 Expression, die auch bereits in der Literatur beschrieben wurde, ist ein Einfluss auf die Tumorprogression zu vermuten und dementsprechend auch die Rationale für pharmakologische EZH2 Inhibition als therapeutischer Ansatz in diesen Entitäten gegeben (Schümann et al. 2021; Fujikawa et al. 2016). Damit einhergehend wurde die EZH2 Inhibition als mögliche Monotherapie in pädiatrischer T-Zell Akute Lymphatische Leukämie (T-ALL) und peripheren Lymphomen mit vielversprechender, wenn auch limitierter Reduktion der Zellviabilität getestet (D'Angelo et al. 2015; Yamagishi et al. 2019).

Die pharmakologische EZH2 Inhibition wird aufgrund der hohen EZH2 Expression in zahlreichen Entitäten bereits für verschiedene Zellhintergründe in klinischen Studien geprüft. Dementsprechend sind aktuell 35 klinische Studien bei [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) aufgeführt (01.09.2023, Suche "EZH2" und "Recruiting", "Active, not recruiting" oder "Enrolling by invitation") und der EZH2-spezifische Inhibitor Tazemetostat (EPZ6438) wurde von der US-amerikanischen Behörde *Food and Drug Administration* für die Anwendung im epitheloiden

Sarkom mit Weichteilgewebe Hintergrund bewilligt, wodurch die hohe klinische Relevanz unterstrichen wird (National Center of Biotechnology Information (NCBI) 1988; Hoy 2020).

Anders als in der Literatur sowohl für solide Tumore oder auch Lymphome und Leukämien beschrieben, zeigen die Daten der vorgelegten Arbeit jedoch unter pharmakologischer EZH2 Inhibition nur bei Konzentrationen, die die klinische Anwendbarkeit überschreiten, eine Reduktion der Zellviabilität; was auch von Kooperationspartnern bestätigt wurde (unpublizierte Korrespondenz) (Li et al. 2022; Gounder et al. 2020; Morschhauser et al. 2020; Basheer et al. 2019). Weiterhin führte auch der EZH2 Verlust mittels Knockdown nicht zu einer starken Veränderung der Proliferation. Dies widerspricht der Eignung entsprechender EZH2 Inhibitoren als Monotherapie im T-Zell Leukämie- und Lymphomhintergrund. Diese Diskrepanz könnte beispielsweise teilweise durch Einflüsse auf das Tumormikromilieu erklärt werden, welche in der vorgelegten Arbeit nicht analysiert wurden (Li et al. 2022).

Die pharmakologische EZH2 Inhibition könnte jedoch dennoch in Kombination mit etablierten Chemotherapeutika genutzt werden, da bekannt ist, dass in Kombination mit Inhibitoren epigenetischer Modulatoren synergistische Effekte auftreten können. Dies wurde beispielsweise für Inhibitoren von Phosphodiesterasen in Kombination mit den Platinanaloga Cisplatin und Carboplatin oder für Inhibitoren von Histon Deacetylasen in Kombination mit den Topoisomerase II Inhibitoren Etoposid und Doxorubicin gezeigt (Domvri et al. 2017; Namdar et al. 2010). Weiterführend wurden auch bereits synergistische Einflüsse unter EZH2 Verlust auf das Erstlinientherapiemedikament Doxorubicin gefunden (Bai et al. 2014). Allerdings müssen auch mögliche antagonistische Einflüsse in Betracht gezogen werden, wie es für EZH2 Inhibition bereits für die Kombination mit Cytarabin bewiesen wurde (Göllner et al. 2017). Dementsprechend habe ich anhand eines Screenings die Eignung der Kombination pharmakologischer EZH2 Inhibition mit verschiedenen Chemotherapeutika getestet. In diesem Experiment konnte auch die bereits bekannte Sensitivierung für Doxorubicin bestätigt werden. Besonders auffällig war jedoch die sehr drastische Erhöhung der Resistenz gegenüber Oxaliplatin, die in allen Zelllinien nachgewiesen werden konnte und weitergehend analysiert werden sollte.

In der vorliegenden Arbeit habe ich gezeigt, dass durch pharmakologische EZH2 Inhibition mittels SAM-kompetitiver kleiner Wirkstoffmoleküle anhand der Beispiele GSK126 und EPZ6438 die Sensitivität gegenüber dem in der Therapie rezidivierender und refraktärer T-Zell-Neoplasien häufig eingesetztem Medikament Oxaliplatin drastisch in peripheren T-Zell Lymphom, T-Zell Leukämie und B-Zell Lymphom Zelllinien verringert wurde. Dieser Effekt trat unabhängig von der zelltypspezifischen EZH2 Expression oder H3K27 Trimethylierung auf und wurde unter EZH2 Knockdown oder pharmakologischer EZH2 Inhibition mittels des SAH-Hydrolase Inhibitors DZNep nicht gefunden. Zudem wurde die Sensitivität gegenüber Oxaliplatin sowohl in den *mock* Kontrollzelllinien als auch in den EZH2 Knockdownlinien durch

zusätzliche pharmakologische EZH2 Inhibition durch GSK126 erniedrigt. Dies zeigt, dass der Effekt nicht vom Vorhandensein von EZH2 oder seiner Funktionsfähigkeit abhängt und deutet somit darauf hin, dass es sich um eine EZH2-unabhängige Induktion der Oxaliplatinresistenz handelt.

Für die T-ALL Zelllinien Jurkat und Loucy, die CTCL Zelllinie HH und die HSTCL Zelllinie DERL2 habe ich zudem sekundäre Auslesemethoden wie Zellzyklusanalyse und Analyse von Apoptose und Nekrose unter Oxaliplatin untersucht. Unter GSK126 Monotherapie wurde weder eine Deregulation des Zellzyklus noch eine Induktion von Apoptose und Nekrose gefunden. Da keine letale Konzentration genutzt wurde, wurden solche Veränderungen auch nicht erwartet und die Ergebnisse bestätigen demnach die bereits aus den Viabilitätsassays abgeleitete geringe Eignung der pharmakologischen EZH2 Inhibition als Monotherapie. Die Oxaliplatinmonotherapie hingegen zeigte deutliche Deregulation des Zellzyklus sowie eine Induktion von Apoptose und Nekrose. Da in der Zellzyklusanalyse unter Oxaliplatinmonotherapie in Jurkat ein G₂M-Phase Arrest, in Loucy ein S-Phase Arrest und in den PTCL Zelllinien HH und DERL2 eine Induktion der Sub-G₀G₁-Phase ohne Arrest in anderen Phasen gefunden wurde, kann man ableiten, dass Oxaliplatin initial unterschiedliche Mechanismen in den verschiedenen Zelllinien induziert, weil der Phasenübergang an verschiedenen Punkten gestört wurde und dies auf unterschiedliche zugrundeliegende Mechanismen hindeuten kann (Sun et al. 2021b). Dies wird weiterhin unterstrichen durch die frühere und intensivere Induktion von Apoptose und Nekrose in den Zelllinien HH und DERL2 im Vergleich mit den Zelllinien Jurkat und Loucy. Hier zeigte sich eine Gruppeneinteilung nach Reifungsgrad, weil HH und DERL2 Zelllinien mit einem reifzelligem post-thymischen Peripheren T-Zell Lymphom (PTCL) Hintergrund und Jurkat und Loucy Zelllinien mit einem unreifzelligem prä-thymischen T-ALL Hintergrund sind.

Da jedoch durch zusätzliche GSK126 Inkubation über alle Zelllinien hinweg eine Reduktion der verschiedenen durch Oxaliplatin induzierten Effekte gefunden wurde, deutet dies darauf hin, dass es sich bei der Induktion der Resistenz um einen universellen Mechanismus handelt, welcher unabhängig vom ursprünglichen Oxaliplatineffekt ist. Die Reduktion der Effekte konnte zuerst nach 48 h Kombinationstherapie nachgewiesen werden. Da es sich hierbei um ein vergleichsweise langes Zeitfenster handelt, könnte dies zeitlich auf transkriptionelle Veränderungen, eventuell auch mit mehreren Schritten, hindeuten.

Weiterhin wurde der intrazelluläre Platingehalt in Jurkat und HH unter Oxaliplatin Monotherapie im Vergleich mit Oxaliplatin/GSK126 Kombinationstherapie analysiert. Hier wurde ein vielversprechender Ansatzpunkt für die Aufklärung des Mechanismus hinter der Induktion der Oxaliplatinresistenz gefunden, da der intrazelluläre Platingehalt unter pharmakologischer EZH2 Inhibition erniedrigt war. Weil dieser Effekt frühestens nach 48 h, jedoch nicht am ersten Messpunkt nach 6 h nachgewiesen wurde, deutet dies auf eine

Erhöhung des Oxaliplatinflux jedoch nicht auf eine Verringerung des Oxaliplatininflux hin. Zudem war das Auftreten des verringerten intrazellulären Platingehalts zeitlich simultan mit der Reduktion der Oxaliplatinwirkungen auf Zellzyklus und Apoptose durch pharmakologische EZH2 Inhibition. Dies deutet weiterhin daraufhin, dass ein erhöhter Oxaliplatinflux für die Verringerung der Oxaliplatinwirkungen verantwortlich ist.

Auch die Reduktion des intrazellulären Platingehalts wurde unabhängig vom zellulären Hintergrund gefunden, wodurch die Hypothese erstarbt wird, dass die Induktion der Oxaliplatinresistenz unabhängig vom zelltypspezifischen Oxaliplatinwirkung ist. Zudem wurde durch die fehlende Reduktion des intrazellulären Oxaliplatingehalts unter EZH2 Knockdown bewiesen, dass der Effekt nicht mit fehlender EZH2 Aktivität in Verbindung steht.

Somit weisen mehrere Ergebnisse auf zelltyp- und EZH2-unabhängige Nebenwirkungen der SAM-kompetitiven EZH2 Inhibitoren hin. Damit einhergehend wird auch von der aktuellen Literatur bestätigt, dass diese Gruppe von EZH2 Inhibitoren in hepatozellulären Karzinomzelllinien mit einer EZH2-unabhängigen Induktion von SRE bindenden Proteinen in Zusammenhang steht (Yang et al. 2019). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte mittels mRNA-Sequenzierung über alle getesteten Zelllinien eine Hochregulation von *SREBF1* und *SREBF2* nachgewiesen werden. Für die von diesen Genen codierten Proteine SREBP1 und SREBP2 ist aus der Literatur bekannt, dass sie die Cholesterolumöostase kontrollieren (Yokoyama et al. 1993). Neben dieser physiologischen Funktion wurden die SRE bindenden Proteine auch im kolorektalen und hepatozellulären Karzinomhintergrund in Zusammenhang mit Resistenz gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika sowie Bestrahlung gebracht (Gao et al. 2019; Shen et al. 2019; Jin et al. 2021; Mok et al. 2022).

Des Weiteren wurde gezeigt, dass SRE bindende Proteine die Expression des Transporters ABCG1 kontrollieren können (Ecker et al. 2007). Für dieses Protein ist aus verschiedenen Zellhintergründen eine Regulation des intrazellulären Cholesterolgehalts bekannt (Klucken et al. 2000; Xu et al. 2022). Aber auch ein Einfluss speziell auf die Resistenz gegenüber Oxaliplatin wurde für ABCG1 im Zellhintergrund des hepatozellulären Karzinoms bereits publiziert (Liao et al. 2020). Damit einhergehend wurde für verschiedene Vertreter der ABC Transporterfamilie ein Einfluss auf die *multidrug* Resistenz nachgewiesen (Choi 2005). So wurde auch für ein weiteres Protein der ABC Subfamilie G, ABCG2, gezeigt, dass der Transporter die Resistenz gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika erhöht (Han u. Zhang 2004).

Im Einklang mit der Literatur, konnte in der vorliegenden Arbeit eine Hochregulation auf mRNA-Ebene von *SREBF1*, *SREBF2*, *ABCG1* und *ABCG2* mittels Inkubation mit zwei Vertretern der SAM-kompetitiven EZH2 Inhibitoren nachgewiesen werden. Die Effektivität der Regulation war dabei unter GSK126 Inkubation stärker als unter EPZ6438 Inkubation. Damit einhergehend habe ich für EPZ6438 auch eine geringere Reduktion der Zellviabilität unter Monotherapie

sowie eine weniger starke Induktion der Oxaliplatinresistenz in Viabilitätsassays festgestellt. Dies lässt den Schluss zu, dass die Effektivität des Inhibitors EPZ6438 insgesamt geringer als die von GSK126 ist. Anders als unter pharmakologischer EZH2 Inhibition mittels SAM-kompetitiver EZH2 Inhibitoren habe ich unter Inkubation mit dem nicht-SAM-kompetitiven EZH2 Inhibitor DZNep keinerlei Regulation und unter EZH2 Knockdown nur bei Nutzung einer shRNA in Jurkat eine Hochregulation von ABCG2 gefunden. Da dieses Ergebnis nicht mit der zweiten shRNA in Jurkat oder der anderen getesteten Zelllinie HH bestätigt werden konnte, handelt es sich wahrscheinlich um eine Kombination aus shRNA- und zelltypspezifischem Effekt. Des Weiteren war die mRNA-Expression von *ABCG1*, *SREBF1* und *SREBF2* unter EZH2 Knockdown nicht hochreguliert. Dies unterstützt die Hypothese, dass die Regulation der Proteinexpression von SREBP1/2 und ABCG1/2 genau wie die Induktion der Oxaliplatinresistenz ein EZH2-unabhängiger Effekt SAM-kompetitiver EZH2 Inhibitoren ist. Obwohl ein PRC2-abhängiger oder nicht-kanonischer EZH2 Signalweg aufgrund des Auftretens der Oxaliplatinresistenz unabhängig von der EZH1/2 Expression oder H3K27 Trimethylierung unwahrscheinlich ist, können diese Möglichkeiten auf Basis der Datenlage der vorliegenden Arbeit nicht vollständig eliminiert werden. Mittels pharmakologischer EZH2 Inhibition ist auch eine Nebenwirkung auf das paraloge Protein EZH1 nicht komplett auszuschließen, da für die *Drosophila melanogaster* Homologe Ezh1 und Ezh2 65 % Sequenzidentität bekannt ist und auch zwischen den humanen Proteinen 76 % Sequenzidentität besteht (Margueron et al. 2008; National Center of Biotechnology Information (NCBI) 1988; Sayers et al. 2022). Diese simultane EZH1 Inhibition würde unter EZH2 Knockdown nicht auftreten, weil die shRNAs die EZH1 Expression oder Funktionalität nicht beeinflussen sollten. Dies wurde überprüft, indem ich die Zielsequenzen der EZH2 shRNAs gegen die EZH1 mRNA Sequenz (NCBI Referenzsequenz NM_001321079.2) abgeglichen und keine Übereinstimmung gefunden habe (Sayers et al. 2022; National Center of Biotechnology Information (NCBI) 1988). Da bewiesen wurde, dass EZH1 zum Teil die Aufgaben von EZH2 unter EZH2 Verlust übernehmen kann, könnte EZH1 unter EZH2 Knockdown eventuell die Induktion der Oxaliplatinresistenz kompensieren (Margueron et al. 2008; Shen et al. 2008).

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Literatur ist es dennoch wahrscheinlicher, dass es sich bei der Induktion der Oxaliplatinresistenz um eine EZH1/2-unabhängige Nebenwirkung SAM-kompetitiver EZH2 Inhibitoren handelt (Yang et al. 2019). Dementsprechend wurde in der vorliegenden Arbeit die Hypothese abgeleitet, dass es EZH2-unabhängig durch pharmakologische EZH2 Inhibition zu einer Hochregulation von SREBP1/2 kommt, wodurch die Transporter ABCG1/2 hochreguliert werden. Dadurch wird der Oxaliplatinefflux erhöht, wodurch die Resistenz vermittelt wird.

Diese Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit bewiesen, da es zu einer Reduktion der durch pharmakologische EZH2 Inhibition induzierten Erhöhung der Oxaliplatinresistenz sowie Verringerung des intrazellulären Platingehalts durch zusätzliche Inhibition der SRE bindenden Proteine oder ABC Transporter kam. Damit konnten die beiden in der vorliegenden Arbeit analysierten Effekte, die maßgeblich durch pharmakologische EZH2 Inhibition verändert wurden, durch Inhibition der gefundenen Zielproteine gerettet werden.

Da in Jurkat durch zusätzliche Inhibition der SRE bindenden Proteine oder ABC Transporter zunächst eine Erhöhung und in HH eine Erniedrigung des intrazellulären Platingehalts nachgewiesen werden konnte, könnten Fatostatin und Glibenclamide auch Einfluss auf den Oxaliplatininflux haben. Aufgrund der Diskrepanz zwischen den getesteten Ziellinien, könnten zudem zelllinienspezifische Effekte eine Rolle spielen, die aber nicht weiter analysiert wurden. Fatostatin und Glibenclamide ohne zusätzliche EZH2 Inhibition hatten jedoch keinen Einfluss auf den intrazellulären Platingehalt. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Induktion der SRE bindenden Proteine und ABC Transporter durch SAM-kompetitive EZH2 Inhibitoren zunächst nötig ist, um die konsekutiven Effekte nachweisen zu können.

Die Ergebnisse der Arbeit deuten darauf hin, dass die gefundenen Effekte durch die Gruppe der SAM-kompetitiven EZH2 Inhibitoren ausgelöst werden, nicht aber durch alle Wirkgruppen der EZH2 Inhibitoren. So wurde für den SAH-Hydrolase Inhibitor DZNep weder eine Induktion der Oxaliplatinresistenz noch eine Induktion der ermittelten Zielgene *SREBF1/2* oder *ABCG1/2* gefunden.

Im Überblick ist in Abbildung 36 die Hypothese des Mechanismus zusammengefasst. Obwohl SAM-kompetitive EZH2 Inhibitoren die kanonische und nicht-kanonische EZH2 Signalweiterleitung inhibieren, ist diese Funktion nicht für die Induktion der Oxaliplatinresistenz verantwortlich. Es wurde nachgewiesen, dass die Inhibitoren zusätzlich EZH2-unabhängig die Transkription von SREBP1/2 aktivieren, wodurch die Transkription von ABCG1/2 aktiviert wird. Diese Transporter führen zu einem gesteigertem Oxaliplatinefflux, wodurch die Resistenz zumindest in Teilen erklärt werden kann.

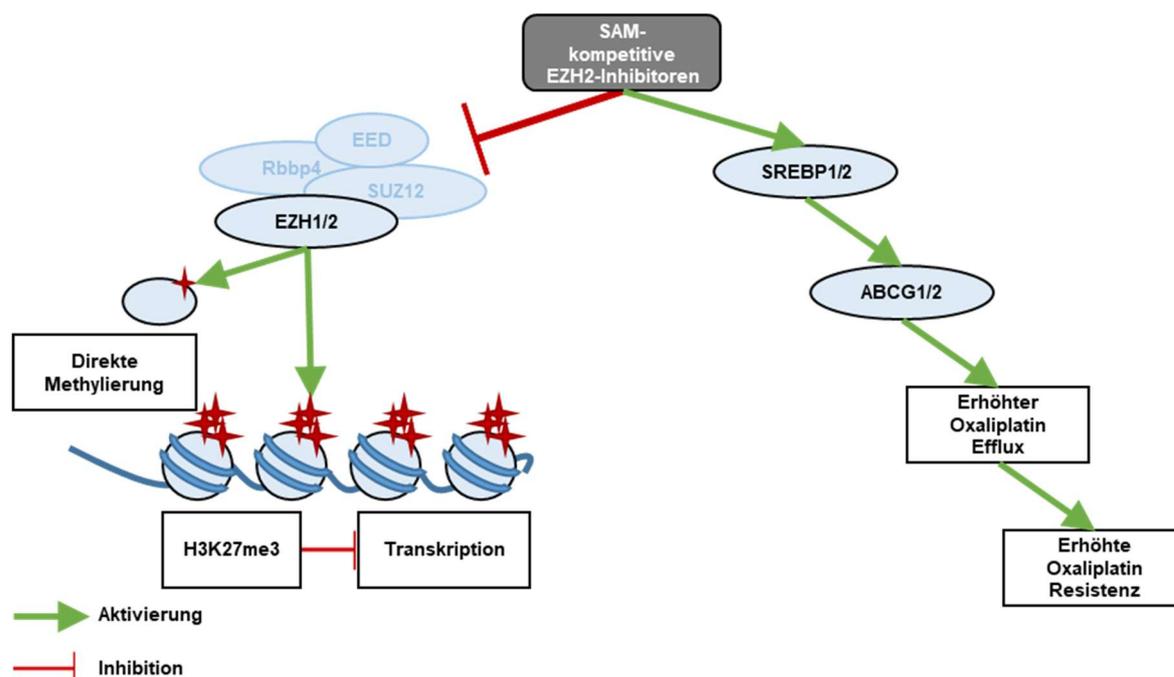


Abbildung 36 Aufgedeckter Mechanismus der Induktion der Oxaliplatinresistenz unter pharmakologischer EZH2 Inhibition.

Zusammengefasst zeigen EZH2 Inhibitoren in der Literatur vielversprechende Aktivität in T-Zell Lymphomen, die in der aktuell vorgelegten Arbeit für Zelllinien mit T-Zell Leukämie- und Lymphomhintergrund jedoch nicht reproduziert werden konnten. Dementsprechend ist der klinische Einsatz pharmakologischer EZH2 Inhibition als Monotherapie auf Basis der in den untersuchten Modellen gewonnenen Daten nicht vielversprechend.

Des Weiteren wurden in der Vergangenheit zwar synergistische Effekte mit anderen Chemotherapeutika wie dem weit verbreiteten Erstlinientherapiemedikament Doxorubicin gefunden, die vorliegenden Daten zeigen jedoch eindrücklich die Erhöhung der Resistenz gegenüber Oxaliplatin. Da gerade periphere T-Zell Lymphome häufig schlechtes Ansprechen auf Erstlinientherapie zeigen und Sekundärtherapiemedikamente wie Oxaliplatin eingesetzt werden, sprechen die vorliegenden Ergebnisse gegen einen Einsatz der pharmakologischen EZH2 Inhibition in Entitäten mit T-Zell Hintergrund. Aus der Literatur sind zudem auch nachteilige Effekte der Kombination von EZH2 Inhibition und anderen Chemotherapeutika bekannt (Göllner et al. 2017). Zusammengenommen, könnte dies darauf hindeuten, dass es durch pharmakologische EZH2 Inhibition auch zu antagonistischen Effekten mit weiteren Chemotherapeutika kommen könnte. Dafür spricht die in der vorliegenden Arbeit aufgedeckte Hochregulation der für Chemotherapieresistenz bekannten Transporter ABCG1 und ABCG2, die in mehreren Zellhintergründen nachgewiesen werden konnte (Liao et al. 2020; Han u. Zhang 2004).

Die aufgezeigten Effekte unterstreichen den Einfluss der Nebenwirkungen von Inhibitoren, trotz nachgewiesener Spezifität (Knutson et al. 2013; McCabe et al. 2012). Es wurde deutlich gemacht, dass eingehende Untersuchungen rational erstellter Kombination neuer Inhibitoren

und etablierter Chemotherapeutika vor dem Erstellen klinischer Studien wichtig sind, um mögliche nachteilige Effekte auszuschließen.

5.3 Limitationen und Ausblick

In der vorgelegten Arbeit habe ich epigenetische Aberrationen in reifzelligen T-Zell Neoplasien analysiert. Es wurden sowohl in Patientenproben einer MEITL Kohorte als auch in einer breiten Auswahl an Zelllinien mit T-Zell Leukämie, reifzelligem T-Zell Lymphom und reifzelligem B-Zell Lymphom Hintergrund Veränderungen auf genetischer und Proteinebene charakterisiert. In den Zelllinienmodellen wurde auch die mRNA-Expression der relevanten Gene analysiert.

Es zeigte sich ein mutationsbedingter, zelltypabhängiger Verlust der Histon Lysin Methyltransferase SETD2 in MEITL, der mit einem Verlust der H3K36 Trimethylierung einherging und bei anderen Hintergründen nicht gefunden werden konnte. Die Analyse wird dadurch limitiert, dass aufgrund der vergleichsweise schlechten Qualität der FFPE-Materialien und zum Teil lang gelagerten Proben keine mRNA-Sequenzierung an der MEITL-Kohorte vorgenommen wurde, um eventuelle Genexpressionsveränderungen durch den Verlust von SETD2 und H3K36me3 aufzudecken. Des Weiteren wird der Aussagegehalt der Analyse der *DNA-Damage-Response* ebenfalls besonders durch die geringe Probenzahl beeinflusst. Diese könnte in Zukunft durch eine Erweiterung der vorhandenen Proben das Verständnis des MEITL-spezifischen SETD2 Verlusts vergrößern und die aufgedeckten Zusammenhänge validieren.

Die vergleichende Analyse der Proliferation zwischen Zelltypen, in denen SETD2 Verlust nicht geläufig oder bekannt ist, zeigte, dass SETD2 Knockdown in T-Zell-Leukämie und reifzelligen T-Zell-Lymphom ohne bekanntem SETD2 Verlust oder weiterer proliferationstreibender Mutation zu einer Verlangsamung der Proliferation führte, während eine Zelllinie mit ccRCC Hintergrund, für welches der SETD2 Verlust publiziert und der proliferationstreibende VHL Verlust bekannt ist, diesen nachteiligen Effekt nicht zeigte. Dies ist ein erstes Anzeichen für die hohe Zellhintergrundabhängigkeit der publizierten SETD2 Aberrationen. Es wurde die Hypothese abgeleitet, dass eine zweite treibende Mutation, wie beispielsweise die in MEITL häufig auftretende Aktivierung des JAK/STAT Signalweges oder der Verlust des Faktors VHL in ccRCC nötig ist. Diese Hypothese wurde in der vorgelegten Arbeit anhand des Einbringens des STAT5 aktivierenden Fusionsproteinen ITK-SYK bzw. TEL-SYK analysiert, wodurch der durch SETD2 Verlust induzierte Proliferationsnachteil überwunden werden konnte. Zur weiteren Analyse mit höherer Ähnlichkeit zu den typischen MEITL Mutationsmuster sind jedoch spezifische Arbeiten mittels Überexpression bekannter treibender Mutationen wie *STAT5B*^{N642H} zu dieser Fragestellung nötig.

Das onkogene Potential des SETD2 Verlusts wurde zudem durch den Einfluss auf die primäre Chemotherapiesensitivität geprüft. Es zeigte sich in der Zelllinie Jurkat grundsätzlich eine Erhöhung der Resistenz gegenüber den Chemotherapeutika Doxorubicin und Etoposid.

Jedoch wurde in der zweiten getesteten Zelllinie SR786 eine Tendenz zur Sensitivierung gegenüber Doxorubicin gefunden und eine zum Teil signifikante Sensitivierung gegenüber Etoposid. Weiterhin variierte der Effekt innerhalb der genutzten shRNAs bei der Zelllinie Caki2. Dies gibt einen Ansatz, dass es sowohl spezifische Einflüsse durch den Zellhintergrund als auch der genutzten shRNAs auf die Chemotherapiesensitivität gibt, für dessen Beweis weitere Analysen benötigt werden.

Da jedoch nachgewiesen wurde, dass SETD2 Verlust allgemein zu einer Veränderung der Sensitivität gegenüber Komponenten der gängigen PTCL Erstlinientherapie führt, geben die Ergebnisse einen ersten Hinweis darauf, weshalb es sich bei MEITL um eine primär chemotherapierefraktäre Entität handelt. Dieser Zusammenhang konnte jedoch nicht detailliert analysiert werden, da es keine kommerziell erhältlichen Zelllinienmodelle für MEITL gibt und der SETD2 Knockdown in der nächstverwandten Zelllinie DERL2 nicht erfolgreich war. Weiterhin muss in Betracht gezogen werden, dass Caki2, die als Zelllinie mit Hintergrund, für den ein SETD2 Verlust bekannt ist, gewählt wurde, als adhärente Zelllinie mit Nierenzellkarzinomhintergrund systemfremd ist, was Einflüsse auf die Vergleichbarkeit der Analysen haben kann. In kommenden Arbeiten sollten also weitere reifzellige lymphoide Modelle und auch die Analyse von Primärmaterial mit einbezogen werden.

In der vorgelegten Arbeit wurde nachgewiesen, dass DNA-Reparaturmechanismen unter SETD2 Verlust gestört sind, wodurch die Erhöhung der Chemotherapieresistenz zumindest in Teilen erklärt werden kann. Die Fokussierung auf diesen Mechanismus ist begründet durch die in der Literatur bekannte Veränderung der DNA-Reparatur unter SETD2 Aberrationen. Andere Mechanismen, die die Chemotherapiesensitivität beeinflussen können, wie In- und Effluxveränderungen, Aberrationen des *Mitogen-Activated-Protein* Kinase Signalweges oder Induktion der Apoptose wurden hingegen nicht analysiert und sollten in weiteren Arbeiten vertieft werden.

Neben SETD2 wurde zudem die Expression der Histon Lysin Methyltransferase EZH2 in Patientenproben der MEITL Kohorte als auch in derselben Auswahl an Zelllinien auf genomischer und Proteinebene analysiert, wobei Mutationen in diesem Gen bei Proben mit T-Zellhintergrund nur selten auftraten. Sowohl die EZH2 Expression als auch die H3K27 Trimethylierung war in diesen Systemen jedoch mit wenigen Ausnahmen erhöht. Während der Verlust von EZH2 und subsequent H3K27me3 in der T-ALL Zelllinie Loucy aus der Literatur bekannt ist, ist der Verlust von H3K27me3 bei starker EZH2 Expression in der wenig charakterisierten HSTCL Zelllinie DERL2 jedoch nicht aufgedeckt. Dementsprechend bedarf es weiterer Analysen zu posttranskriptionellen Veränderungen und Abbauprozessen in dieser Zelllinie.

Obwohl die Überexpression von EZH2 sowohl in der Literatur bekannt ist als auch in der vorgelegten Arbeit nachgewiesen werden konnte, wodurch ein onkogener Charakter zu

vermuten ist, wurde unter EZH2 Knockdown in verschiedenen Zelllinienmodellen keine Verlangsamung der Proliferation gefunden. In weiteren Arbeiten sollten also andere Mechanismen analysiert werden, die über das reine Zellwachstum hinausgehen und sich vorteilhaft auf die Tumorentwicklung auswirken können, wie beispielsweise Veränderungen des Tumormikromilieus. Da dies im Zelllinienmodell nur bedingt durch Veränderungen des pH-Wertes oder der Osmolarität nachgestellt werden kann, würden eventuelle Veränderungen in der vorgelegten Arbeit durch die Restriktion auf Zellkulturmethoden gegebenenfalls nicht aufgedeckt werden können.

In der Arbeit wurde offengelegt, dass pharmakologische EZH2 Inhibition zelltyp- und EZH2-unabhängig zu einer Erhöhung der Oxaliplatinresistenz in klinisch relevanten Konzentrationsbereichen führt. Dafür wurden sowohl Zelllinien mit verschiedenem EZH2- und H3K27me3-Status als auch EZH2-Knockdown mit einbezogen. Es wurde aufgedeckt, dass Veränderungen des Oxaliplatineffluxes durch EZH2-unabhängige Regulation der SRE bindenden Proteine 1 und 2 und der ABCG Transporter 1 und 2 an der Erhöhung der Resistenz beteiligt sind. Durch anschließende gemeinsame Inkubation mit SREBP und ABC Inhibitoren, die zu einer Verringerung der durch EZH2 Inhibition induzierten Effekte führte, wurde die Abhängigkeit verifiziert. In den Expressionsanalysen wurden EZH2-abhängige Effekte jedoch nur bedingt und EZH1-spezifische Effekte überhaupt nicht analysiert. Für genauere Aussagen wären Zellen mit EZH1/2 Einzel- und Doppelknockdown sowie die entsprechende Überexpression nötig. Des Weiteren sollten SREBP1/2 und ABCG1/2 Knockdowns mit einbezogen werden, um Nebenwirkungen der SREBP und ABC Inhibitoren auszuschließen. Anhand der vorgelegten Arbeit wurde abgeleitet, dass die Erhöhung der Oxaliplatinresistenz unter pharmakologischer EZH2 Inhibition ein Nebeneffekt SAM-kompetitiver EZH2 Inhibitoren ist. Dies wurde an zwei Vertretern der Gruppe dieses Wirkmechanismus' bewiesen und konnte an einem EZH2 Inhibitor mit einem anderen Wirkmechanismus nicht gezeigt werden. Um die Allgemeingültigkeit der Aussage jedoch sicher beweisen zu können, sollten die Ergebnisse in weiteren Vertretern der Gruppe der SAM-kompetitiven EZH2 Inhibitoren verifiziert werden und auch die Effekte bei Inkubation mit dualen EZH1/2 Inhibitoren, EZH2-EED-Disruptoren sowie Wirkstoffen, die zum Abbau von EZH2 führen, analysiert werden.

Insgesamt erschwert die Komplexität des Systems durch die unterschiedlichen genutzten Zellhintergründe der Zelllinien die Analyse der verschiedenen Fragestellungen. Dieses Problem könnte durch eine weitreichende Erweiterung der Auswahl an Zelllinien für alle durchgeführten Experimente sowohl unter Knockdown als auch Inhibition der analysierten Proteine aufgelöst werden. Dadurch könnten mehrere Zelllinien je zellulärem Hintergrund zu einer allgemeingültigen Aussage je Entität führen.

Weiterhin muss aber unabhängig von der Anzahl der genutzten Zelllinien auch bedacht werden, dass Zelllinienmodelle stets ein artifizielles System darstellen, da es sich um

immortale Zellen handelt, die unter künstlichen Bedingungen am Leben erhalten werden und demnach nie die realen Bedingungen im Körper von Patienten widerspiegeln. Dies wird beispielsweise deutlich durch fehlende Analyse der Vaskularisierung, Metastasierung oder des Tumormikromilieus. Zudem kann es durch lange Kultivierung zu Subklonierung mit neuen akquirierten Mutationen kommen, weshalb langanhaltende durchgängige Zellkultur in der vorgelegten Arbeit nach Möglichkeit vermieden wurde. Aufgrund des artifiziellen Charakters der Methode sollten aber alle im Zelllinienmodell durchgeführten Arbeiten mittels *in vivo* Modellen oder in primären Proben von Patiententumormaterial verifiziert werden.

7. Literaturverzeichnis

- Abbas T, Shibata E, Park J, Jha S, Karnani N, Dutta A (2010) CRL4(Cdt2) regulates cell proliferation and histone gene expression by targeting PR-Set7/Set8 for degradation. *Mol Cell* 40, 9–21
- Afzal A, Esmaeili A, Ibrahim S, Farooque U, Gehrs B (2020) Monomorphic Epitheliotropic Intestinal T-Cell Lymphoma With Extraintestinal Areas of Peripheral T-Cell Lymphoma Involvement. *Cureus* 12, e10021
- Agar NS, Wedgworth E, Crichton S, Mitchell TJ, Cox M, Ferreira S, Robson A, Calonje E, Stefanato CM, Wain EM, Wilkins B, Fields PA, Dean A, Webb K, Scarisbrick J, Morris S, Whittaker SJ (2010) Survival outcomes and prognostic factors in mycosis fungoides/Sézary syndrome: validation of the revised International Society for Cutaneous Lymphomas/European Organisation for Research and Treatment of Cancer staging proposal. *J Clin Oncol* 28, 4730–4739
- Agger K, Cloos PAC, Christensen J, Pasini D, Rose S, Rappsilber J, Issaeva I, Canaani E, Salcini AE, Helin K (2007) UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. *Nature* 449, 731–734
- Ahmed SA, Gogal RM, Walsh JE (1994) A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to ³Hthymidine incorporation assay. *J Immunol Methods* 170, 211–224
- Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, Attygalle AD, Araujo IBdO, Berti E, Bhagat G, Borges AM, Boyer D, Calaminici M, Chadburn A, Chan JKC, Cheuk W, Chng W-J, Choi JK, Chuang S-S, Coupland SE, Czader M, Dave SS, Jong D de, Du M-Q, Elenitoba-Johnson KS, Ferry J, Geyer J, Gratzinger D, Guitart J, Gujral S, Harris M, Harrison CJ, Hartmann S, Hochhaus A, Jansen PM, Karube K, Kempf W, Khoury J, Kimura H, Klapper W, Kovach AE, Kumar S, Lazar AJ, Lazzi S, Leoncini L, Leung N, Leventaki V, Li X-Q, Lim MS, Liu W-P, Louissaint A, Marcogliese A, Medeiros LJ, Michal M, Miranda RN, Mitteldorf C, Montes-Moreno S, Morice W, Nardi V, Naresh KN, Natkunam Y, Ng S-B, Oschlies I, Ott G, Parrens M, Pulitzer M, Rajkumar SV, Rawstron AC, Rech K, Rosenwald A, Said J, Sarkozy C, Sayed S, Saygin C, Schuh A, Sewell W, Siebert R, Sohani AR, Tooze R, Traverse-Glehen A, Vega F, Vergier B, Wechalekar AD, Wood B, Xerri L, Xiao W (2022) The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia* 36, 1720–1748
- Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE (1964) Acetylation And Methylation Of Histones And Their Possible Role In The Regulation Of RNA Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 51, 786–794
- Alotaibi S, Hamadani M, Al-Mansour M, Aljurf M (2021) Breast Implant-associated Anaplastic Large Cell Lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 21, e272-e276

- Araujo ED de, Erdogan F, Neubauer HA, Meneksedag-Erol D, Manaswiyoungkul P, Eram MS, Seo H-S, Qadree AK, Israelian J, Orlova A, Suske T, Pham HTT, Boersma A, Tangermann S, Kenner L, Rüllicke T, Dong A, Ravichandran M, Brown PJ, Audette GF, Rauscher S, Dhe-Paganon S, Moriggl R, Gunning PT (2019) Structural and functional consequences of the STAT5BN642H driver mutation. *Nat Commun* 10, 2517
- Arber DA, Hasserjian RP, Orazi A, Mathews V, Roberts AW, Schiffer CA, Roug AS, Cazzola M, Döhner H, Tefferi A (2022) Classification of myeloid neoplasms/acute leukemia: Global perspectives and the international consensus classification approach. *Am J Hematol* 97, 514–518
- Ariès IM, Bodaar K, Karim SA, Chonghaile TN, Hinze L, Burns MA, Pfirrmann M, Degar J, Landrigan JT, Balbach S, Peirs S, Menten B, Isenhardt R, Stevenson KE, Neuberg DS, Devidas M, Loh ML, Hunger SP, Teachey DT, Rabin KR, Winter SS, Dunsmore KP, Wood BL, Silverman LB, Sallan SE, van Vlierberghe P, Orkin SH, Knoechel B, Letai AG, Gutierrez A (2018) PRC2 loss induces chemoresistance by repressing apoptosis in T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Med* 215, 3094–3114
- Artuso M, Esteve A, Brésil H, Vuillaume M, Hall J (1995) The role of the Ataxia telangiectasia gene in the p53, WAF1/CIP1(p21)- and GADD45-mediated response to DNA damage produced by ionising radiation. *Oncogene* 11, 1427–1435
- Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, Marchini JL, McCarthy S, McVean GA, Abecasis GR (2015) A global reference for human genetic variation. *Nature* 526, 68–74
- Bachmann IM, Halvorsen OJ, Collett K, Stefansson IM, Straume O, Haukaas SA, Salvesen HB, Otte AP, Akslen LA (2006) EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. *J Clin Oncol* 24, 268–273
- Bai J, Ma M, Cai M, Xu F, Chen J, Wang G, Shuai X, Tao K (2014) Inhibition enhancer of zeste homologue 2 promotes senescence and apoptosis induced by doxorubicin in p53 mutant gastric cancer cells. *Cell Prolif* 47, 211–218
- Bandapalli OR, Schuessele S, Kunz JB, Rausch T, Stütz AM, Tal N, Geron I, Gershman N, Izraeli S, Eilers J, Vaezipour N, Kirschner-Schwabe R, Hof J, Stackelberg A von, Schrappe M, Stanulla M, Zimmermann M, Koehler R, Avigad S, Handgretinger R, Frismantas V, Bourquin JP, Bornhauser B, Korbel JO, Muckenthaler MU, Kulozik AE (2014) The activating STAT5B N642H mutation is a common abnormality in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia and confers a higher risk of relapse. *Haematologica* 99, e188-92
- Barretina J, Caponigro G, Stransky N, Venkatesan K, Margolin AA, Kim S, Wilson CJ, Lehár J, Kryukov GV, Sonkin D, Reddy A, Liu M, Murray L, Berger MF, Monahan JE, Morais

- P, Meltzer J, Korejwa A, Jané-Valbuena J, Mapa FA, Thibault J, Bric-Furlong E, Raman P, Shipway A, Engels IH, Cheng J, Yu GK, Yu J, Aspesi P, Silva M de, Jagtap K, Jones MD, Wang L, Hatton C, Palessandolo E, Gupta S, Mahan S, Sougnez C, Onofrio RC, Liefeld T, MacConaill L, Winckler W, Reich M, Li N, Mesirov JP, Gabriel SB, Getz G, Ardlie K, Chan V, Myer VE, Weber BL, Porter J, Warmuth M, Finan P, Harris JL, Meyerson M, Golub TR, Morrissey MP, Sellers WR, Schlegel R, Garraway LA (2012) The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 483, 603–607
- Basheer F, Giotopoulos G, Meduri E, Yun H, Mazan M, Sasca D, Gallipoli P, Marando L, Gozdecka M, Asby R, Sheppard O, Dudek M, Bullinger L, Döhner H, Dillon R, Freeman S, Ottmann O, Burnett A, Russell N, Papaemmanuil E, Hills R, Campbell P, Vassiliou GS, Huntly BJP (2019) Contrasting requirements during disease evolution identify EZH2 as a therapeutic target in AML. *J Exp Med* 216, 966–981
- Blighe K, Rana S, Turkes E, Ostendorf B, Grioni A, Lewis M (2021) EnhancedVolcano: Publication-ready volcano plots with enhanced colouring and labeling. R package version 1.18.0. URL: <https://github.com/kevinblighe/EnhancedVolcano> (abgerufen am: 23. August 2023)
- Bödör C, Grossmann V, Popov N, Okosun J, O’Riain C, Tan K, Marzec J, Araf S, Wang J, Lee AM, Clear A, Montoto S, Matthews J, Iqbal S, Rajnai H, Rosenwald A, Ott G, Campo E, Rimsza LM, Smeland EB, Chan WC, Braziel RM, Staudt LM, Wright G, Lister TA, Elemento O, Hills R, Gribben JG, Chelala C, Matolcsy A, Kohlmann A, Haferlach T, Gascoyne RD, Fitzgibbon J (2013) EZH2 mutations are frequent and represent an early event in follicular lymphoma. *Blood* 122, 3165–3168
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120
- Bouaoun L, Sonkin D, Ardin M, Hollstein M, Byrnes G, Zavadil J, Olivier M (2016) TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data. *Hum Mutat* 37, 865–876
- Brown RS, Sander C, Argos P (1985) The primary structure of transcription factor TFIIIA has 12 consecutive repeats. *FEBS Lett* 186, 271–274
- Bruno PM, Liu Y, Park GY, Murai J, Koch CE, Eisen TJ, Pritchard JR, Pommier Y, Lippard SJ, Hemann MT (2017) A subset of platinum-containing chemotherapeutic agents kills cells by inducing ribosome biogenesis stress. *Nat Med* 23, 461–471
- Bu J, Chen A, Yan X, He F, Dong Y, Zhou Y, He J, Zhan D, Lin P, Hayashi Y, Sun Y, Zhang Y, Xiao Z, Grimes HL, Wang Q-F, Huang G (2018) SETD2-mediated crosstalk between H3K36me3 and H3K79me2 in MLL-rearranged leukemia. *Leukemia* 32, 890–899

- Cao Q, Yu J, Dhanasekaran SM, Kim JH, Mani R-S, Tomlins SA, Mehra R, Laxman B, Cao X, Kleer CG, Varambally S, Chinnaiyan AM (2008) Repression of E-cadherin by the polycomb group protein EZH2 in cancer. *Oncogene* 27, 7274–7284
- Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jones RS, Zhang Y (2002) Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* 298, 1039–1043
- Carvalho S, Vitor AC, Sridhara SC, Martins FB, Raposo AC, Desterro JMP, Ferreira J, Almeida SF de (2014) SETD2 is required for DNA double-strand break repair and activation of the p53-mediated checkpoint. *Elife* 3, e02482
- Cavalieri D, Tournilhac O, Missiglia E, Bonnet C, Ledoux-Pilon A, Bisig B, Cairoli A, Pouillot E, Fataccioli V, Parrens M, Copin MC, Gutierrez FL, Xerri L, Bossard C, Wind R, Drieux F, Lhomme F, Daniel A, Clément-Filliatre L, Lemmonier F, Morel P, Noël R, Brotelle T, Glaisner S, Sibon D, Yamani A, Bologna S, Queru K, Damaj G, Letailleur V, Villemagne B, Fleck E, Dupont E, Tchernonog E, Monjanel H, Wilde V, Vallois D, Gaulard P, Leval L (2021) MONOMORPHIC EPITHELIOTROPIC INTESTINAL T-CELL LYMPHOMA (MEITL): CLINICO-PATHOLOGICAL ANALYSIS OF A MULTICENTER EUROPEAN COHORT. *Hematol Oncol* 39
- Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E, Antipin Y, Reva B, Goldberg AP, Sander C, Schultz N (2012) The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data. *Cancer Discov* 2, 401–404
- Chadee DN, Hendzel MJ, Tylopski CP, Allis CD, Bazett-Jones DP, Wright JA, Davie JR (1999) Increased Ser-10 phosphorylation of histone H3 in mitogen-stimulated and oncogene-transformed mouse fibroblasts. *J Biol Chem* 274, 24914–24920
- Chakravarty D, Gao J, Phillips SM, Kundra R, Zhang H, Wang J, Rudolph JE, Yaeger R, Soumerai T, Nissan MH, Chang MT, Chandralapaty S, Traina TA, Paik PK, Ho AL, Hantash FM, Grupe A, Baxi SS, Callahan MK, Snyder A, Chi P, Danila D, Gounder M, Harding JJ, Hellmann MD, Iyer G, Janjigian Y, Kaley T, Levine DA, Lowery M, Omuro A, Postow MA, Rathkopf D, Shoushtari AN, Shukla N, Voss M, Paraiso E, Zehir A, Berger MF, Taylor BS, Saltz LB, Riely GJ, Ladanyi M, Hyman DM, Baselga J, Sabbatini P, Solit DB, Schultz N (2017) OncoKB: A Precision Oncology Knowledge Base. *JCO Precis Oncol* 2017
- Chan JKC, Chan ACL, Cheuk W, Wan S-K, Lee W-K, Lui Y-H, Chan W-K (2011) Type II enteropathy-associated T-cell lymphoma: a distinct aggressive lymphoma with frequent $\gamma\delta$ T-cell receptor expression. *Am J Surg Pathol* 35, 1557–1569

- Chen CN, Wang Z, Jiang Y, Gao H, Tao R, Li J, Zhang ZH (2020) Monomorphic epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma: a clinicopathological analysis of twelve cases. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 49, 17–21
- Chen K, Liu J, Liu S, Xia M, Zhang X, Han D, Jiang Y, Wang C, Cao X (2017) Methyltransferase SETD2-Mediated Methylation of STAT1 Is Critical for Interferon Antiviral Activity. *Cell* 170, 492-506.e14
- Chiang Y-C, Park I-Y, Terzo EA, Tripathi DN, Mason FM, Fahey CC, Karki M, Shuster CB, Sohn B-H, Chowdhury P, Powell RT, Ohi R, Tsai YS, Cubas AA de, Khan A, Davis IJ, Strahl BD, Parker JS, Dere R, Walker CL, Rathmell WK (2018) SETD2 Haploinsufficiency for Microtubule Methylation Is an Early Driver of Genomic Instability in Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res* 78, 3135–3146
- Choi C-H (2005) ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell Int* 5, 30
- Cooper GM (2000) *The cell. A molecular approach*, 2. Aufl. ASM Press Washington, D.C., Sunderland, Mass.
- Dalgliesh GL, Furge K, Greenman C, Chen L, Bignell G, Butler A, Davies H, Edkins S, Hardy C, Latimer C, Teague J, Andrews J, Barthorpe S, Beare D, Buck G, Campbell PJ, Forbes S, Jia M, Jones D, Knott H, Kok CY, Lau KW, Leroy C, Lin M-L, McBride DJ, Maddison M, Maguire S, McLay K, Menzies A, Mironenko T, Mulderrig L, Mudie L, O'Meara S, Pleasance E, Rajasingham A, Shepherd R, Smith R, Stebbings L, Stephens P, Tang G, Tarpey PS, Turrell K, Dykema KJ, Khoo SK, Petillo D, Wonderegem B, Anema J, Kahnoski RJ, Teh BT, Stratton MR, Futreal PA (2010) Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes. *Nature* 463, 360–363
- d'Amore F, Relander T, Lauritzsen GF, Jantunen E, Hagberg H, Anderson H, Holte H, Österborg A, Merup M, Brown P, Kuittinen O, Erlanson M, Østenstad B, Fagerli U-M, Gadeberg OV, Sundström C, Delabie J, Ralfkiaer E, Vornanen M, Toldbod HE (2012) Up-front autologous stem-cell transplantation in peripheral T-cell lymphoma: NLG-T-01. *J Clin Oncol* 30, 3093–3099
- D'Angelo V, Iannotta A, Ramaglia M, Lombardi A, Zarone MR, Desiderio V, Affinita MC, Pecoraro G, Di Martino M, Indolfi P, Casale F, Caraglia M (2015) EZH2 is increased in paediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia and is a suitable molecular target in combination treatment approaches. *J Exp Clin Cancer Res* 34, 83
- Degryse S, Bock CE de, Cox L, Demeyer S, Gielen O, Mentens N, Jacobs K, Geerdens E, Gianfelici V, Hulselmans G, Fiers M, Aerts S, Meijerink JP, Tousseyn T, Cools J (2014) JAK3 mutants transform hematopoietic cells through JAK1 activation, causing T-cell acute lymphoblastic leukemia in a mouse model. *Blood* 124, 3092–3100

- Delabie J, Holte H, Vose JM, Ullrich F, Jaffe ES, Savage KJ, Connors JM, Rimsza L, Harris NL, Müller-Hermelink H-K, Rüdiger T, Coiffier B, Gascoyne RD, Berger F, Tobinai K, Au WY, Liang R, Montserrat E, Hochberg EP, Pileri S, Federico M, Nathwani B, Armitage JO, Weisenburger DD (2011) Enteropathy-associated T-cell lymphoma: clinical and histological findings from the international peripheral T-cell lymphoma project. *Blood* 118, 148–155
- Deleeuw RJ, Zettl A, Klinker E, Haralambieva E, Trottier M, Chari R, Ge Y, Gascoyne RD, Chott A, Müller-Hermelink H-K, Lam WL (2007) Whole-genome analysis and HLA genotyping of enteropathy-type T-cell lymphoma reveals 2 distinct lymphoma subtypes. *Gastroenterology* 132, 1902–1911
- DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, Philippakis AA, del Angel G, Rivas MA, Hanna M, McKenna A, Fennell TJ, Kernytsky AM, Sivachenko AY, Cibulskis K, Gabriel SB, Altshuler D, Daly MJ (2011) A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet* 43, 491–498
- Detre S, Saclani Jotti G, Dowsett M (1995) A "quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. *J Clin Pathol* 48, 876–878
- Dierks C, Adrian F, Fisch P, Ma H, Maurer H, Herchenbach D, Forster CU, Sprissler C, Liu G, Rottmann S, Guo G-R, Katja Z, Veelken H, Warmuth M (2010) The ITK-SYK fusion oncogene induces a T-cell lymphoproliferative disease in mice mimicking human disease. *Cancer Res* 70, 6193–6204
- Dion MF, Altschuler SJ, Wu LF, Rando OJ (2005) Genomic characterization reveals a simple histone H4 acetylation code. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 5501–5506
- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15–21
- Domvri K, Zarogoulidis K, Zogas N, Zarogoulidis P, Petanidis S, Porpodis K, Kioseoglou E, Hohenforst-Schmidt W (2017) Potential synergistic effect of phosphodiesterase inhibitors with chemotherapy in lung cancer. *J Cancer* 8, 3648–3656
- Dong Y, Zhao X, Feng X, Zhou Y, Yan X, Zhang Y, Bu J, Di Zhan, Hayashi Y, Zhang Y, Xu Z, Huang R, Wang J, Zhao T, Xiao Z, Ju Z, Andreassen PR, Wang Q-F, Chen W, Huang G (2019) SETD2 mutations confer chemoresistance in acute myeloid leukemia partly through altered cell cycle checkpoints. *Leukemia* 33, 2585–2598
- Downs JA, Lowndes NF, Jackson SP (2000) A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature* 408, 1001–1004
- Dronamraju R, Jha DK, Eser U, Adams AT, Dominguez D, Choudhury R, Chiang Y-C, Rathmell WK, Emanuele MJ, Churchman LS, Strahl BD (2018) Set2 methyltransferase facilitates

- cell cycle progression by maintaining transcriptional fidelity. *Nucleic Acids Res* 46, 1331–1344
- Duns G, van den Berg E, van Duivenbode I, Osinga J, Hollema H, Hofstra RMW, Kok K (2010) Histone methyltransferase gene SETD2 is a novel tumor suppressor gene in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Res* 70, 4287–4291
- Durinck S, Spellman PT, Birney E, Huber W (2009) Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. *Nat Protoc* 4, 1184–1191
- Ecker J, Langmann T, Moehle C, Schmitz G (2007) Isomer specific effects of Conjugated Linoleic Acid on macrophage ABCG1 transcription by a SREBP-1c dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 352, 805–811
- Edmunds JW, Mahadevan LC, Clayton AL (2008) Dynamic histone H3 methylation during gene induction: HYPB/Setd2 mediates all H3K36 trimethylation. *EMBO J* 27, 406–420
- Faber PW, Barnes GT, Srinidhi J, Chen J, Gusella JF, MacDonald ME (1998) Huntingtin interacts with a family of WW domain proteins. *Hum Mol Genet* 7, 1463–1474
- Fathi NN, Mohammad DK, Görgens A, Andaloussi SE, Zain R, Nore BF, Smith CIE (2018) Translocation-generated ITK-FER and ITK-SYK fusions induce STAT3 phosphorylation and CD69 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 504, 749–752
- Feller AC, Diebold J (Hrsg.) (2004a) *Histopathology of Nodal and Extranodal Non-Hodgkin's Lymphomas*. Springer Berlin Heidelberg Berlin, Heidelberg
- Feller AC, Diebold J (2004b) Nodal and Leukemic NK/T-Cell Lymphoma. In: Feller AC, Diebold J (Hrsg.) *Histopathology of Nodal and Extranodal Non-Hodgkin's Lymphomas*, 121–185. Springer Berlin Heidelberg Berlin, Heidelberg
- Ferreri AJM, Govi S, Pileri SA, Savage KJ (2013) Anaplastic large cell lymphoma, ALK-negative. *Crit Rev Oncol Hematol* 85, 206–215
- Fiskus W, Wang Y, Sreekumar A, Buckley KM, Shi H, Jillella A, Ustun C, Rao R, Fernandez P, Chen J, Balusu R, Koul S, Atadja P, Marquez VE, Bhalla KN (2009) Combined epigenetic therapy with the histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A and the histone deacetylase inhibitor panobinostat against human AML cells. *Blood* 114, 2733–2743
- Flex E, Petrangeli V, Stella L, Chiaretti S, Hornakova T, Knoops L, Ariola C, Fodale V, Clappier E, Paoloni F, Martinelli S, Fragale A, Sanchez M, Tavolaro S, Messina M, Cazzaniga G, Camera A, Pizzolo G, Tornesello A, Vignetti M, Battistini A, Cavé H, Gelb BD, Renaud J-C, Biondi A, Constantinescu SN, Foà R, Tartaglia M (2008) Somaticly acquired JAK1 mutations in adult acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Med* 205, 751–758
- Francis NJ, Kingston RE, Woodcock CL (2004) Chromatin compaction by a polycomb group protein complex. *Science* 306, 1574–1577

- Fujikawa D, Nakagawa S, Hori M, Kurokawa N, Soejima A, Nakano K, Yamochi T, Nakashima M, Kobayashi S, Tanaka Y, Iwanaga M, Utsunomiya A, Uchimarui K, Yamagishi M, Watanabe T (2016) Polycomb-dependent epigenetic landscape in adult T-cell leukemia. *Blood* 127, 1790–1802
- Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E, Cerami E, Sander C, Schultz N (2013) Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* 6, p11
- Gao Y, Zhao Q, Mu X, Zhu H, Liu B, Yao B, Liu X, Xue W, Wang B, Liu S (2019) SREBP1 promotes 5-FU resistance in colorectal cancer cells by inhibiting the expression of caspase7. *Int J Clin Exp Pathol* 12, 1095–1100
- Gentile C, Qin Q, Barbieri A, Ravi PS, Iyer S (2017) Use of PEG-asparaginase in monomorphic epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma, a disease with diagnostic and therapeutic challenges. *Ecancermedicallscience* 11, 771
- Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, Varela I, Phillimore B, Begum S, McDonald NQ, Butler A, Jones D, Raine K, Latimer C, Santos CR, Nohadani M, Eklund AC, Spencer-Dene B, Clark G, Pickering L, Stamp G, Gore M, Szallasi Z, Downward J, Futreal PA, Swanton C (2012) Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 366, 883–892
- Gil-Henn H, Patsialou A, Wang Y, Warren MS, Condeelis JS, Koleske AJ (2013) Arg/Abl2 promotes invasion and attenuates proliferation of breast cancer in vivo. *Oncogene* 32, 2622–2630
- Gisselbrecht C, Gaulard P, Lepage E, Coiffier B, Brière J, Haioun C, Cazals-Hatem D, Bosly A, Xerri L, Tilly H, Berger F, Bouhabdallah R, Diebold J (1998) Prognostic significance of T-cell phenotype in aggressive non-Hodgkin's lymphomas. Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte (GELA). *Blood* 92, 76–82
- Glazer RI, Hartman KD, Knode MC, Richard MM, Chiang PK, Tseng CK, Marquez VE (1986) 3-Deazaneplanocin: a new and potent inhibitor of S-adenosylhomocysteine hydrolase and its effects on human promyelocytic leukemia cell line HL-60. *Biochem Biophys Res Commun* 135, 688–694
- Göllner S, Oellerich T, Agrawal-Singh S, Schenk T, Klein H-U, Rohde C, Pabst C, Sauer T, Lerdrup M, Tavor S, Stölzel F, Herold S, Ehninger G, Köhler G, Pan K-T, Urlaub H, Serve H, Dugas M, Spiekermann K, Vick B, Jeremias I, Berdel WE, Hansen K, Zelent A, Wickenhauser C, Müller LP, Thiede C, Müller-Tidow C (2017) Loss of the histone methyltransferase EZH2 induces resistance to multiple drugs in acute myeloid leukemia. *Nat Med* 23, 69–78

- González-Rodríguez P, Engskog-Vlachos P, Zhang H, Murgoci A-N, Zerdas I, Joseph B (2020) SETD2 mutation in renal clear cell carcinoma suppress autophagy via regulation of ATG12. *Cell Death Dis* 11, 69
- Gordon GM, Lambert QT, Daniel KG, Reuther GW (2010) Transforming JAK1 mutations exhibit differential signalling, FERM domain requirements and growth responses to interferon- γ . *Biochem J* 432, 255–265
- Gough KR, Read AE, Naish JM (1962) Intestinal reticulosis as a complication of idiopathic steatorrhoea. *Gut* 3, 232–239
- Gounder M, Schöffski P, Jones RL, Agulnik M, Cote GM, Villalobos VM, Attia S, Chugh R, Chen TW-W, Jahan T, Loggers ET, Gupta A, Italiano A, Demetri GD, Ratan R, Davis LE, Mir O, Dileo P, van Tine BA, Pressey JG, Lingaraj T, Rajarethinam A, Sierra L, Agarwal S, Stacchiotti S (2020) Tazemetostat in advanced epithelioid sarcoma with loss of INI1/SMARCB1: an international, open-label, phase 2 basket study. *Lancet Oncol* 21, 1423–1432
- Greger V, Passarge E, Höpping W, Messmer E, Horsthemke B (1989) Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Hum Genet* 83, 155–158
- Gulati N, Béguelin W, Giulino-Roth L (2018) Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) inhibitors. *Leuk Lymphoma* 59, 1574–1585
- Haddad BR, Gu L, Mirtti T, Dagvadorj A, Vogiatzi P, Hoang DT, Bajaj R, Leiby B, Ellsworth E, Blackmon S, Ruiz C, Curtis M, Fortina P, Ertel A, Liu C, Rui H, Visakorpi T, Bubendorf L, Lallas CD, Trabulsi EJ, McCue P, Gomella L, Nevalainen MT (2013) STAT5A/B gene locus undergoes amplification during human prostate cancer progression. *Am J Pathol* 182, 2264–2275
- Hah SS, Sumbad RA, Vere White RW de, Turteltaub KW, Henderson PT (2007) Characterization of oxaliplatin-DNA adduct formation in DNA and differentiation of cancer cell drug sensitivity at microdose concentrations. *Chem Res Toxicol* 20, 1745–1751
- Han B, Zhang J-T (2004) Multidrug resistance in cancer chemotherapy and xenobiotic protection mediated by the half ATP-binding cassette transporter ABCG2. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 4, 31–42
- Hang J-F, Yuan C-T, Chang K-C, Wang R-C, Chen B-J, Hsieh P-P, Huang W-T, Chuang W-Y, Chen T-W, Yeh Y-C, Lin S-Y, Hsiao C-H, Chou S-C, Tseng C-E, Pan S-T, Chang S-L, Chuang S-S (2022) Targeted Next-generation Sequencing Reveals a Wide Morphologic and Immunophenotypic Spectrum of Monomorphic Epitheliotropic Intestinal T-Cell Lymphoma. *Am J Surg Pathol* 46, 1207–1218

- Hartman DJ, Davison JM, Foxwell TJ, Nikiforova MN, Chiosea SI (2012) Mutant allele-specific imbalance modulates prognostic impact of KRAS mutations in colorectal adenocarcinoma and is associated with worse overall survival. *Int J Cancer* 131, 1810–1817
- He Y, Selvaraju S, Curtin ML, Jakob CG, Zhu H, Comess KM, Shaw B, The J, Lima-Fernandes E, Szewczyk MM, Cheng D, Klinge KL, Li H-Q, Pliushchev M, Algire MA, Maag D, Guo J, Dietrich J, Panchal SC, Petros AM, Sweis RF, Torrent M, Bigelow LJ, Senisterra G, Li F, Kennedy S, Wu Q, Osterling DJ, Lindley DJ, Gao W, Galasinski S, Barsyte-Lovejoy D, Vedadi M, Buchanan FG, Arrowsmith CH, Chiang GG, Sun C, Pappano WN (2017) The EED protein-protein interaction inhibitor A-395 inactivates the PRC2 complex. *Nat Chem Biol* 13, 389–395
- Holliday R (2006) Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics* 1, 76–80
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC (1991) p53 mutations in human cancers. *Science* 253, 49–53
- Hopfinger G, Herling M, Leval L de, Krasniqi F, Reimer P, Schmitz N, Wulf G (2021) Periphere T-Zell Lymphome. 6.1 Therapiestruktur. URL: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/periphere-t-zell-lymphome/@@guideline/html/index.html> (abgerufen am: 2. November 2023)
- Houot R, Poeschel V, Altmann B, Angel S, Thurner L, Illmer T, Andre M, Dreyling M, Maisonneuve H, Tilly H, Mayer S, Casasnovas O, Le Gouill S, Offner F, Cartron G, Kerkhoff A, Weber T, Hoffmann J, Ziepert M, Klapper W, Itti E, Hellwig D, Natchkebia G, Leval L de, Rosenwald A, Haioun C, Dercle L, Gaulard P, Held G (2022) Prolonged Remissions After Nivolumab Plus Gemcitabine/Oxaliplatin in Relapsed/Refractory T-cell Lymphoma. *Hemasphere* 6, e672
- Hoy SM (2020) Tazemetostat: First Approval. *Drugs* 80, 513–521
- Hsieh JJ, Le VH, Oyama T, Ricketts CJ, Ho TH, Cheng EH (2018) Chromosome 3p Loss-Orchestrated VHL, HIF, and Epigenetic Dereglulation in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *J Clin Oncol* 36, JCO2018792549
- Huang D, Lim JQ, Cheah DMZ, Kahliab KHBM, Laurensia Y, Pang JW, Wong EKY, Chia BKH, Goh J, Zhang X, Chan JY, Chow EK-H, Tan SY, Lim ST, Ong CK (2020) Whole-genome sequencing reveals potent therapeutic strategy for monomorphic epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma. *Blood Adv* 4, 4769–4774
- Huang Y, Liu N, Liu J, Liu Y, Zhang C, Long S, Luo G, Zhang L, Zhang Y (2019) Mutant p53 drives cancer chemotherapy resistance due to loss of function on activating transcription of PUMA. *Cell Cycle* 18, 3442–3455
- Ibrahim A, Hirschfeld S, Cohen MH, Griebel DJ, Williams GA, Pazdur R (2004) FDA drug approval summaries: oxaliplatin. *Oncologist* 9, 8–12

- Ishitsuka K, Izutsu K, Maruyama D, Makita S, Jacobsen ED, Horwitz S, Kusumoto S, Allen P, Porcu P, Imaizumi Y, Yamauchi N, Morishima S, Kawamata T, Foss FM, Utsunomiya A, Nosaka K, Serbest G, Kato K, Adachi N, Tsukasaki K, Tobinai K (2021) First-In-Human Study Of The EZH1 And EZH2 Dual Inhibitor Valemetostat Tosylate (DS-3201B) In Patients With Relapsed Or Refractory Non-Hodgkin Lymphomas. *Hematol Oncol* 39
- Italiano A, Soria J-C, Toulmonde M, Michot JM, Lucchesi C, Varga A, Coindre J-M, Blakemore SJ, Clawson A, Suttle B, McDonald AA, Woodruff M, Ribich S, Hedrick E, Keilhack H, Thomson B, Owa T, Copeland RA, Ho PTC, Ribrag V (2018) Tazemetostat, an EZH2 inhibitor, in relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma and advanced solid tumours: a first-in-human, open-label, phase 1 study. *Lancet Oncol* 19, 649–659
- Jachimowicz RD, Beleggia F, Isensee J, Velpula BB, Goergens J, Bustos MA, Doll MA, Shenoy A, Checa-Rodriguez C, Wiederstein JL, Baranes-Bachar K, Bartenhagen C, Hertwig F, Teper N, Nishi T, Schmitt A, Distelmaier F, Lüdecke H-J, Albrecht B, Krüger M, Schumacher B, Geiger T, Hoon DSB, Huertas P, Fischer M, Hucho T, Peifer M, Ziv Y, Reinhardt HC, Wicczorek D, Shiloh Y (2019) UBQLN4 Represses Homologous Recombination and Is Overexpressed in Aggressive Tumors. *Cell* 176, 505-519.e22
- Ji Z, Sheng Y, Miao J, Li X, Zhao H, Wang J, Cheng C, Wang X, Liu K, Zhang K, Xu L, Yao J, Shen L, Hou J, Zhou W, Sun J, Li L, Gao W-Q, Zhu HH (2019) The histone methyltransferase Setd2 is indispensable for V(D)J recombination. *Nat Commun* 10, 3353
- Jiang H, Reinhardt HC, Bartkova J, Tommiska J, Blomqvist C, Nevanlinna H, Bartek J, Yaffe MB, Hemann MT (2009) The combined status of ATM and p53 link tumor development with therapeutic response. *Genes Dev* 23, 1895–1909
- Jin Y, Chen Z, Dong J, Wang B, Fan S, Yang X, Cui M (2021) SREBP1/FASN/cholesterol axis facilitates radioresistance in colorectal cancer. *FEBS Open Bio* 11, 1343–1352
- Kahn TG, Dorafshan E, Schultheis D, Zare A, Stenberg P, Reim I, Pirrotta V, Schwartz YB (2016) Interdependence of PRC1 and PRC2 for recruitment to Polycomb Response Elements. *Nucleic Acids Res* 44, 10132–10149
- Kan Z, Zheng H, Liu X, Li S, Barber TD, Gong Z, Gao H, Hao K, Willard MD, Xu J, Hauptschein R, Rejto PA, Fernandez J, Wang G, Zhang Q, Wang B, Chen R, Wang J, Lee NP, Zhou W, Lin Z, Peng Z, Yi K, Chen S, Li L, Fan X, Yang J, Ye R, Ju J, Wang K, Estrella H, Deng S, Wei P, Qiu M, Wulur IH, Liu J, Ehsani ME, Zhang C, Loboda A, Sung WK, Aggarwal A, Poon RT, Fan ST, Wang J, Hardwick J, Reinhard C, Dai H, Li Y, Luk JM, Mao M (2013) Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in hepatocellular carcinoma. *Genome Res* 23, 1422–1433

- Kanie T, Abe A, Matsuda T, Kuno Y, Towatari M, Yamamoto T, Saito H, Emi N, Naoe T (2004) TEL-Syk fusion constitutively activates PI3-K/Akt, MAPK and JAK2-independent STAT5 signal pathways. *Leukemia* 18, 548–555
- Kasinathan G (2021) Monomorphic epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma of the duodenum: an aggressive disease. *Hematol Transfus Cell Ther* 43, 518–520
- Kidani Y, Inagaki K, Iigo M, Hoshi A, Kuretani K (1978) Antitumor activity of 1,2-diaminocyclohexane--platinum complexes against sarcoma-180 ascites form. *J Med Chem* 21, 1315–1318
- Kim MK, Kim S, Lee SS, Sym SJ, Lee DH, Jang S, Park CJ, Chi HS, Huh J, Suh C (2007) High-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation for peripheral T-cell lymphoma: complete response at transplant predicts survival. *Ann Hematol* 86, 435–442
- Kleer CG, Cao Q, Varambally S, Shen R, Ota I, Tomlins SA, Ghosh D, Sewalt RGAB, Otte AP, Hayes DF, Sabel MS, Livant D, Weiss SJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM (2003) EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 11606–11611
- Klucken J, Büchler C, Orsó E, Kaminski WE, Porsch-Ozcürümez M, Liebisch G, Kapinsky M, Diederich W, Drobnik W, Dean M, Allikmets R, Schmitz G (2000) ABCG1 (ABC8), the human homolog of the *Drosophila* white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 817–822
- Knutson SK, Warholic NM, Wigle TJ, Klaus CR, Allain CJ, Raimondi A, Porter Scott M, Chesworth R, Moyer MP, Copeland RA, Richon VM, Pollock RM, Kuntz KW, Keilhack H (2013) Durable tumor regression in genetically altered malignant rhabdoid tumors by inhibition of methyltransferase EZH2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 7922–7927
- Knutson SK, Wigle TJ, Warholic NM, Sneeringer CJ, Allain CJ, Klaus CR, Sacks JD, Raimondi A, Majer CR, Song J, Scott MP, Jin L, Smith JJ, Olhava EJ, Chesworth R, Moyer MP, Richon VM, Copeland RA, Keilhack H, Pollock RM, Kuntz KW (2012) A selective inhibitor of EZH2 blocks H3K27 methylation and kills mutant lymphoma cells. *Nat Chem Biol* 8, 890–896
- Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE, Shen D, McLellan MD, Lin L, Miller CA, Mardis ER, Ding L, Wilson RK (2012) VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res* 22, 568–576
- Kong A, Mehanna H (2021) WEE1 Inhibitor: Clinical Development. *Curr Oncol Rep* 23, 107
- Konze KD, Ma A, Li F, Barsyte-Lovejoy D, Parton T, Macnevin CJ, Liu F, Gao C, Huang X-P, Kuznetsova E, Rougie M, Jiang A, Pattenden SG, Norris JL, James LI, Roth BL, Brown PJ, Frye SV, Arrowsmith CH, Hahn KM, Wang GG, Vedadi M, Jin J (2013) An orally bioavailable chemical probe of the Lysine Methyltransferases EZH2 and EZH1. *ACS Chem Biol* 8, 1324–1334

- Kornberg RD (1977) Structure of chromatin. *Annu Rev Biochem* 46, 931–954
- Krueger F, James F, Ewels P, Afyounian E, Schuster-Boeckler B (2021) FelixKrueger/TrimGalore: v0.6.7 - DOI via Zenodo. Zenodo
- Küçük C, Jiang B, Hu X, Zhang W, Chan JKC, Xiao W, Lack N, Alkan C, Williams JC, Avery KN, Kavak P, Scuto A, Sen E, Gaulard P, Staudt L, Iqbal J, Zhang W, Cornish A, Gong Q, Yang Q, Sun H, d'Amore F, Leppä S, Liu W, Fu K, Leval L de, McKeithan T, Chan WC (2015) Activating mutations of STAT5B and STAT3 in lymphomas derived from $\gamma\delta$ -T or NK cells. *Nat Commun* 6, 6025
- Kuhn K, Steinmetzer K, Brantl S (2001) Transcriptional repressor CopR: dissection of stabilizing motifs within the C terminus. *Microbiology (Reading)* 147, 3387–3392
- Kuleshov MV, Jones MR, Rouillard AD, Fernandez NF, Duan Q, Wang Z, Koplev S, Jenkins SL, Jagodnik KM, Lachmann A, McDermott MG, Monteiro CD, Gundersen GW, Ma'ayan A (2016) Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res* 44, W90-7
- Kuser-Abali G, Gong L, Yan J, Liu Q, Zeng W, Williamson A, Lim CB, Molloy ME, Little JB, Huang L, Yuan Z-M (2018) An EZH2-mediated epigenetic mechanism behind p53-dependent tissue sensitivity to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, 3452–3457
- Kuzmichev A, Nishioka K, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D (2002) Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes Dev* 16, 2893–2905
- Labonté B, Suderman M, Maussion G, Lopez JP, Navarro-Sánchez L, Yerko V, Mechawar N, Szyf M, Meaney MJ, Turecki G (2013) Genome-wide methylation changes in the brains of suicide completers. *Am J Psychiatry* 170, 511–520
- Lai P, Wang Y (2021) Epigenetics of cutaneous T-cell lymphoma: biomarkers and therapeutic potentials. *Cancer Biol Med* 18, 34–51
- Lau ATY, Lee S-Y, Xu Y-M, Zheng D, Cho Y-Y, Zhu F, Kim H-G, Li S-Q, Zhang Z, Bode AM, Dong Z (2011) Phosphorylation of histone H2B serine 32 is linked to cell transformation. *J Biol Chem* 286, 26628–26637
- Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, Carter SL, Stewart C, Mermel CH, Roberts SA, Kiezun A, Hammerman PS, McKenna A, Drier Y, Zou L, Ramos AH, Pugh TJ, Stransky N, Helman E, Kim J, Sougnez C, Ambrogio L, Nickerson E, Shefler E, Cortés ML, Auclair D, Saksena G, Voet D, Noble M, DiCara D, Lin P, Lichtenstein L, Heiman DI, Fennell T, Imielinski M, Hernandez B, Hodis E, Baca S, Dulak AM, Lohr J, Landau D-A, Wu CJ, Melendez-Zajgla J, Hidalgo-Miranda A, Koren A, McCarroll SA, Mora J, Crompton B, Onofrio R, Parkin M, Winckler W, Ardlie K, Gabriel SB, Roberts CWM, Biegel JA, Stegmaier K, Bass AJ, Garraway LA, Meyerson M, Golub

- TR, Gordenin DA, Sunyaev S, Lander ES, Getz G (2013) Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* 499, 214–218
- Leaman DW, Pisharody S, Flickinger TW, Commane MA, Schlessinger J, Kerr IM, Levy DE, Stark GR (1996) Roles of JAKs in activation of STATs and stimulation of c-fos gene expression by epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 16, 369–375
- Lee ST, Li Z, Wu Z, Aau M, Guan P, Karuturi RKM, Liou YC, Yu Q (2011) Context-specific regulation of NF- κ B target gene expression by EZH2 in breast cancers. *Mol Cell* 43, 798–810
- Levine SS, Weiss A, Erdjument-Bromage H, Shao Z, Tempst P, Kingston RE (2002) The core of the polycomb repressive complex is compositionally and functionally conserved in flies and humans. *Mol Cell Biol* 22, 6070–6078
- Lewis MD, Roberts BJ (2004) Role of the C-terminal alpha-helical domain of the von Hippel-Lindau protein in its E3 ubiquitin ligase activity. *Oncogene* 23, 2315–2323
- Li C, Song J, Guo Z, Gong Y, Zhang T, Huang J, Cheng R, Yu X, Li Y, Chen L, Ma X, Sun Y, Wang Y, Xue L (2022) EZH2 Inhibitors Suppress Colorectal Cancer by Regulating Macrophage Polarization in the Tumor Microenvironment. *Front Immunol* 13, 857808
- Li H, Durbin R (2010) Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 26, 589–595
- Li L, Miao W, Huang M, Williams P, Wang Y (2019) Integrated Genomic and Proteomic Analyses Reveal Novel Mechanisms of the Methyltransferase SETD2 in Renal Cell Carcinoma Development. *Mol Cell Proteomics* 18, 437–447
- Li M, Phatnani HP, Guan Z, Sage H, Greenleaf AL, Zhou P (2005) Solution structure of the Set2-Rpb1 interacting domain of human Set2 and its interaction with the hyperphosphorylated C-terminal domain of Rpb1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 17636–17641
- Li WX (2008) Canonical and non-canonical JAK–STAT signaling. *Trends Cell Biol* 18, 545–551
- Liao X, Song G, Xu Z, Bu Y, Chang F, Jia F, Xiao X, Ren X, Zhang M, Jia Q (2020) Oxaliplatin resistance is enhanced by saracatinib via upregulation Wnt-ABCG1 signaling in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 20, 31
- Liao Y, Smyth GK, Shi W (2014) featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30, 923–930
- Liao Y, Smyth GK, Shi W (2019) The R package Rsubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads. *Nucleic Acids Res* 47, e47
- Licht JD, Gossel MJ, Figge J, Hansen UM (1990) *Drosophila* Krüppel protein is a transcriptional repressor. *Nature* 346, 76–79

- Lifton RP, Goldberg ML, Karp RW, Hogness DS (1978) The organization of the histone genes in *Drosophila melanogaster*: functional and evolutionary implications. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 42 Pt 2, 1047–1051
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* 25, 402–408
- Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15, 550
- Lu Y, Zhou J, Xu C, Lin H, Xiao J, Wang Z, Yang B (2008) JAK/STAT and PI3K/AKT pathways form a mutual transactivation loop and afford resistance to oxidative stress-induced apoptosis in cardiomyocytes. *Cell Physiol Biochem* 21, 305–314
- Lue JK, Prabhu SA, Liu Y, Gonzalez Y, Verma A, Mundi PS, Abshiru N, Camarillo JM, Mehta S, Chen EI, Qiao C, Nandakumar R, Cremers S, Kelleher NL, Elemento O, Amengual JE (2019) Precision Targeting with EZH2 and HDAC Inhibitors in Epigenetically Dysregulated Lymphomas. *Clin Cancer Res* 25, 5271–5283
- Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251–260
- Luo J, Su F, Chen D, Shiloh A, Gu W (2000) Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. *Nature* 408, 377–381
- Ma A, Stratikopoulos E, Park K-S, Wei J, Martin TC, Yang X, Schwarz M, Leshchenko V, Rialdi A, Dale B, Lagana A, Guccione E, Parekh S, Parsons R, Jin J (2020a) Discovery of a first-in-class EZH2 selective degrader. *Nat Chem Biol* 16, 214–222
- Ma H, Cheng B, Falchi L, Marchi E, Sawas A, Bhagat G, O'Connor OA (2020b) Survival benefit in patients with peripheral T-cell lymphomas after treatments with novel therapies and clinical trials. *Hematol Oncol* 38, 51–58
- Ma M, Wang X, Tang J, Xue H, Chen J, Pan C, Jiang H, Shen S (2012) Early T-cell precursor leukemia: a subtype of high risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *Front Med* 6, 416–420
- Mar BG, Chu SH, Kahn JD, Krivtsov AV, Koche R, Castellano CA, Kotlier JL, Zon RL, McConkey ME, Chabon J, Chappell R, Grauman PV, Hsieh JJ, Armstrong SA, Ebert BL (2017) SETD2 alterations impair DNA damage recognition and lead to resistance to chemotherapy in leukemia. *Blood* 130, 2631–2641
- Margueron R, Li G, Sarma K, Blais A, Zavadil J, Woodcock CL, Dynlacht BD, Reinberg D (2008) Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms. *Mol Cell* 32, 503–518
- Marks DI, Paietta EM, Moorman AV, Richards SM, Buck G, DeWald G, Ferrando A, Fielding AK, Goldstone AH, Ketterling RP, Litzow MR, Luger SM, McMillan AK, Mansour MR, Rowe JM, Tallman MS, Lazarus HM (2009) T-cell acute lymphoblastic leukemia in

- adults: clinical features, immunophenotype, cytogenetics, and outcome from the large randomized prospective trial (UKALL XII/ECOG 2993). *Blood* 114, 5136–5145
- Matthews KS (1992) DNA looping. *Microbiol Rev* 56, 123–136
- McCabe MT, Ott HM, Ganji G, Korenchuk S, Thompson C, van Aller GS, Liu Y, Graves AP, Della Pietra A, Diaz E, LaFrance LV, Mellinger M, Duquenne C, Tian X, Kruger RG, McHugh CF, Brandt M, Miller WH, Dhanak D, Verma SK, Tummino PJ, Creasy CL (2012) EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature* 492, 108–112
- McKinney M, Moffitt AB, Gaulard P, Travert M, Leval L de, Nicolae A, Raffeld M, Jaffe ES, Pittaluga S, Xi L, Heavican T, Iqbal J, Belhadj K, Delfau-Larue M-H, Fataccioli V, Czader MB, Lossos IS, Chapman-Fredricks JR, Richards KL, Fedoriw Y, Ondrejka SL, Hsi ED, Low L, Weisenburger D, Chan WC, Mehta-Shah N, Horwitz S, Bernal-Mizrachi L, Flowers CR, Beaven AW, Parihar M, Baseggio L, Parrens M, Moreau A, Sujobert P, Pilichowska M, Evens AM, Chadburn A, Au-Yeung RKH, Srivastava G, Choi WWL, Goodlad JR, Aurer I, Basic-Kinda S, Gascoyne RD, Davis NS, Li G, Zhang J, Rajagopalan D, Reddy A, Love C, Levy S, Zhuang Y, Datta J, Dunson DB, Davé SS (2017) The Genetic Basis of Hepatosplenic T-cell Lymphoma. *Cancer Discov* 7, 369–379
- Melloni GE, Ogier AG, Pretis S de, Mazzarella L, Pelizzola M, Pelicci PG, Riva L (2014) DOTS-Finder: a comprehensive tool for assessing driver genes in cancer genomes. *Genome Med* 6, 44
- Miranda TB, Cortez CC, Yoo CB, Liang G, Abe M, Kelly TK, Marquez VE, Jones PA (2009) DZNep is a global histone methylation inhibitor that reactivates developmental genes not silenced by DNA methylation. *Mol Cancer Ther* 8, 1579–1588
- Moffitt AB, Ondrejka SL, McKinney M, Rempel RE, Goodlad JR, Teh CH, Leppa S, Mannisto S, Kovanen PE, Tse E, Au-Yeung RKH, Kwong Y-L, Srivastava G, Iqbal J, Yu J, Naresh K, Villa D, Gascoyne RD, Said J, Czader MB, Chadburn A, Richards KL, Rajagopalan D, Davis NS, Smith EC, Palus BC, Tzeng TJ, Healy JA, Lugar PL, Datta J, Love C, Levy S, Dunson DB, Zhuang Y, Hsi ED, Davé SS (2017) Enteropathy-associated T cell lymphoma subtypes are characterized by loss of function of SETD2. *J Exp Med* 214, 1371–1386
- Mok EHK, Leung CON, Zhou L, Lei MML, Leung HW, Tong M, Wong TL, Lau EYT, Ng IOL, Ding J, Yun JP, Yu J, Zhu HL, Lin CH, Lindholm D, Leung KS, Cybulski JD, Baker DM, Ma S, Lee TKW (2022) Caspase-3-Induced Activation of SREBP2 Drives Drug Resistance via Promotion of Cholesterol Biosynthesis in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res* 82, 3102–3115

- Monaco G, Lee B, Xu W, Mustafah S, Hwang YY, Carré C, Burdin N, Visan L, Ceccarelli M, Poidinger M, Zippelius A, Pedro de Magalhães J, Larbi A (2019) RNA-Seq Signatures Normalized by mRNA Abundance Allow Absolute Deconvolution of Human Immune Cell Types. *Cell Rep* 26, 1627-1640.e7
- Morin RD, Johnson NA, Severson TM, Mungall AJ, An J, Goya R, Paul JE, Boyle M, Woolcock BW, Kuchenbauer F, Yap D, Humphries RK, Griffith OL, Shah S, Zhu H, Kimbara M, Shashkin P, Charlot JF, Tcherpakov M, Corbett RD, Tam A, Varhol R, Smailus D, Moksa M, Zhao Y, Delaney A, Qian H, Birol I, Schein J, Moore R, Holt R, Horsman DE, Connors JM, Jones S, Aparicio S, Hirst M, Gascoyne RD, Marra MA (2010) Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat Genet* 42, 181–185
- Morin RD, Mungall K, Pleasance E, Mungall AJ, Goya R, Huff RD, Scott DW, Ding J, Roth A, Chiu R, Corbett RD, Chan FC, Mendez-Lago M, Trinh DL, Bolger-Munro M, Taylor G, Hadj Khodabakhshi A, Ben-Neriah S, Pon J, Meissner B, Woolcock BW, Farnoud N, Rogic S, Lim EL, Johnson NA, Shah S, Jones S, Steidl C, Holt R, Birol I, Moore R, Connors JM, Gascoyne RD, Marra MA (2013) Mutational and structural analysis of diffuse large B-cell lymphoma using whole-genome sequencing. *Blood* 122, 1256–1265
- Morschhauser F, Tilly H, Chaidos A, McKay P, Phillips T, Assouline S, Batlevi CL, Campbell P, Ribrag V, Damaj GL, Dickinson M, Jurczak W, Kazmierczak M, Opat S, Radford J, Schmitt A, Yang J, Whalen J, Agarwal S, Adib D, Salles G (2020) Tazemetostat for patients with relapsed or refractory follicular lymphoma: an open-label, single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 21, 1433–1442
- Mounier N, El Gnaoui T, Tilly H, Canioni D, Sebban C, Casasnovas O, Delarue R, Sonet A, Beaussart P, Petrella T, Castaigne S, Bologna S, Salles G, Rahmouni A, Gaulard P, Haioun C (2013) Rituximab plus gemcitabine and oxaliplatin in patients with refractory/relapsed diffuse large B-cell lymphoma who are not candidates for high-dose therapy. A phase II Lymphoma Study Association trial. *Haematologica* 98, 1726–1731
- Mukaka MM (2012) Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Med J* 24, 69–71
- Muramoto K, Kaida S, Miyake T, Nishimura R, Kito K, Shiohara M, Kushima R, Shimizu T, Tani M (2022) Rare monomorphic epithelial intestinal T-cell lymphoma of the stomach with a giant gastric perforation rescued by liver-covering sutures followed by a total gastrectomy and lateral hepatectomy: a case report. *Surg Case Rep* 8, 27
- Mutskov V, Felsenfeld G (2004) Silencing of transgene transcription precedes methylation of promoter DNA and histone H3 lysine 9. *EMBO J* 23, 138–149
- Nairismägi M-L, Tan J, Lim JQ, Nagarajan S, Ng CCY, Rajasegaran V, Huang D, Lim WK, Laurensia Y, Wijaya GC, Li ZM, Cutcutache I, Pang WL, Thangaraju S, Ha J, Khoo LP,

- Chin ST, Dey S, Poore G, Tan LHC, Koh HKM, Sabai K, Rao H-L, Chuah KL, Ho Y-H, Ng S-B, Chuang S-S, Zhang F, Liu Y-H, Pongpruttipan T, Ko YH, Cheah P-L, Karim N, Chng W-J, Tang T, Tao M, Tay K, Farid M, Quek R, Rozen SG, Tan P, Teh BT, Lim ST, Tan S-Y, Ong CK (2016) JAK-STAT and G-protein-coupled receptor signaling pathways are frequently altered in epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma. *Leukemia* 30, 1311–1319
- Namdar M, Perez G, Ngo L, Marks PA (2010) Selective inhibition of histone deacetylase 6 (HDAC6) induces DNA damage and sensitizes transformed cells to anticancer agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 20003–20008
- National Center of Biotechnology Information (NCBI) (1988) National Library of Medicine (US), National Center of Biotechnology Information. Stand: 23. August 2023. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Nekrasov M, Klymenko T, Fraterman S, Papp B, Oktaba K, Köcher T, Cohen A, Stunnenberg HG, Wilm M, Müller J (2007) Pcl-PRC2 is needed to generate high levels of H3-K27 trimethylation at Polycomb target genes. *EMBO J* 26, 4078–4088
- Ngollo M, Lebert A, Dagdemir A, Judes G, Karsli-Ceppioglu S, Daures M, Kemeny J-L, Penault-Llorca F, Boiteux J-P, Bignon Y-J, Guy L, Bernard-Gallon D (2014) The association between histone 3 lysine 27 trimethylation (H3K27me3) and prostate cancer: relationship with clinicopathological parameters. *BMC Cancer* 14, 994
- Nosari A, Oreste PL, Biondi A, Costantini MC, Santoleri L, Intropido L, Muti G, Pungolino E, Gargantini L, Morra E (1999) Hepato-splenic ?? T-cell lymphoma: A rare entity mimicking the hemophagocytic syndrome. *Am J Hematol* 60, 61–65
- Pacis A, Mailhot-Léonard F, Tailleux L, Randolph HE, Yotova V, Dumaine A, Grenier J-C, Barreiro LB (2019) Gene activation precedes DNA demethylation in response to infection in human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, 6938–6943
- Paulsen N de (2001) Role of transforming growth factor-alpha in von Hippel- Lindau (VHL)-/- clear cell renal carcinoma cell proliferation: A possible mechanism coupling VHL tumor suppressor inactivation and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1387–1392
- Pear WS, Miller JP, Xu L, Pui JC, Soffer B, Quackenbush RC, Pendergast AM, Bronson R, Aster JC, Scott ML, Baltimore D (1998) Efficient and Rapid Induction of a Chronic Myelogenous Leukemia-Like Myeloproliferative Disease in Mice Receiving P210 bcr/abl- Transduced Bone Marrow. *Blood* 92, 3780–3792
- Pengelly AR, Kalb R, Finkl K, Müller J (2015) Transcriptional repression by PRC1 in the absence of H2A monoubiquitylation. *Genes Dev* 29, 1487–1492
- Pfister SX, Markkanen E, Jiang Y, Sarkar S, Woodcock M, Orlando G, Mavrommati I, Pai C-C, Zalmas L-P, Drobniitzky N, Dianov GL, Verrill C, Macaulay VM, Ying S, La Thangue

- NB, D'Angiolella V, Ryan AJ, Humphrey TC (2015) Inhibiting WEE1 Selectively Kills Histone H3K36me3-Deficient Cancers by dNTP Starvation. *Cancer Cell* 28, 557–568
- Pham HTT, Maurer B, Prchal-Murphy M, Grausenburger R, Grundschober E, Javaheri T, Nivarthi H, Boersma A, Kolbe T, Elabd M, Halbritter F, Pencik J, Kazemi Z, Grebien F, Hengstschläger M, Kenner L, Kubicek S, Farlik M, Bock C, Valent P, Müller M, Rüllicke T, Sexl V, Moriggl R (2018) STAT5BN642H is a driver mutation for T cell neoplasia. *J Clin Invest* 128, 387–401
- Piu F, Magnani M, Ader ME (2002) Dissection of the cytoplasmic domains of cytokine receptors involved in STAT and Ras dependent proliferation. *Oncogene* 21, 3579–3591
- Pro B, Allen P, Behdad A (2020) Hepatosplenic T-cell lymphoma: a rare but challenging entity. *Blood* 136, 2018–2026
- Qian YQ, Otting G, Furukubo-Tokunaga K, Affolter M, Gehring WJ, Wüthrich K (1992) NMR structure determination reveals that the homeodomain is connected through a flexible linker to the main body in the *Drosophila* Antennapedia protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10738–10742
- Quddus J, Johnson KJ, Gavalchin J, Amento EP, Chrisp CE, Yung RL, Richardson BC (1993) Treating activated CD4+ T cells with either of two distinct DNA methyltransferase inhibitors, 5-azacytidine or procainamide, is sufficient to cause a lupus-like disease in syngeneic mice. *J Clin Invest* 92, 38–53
- Rajala HLM, Eldfors S, Kuusanmäki H, van Adrichem AJ, Olson T, Lagström S, Andersson EI, Jerez A, Clemente MJ, Yan Y, Zhang D, Awwad A, Ellonen P, Kallioniemi O, Wennerberg K, Porkka K, Maciejewski JP, Loughran TP, Heckman C, Mustjoki S (2013) Discovery of somatic STAT5b mutations in large granular lymphocytic leukemia. *Blood* 121, 4541–4550
- Rangoonwala HI, Cascella M (2022) StatPearls. Peripheral T-Cell Lymphoma Treasure Island (FL)
- Richly H, Aloia L, Di Croce L (2011) Roles of the Polycomb group proteins in stem cells and cancer. *Cell Death Dis* 2, e204
- Roberti A, Dobay MP, Bisig B, Vallois D, Boéchat C, Lanitis E, Bouchindhomme B, Parrens M-C, Bossard C, Quintanilla-Martinez L, Missiaglia E, Gaulard P, Leval L de (2016) Type II enteropathy-associated T-cell lymphoma features a unique genomic profile with highly recurrent SETD2 alterations. *Nat Commun* 7, 12602
- Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, Mesirov JP (2011) Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* 29, 24–26
- RStudio Team (2021) RStudio: Integrated Development Environment for R. URL: <http://www.rstudio.com/> (abgerufen am: 24. August 2023)

- Salles D, Mencalha AL, Ireneo IC, Wiesmüller L, Abdelhay E (2011) BCR-ABL stimulates mutagenic homologous DNA double-strand break repair via the DNA-end-processing factor CtIP. *Carcinogenesis* 32, 27–34
- Sandmann S, Karimi M, Graaf AO de, Rohde C, Göllner S, Varghese J, Ernsting J, Walldin G, van der Reijden BA, Müller-Tidow C, Malcovati L, Hellström-Lindberg E, Jansen JH, Dugas M (2018) appreci8: a pipeline for precise variant calling integrating 8 tools. *Bioinformatics* 34, 4205–4212
- Sapozhnikov DM, Szyf M (2021) Unraveling the functional role of DNA demethylation at specific promoters by targeted steric blockage of DNA methyltransferase with CRISPR/dCas9. *Nat Commun* 12, 5711
- Saramäki OR, Tammela TLJ, Martikainen PM, Vessella RL, Visakorpi T (2006) The gene for polycomb group protein enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) is amplified in late-stage prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 45, 639–645
- Sarkozy C, Morschhauser F, Dubois S, Molina T, Michot JM, Cullières-Dartigues P, Suttle B, Karlin L, Le Gouill S, Picquenot J-M, Dubois R, Tilly H, Herbaux C, Jardin F, Salles G, Ribrag V (2020) A LYSA Phase Ib Study of Tazemetostat (EPZ-6438) plus R-CHOP in Patients with Newly Diagnosed Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL) with Poor Prognosis Features. *Clin Cancer Res* 26, 3145–3153
- Sawadogo M, Roeder RG (1985) Interaction of a gene-specific transcription factor with the adenovirus major late promoter upstream of the TATA box region. *Cell* 43, 165–175
- Sayers EW, Bolton EE, Brister JR, Canese K, Chan J, Comeau DC, Connor R, Funk K, Kelly C, Kim S, Madej T, Marchler-Bauer A, Lanczycki C, Lathrop S, Lu Z, Thibaud-Nissen F, Murphy T, Phan L, Skripchenko Y, Tse T, Wang J, Williams R, Trawick BW, Pruitt KD, Sherry ST (2022) Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Res* 50, D20-D26
- Scarlsbrick JJ, Prince HM, Vermeer MH, Quaglino P, Horwitz S, Porcu P, Stadler R, Wood GS, Beylot-Barry M, Pham-Ledard A, Foss F, Girardi M, Bagot M, Michel L, Battistella M, Guitart J, Kuzel TM, Martinez-Escala ME, Estrach T, Papadavid E, Antoniou C, Rigopoulos D, Nikolaou V, Sugaya M, Miyagaki T, Gniadecki R, Sanches JA, Cury-Martins J, Miyashiro D, Servitje O, Muniesa C, Berti E, Onida F, Corti L, Hodak E, Amitay-Laish I, Ortiz-Romero PL, Rodríguez-Peralto JL, Knobler R, Porkert S, Bauer W, Pimpinelli N, Grandi V, Cowan R, Rook A, Kim E, Pileri A, Patrizi A, Pujol RM, Wong H, Tyler K, Stranzenbach R, Querfeld C, Fava P, Maule M, Willemze R, Evison F, Morris S, Twigger R, Talpur R, Kim J, Ognibene G, Li S, Tavallae M, Hoppe RT, Duvic M, Whittaker SJ, Kim YH (2015) Cutaneous Lymphoma International Consortium Study of Outcome in Advanced Stages of Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome: Effect of

- Specific Prognostic Markers on Survival and Development of a Prognostic Model. *J Clin Oncol* 33, 3766–3773
- Schmiedel BJ, Singh D, Madrigal A, Valdovino-Gonzalez AG, White BM, Zapardiel-Gonzalo J, Ha B, Altay G, Greenbaum JA, McVicker G, Seumois G, Rao A, Kronenberg M, Peters B, Vijayanand P (2018) Impact of Genetic Polymorphisms on Human Immune Cell Gene Expression. *Cell* 175, 1701-1715.e16
- Schotta G, Lachner M, Sarma K, Ebert A, Sengupta R, Reuter G, Reinberg D, Jenuwein T (2004) A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev* 18, 1251–1262
- Schümann FL, Groß E, Bauer M, Rohde C, Sandmann S, Terziev D, Müller LP, Posern G, Wienke A, Fend F, Hansmann M-L, Klapper W, Rosenwald A, Stein H, Dugas M, Müller-Tidow C, Wickenhauser C, Binder M, Weber T (2021) Divergent Effects of EZH1 and EZH2 Protein Expression on the Prognosis of Patients with T-Cell Lymphomas. *Biomedicines* 9
- Sessa A, Fagnocchi L, Mastrototaro G, Massimino L, Zaghi M, Indrigo M, Cattaneo S, Martini D, Gabellini C, Pucci C, Fasciani A, Belli R, Taverna S, Andreazzoli M, Zippo A, Broccoli V (2019) SETD5 Regulates Chromatin Methylation State and Preserves Global Transcriptional Fidelity during Brain Development and Neuronal Wiring. *Neuron* 104, 271-289.e13
- Shao Z, Raible F, Mollaaghababa R, Guyon JR, Wu CT, Bender W, Kingston RE (1999) Stabilization of chromatin structure by PRC1, a Polycomb complex. *Cell* 98, 37–46
- Shen W, Xu T, Chen D, Tan X (2019) Targeting SREBP1 chemosensitizes colorectal cancer cells to gemcitabine by caspase-7 upregulation. *Bioengineered* 10, 459–468
- Shen X, Liu Y, Hsu Y-J, Fujiwara Y, Kim J, Mao X, Yuan G-C, Orkin SH (2008) EZH1 mediates methylation on histone H3 lysine 27 and complements EZH2 in maintaining stem cell identity and executing pluripotency. *Mol Cell* 32, 491–502
- Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, Sirotkin K (2001) dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res* 29, 308–311
- Shoaib M, Chen Q, Shi X, Nair N, Prasanna C, Yang R, Walter D, Frederiksen KS, Einarsson H, Svensson JP, Liu CF, Ekwall K, Lerdrup M, Nordenskiöld L, Sørensen CS (2021) Histone H4 lysine 20 mono-methylation directly facilitates chromatin openness and promotes transcription of housekeeping genes. *Nat Commun* 12, 4800
- Simon JM, Hacker KE, Singh D, Brannon AR, Parker JS, Weiser M, Ho TH, Kuan P-F, Jonasch E, Furey TS, Prins JF, Lieb JD, Rathmell WK, Davis IJ (2014) Variation in chromatin accessibility in human kidney cancer links H3K36 methyltransferase loss with widespread RNA processing defects. *Genome Res* 24, 241–250

- Skaland I, Janssen EAM, Gudlaugsson E, Klos J, Kjellevoid KH, Søiland H, Baak JPA (2007) Phosphohistone H3 expression has much stronger prognostic value than classical prognosticators in invasive lymph node-negative breast cancer patients less than 55 years of age. *Mod Pathol* 20, 1307–1315
- Skucha A, Ebner J, Schmöllerl J, Roth M, Eder T, César-Razquin A, Stukalov A, Vittori S, Muhar M, Lu B, Aichinger M, Jude J, Müller AC, Györfy B, Vakoc CR, Valent P, Bennett KL, Zuber J, Superti-Furga G, Grebien F (2018) MLL-fusion-driven leukemia requires SETD2 to safeguard genomic integrity. *Nat Commun* 9, 1983
- Sos ML, Michel K, Zander T, Weiss J, Frommolt P, Peifer M, Li D, Ullrich R, Koker M, Fischer F, Shimamura T, Rauh D, Mermel CH, Fischer S, Stückrath I, Heynck S, Beroukhim R, Lin W, Winckler W, Shah K, LaFramboise T, Moriarty WF, Hanna M, Tolosi L, Rahnenführer J, Verhaak R, Chiang D, Getz G, Hellmich M, Wolf J, Girard L, Peyton M, Weir BA, Chen T-H, Greulich H, Barretina J, Shapiro GI, Garraway LA, Gazdar AF, Minna JD, Meyerson M, Wong K-K, Thomas RK (2009) Predicting drug susceptibility of non-small cell lung cancers based on genetic lesions. *J Clin Invest* 119, 1727–1740
- Sprissler C, Belenki D, Maurer H, Aumann K, Pfeifer D, Klein C, Müller TA, Kissel S, Hülsdünker J, Alexandrovski J, Brummer T, Jumaa H, Duyster J, Dierks C (2014) Depletion of STAT5 blocks TEL-SYK-induced APMF-type leukemia with myelofibrosis and myelodysplasia in mice. *Blood Cancer J* 4, e240
- Stojanoski Z, Saliu V, Petrushevska G, Spirov G, Karanfiliska A, Ivanovski M, Karanfilski O, Panovska-Stavridis I (2022) MONOMORPHIC EPITHELIOTROPIC INTESTINAL T-LYMPHOMA – CASE REPORT. *Open Access Maced J Med Sci* 10, 191–195
- Strelkov IS, Davie JR (2002) Ser-10 phosphorylation of histone H3 and immediate early gene expression in oncogene-transformed mouse fibroblasts. *Cancer Res* 62, 75–78
- Stucki M, Clapperton JA, Mohammad D, Yaffe MB, Smerdon SJ, Jackson SP (2005) MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* 123, 1213–1226
- Sun J, Cai X, Yung MM, Zhou W, Li J, Zhang Y, Li Z, Liu SS, Cheung ANY, Ngan HYS, Li Y, Dai Z, Kai Y, Tzatsos A, Peng W, Chan DW, Zhu W (2019) miR-137 mediates the functional link between c-Myc and EZH2 that regulates cisplatin resistance in ovarian cancer. *Oncogene* 38, 564–580
- Sun J, Jiang Q, Chen H, Zhang Q, Zhao J, Li H, Wang X, Fang Y, Ruan Y, Sun Y (2021a) Genomic instability-associated lncRNA signature predicts prognosis and distinct immune landscape in gastric cancer. *Ann Transl Med* 9, 1326
- Sun Y, Liu Y, Ma X, Hu H (2021b) The Influence of Cell Cycle Regulation on Chemotherapy. *Int J Mol Sci* 22

- Sutter D, Doerfler W (1980) Methylation of integrated adenovirus type 12 DNA sequences in transformed cells is inversely correlated with viral gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 253–256
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (2008) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 4. Aufl. WORLD HEALTH ORGANIZATION Geneva, Switzerland
- Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, Jaffe ES (2016) The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 127, 2375–2390
- Tan S-Y, Chuang S-S, Tang T, Tan L, Ko YH, Chuah KL, Ng S-B, Chng W-J, Gatter K, Loong F, Liu Y-H, Hosking P, Cheah P-L, Teh B-T, Tay K, Koh M, Lim ST (2013) Type II EATL (epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma): a neoplasm of intra-epithelial T-cells with predominant CD8 α phenotype. *Leukemia* 27, 1688–1696
- Tate JG, Bamford S, Jubb HC, Sondka Z, Beare DM, Bindal N, Boutselakis H, Cole CG, Creatore C, Dawson E, Fish P, Harsha B, Hathaway C, Jupe SC, Kok CY, Noble K, Ponting L, Ramshaw CC, Rye CE, Speedy HE, Stefancsik R, Thompson SL, Wang S, Ward S, Campbell PJ, Forbes SA (2019) COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res* 47, D941-D947
- The Cancer Genome Atlas Research Network (2013) Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature* 499, 43–49
- Tian X, Pelton A, Shahsafaei A, Dorfman DM (2016) Differential expression of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) protein in small cell and aggressive B-cell non-Hodgkin lymphomas and differential regulation of EZH2 expression by p-ERK1/2 and MYC in aggressive B-cell lymphomas. *Mod Pathol* 29, 1050–1057
- Tomita S, Kikuti YY, Carreras J, Sakai R, Takata K, Yoshino T, Bea S, Campo E, Missiaglia E, Bouilly J, Letourneau A, Leval L de, Nakamura N (2020) Monomorphic Epitheliotropic Intestinal T-Cell Lymphoma in Asia Frequently Shows SETD2 Alterations. *Cancers* 12
- Tse E, Gill H, Loong F, Kim SJ, Ng S-B, Tang T, Ko YH, Chng W-J, Lim ST, Kim WS, Kwong Y-L (2012) Type II enteropathy-associated T-cell lymphoma: a multicenter analysis from the Asia Lymphoma Study Group. *Am J Hematol* 87, 663–668
- Uhlen M, Karlsson MJ, Zhong W, Tebani A, Pou C, Mikes J, Lakshmikanth T, Forsström B, Edfors F, Odeberg J, Mardinoglu A, Zhang C, Feilitzten K von, Mulder J, Sjöstedt E, Hober A, Oksvold P, Zwahlen M, Ponten F, Lindskog C, Sivertsson Å, Fagerberg L, Brodin P (2019) A genome-wide transcriptomic analysis of protein-coding genes in human blood cells. *Science* 366
- Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson Å, Kampf C, Sjöstedt E, Asplund A, Olsson I, Edlund K, Lundberg E, Navani S, Szigartyo

- CA-K, Odeberg J, Djureinovic D, Takanen JO, Hober S, Alm T, Edqvist P-H, Berling H, Tegel H, Mulder J, Rockberg J, Nilsson P, Schwenk JM, Hamsten M, Feilitzén K von, Forsberg M, Persson L, Johansson F, Zwahlen M, Heijne G von, Nielsen J, Pontén F (2015) Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 347, 1260419
- Ujfaludi Z, Kuthi L, Pankotai-Bodó G, Bankó S, Sükösd F, Pankotai T (2022) Novel Diagnostic Value of Driver Gene Transcription Signatures to Characterise Clear Cell Renal Cell Carcinoma, ccRCC. *Pathol Oncol Res* 28, 1610345
- Ungerstedt JS, Sowa Y, Xu W-S, Shao Y, Dokmanovic M, Perez G, Ngo L, Holmgren A, Jiang X, Marks PA (2005) Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 673–678
- Valdembri D, Serini G, Vacca A, Ribatti D, Bussolino F (2002) In vivo activation of JAK2/STAT-3 pathway during angiogenesis induced by GM-CSF. *FASEB J* 16, 225–227
- van Vlierberghe P, Ambesi-Impombato A, Keersmaecker K de, Hadler M, Paietta E, Tallman MS, Rowe JM, Forne C, Rue M, Ferrando AA (2013) Prognostic relevance of integrated genetic profiling in adult T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 122, 74–82
- Veloza L, Cavalieri D, Missiaglia E, Ledoux-Pilon A, Bisig B, Pereira B, Bonnet C, Pouillot E, Quintanilla-Martinez L, Dubois R, Llamas-Gutierrez F, Bossard C, Wind R de, Drieux F, Fontaine J, Parrens M, Sandrini J, Fataccioli V, Delfau-Larue M-H, Daniel A, Lhomme F, Clément-Filliatre L, Lemonnier F, Cairoli A, Morel P, Glaisner S, Joly B, El Yamani A, Laribi K, Bachy E, Siebert R, Vallois D, Gaulard P, Tournilhac O, Leval L de (2023) Monomorphic epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma comprises morphologic and genomic heterogeneity impacting outcome. *Haematologica* 108, 181–195
- Verbeek WHM, van de Water JMW, Al-Toma A, Oudejans JJ, Mulder CJJ, Coupé VMH (2008) Incidence of enteropathy-associated T-cell lymphoma: a nation-wide study of a population-based registry in The Netherlands. *Scand J Gastroenterol* 43, 1322–1328
- Verma SK, Tian X, LaFrance LV, Duquenne C, Suarez DP, Newlander KA, Romeril SP, Burgess JL, Grant SW, Brackley JA, Graves AP, Scherzer DA, Shu A, Thompson C, Ott HM, van Aller GS, Machutta CA, Diaz E, Jiang Y, Johnson NW, Knight SD, Kruger RG, McCabe MT, Dhanak D, Tummino PJ, Creasy CL, Miller WH (2012) Identification of Potent, Selective, Cell-Active Inhibitors of the Histone Lysine Methyltransferase EZH2. *ACS Med Chem Lett* 3, 1091–1096
- Vicente C, Schwab C, Broux M, Geerdens E, Degryse S, Demeyer S, Lahortiga I, Elliott A, Chilton L, La Starza R, Mecucci C, Vandenberghe P, Goulden N, Vora A, Moorman AV, Soulier J, Harrison CJ, Clappier E, Cools J (2015) Targeted sequencing identifies associations between IL7R-JAK mutations and epigenetic modulators in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 100, 1301–1310

- Vose J, Armitage JO, Weisenburger D (2008) International peripheral T-cell and natural killer/T-cell lymphoma study: pathology findings and clinical outcomes. *J Clin Oncol* 26, 4124–4130
- Wang F, Hou W, Chitsike L, Xu Y, Bettler C, Perera A, Bank T, Cotler SJ, Dhanarajan A, Denning MF, Ding X, Breslin P, Qiang W, Li J, Koleske AJ, Qiu W (2020) ABL1, Overexpressed in Hepatocellular Carcinomas, Regulates Expression of NOTCH1 and Promotes Development of Liver Tumors in Mice. *Gastroenterology* 159, 289-305.e16
- Wang GG, Cai L, Pasillas MP, Kamps MP (2007) NUP98-NSD1 links H3K36 methylation to Hox-A gene activation and leukaemogenesis. *Nat Cell Biol* 9, 804–812
- Wang H, Wang L, Erdjument-Bromage H, Vidal M, Tempst P, Jones RS, Zhang Y (2004) Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* 431, 873–878
- Wang J, Rouse C, Jasper JS, Pendergast AM (2016) ABL kinases promote breast cancer osteolytic metastasis by modulating tumor-bone interactions through TAZ and STAT5 signaling. *Sci Signal* 9, ra12
- Watson JV, Chambers SH, Smith PJ (1987) A pragmatic approach to the analysis of DNA histograms with a definable G1 peak. *Cytometry* 8, 1–8
- Wierda RJ, Rietveld IM, van Eggermond MCJA, Belien JAM, van Zwet EW, Lindeman JHN, van den Elsen PJ (2015) Global histone H3 lysine 27 triple methylation levels are reduced in vessels with advanced atherosclerotic plaques. *Life Sci* 129, 3–9
- Wilhelm M, Smetak M, Reimer P, Geissinger E, Ruediger T, Metzner B, Schmitz N, Engert A, Schaefer-Eckart K, Birkmann J (2016) First-line therapy of peripheral T-cell lymphoma: extension and long-term follow-up of a study investigating the role of autologous stem cell transplantation. *Blood Cancer J* 6, e452
- Winston LA, Hunter T (1995) JAK2, Ras, and Raf are required for activation of extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase by growth hormone. *J Biol Chem* 270, 30837–30840
- Wossning T, Herzog S, Köhler F, Meixlsperger S, Kulathu Y, Mittler G, Abe A, Fuchs U, Borkhardt A, Jumaa H (2006) Deregulated Syk inhibits differentiation and induces growth factor-independent proliferation of pre-B cells. *J Exp Med* 203, 2829–2840
- Wright GW, Huang DW, Phelan JD, Coulibaly ZA, Roulland S, Young RM, Wang JQ, Schmitz R, Morin RD, Tang J, Jiang A, Bagaev A, Plotnikova O, Kotlov N, Johnson CA, Wilson WH, Scott DW, Staudt LM (2020) A Probabilistic Classification Tool for Genetic Subtypes of Diffuse Large B Cell Lymphoma with Therapeutic Implications. *Cancer Cell* 37, 551-568.e14
- Xi H, Yu Y, Fu Y, Foley J, Halees A, Weng Z (2007) Analysis of overrepresented motifs in human core promoters reveals dual regulatory roles of YY1. *Genome Res* 17, 798–806

- Xie A, Hartlerode A, Stucki M, Odate S, Puget N, Kwok A, Nagaraju G, Yan C, Alt FW, Chen J, Jackson SP, Scully R (2007) Distinct roles of chromatin-associated proteins MDC1 and 53BP1 in mammalian double-strand break repair. *Mol Cell* 28, 1045–1057
- Xie Y, Sahin M, Sinha S, Wang Y, Nargund AM, Lyu Y, Han S, Dong Y, Hsieh JJ, Leslie CS, Cheng EH (2022) SETD2 loss perturbs the kidney cancer epigenetic landscape to promote metastasis and engenders actionable dependencies on histone chaperone complexes. *Nat Cancer* 3, 188–202
- Xu H, Zheng L-X, Chen X-S, Pang Q-Y, Yan Y-N, Liu R, Guo H-M, Ren Z-Y, Yang Y, Gu Z-Y, Gao C, Gao Y, Luo C-L, Zhao Y, Wang Y, Wang T, Tao L-Y (2022) Brain-specific loss of *Abcg1* disturbs cholesterol metabolism and aggravates pyroptosis and neurological deficits after traumatic brain injury. *Brain Pathol*, e13126
- Xu L, Tang H, Wang K, Zheng Y, Feng J, Dong H, Jin Y, Cao C, Chen X, Gao G (2019) Pharmacological inhibition of EZH2 combined with DNA-damaging agents interferes with the DNA damage response in MM cells. *Mol Med Rep* 19, 4249–4255
- Yamada K, Ariyoshi K, Onishi M, Miyajima A, Hayakawa F, Towatari M, Saito H, Oka Y, Asano S, Nosaka T, Kitamura T (2000) Constitutively active STAT5A and STAT5B in vitro and in vivo: mutation of STAT5 is not a frequent cause of leukemogenesis. *Int J Hematol* 71, 46–54
- Yamagishi M, Hori M, Fujikawa D, Ohsugi T, Honma D, Adachi N, Katano H, Hishima T, Kobayashi S, Nakano K, Nakashima M, Iwanaga M, Utsunomiya A, Tanaka Y, Okada S, Tsukasaki K, Tobinai K, Araki K, Watanabe T, Uchimarui K (2019) Targeting Excessive EZH1 and EZH2 Activities for Abnormal Histone Methylation and Transcription Network in Malignant Lymphomas. *Cell Rep* 29, 2321-2337.e7
- Yamashita Y, Yuan J, Suetake I, Suzuki H, Ishikawa Y, Choi YL, Ueno T, Soda M, Hamada T, Haruta H, Takada S, Miyazaki Y, Kiyoi H, Ito E, Naoe T, Tomonaga M, Toyota M, Tajima S, Iwama A, Mano H (2010) Array-based genomic resequencing of human leukemia. *Oncogene* 29, 3723–3731
- Yang P-M, Hong Y-H, Hsu K-C, Liu T-P (2019) p38 α /S1P/SREBP2 activation by the SAM-competitive EZH2 inhibitor GSK343 limits its anticancer activity but creates a druggable vulnerability in hepatocellular carcinoma. *Am J Cancer Res* 9, 2120–2139
- Yao X, Tan J, Lim KJ, Koh J, Ooi WF, Li Z, Huang D, Xing M, Chan YS, Qu JZ, Tay ST, Wijaya G, Lam YN, Hong JH, Lee-Lim AP, Guan P, Ng MSW, He CZ, Lin JS, Nandi T, Qamra A, Xu C, Myint SS, Davies JOJ, Goh JY, Loh G, Tan BC, Rozen SG, Yu Q, Tan IBH, Cheng CWS, Li S, Chang KTE, Tan PH, Silver DL, Lezhava A, Steger G, Hughes JR, Teh BT, Tan P (2017) VHL Deficiency Drives Enhancer Activation of Oncogenes in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer Discov* 7, 1284–1305

- Yao Y, Tang Y, Zhu Q, Zhuang Y, Cheng Y, Wang L, Zou L (2013) Gemcitabine, oxaliplatin and dexamethasone as salvage treatment for elderly patients with refractory and relapsed peripheral T-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 54, 1194–1200
- Yap DB, Chu J, Berg T, Schapira M, Cheng S-WG, Moradian A, Morin RD, Mungall AJ, Meissner B, Boyle M, Marquez VE, Marra MA, Gascoyne RD, Humphries RK, Arrowsmith CH, Morin GB, Aparicio SAJR (2011) Somatic mutations at EZH2 Y641 act dominantly through a mechanism of selectively altered PRC2 catalytic activity, to increase H3K27 trimethylation. *Blood* 117, 2451–2459
- Yokoyama C, Wang X, Briggs MR, Admon A, Wu J, Hua X, Goldstein JL, Brown MS (1993) SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell* 75, 187–197
- Zhang CL, McKinsey TA, Chang S, Antos CL, Hill JA, Olson EN (2002) Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy. *Cell* 110, 479–488
- Zhang H, Zhu D, Zhang Z, Kaluz S, Yu B, Devi NS, Olson JJ, van Meir EG (2020) EZH2 targeting reduces medulloblastoma growth through epigenetic reactivation of the BAI1/p53 tumor suppressor pathway. *Oncogene* 39, 1041–1048
- Zhang L-L, Pan H-X, Wang Y-X, Guo T, Liu L (2019) Genome profiling revealed the activation of IL2RG/JAK3/STAT5 in peripheral T-cell lymphoma expressing the ITK-SYK fusion gene. *Int J Oncol* 55, 1077–1089
- Zheng S, Wang W, Aldahdooh J, Malyutina A, Shadbahr T, Tanoli Z, Pessia A, Tang J (2022) SynergyFinder Plus: Toward Better Interpretation and Annotation of Drug Combination Screening Datasets. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 20, 587–596
- Zheng Y, Liu A, Wang Z-J, Cao Q, Wang W, Lin L, Ma K, Zhang F, Wei J, Matas E, Cheng J, Chen G-J, Wang X, Yan Z (2019) Inhibition of EHMT1/2 rescues synaptic and cognitive functions for Alzheimer's disease. *Brain* 142, 787–807
- Zhu X, He F, Zeng H, Ling S, Chen A, Wang Y, Yan X, Wei W, Pang Y, Cheng H, Hua C, Zhang Y, Yang X, Lu X, Cao L, Hao L, Dong L, Zou W, Wu J, Li X, Zheng S, Yan J, Zhou J, Zhang L, Mi S, Wang X, Zhang L, Zou Y, Chen Y, Geng Z, Wang J, Zhou J, Liu X, Wang J, Yuan W, Huang G, Cheng T, Wang Q-F (2014) Identification of functional cooperative mutations of SETD2 in human acute leukemia. *Nat Genet* 46, 287–293

Anhang

Tabellen

Tabelle 21 Chromosomenabschnitte und korrespondierende Gene der zielgerichteten Sequenzierung. Die Chromosomenabschnitte beziehen sich auf hg19 (National Center of Biotechnology Information (NCBI) 1988; Sayers et al. 2022). Mit „*“ markierte Abschnitte sind vom Nutzer bestimmt („*userdefined*“).

Chr.	Chromosomenabschnitt	Korrespondierendes Zielgen
11	108128172-108128321	ATM_RS34231402
2	25467375-25467524	COSM87002_DNMT3A_13
8	145999367-145999516	ZNF34_
11	108236012-108236162	COSM21642_ATM_14; COSM21626_ATM_16
6	32188153-32188302	NOTCH4
11	5510350-5510499	OR52D1_RS35986511 RS370608634
8	145999543-145999692	ZNF34_RS3830702
2	88913199-88913348	COSM3736268_EIF2AK3_10
20	126082-126231	DEFB126_RS200807952 RS397788846 RS11467497
10	70426780-70426929	TET1
2	25463467-25463616	COSM87011_DNMT3A_15
10	21435267-21435416	C10ORF113_RS45546236 RS72102767
9	107361105-107361254	OR13C5_RS202235686
11	108114719-108114868	ATM_RS147915571
9	139417390-139417539	COSM1624742_NOTCH1_24
7	25266496-25266645	NPVF_RS3216928
2	169851857-169852006	ABCB11
9	139399270-139399497	COSM12771_NOTCH1_39
15	60734623-60734772	NARG2_RS1063100
2	169850262-169850411	ABCB11
10	70404759-70404908	TET1_RS376078561
15	60740111-60740272	NARG2
9	139413023-139413286	COSM4163569_NOTCH1_33; COSM4163567_NOTCH1_29
12	109017577-109017726	SELPLG_RS63748999 RS372173288
1	150198966-150199154	ANP32E_RS56692627 RS68136184; ANP32E_RS375209062
2	25457168-25457318	COSM52944_DNMT3A_459
1	152748963-152749112	LCE1F_RS149277953

9	139397694-139397843	COSM13048_NOTCH1_33
11	108175388-108175537	COSM41596_ATM_20
15	60720745-60720894	NARG2_RS117095293
8	8869052-8869201	ERI1_RS138826421
9	139402640-139402789	NOTCH1
4	140641011-140641160	MAML3
9	139390610-139390948	COSM12776_NOTCH1_11; COSM13061_NOTCH1_10; COSM28669_NOTCH1_10
11	56380473-56380622	OR5M1_RS71931749 RS72003051
9	139396755-139396904	NOTCH1
2	25463212-25463361	COSM133737_DNMT3A_11
15	60758831-60758980	NARG2_RS141469235
4	140812011-140812160	MAML3
6	32188566-32188715	COSM4003969_NOTCH4_14
8	8887469-8887618	ERI1_RS66532380 RS140242735
19	55286695-55286943	KIR2DL1_RS111799279
19	55290034-55290183	KIR2DL1_RS75232650
11	108117724-108117874	COSM21323_ATM_20; COSM21301_ATM_12
10	70405708-70405857	TET1_RS377753307
2	169788856-169789005	ABCB11_RS200174512
19	55295141-55295290	KIR2DL1_RS201644346
3	75786101-75786430	ZNF717_RS144353922; ZNF717_RS148347794; ZNF717; ZNF717_RS80256387
17	39274245-39274507	KRTAP4-11_RS199712484; KRTAP4-11_RS425784; KRTAP4-11
11	108123555-108123704	ATM_RS148191382
3	75786919-75787202	ZNF717_RS149887072
19	55284713-55285157	KIR2DL1_RS200323121
3	75787384-75787533	ZNF717_RS199620349
6	32497839-32498003	HLA-DRB5_RS146966122; HLA-DRB5_RS72508462; HLA-DRB5_RS73727923
X	55172511-55172754	FAM104B
19	55282292-55282346	KIR2DL1_CDS_16889200 *
10	29770504-29770667	SVIL_CDS_16697922 *
3	47084042-47084200	SETD2_CDS_16964151 *

9	133759347-133761077	ABL1_CDS_17103692 *
6	157519936-157520051	ARID1B_REGION"_CDS_17046308 *
10	29775005-29775496	SVIL
1	117146237-117146657	IGSF3_CDS_16673056 *
10	29783834-29784120	SVIL
10	29843703-29843997	SVIL
1	152187926-152188124	HRNR_HS3
3	47155357-47155504	SETD2_CDS_16961943
1	179198367-179198542	ABL2_CDS_16687876 *
12	123892031-123892257	SETD8_CDS_16771636 *
10	29839517-29840202	SVIL_CDS_16700276 *
10	29779767-29779958	SVIL_CDS_16701459 *
3	47129594-47129747	SETD2_CDS_16966927 *
22	41566401-41566585	EP300_HAT+ZF_CDS_16951776 *
3	47103644-47103846	SETD2_CDS_16962883 *
1	117149105-117149183	IGSF3_CDS_16676733 *
10	29820922-29821111	SVIL_CDS_16697607 *
19	55290055-55290124	KIR2DL1_CDS_16890656 *
10	29821449-29822397	SVIL_CDS_16698875 *
5	176023803-176026845	GPRIN1_CDS_17021316 *
6	157527292-157529032	ARID1B_REGION"_CDS_17048110 *
4	106155035-106158508	TET2_HS1
1	120457923-120459327	NOTCH2_25-34"_CDS_16674063 *
10	29801655-29801800	SVIL_CDS_16697515 *
1	117131307-117131736	IGSF3_CDS_16674931 *
19	4511727-4511761	PLIN4_HS3 *
3	47142939-47143055	SETD2_CDS_16965805 *
1	152186680-152186714	HRNR_HS1 *
9	133738141-133738432	ABL1_CDS_17103871 *
X	55187289-55187599	FAM104B
10	29747170-29747528	SVIL
19	55284776-55285094	KIR2DL1_CDS_16888035 *
10	29754515-29754689	SVIL_CDS_16696961 *
19	55286608-55286920	KIR2DL1_CDS_16889502 *
X	135961167-135961596	RBMX
X	135957236-135957754	RBMX

19	55294929-55295272	KIR2DL1
1	14104904-14109336	PRDM2_EX8"_CDS_16650756 *
1	117142554-117142977	IGSF3_CDS_16673939 *
1	179112059-179112189	ABL2_CDS_16686144 *
1	120611939-120612030	NOTCH2_1-2_CDS_16674601 *
1	117158693-117159089	IGSF3_CDS_16675417 *
6	157517290-157517459	ARID1B_REGION"_CDS_17047082 *
X	55185546-55185671	FAM104B
1	120572520-120572620	NOTCH2_1-2_CDS_16677165 *
4	106196196-106197683	TET2_HS9_CDS_17000041 *
19	55294365-55294485	KIR2DL1_CDS_16891140 *
17	21216795-21216859	MAP2K3"_CDS_16838912 *
1	117150555-117150963	IGSF3_CDS_16678259 *
3	47087968-47088121	SETD2_CDS_16963481 *
X	135958653-135958824	RBMX_CDS_17123518 *
3	47147478-47147620	SETD2_CDS_16963076 *
3	47161663-47166048	SETD2_CDS_16964856 *
6	157502094-157502322	ARID1B_REGION"_CDS_17045086 *
12	122361701-122361718	WDR66_HS1 *
1	152192005-152192234	HRNR_HS5
X	100542457-100542543	TAF7L
22	41533648-41533804	EP300_KIX_CDS_16955162 *
1	179090721-179091012	ABL2_CDS_16684792 *
X	100547769-100548043	TAF7L_CDS_17117484 *
10	29776083-29776238	SVIL_CDS_16697485 *
1	152187535-152187569	HRNR_HS2 *
16	3795269-3795330	CREBBP_HAT+_CDS_16814483 *
17	7576531-7577165	TP53_EX4-11
17	40475013-40475094	STAT3_HSATSH-DOMAIN_CDS_16843077 *
17	76808933-76809093	USP36_CDS_16853643 *
3	47079147-47079277	SETD2_CDS_16965910 *
4	106193722-106194075	TET2_EX10 *
15	90631816-90631945	IDH2_EX4_HS *
10	29820174-29820227	SVIL_CDS_16697441 *
10	29812371-29812966	SVIL_CDS_16698612 *
7	148508708-148508800	EZH2_SET_HS_CDS_17068617 *

17	21202181-21202248	MAP2K3" _CDS_16834972 *
X	100533973-100534033	TAF7L_CDS_17116489 *
1	152192595-152192629	HRNR_HS8 *
5	149516562-149516620	PDGFRB_CDS_17025722 *
22	41565498-41565630	EP300_HAT+ZF_CDS_16952469 *
16	3820562-3820950	CREBBP_REGION2_CDS_16811697 *
22	41550990-41551127	EP300_BROMO_CDS_16952277 *
5	149502596-149502774	PDGFRB_CDS_17025397 *
14	93117918-93119430	RIN3_EX6_CDS_16789971 *
9	133710825-133710922	ABL1_CDS_17103350 *
17	76803032-76803728	USP36_CDS_16852626 *
4	55140999-55141150	PDGFRA_REGION_CDS_16990666 *
7	2565869-2566053	LFNG_CDS_17049370 *
5	149504999-149505150	PDGFRB_CDS_17021329 *
X	135956295-135956621	RBMX_CDS_17122101 *
3	47158104-47158254	SETD2_CDS_16966523 *
9	5044388-5044422	JAK2_HS_R122 *
15	75094663-75094710	CSK_REGION_CDS_16809498 *
16	3788551-3788683	CREBBP_HAT+_CDS_16812182 *
5	149499566-149499696	PDGFRB_CDS_17021792 *
1	120462843-120463030	NOTCH2_25-34" _CDS_16675218 *
12	122359203-122359599	WDR66_EX2_CDS_16772330 *
7	148506420-148506492	EZH2_SET_HS_CDS_17069331 *
6	157099381-157099415	ARID1B_HS *
5	149504281-149504404	PDGFRB_CDS_17021996 *
17	76818010-76818096	USP36_CDS_16851930 *
10	29773576-29773770	SVIL_CDS_16699414 *
12	123875168-123875343	SETD8_CDS_16768907 *
17	21188224-21188291	MAP2K3" _CDS_16840750 *
12	25380216-25380300	KRAS_HS2
17	76798397-76798627	USP36_CDS_16855951 *
4	106190748-106190904	TET2_HS7
10	29813392-29813654	SVIL_CDS_16696964 *
1	179081435-179081543	ABL2_CDS_16687078 *
22	41547921-41548364	EP300_BROMO
9	5072532-5072566	JAK2_HS_G571 *

19	4511251-4511285	PLIN4_HS2 *
9	133589698-133589852	ABL1_CDS_17103793 *
1	120464327-120464442	NOTCH2_25-34"_CDS_16677932 *
5	149506074-149506187	PDGFRB_CDS_17024957 *
1	117127258-117127684	IGSF3_CDS_16673179 *
10	29759196-29759422	SVIL_CDS_16699828 *
17	21208354-21208450	MAP2K3"_CDS_16835898 *
12	122380806-122380860	WDR66_HS2 *
17	40483481-40483515	STAT3_HS_K365 *
12	123873971-123874111	SETD8_CDS_16771521 *
16	3778651-3779010	CREBBP_REGION4_CDS_16815042 *
5	149512304-149512515	PDGFRB_CDS_17024400 *
22	41569618-41569798	EP300_HAT+ZF_CDS_16951526 *
19	55281294-55281346	KIR2DL1_CDS_16889571 *
9	133729442-133729634	ABL1_CDS_17107150 *
1	120466251-120466617	NOTCH2_25-34"_CDS_16676533 *
5	149514304-149514589	PDGFRB_CDS_17021690 *
5	149511533-149511667	PDGFRB_CDS_17024826 *
12	25398192-25398340	KRAS_HS1 *
4	55595492-55595661	KIT_REGION_CDS_16994359 *
1	179079408-179079600	ABL2_CDS_16684884 *
16	3781361-3781484	CREBBP_HAT+_CDS_16812201 *
5	149500442-149500895	PDGFRB
10	29811330-29811574	SVIL_CDS_16701228 *
6	157469749-157470095	ARID1B_REGION"_CDS_17046923 *
X	100536699-100536773	TAF7L_CDS_17114375 *
17	40354377-40354467	STAT5B_HS2_KORR *
12	123868737-123868765	SETD8_CDS_16771743 *
1	65310428-65310582	JAK1_CDS_16671565 *
16	3828098-3828193	CREBBP_KIX_CDS_16816073 *
X	100533028-100533119	TAF7L_CDS_17113892 *
3	47061241-47061340	SETD2_CDS_16965050 *
4	55599227-55599368	KIT_REGION_CDS_16995847 *
4	106162477-106162586	TET2_HS2
1	120460279-120460395	NOTCH2_25-34"_CDS_16674996 *
17	21207729-21207875	MAP2K3"_CDS_16837445 *

1	120461926-120462246	NOTCH2_25-34" _CDS_16674028 *
1	52306045-52306084	NRD1_HS_CDS_16663179 *
3	47058577-47058754	SETD2_CDS_16964489 *
4	55153588-55153718	PDGFRA_REGION_CDS_16992315 *
3	47059119-47059239	SETD2_CDS_16963407 *
9	133755878-133756061	ABL1_CDS_17107597 *
X	100537306-100537451	TAF7L_CDS_17116127 *
3	47144827-47144923	SETD2_CDS_16962763 *
6	116263700-116263734	FRK_HS *
17	76810485-76810644	USP36_CDS_16852263 *
16	3819166-3819364	CREBBP_REGION2_CDS_16815080 *
1	179087713-179087909	ABL2_CDS_16687386 *
X	135954448-135954514	RBMX_CDS_17123104 *
1	65306919-65307294	JAK1
10	29815881-29815995	SVIL_CDS_16697111 *
12	123889422-123889631	SETD8_CDS_16769933 *
17	7578168-7578564	TP53_EX4-11
1	179076847-179078586	ABL2
6	157510767-157510924	ARID1B_REGION" _CDS_17044570 *
9	133753793-133753964	ABL1_CDS_17105317 *
17	40474397-40474522	STAT3_HSATSH-DOMAIN_CDS_16841075 *
5	149499021-149499139	PDGFRB_CDS_17020089 *
10	29777521-29777695	SVIL_CDS_16695979 *
16	3786642-3786826	CREBBP_HAT+_CDS_16814614 *
4	55592166-55592226	KIT_REGION
19	4513441-4513475	PLIN4_HS4 *
17	21205446-21205581	MAP2K3" _CDS_16838501 *
3	50293634-50293762	GNAI2_HOT_CDS_16964716 *
6	157222501-157222669	ARID1B_REGION" _CDS_17045175 *
22	41572768-41572880	EP300_HAT+ZF_CDS_16953917 *
7	2559487-2559937	LFNG_CDS_17049365 *
9	133748238-133748434	ABL1_CDS_17106371 *
3	47139436-47139581	SETD2_CDS_16965239 *
17	76814740-76814870	USP36_CDS_16857195 *
17	40359663-40359759	STAT5B_HS_N642_KORR *
7	2566771-2566853	LFNG_CDS_17049372 *

4	106180757-106180926	TET2_HS5
17	76817064-76817153	USP36_CDS_16857686 *
17	7577490-7577618	TP53_EX4-11_CDS_16837290 *
4	55151529-55151663	PDGFRA_REGION_CDS_16994058 *
17	76824970-76825099	USP36_CDS_16855198 *
17	76794496-76794643	USP36_CDS_16852037 *
7	2564320-2564387	LFNG_CDS_17049366 *
1	179079934-179079990	ABL2_CDS_16686418 *
22	41574239-41574358	EP300_REGION4 *
22	41568494-41568677	EP300_HAT+ZF_CDS_16954893 *
6	157256591-157256720	ARID1B_REGION" _CDS_17048158 *
19	17943448-17943669	JAK3_REGION2
6	157505356-157505579	ARID1B_REGION" _CDS_17044859 *
17	7573941-7574043	TP53_EX4-11_CDS_16835833 *
16	3831196-3831246	CREBBP_KIX_CDS_16816703 *
4	106182897-106183008	TET2_HS6
16	3900761-3900830	CREBBP_HS_AS100 *
1	120464850-120465411	NOTCH2_25-34"
X	150348234-150349916	GPR50_CDS_17121574 *
10	29819527-29819607	SVIL_CDS_16700094 *
4	55597485-55597595	KIT_REGION_CDS_16994606 *
1	179089316-179089419	ABL2_CDS_16688694 *
10	29760058-29760182	SVIL_CDS_16696430 *
6	157454153-157454351	ARID1B_REGION" _CDS_17045569 *
4	55139739-55139907	PDGFRA_REGION_CDS_16991036 *
14	93154262-93154604	RIN3_EX10_CDS_16787106 *
10	29756662-29756814	SVIL_CDS_16699119 *
1	179084004-179084175	ABL2_CDS_16683724 *
17	21215445-21215603	MAP2K3" _CDS_16834955 *
9	133750246-133750449	ABL1_CDS_17106231 *
12	123880883-123880989	SETD8_CDS_16769335 *
12	25378539-25378717	KRAS_HS4
6	157431597-157431705	ARID1B_REGION" _CDS_17045188 *
6	157495133-157495261	ARID1B_REGION" _CDS_17047333 *
1	65311187-65311333	JAK1_CDS_16670263 *
5	149501434-149501613	PDGFRB_CDS_17025232 *

17	7579311-7579592	TP53_EX4_NEW_TRSCRPT *
16	3794886-3794972	CREBBP_HAT+_CDS_16813112 *
16	3781768-3781948	CREBBP_HAT+_CDS_16813369 *
5	56177841-56177859	MAK3K1_HS2 *
22	41572242-41572542	EP300_HAT+ZF_CDS_16952126 *
4	55146474-55146659	PDGFRA_REGION_CDS_16993216 *
X	150345185-150345390	GPR50_CDS_17121871 *
1	65309738-65309908	JAK1_CDS_16671956 *
1	23219430-23219464	EPHB2_HS *
10	29782134-29782330	SVIL_CDS_16699108 *
1	179100437-179100626	ABL2_CDS_16689004 *
4	55593980-55594297	KIT_REGION
17	21203848-21203980	MAP2K3"CDS_16840268 *
17	76831353-76831593	USP36_CDS_16855316 *
4	55143546-55143669	PDGFRA_REGION_CDS_16991933 *
5	149498301-149498425	PDGFRB_CDS_17021128 *
16	3808891-3808983	CREBBP_REGION2_CDS_16811030 *
1	120467919-120468443	NOTCH2_25-34"CDS_16675016 *
3	49399920-49400069	RHOA_REGION_CDS_16962699 *
X	100532585-100532717	TAF7L_CDS_17118026 *
X	55170206-55170318	FAM104B_CDS_17119563 *
1	117208897-117208958	IGSF3_CDS_16674631 *
7	2566461-2566565	LFNG_CDS_17049371 *
6	157192739-157192796	ARID1B_REGION"CDS_17047283 *
9	5078333-5078367	JAK2_HS_R683 *
7	2558179-2558242	LFNG_CDS_17049364 *
3	49397636-49397825	RHOA_REGION_CDS_16963511 *
16	3830724-3830889	CREBBP_KIX_CDS_16816499 *
6	157511163-157511354	ARID1B_REGION"CDS_17045064 *
17	76795740-76795860	USP36_CDS_16853903 *
19	17947929-17948032	JAK3_REGION1_CDS_16876878 *
1	179086458-179086661	ABL2_CDS_16684099 *
10	29824909-29825008	SVIL_CDS_16698051 *
6	157405787-157406049	ARID1B_REGION"CDS_17044300 *
7	2564844-2565414	LFNG
16	3789570-3789735	CREBBP_HAT+_CDS_16814314 *

4	55144520-55144692	PDGFRA_REGION_CDS_16992876 *
22	41564469-41564881	EP300_HAT+ZF
X	100524175-100524235	TAF7L_CDS_17114705 *
15	90630701-90630710	IDH2_HS1 *
3	47168129-47168163	SETD2_CDS_16964077 *
5	149503804-149503933	PDGFRB_CDS_17021159 *
X	100530201-100530279	TAF7L_CDS_17116865 *
3	49412861-49413034	RHOA_REGION_CDS_EX2 *
10	29762758-29762928	SVIL_CDS_16701508 *
15	75094206-75094434	CSK_REGION
4	55140689-55140802	PDGFRA_REGION_CDS_16991896 *
19	17945405-17946034	JAK3_REGION1
1	179095503-179095817	ABL2_CDS_16687747 *
4	55593375-55593718	KIT_REGION
X	100541554-100541651	TAF7L_CDS_17118022 *
4	55598028-55598174	KIT_REGION_CDS_16992138 *
1	179102438-179102519	ABL2_CDS_16687850 *
7	2552280-2552345	LFNG_CDS_17049362 *
7	2568499-2568527	LFNG_CDS_17049373 *
10	29769457-29769752	SVIL_CDS_16699232 *
9	5073741-5073775	JAK2_HS_V617 *
5	149497172-149497423	PDGFRB_CDS_17025802 *
3	47098302-47098990	SETD2_CDS_16963600 *
4	55603332-55603444	KIT_REGION_CDS_16991400 *
4	119951793-119951832	SYNPO2_HS2_CDS_16999437 *
3	47127676-47127814	SETD2_CDS_16961277 *
16	3817712-3817920	CREBBP_REGION2_CDS_16811560 *
5	56170920-56170939	MAP3K1_HS_CDS_17013021 *
17	21217450-21217549	MAP2K3" _CDS_16836102 *
1	117122005-117122509	IGSF3_CDS_16675608 *
3	47125201-47125882	SETD2_CDS_16962331 *
17	76816003-76816104	USP36_CDS_16854938 *
4	55602655-55602996	KIT_REGION
10	29788036-29788202	SVIL_CDS_16700792 *
17	21204177-21204315	MAP2K3" _CDS_16836077 *
19	17948732-17949193	JAK3_REGION1

4	55144054-55144183	PDGFRA_REGION_CDS_16992841 *
1	65312323-65312420	JAK1_CDS_16668896 *
17	21206486-21206556	MAP2K3"_CDS_16836251 *
19	4511018-4511052	PLIN4_HS1 *
6	157524991-157525140	ARID1B_REGION"_CDS_17047133 *
5	149510093-149510235	PDGFRB_CDS_17023766 *
5	149495320-149495519	PDGFRB_CDS_17021467 *
4	106164708-106164935	TET2_HS4
22	41537043-41537210	EP300_KIX_CDS_16950863 *
5	149509311-149509541	PDGFRB_CDS_17020065 *
1	32741512-32741634	LCK_HS_CDS_16661354 *
5	149513140-149513581	PDGFRB
7	148507416-148507516	EZH2_SET_HS_CDS_17069309 *
17	76823318-76823439	USP36_CDS_16852523 *
2	231861014-231861048	SPATA3_HS *
3	47108551-47108618	SETD2_CDS_16966428 *
12	14720545-14720565	PLBD1_HS_CDS_16745706 *
9	133730179-133730493	ABL1_CDS_17105883 *
1	117156378-117156807	IGSF3_CDS_16676162 *
8	128750496-128750530	MYC_HS *
16	3828692-3828828	CREBBP_KIX_CDS_16811217 *
4	106163972-106164084	TET2_HS3
12	123879585-123879823	SETD8_CDS_16771075 *
3	49405862-49405981	RHOA_REGION_CDS_16966443_CORRECTION *
19	17946724-17946870	JAK3_REGION1_CDS_16877020 *
X	135960065-135960255	RBMX_CDS_17121102 *
17	21201716-21201801	MAP2K3
1	117119928-117120194	IGSF3_CDS_16676144 *
22	41553164-41553370	EP300_BROMO_CDS_16955413 *
1	65305371-65305488	JAK1_CDS_16672003
X	100538429-100538581	TAF7L_CDS_17119147 *
1	120461020-120461186	NOTCH2_25-34"_CDS_16672807 *
22	41536135-41536271	EP300_KIX_CDS_16954772 *
3	97202768-97202802	EPHA6_HS *
17	76802229-76802378	USP36_CDS_16854895 *
X	100530979-100531526	TAF7L

12	123888111-123888189	SETD8_CDS_16772629 *
6	157521830-157522632	ARID1B_REGION"_CDS_17045543 *
4	55154957-55155259	PDGFRA_REGION
17	76794981-76795115	USP36_CDS_16856133 *
10	29818625-29818783	SVIL_CDS_16697625 *
10	29751197-29751340	SVIL_CDS_16698358 *
6	157150471-157150565	ARID1B_REGION"_CDS_17047483 *
7	2552782-2552972	LFNG_CDS_17049363 *
5	149515109-149515451	PDGFRB_CDS_17022591 *
9	133755446-133755554	ABL1_CDS_17106207 *
6	157488165-157488329	ARID1B_REGION"_CDS_17047818 *
9	133747507-133747610	ABL1_CDS_17107620 *
16	3790391-3790560	CREBBP_HAT+_CDS_16814332 *
4	55151999-55152140	PDGFRA_REGION_CDS_16992759 *
10	29752412-29752574	SVIL_CDS_16696478 *
3	47205335-47205424	SETD2_CDS_16964510 *
17	76799458-76800070	USP36_CDS_16855923 *
17	76832184-76832455	USP36_CDS_16855744 *
16	3786028-3786214	CREBBP_HAT+_CDS_16810942 *
4	119947943-119947982	SYNPO2-HS1_CDS_16999678 *
17	76809846-76809965	USP36_CDS_16853437 *

Tabelle 22 Mutations- und Expressionsanalyse der genutzten Zelllinien. Mutationsdaten wurden von *Cosmic* (03.06.2022) für Jurkat, Loucy, HH, SR786 und Daudi, von *CLE* (20.09.2022) für SUPT11, DERL2 und HeLa sowie von Morin *et al.* und Wright *et al.* für OciLy1 bezogen (Morin *et al.* 2013; Wright *et al.* 2020; Tate *et al.* 2019; Barretina *et al.* 2012). Da die Zelllinie HeLa als Bezugzelllinie der Expressionsanalyse auf mRNA-Ebene (kursives Gensymbol) und auf Proteinebene (rectes Gensymbol) verwendet wurde, konnte diese auf mRNA-Ebene nicht und auf Proteinebene nur qualitativ analysiert werden.

Hintergrund		Jurkat	SUPT11	Loucy
T-Zellen, prä-thymisch		Kortikale T-ALL	ETP-ALL	ETP-ALL
SETD2	<i>SETD2</i>	wt	wt	wt
	<i>SETD2</i>	0,63-fach (p = 0,032)	1,68-fach (p = 0,003)	1,33-fach (p = 0,310)
	H3K36me3	1,23-fach (p = 0,305)	1,75-fach (p = 0,027)	2,05-fach (p = 0,112)
JAK/STAT Signalweg	<i>JAK1</i>	wt	wt	wt
	<i>JAK2</i>	wt	wt	wt
	<i>JAK3</i>	K885E	wt	wt

	<i>TYK2</i>	L242L	wt	wt
	<i>STAT1</i>	wt	wt	wt
	<i>STAT2</i>	wt	wt	wt
	<i>STAT3</i>	L78F; R729FS	wt	wt
	<i>STAT4</i>	wt	wt	wt
	<i>STAT5A</i>	L303L; Q368FS	wt	wt
	<i>STAT5B</i>	L142P; T724M	wt	wt
	<i>STAT6</i>	Q171FS	wt	wt
PRC2 Komplex	<i>EZH1</i>	R557H	wt	wt
	<i>EZH1</i>	1,58-fach (p = 0,060)	2,04-fach (p = 0,056)	1,53-fach (p = 0,070)
	<i>EZH1</i>	0,39-fach (p = 0,044)	0,49-fach (p = 0,032)	0,16-fach (p = 0,00007)
	<i>EZH2</i>	wt	wt	wt
	<i>EZH2</i>	1,72-fach (p = 0,154)	2,96-fach (p = 0,027)	0,003-fach (p < 0,000001)
	<i>EZH2</i>	7,31-fach (p = 0,005)	3,12-fach (p = 0,219)	keine Expression
	H3K27me3	2,33-fach (p = 0,418)	0,90-fach (p = 0,867)	keine Trimethylierung
	<i>EED</i>	wt	wt	wt
	<i>SUZ12</i>	R516H; Q737TFS*20	wt	wt
	<i>RBBP4</i>	A294T	wt	wt
DNA Reparatur	<i>TP53</i>	R196*	R213*	V272M
	<i>CDKN1A</i>	wt	wt	wt
	<i>ATM</i>	wt	wt	wt
	<i>ATR</i>	I1264M; R1631H	wt	wt
	<i>MDM2</i>	wt	wt	wt
Ras/Raf	<i>SRC</i>	wt	wt	wt
	<i>NRAS</i>	wt	wt	wt
	<i>NRAS1</i>	wt	wt	wt
	<i>RAF1</i>	A237T	wt	wt
	<i>ARAF</i>	wt	A475P	wt
	<i>BRAF</i>	A728V	wt	wt
	<i>CASP2</i>	wt	wt	wt

Verhindern der Apoptose	<i>CASP3</i>	E190D	wt	wt
	<i>CASP6</i>	wt	wt	wt
	<i>CASP7</i>	wt	wt	wt
	<i>CASP8</i>	L107R	wt	wt
	<i>CASP9</i>	wt	wt	wt
	<i>CASP10</i>	V33SFS*12	wt	wt
	<i>LMNA</i>	R166W; Q293*; R388H; R482Q	wt	wt
	<i>LMNB1</i>	wt	wt	wt
	<i>LMNB2</i>	wt	wt	wt
	<i>ICAD</i>	wt	wt	wt
	<i>PARP1</i>	wt	wt	wt
	<i>PAK2</i>	S508N	wt	S508N
ABC Transporter	<i>ABCG1</i>	V174M; D587N	wt	wt
	<i>ABCG2</i>	wt	wt	wt
	<i>ABCB1</i>	wt	wt	wt
	<i>ABCC1</i>	wt	wt	wt
	<i>ABCC2</i>	H823Y	wt	wt
	<i>ABCC3</i>	Q614RFS*34	wt	wt
	<i>ABCC4</i>	wt	wt	wt
	<i>ABCC5</i>	wt	wt	wt
	<i>ABCC6</i>	wt	wt	wt
	<i>ABCC10</i>	wt	wt	wt
SREBF	<i>SREBF1</i>	wt	wt	wt
	<i>SREBF2</i>	E328KFS*26; R896C	wt	wt
Hintergrund		DERL2	HH	SR786
T-Zellen, post-thymisch		HSTCL	CTCL	ALK+ ALCL
SETD2	<i>SETD2</i>	wt	wt	wt
	<i>SETD2</i>	0,72-fach (p = 0,087)	0,22-fach (p = 0,00002)	0,47-fach (p = 0,011)
	H3K36me3	2,38-fach (p = 0,007)	1,83-fach (p = 0,175)	1,17-fach (p = 0,018)
JAK/STAT Signalweg	<i>JAK1</i>	wt	wt	wt
	<i>JAK2</i>	wt	wt	wt
	<i>JAK3</i>	wt	wt	wt

	<i>TYK2</i>	wt	wt	wt
	<i>STAT1</i>	wt	wt	wt
	<i>STAT2</i>	wt	wt	wt
	<i>STAT3</i>	wt	wt	wt
	<i>STAT4</i>	wt	wt	wt
	<i>STAT5A</i>	wt	wt	wt
	<i>STAT5B</i>	N642H	wt	wt
	<i>STAT6</i>	wt	wt	wt
PRC2 Komplex	<i>EZH1</i>	wt	wt	wt
	<i>EZH1</i>	1,84-fach (p = 0,086)	0,55-fach (p = 0,0002)	0,93-fach (p = 0,47)
	<i>EZH1</i>	0,11-fach (p = 0,000003)	1,22-fach (p = 0,571)	0,112-fach (p = 0,00004)
	<i>EZH2</i>	wt	wt	wt
	<i>EZH2</i>	3,50-fach (p = 0,007)	0,68-fach (p = 0,078)	0,96-fach (p = 0,883)
	<i>EZH2</i>	4,53-fach (p = 0,009)	4,74-fach (p = 0,00008)	8,03-fach (p = 0,033)
	H3K27me3	keine Trimethylierung	3,41-fach (p = 0,354)	1,98-fach (p = 0,038)
	<i>EED</i>	wt	wt	wt
	<i>SUZ12</i>	wt	wt	wt
	<i>RBBP4</i>	wt	wt	wt
DNA Reparatur	<i>TP53</i>	wt	wt	P152L
	<i>CDKN1A</i>	wt	wt	wt
	<i>ATM</i>	wt	wt	wt
	<i>ATR</i>	wt	wt	wt
	<i>MDM2</i>	wt	wt	wt
Ras/Raf	<i>SRC</i>	wt	wt	wt
	<i>NRAS</i>	wt	wt	wt
	<i>NRAS1</i>	wt	wt	wt
	<i>RAF1</i>	wt	wt	wt
	<i>ARAF</i>	wt	wt	wt
	<i>BRAF</i>	wt	wt	wt
Verhindern der Apoptose	<i>CASP2</i>	wt	wt	wt
	<i>CASP3</i>	wt	wt	wt

	<i>CASP6</i>	wt	wt	wt
	<i>CASP7</i>	wt	wt	wt
	<i>CASP8</i>	wt	wt	wt
	<i>CASP9</i>	wt	wt	wt
	<i>CASP10</i>	wt	wt	wt
	<i>LMNA</i>	wt	wt	wt
	<i>LMNB1</i>	wt	wt	wt
	<i>LMNB2</i>	wt	wt	wt
	<i>ICAD</i>	wt	wt	wt
	<i>PARP1</i>	wt	wt	wt
	<i>PAK2</i>	wt	wt	wt
ABC Transporter	<i>ABCG1</i>	wt	wt	wt
	<i>ABCG2</i>	wt	wt	wt
	<i>ABCB1</i>	wt	wt	wt
	<i>ABCC1</i>	wt	wt	wt
	<i>ABCC2</i>	wt	wt	wt
	<i>ABCC3</i>	wt	wt	wt
	<i>ABCC4</i>	wt	wt	wt
	<i>ABCC5</i>	wt	wt	wt
	<i>ABCC6</i>	wt	wt	wt
	<i>ABCC10</i>	wt	wt	wt
SREBF	<i>SREBF1</i>	wt	wt	wt
	<i>SREBF2</i>	wt	D582N; P870R	wt
Hintergrund		Oci-Ly1		Daudi
B-Zellen, reifzellig		GC-DLBCL		Burkitt Lymphoma
SETD2	<i>SETD2</i>	I1792M		wt
	<i>SETD2</i>	1,11-fach (p = 0,373)		1,04-fach (p = 0,815)
	H3K36me3	1,00-fach (p = 0,990)		1,44-fach (p = 0,164)
JAK/STAT Signalweg	<i>JAK1</i>	wt		wt
	<i>JAK2</i>	wt		wt
	<i>JAK3</i>	wt		wt
	<i>TYK2</i>	wt		wt
	<i>STAT1</i>	wt		wt
	<i>STAT2</i>	wt		wt
	<i>STAT3</i>	wt		wt
	<i>STAT4</i>	wt		wt

	<i>STAT5A</i>	wt	wt
	<i>STAT5B</i>	wt	V46I
	<i>STAT6</i>	G375R	wt
PRC2 Komplex	<i>EZH1</i>	wt	wt
	<i>EZH1</i>	4,28-fach (p = 0,007)	1,97-fach (p = 0,029)
	<i>EZH1</i>	0,235-fach (p = 0,0007)	0,282-fach (p = 0,0004)
	<i>EZH2</i>	Y641N	wt
	<i>EZH2</i>	2,20-fach (p = 0,014)	1,55-fach (p = 0,022)
	<i>EZH2</i>	6,83-fach (p = 0,129)	11,91-fach (p = 0,095)
	H3K27me3	11,28-fach (p = 0,152)	3,61-fach (p = 0,047)
	<i>EED</i>	wt	wt
	<i>SUZ12</i>	wt	wt
	<i>RBBP4</i>	wt	wt
DNA Reparatur	<i>TP53</i>	R158H	G266E
	<i>CDKN1A</i>	wt	wt
	<i>ATM</i>	wt	wt
	<i>ATR</i>	wt	F2427L
	<i>MDM2</i>	wt	wt
Ras/Raf	<i>SRC</i>	wt	wt
	<i>NRAS</i>	wt	wt
	<i>NRAS1</i>	wt	wt
	<i>RAF1</i>	wt	wt
	<i>ARAF</i>	wt	wt
	<i>BRAF</i>	wt	wt
Verhindern der Apoptose	<i>CASP2</i>	wt	wt
	<i>CASP3</i>	wt	wt
	<i>CASP6</i>	wt	wt
	<i>CASP7</i>	wt	wt
	<i>CASP8</i>	wt	wt
	<i>CASP9</i>	wt	wt
	<i>CASP10</i>	wt	wt
	<i>LMNA</i>	wt	wt
	<i>LMNB1</i>	wt	wt
	<i>LMNB2</i>	wt	wt
	<i>ICAD</i>	wt	wt
	<i>PARP1</i>	wt	wt

	<i>PAK2</i>	wt	wt
ABC Transporter	<i>ABCG1</i>	wt	wt
	<i>ABCG2</i>	wt	wt
	<i>ABCB1</i>	wt	wt
	<i>ABCC1</i>	wt	wt
	<i>ABCC2</i>	wt	wt
	<i>ABCC3</i>	wt	wt
	<i>ABCC4</i>	E936Q	wt
	<i>ABCC5</i>	wt	V476F; S523T
	<i>ABCC6</i>	wt	wt
	<i>ABCC10</i>	wt	wt
SREBF	<i>SREBF1</i>	wt	wt
	<i>SREBF2</i>	wt	wt
Hintergrund		Caki2	HeLa
Epithelzellen		klarzelliges Nierenzellkarzinom	Zervixkarzinom
SETD2	<i>SETD2</i>	wt	wt
	<i>SETD2</i>	0,81-fach (p = 0,534)	keine Bezugzelllinie
	H3K36me3	0,356-fach (p = 0,0003)	exprimiert
JAK/STAT Signalweg	<i>JAK1</i>	wt	wt
	<i>JAK2</i>	wt	wt
	<i>JAK3</i>	wt	wt
	<i>TYK2</i>	wt	wt
	<i>STAT1</i>	wt	wt
	<i>STAT2</i>	wt	wt
	<i>STAT3</i>	wt	wt
	<i>STAT4</i>	wt	wt
	<i>STAT5A</i>	wt	wt
	<i>STAT5B</i>	wt	wt
	<i>STAT6</i>	wt	wt
PRC2 Komplex	<i>EZH1</i>	wt	wt
	<i>EZH1</i>	1,94-fach (p = 0,061)	keine Bezugzelllinie
	<i>EZH1</i>	nicht analysiert	exprimiert
	<i>EZH2</i>	wt	wt
	<i>EZH2</i>	2,51-fach (p = 0,040)	keine Bezugzelllinie
	<i>EZH2</i>	nicht analysiert	exprimiert

	H3K27me3	nicht analysiert	exprimiert
	<i>EED</i>	A192P	wt
	<i>SUZ12</i>	wt	wt
	<i>RBBP4</i>	wt	wt
DNA Reparatur	<i>TP53</i>	wt	wt
	<i>CDKN1A</i>	wt	wt
	<i>ATM</i>	wt	wt
	<i>ATR</i>	wt	wt
	<i>MDM2</i>	wt	wt
Ras/Raf	<i>SRC</i>	wt	F32S
	<i>NRAS</i>	wt	wt
	<i>NRAS1</i>	wt	wt
	<i>RAF1</i>	wt	wt
	<i>ARAF</i>	wt	wt
	<i>BRAF</i>	wt	wt
Verhindern der Apoptose	<i>CASP2</i>	wt	wt
	<i>CASP3</i>	wt	wt
	<i>CASP6</i>	wt	wt
	<i>CASP7</i>	wt	wt
	<i>CASP8</i>	wt	wt
	<i>CASP9</i>	wt	wt
	<i>CASP10</i>	wt	wt
	<i>LMNA</i>	wt	wt
	<i>LMNB1</i>	wt	wt
	<i>LMNB2</i>	wt	wt
	<i>ICAD</i>	wt	wt
	<i>PARP1</i>	wt	wt
	<i>PAK2</i>	wt	wt
ABC Transporter	<i>ABCG1</i>	wt	wt
	<i>ABCG2</i>	wt	wt
	<i>ABCB1</i>	wt	wt
	<i>ABCC1</i>	wt	wt
	<i>ABCC2</i>	wt	wt
	<i>ABCC3</i>	W347R	wt
	<i>ABCC4</i>	wt	wt
	<i>ABCC5</i>	wt	wt

	<i>ABCC6</i>	wt	wt
	<i>ABCC10</i>	wt	wt
SREBF	<i>SREBF1</i>	wt	wt
	<i>SREBF2</i>	wt	wt
Hypoxie	<i>VHL</i>	R177*	wt
	<i>HIF1α</i>	wt	wt
	<i>HIF2α</i>	wt	wt

Tabelle 23 Signifikant regulierte Gene der RNA Sequenzierung unter GSK126 im Vergleich zu Oxaliplatin behandelten Zellen. Es wurde der Mittelwert der vier Zelllinien Jurkat, Loucy, HH und DERL2 berechnet, n=2 je Zelllinie. Der Grenzwert wurde mit p-Wert <0,05 festgelegt. Gene, die im weiteren Verlauf analysiert wurden, sind rot markiert.

Reg.	Gensymbol	Basis Mittelwert	\log_2 (Fold Change)	p-Wert ($\times 10^{-5}$)	adj. p-Wert ($\times 10^{-3}$)
↑	<i>GNAZ</i>	100,90	0,89	0,0002	0,0080
↑	<i>MAT1A</i>	16,70	0,87	0,0830	0,8517
↑	<i>SNX9</i>	175,99	0,86	0,0034	0,0865
↑	<i>MLXIPL</i>	18,06	0,86	0,0322	0,4256
↑	<i>CEBPA</i>	18,48	0,85	0,0201	0,3101
↑	<i>CLMN</i>	177,95	0,84	0,0306	0,4256
↑	<i>TFCP2L1</i>	24,42	0,78	0,6347	3,1083
↑	<i>ZDHC11B</i>	22,09	0,76	0,6418	3,1083
↑	<i>EGFL7</i>	43,76	0,75	0,0958	0,9318
↑	<i>NRARP</i>	84,25	0,74	1,0660	4,4542
↑	<i>NUDT11</i>	109,63	0,72	1,1952	4,5261
↑	<i>IGSF9</i>	13,62	0,71	1,2002	4,5261
↑	<i>TMEM98</i>	35,65	0,71	2,8613	8,1308
↑	<i>FNDC10</i>	88,89	0,70	0,1416	1,2697
↑	<i>REEP1</i>	19,45	0,70	4,1887	9,7972
↑	<i>MET</i>	59,62	0,69	5,8185	12,5017
↑	<i>MYCL</i>	42,85	0,69	0,5535	3,0993
↑	<i>ARFGEF3</i>	197,42	0,69	2,9004	8,1308
↑	<i>PDE9A</i>	82,41	0,69	6,3535	13,0445
↑	<i>RALGPS2</i>	252,26	0,68	3,0066	8,2752
↑	<i>C1QL1</i>	35,84	0,68	6,9354	13,4896
↑	<i>AIF1L</i>	171,52	0,67	0,1443	1,2697
↑	<i>TLL2</i>	16,46	0,67	12,7387	19,1370
↑	<i>OGDHL</i>	109,43	0,66	2,5254	7,6597

↑	<i>TEX15</i>	198,65	0,66	3,4086	8,9978
↑	<i>PLXND1</i>	916,32	0,66	3,6665	9,2808
↑	<i>TMEM132A</i>	105,17	0,65	2,9042	8,1308
↑	<i>SREBF1</i>	1563,94	0,65	0,2559	1,9837
↑	<i>HRK</i>	25,69	0,64	16,6339	22,7676
↑	<i>PPFIA4</i>	696,53	0,64	8,0952	14,3127
↑	<i>COL27A1</i>	381,33	0,64	3,7211	9,2916
↑	<i>HAGHL</i>	255,23	0,63	0,0465	0,5366
↑	<i>SCN5A</i>	20,31	0,63	20,3339	26,0980
↑	<i>CLYBL</i>	165,45	0,63	0,0650	0,7065
↑	<i>EDA</i>	47,17	0,63	8,2570	14,3937
↑	<i>MEIS3</i>	13,43	0,63	0,7069	3,2655
↑	<i>KCNJ11</i>	84,13	0,63	0,0102	0,1890
↑	<i>RAB3B</i>	23,59	0,62	31,0149	32,7449
↑	<i>ABCG2</i>	94,93	0,62	36,0347	35,0452
↑	<i>APBB2</i>	209,67	0,62	0,4410	2,6604
↑	<i>GNB3</i>	122,63	0,61	0,6560	3,1083
↑	<i>BAIAP2</i>	155,05	0,60	1,3305	4,7278
↑	<i>TERT</i>	282,81	0,60	11,8069	18,4887
↑	<i>HES7</i>	96,19	0,60	5,6182	12,2132
↑	<i>SERPINE2</i>	756,17	0,60	20,4795	26,0980
↑	<i>ADD2</i>	490,28	0,60	33,3925	34,0368
↑	<i>RNF157</i>	720,15	0,60	1,1089	4,4542
↑	<i>GAD1</i>	81,47	0,59	38,0645	36,2649
↑	<i>SELENON</i>	221,64	0,59	21,4970	26,9089
↑	<i>FJX1</i>	34,68	0,59	43,1087	38,7981
↑	<i>PNPLA3</i>	16,12	0,58	49,2444	40,8044
↑	<i>IGF1R</i>	1290,81	0,58	4,9576	11,1716
↑	<i>NPAS2</i>	64,86	0,58	58,5319	44,3953
↑	<i>SCD</i>	18412,24	0,58	18,5155	24,6137
↓	<i>GPR35</i>	39,84	-0,59	13,5338	19,7351
↓	<i>ACTG2</i>	1310,05	-0,61	43,2104	38,7981
↓	<i>LINC00324</i>	52,90	-0,62	7,2973	13,7591
↓	<i>CFTR</i>	10,31	-0,62	4,7973	11,0003
↓	<i>CABCOC01</i>	17,15	-0,63	28,1908	31,1880
↓	<i>PYHIN1</i>	148,80	-0,63	15,4078	21,7332

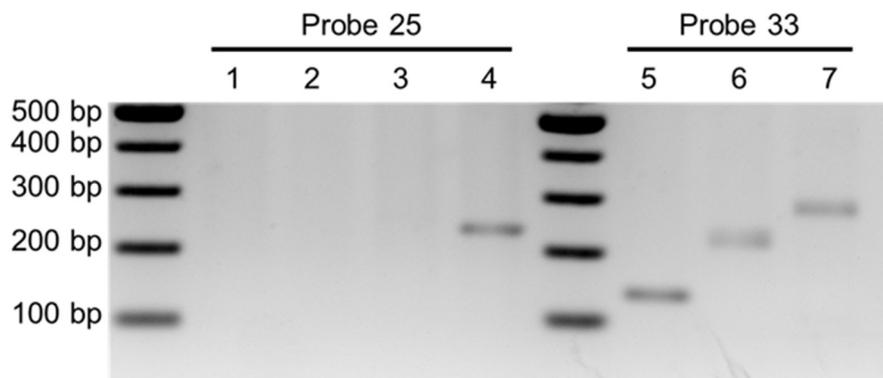
↓	<i>TNFSF8</i>	285,28	-0,63	17,3852	23,6209
↓	<i>LINC01871</i>	345,29	-0,63	28,2734	31,1880
↓	<i>ACTA2</i>	193,13	-0,64	13,5735	19,7351
↓	<i>CHRM5</i>	10,42	-0,64	26,0608	30,4780
↓	<i>ASS1P12</i>	21,92	-0,64	6,7207	13,3533
↓	<i>TRAV16</i>	9,87	-0,64	27,9425	31,1880
↓	<i>PDE6G</i>	26,01	-0,65	20,4445	26,0980
↓	<i>CD82</i>	1831,33	-0,65	1,2978	4,7055
↓	<i>MYL4</i>	26,01	-0,65	13,4834	19,7351
↓	<i>SEMA4A</i>	86,03	-0,66	0,0165	0,2765
↓	<i>TNFSF4</i>	629,47	-0,66	8,5128	14,4311
↓	<i>GVINP1</i>	1015,02	-0,68	0,0001	0,0058
↓	<i>SUCNR1</i>	38,66	-0,81	0,1748	1,4685
↓	<i>TRAV17</i>	36,18	-0,82	0,2753	1,9837

Tabelle 24 Signifikant regulierte Signalwege der RNA Sequenzierung unter GSK126 im Vergleich zu Oxaliplatin behandelten Zellen. Es wurde der Mittelwert der vier Zelllinien Jurkat, Loucy, HH und DERL2 berechnet, n=2 je Zelllinie. Der Grenzwert wurde mit p-Wert <0,05 festgelegt. Signalwege, die *SREBF1* enthalten, sind rot markiert.

Reg.	Signalweg		p-Wert (x10 ⁻³)	log ₁₀ (Adj. p-Wert)	Odds Ratio	Kombinierte r Score	Gen- symbole
↑	Liver X Receptor Pathway	WP2874	0,3416	1,8040	92,2963	736,7103	<i>SREBF1</i> , <i>SCD</i>
↑	Adipogenesis	WP236	0,4819	1,8040	12,0989	92,4094	<i>SREBF1</i> , <i>CEBPA</i> , <i>SCD</i> , <i>PNPLA3</i>
↑	Transcriptional cascade regulating adipogenesis	WP4211	0,5888	1,8040	67,1145	499,1545	<i>CEBPA</i> , <i>SREBF1</i>
↑	SREBF and miR33 in cholesterol and lipid homeostasis	WP2011	0,9010	1,7442	52,7249	369,7050	<i>SREBF1</i> , <i>SCD</i>
↓	muscle contraction	GO: 0006936	0,3291	1,4901	26,1361	209,5878	<i>ACTA2</i> , <i>MYL4</i> , <i>ACTG2</i>
↓	cellular response to ketone	GO: 1901655	0,3535	1,4901	85,2735	677,7102	<i>TNFSF4</i> , <i>CFTR</i>

↓	Striated Muscle Contraction Pathway	WP383	0,6536	2,2220	61,5556	451,3880	<i>ACTA2</i> , <i>MYL4</i>
↓	Mechanoregulation and pathology of YAP/TAZ via Hippo and non-Hippo mechanisms	WP4534	0,9996	2,2220	49,2222	340,0332	<i>ACTA2</i> , <i>ACTG2</i>
↓	GPCRs, Class A Rhodopsin-like	WP455	2,0336	2,0897	13,7050	84,9428	<i>SUCNR1</i> , <i>GPR35</i> , <i>CHRM5</i>
↓	Myometrial Relaxation and Contraction Pathways	WP289	10,4747	1,5027	14,3045	65,2112	<i>ACTA2</i> , <i>MYL4</i>

Abbildungen



- 1 – unabhängiger Primer in Probe 25
2 – nicht funktionaler SETD2 Primer an Position hg19 chr3: 47084139 in Probe 25
3 – nicht funktionaler SETD2 Primer an Position hg19 chr3: 47084139 in Probe 25
4 – funktionaler SETD2 Primer an Position hg19 chr3: 47084139 in Probe 25
5 – unabhängiger Primer in Probe 25
6 – funktionaler SETD2 Primer an Position hg19 chr3: 47098908 in Probe 33
7 – funktionaler SETD2 Primer an Position hg19 chr3: 47098908 in Probe 33

Abbildung 37 Validierung der Funktionalität und Spezifität der Primer zur Sangersequenzierung. Errechnete Produktgrößen: Spur 4 – 232 bp; Spur 6 – 225 bp; Spur 7 – 288 bp.

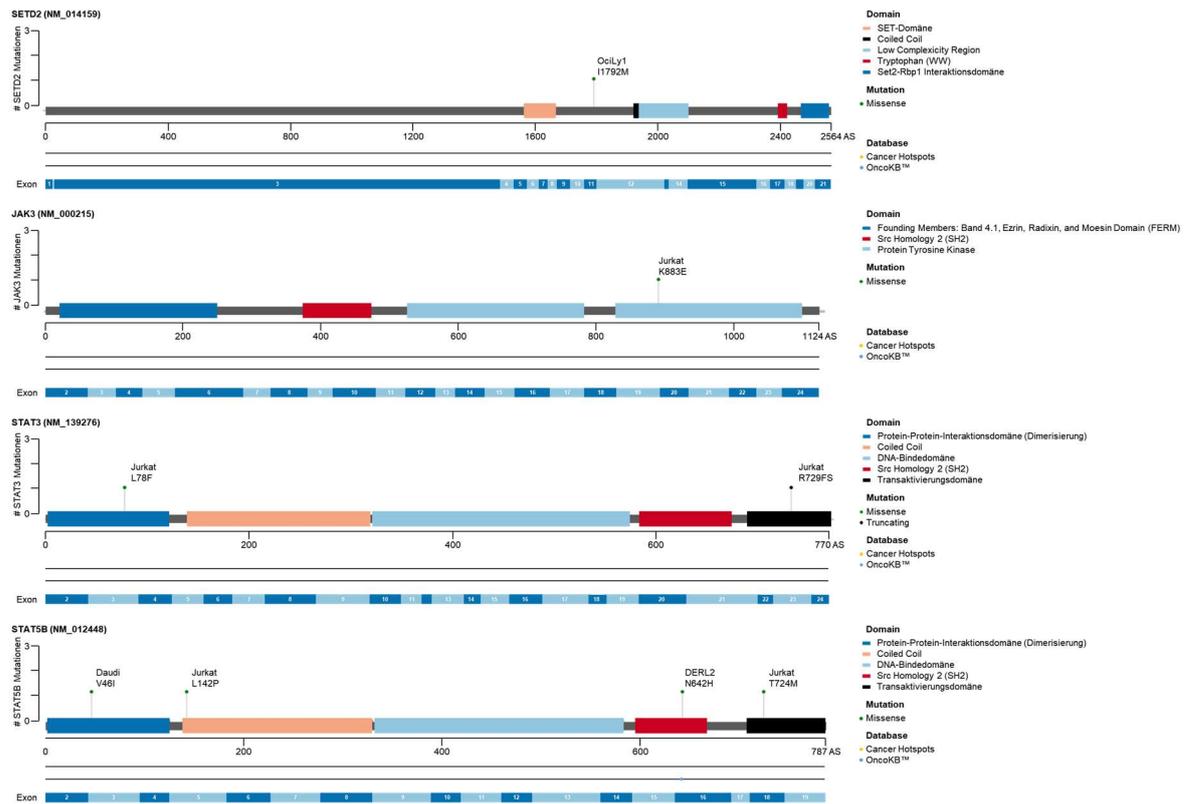


Abbildung 38 Lokalisation und Art der gefundenen *SETD2*, *JAK* und *STAT* Mutationen in den Zelllinien. Die Analyse wurde für *SETD2*, *JAK3*, *STAT3*, und *STAT5B* mittels cBioPortal Mutation Mapper durchgeführt (Cerami et al. 2012; Gao et al. 2013). Im *JAK1* Gen wurde keine Mutation gefunden. Das Auftreten bekannter Mutationen mit Einfluss auf das Tumorstadium wurde anhand der OncoKB™ Datenbank analysiert (Chakravarty et al. 2017).

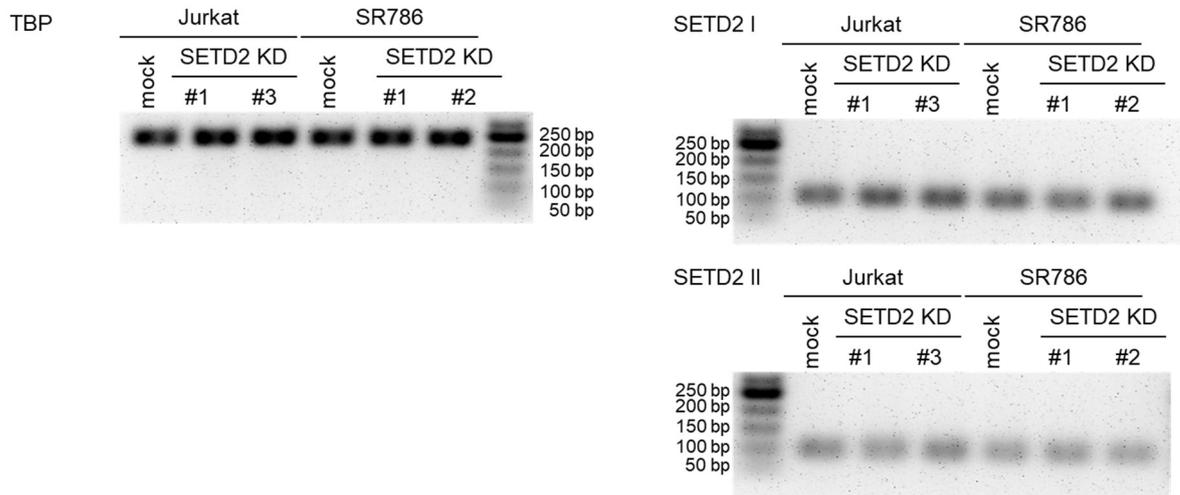


Abbildung 39 Validierung der Funktionalität und Spezifität der Primer zur *SETD2* Expressionsanalyse mittels qPCR. Errechnete Produktgrößen: TBP – 243 bp; SETD2 I – 107 bp; SETD2 II – 97 bp.

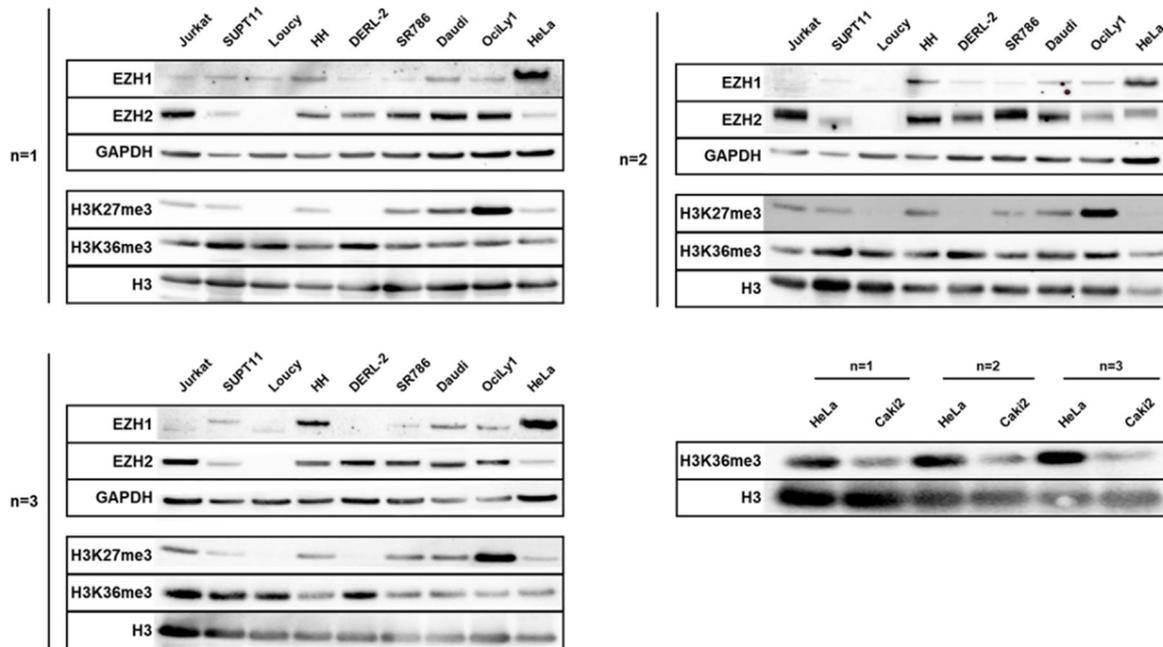


Abbildung 40 Biologische Replikate der basalen Expressionsanalyse auf Proteinebene.

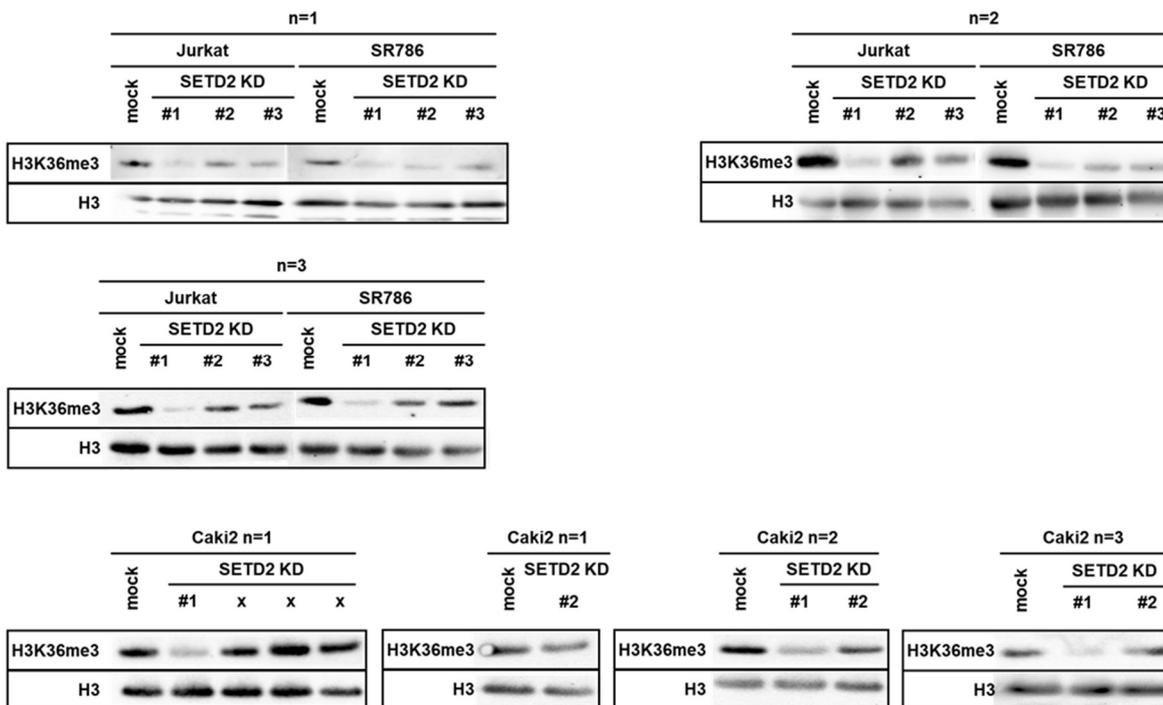


Abbildung 41 Biologische Replikate des SETD2 Knockdown Nachweises auf Proteinebene. Knockdownzelllinien, die nicht weiterverwendet wurden, wurden mit „x“ beschriftet.

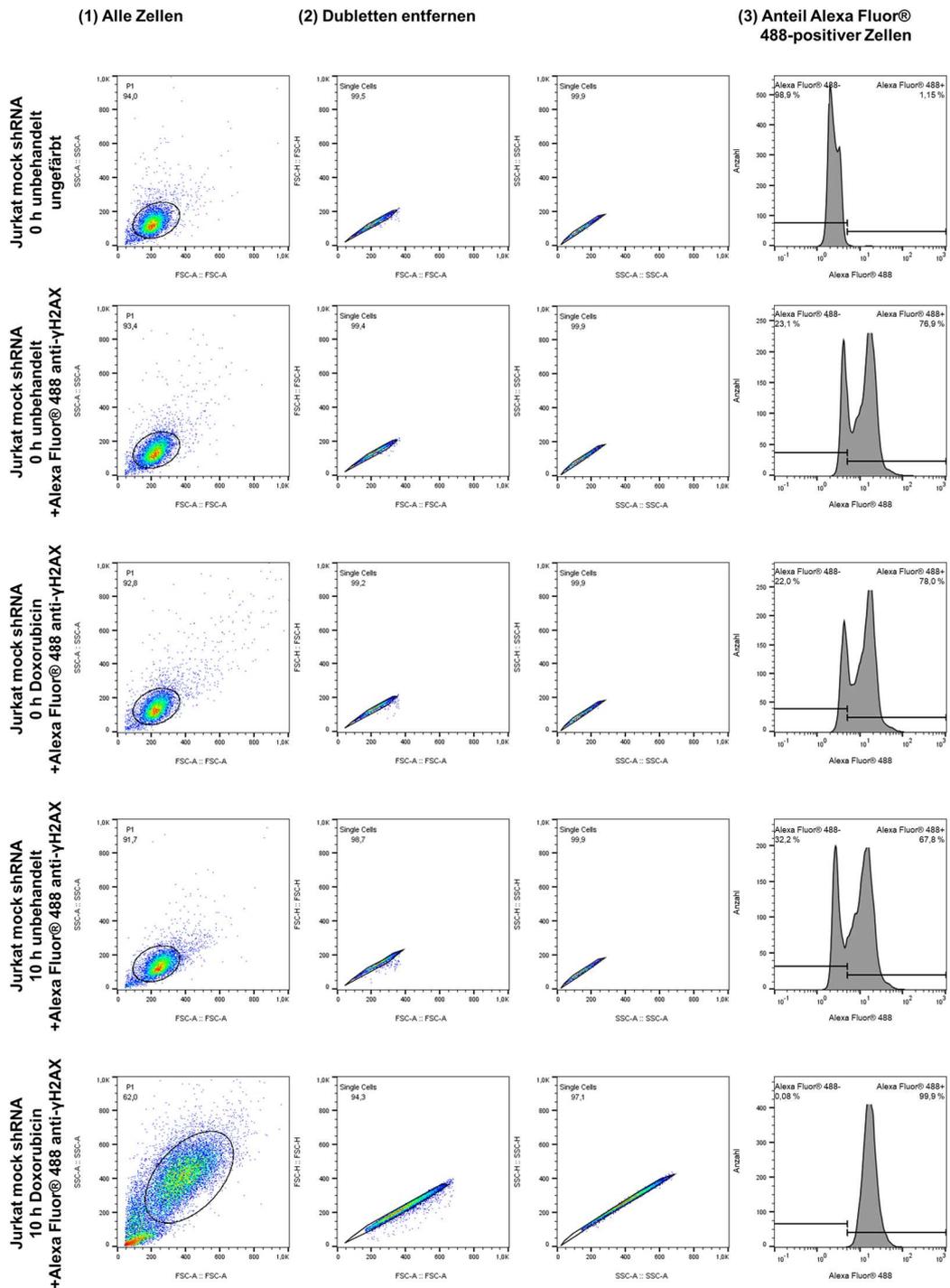


Abbildung 42 Beispielhafte Darstellung der Gatingstrategie der DNA-Damage-Response.

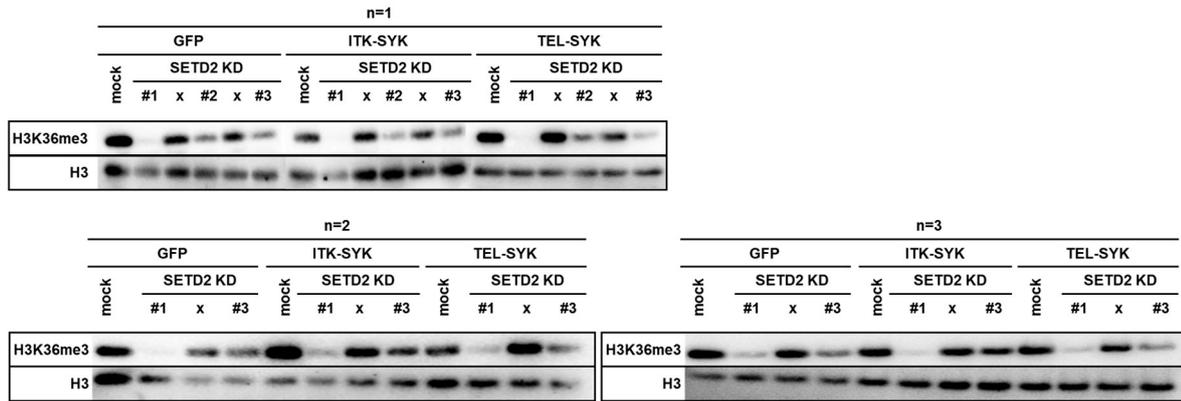


Abbildung 43 Biologische Replikate des SETD2 Knockdown Nachweises auf Proteinebene der ITK- oder TEL-SYK-getriebenen Zelllinien. Knockdownzelllinien, die nicht weiterverwendet wurden, wurden mit „x“ beschriftet.

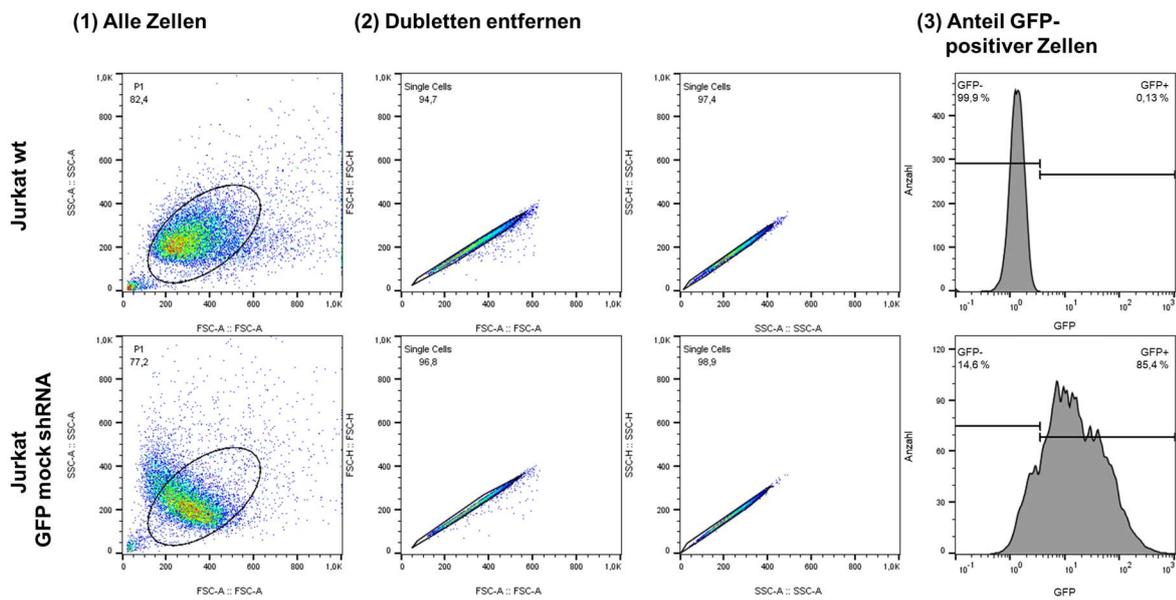


Abbildung 44 Beispielhafte Darstellung der Gatingstrategie der Validierung der GFP-Positivität.

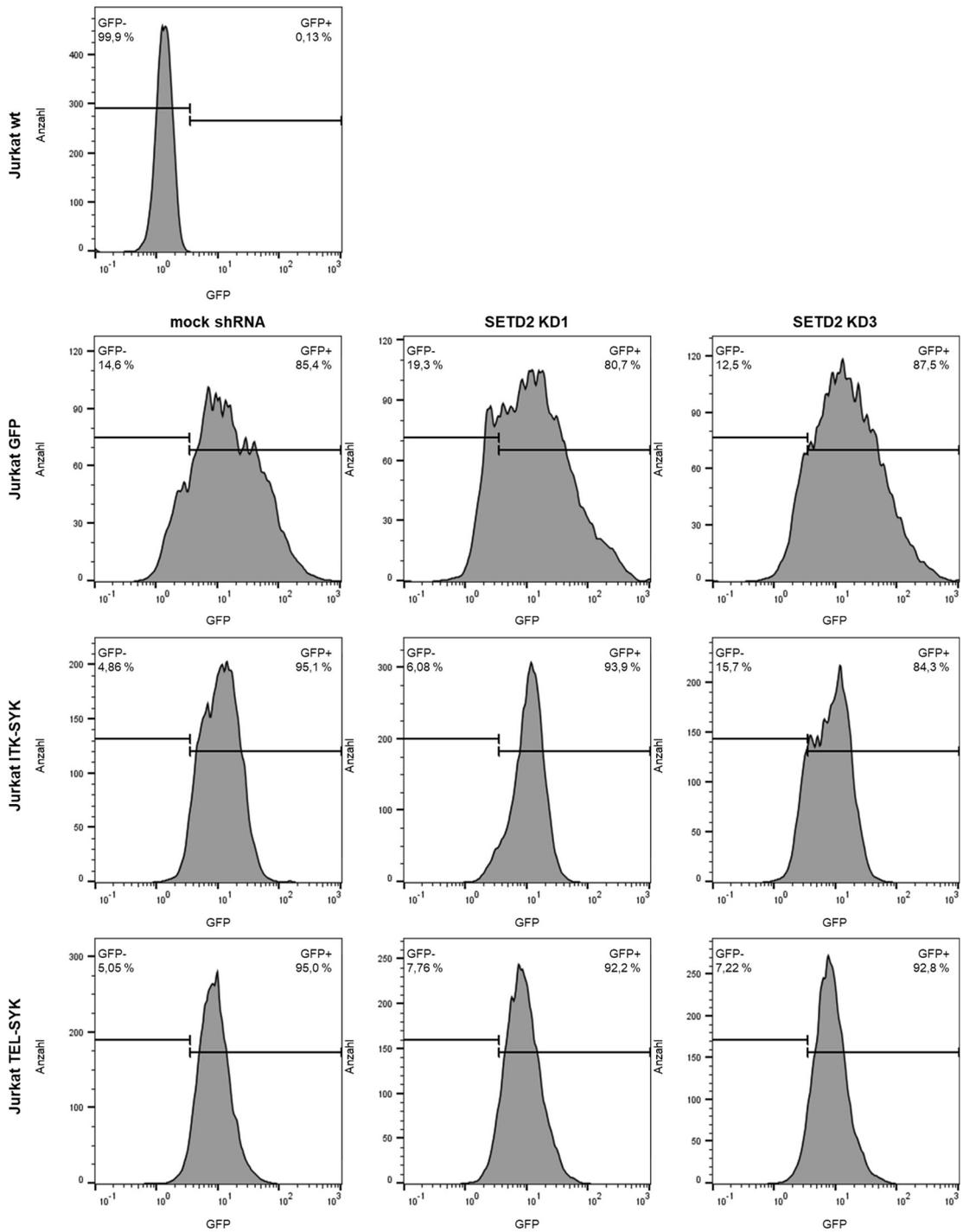


Abbildung 45 Beispielhafte Darstellung der durchflusszytometrischen Ergebnisse der Validierung der GFP-Positivität.

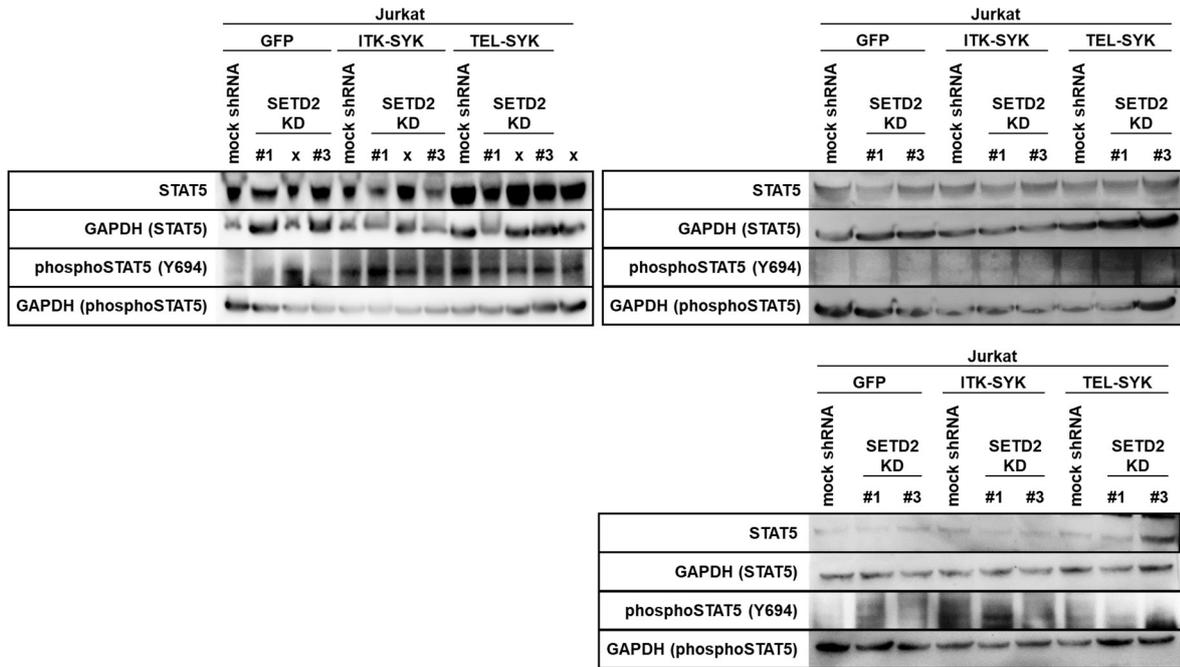


Abbildung 46 Biologische Replikate des Nachweises der STAT5 Aktivierung ITK- oder TEL-SYK getriebener Zelllinien. Zelllinien, die nicht weiterverwendet wurden, wurden mit „x“ beschriftet.

Jurkat ITK- bzw. TEL-SYK mock shRNA im Vergleich zu Jurkat GFP mock shRNA

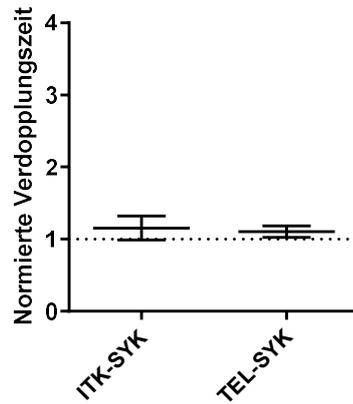


Abbildung 47 Verdopplungszeiten der ITK- und TEL-SYK getriebenen Zelllinien im Vergleich zur GFP-Kontrollzelllinie. n=5

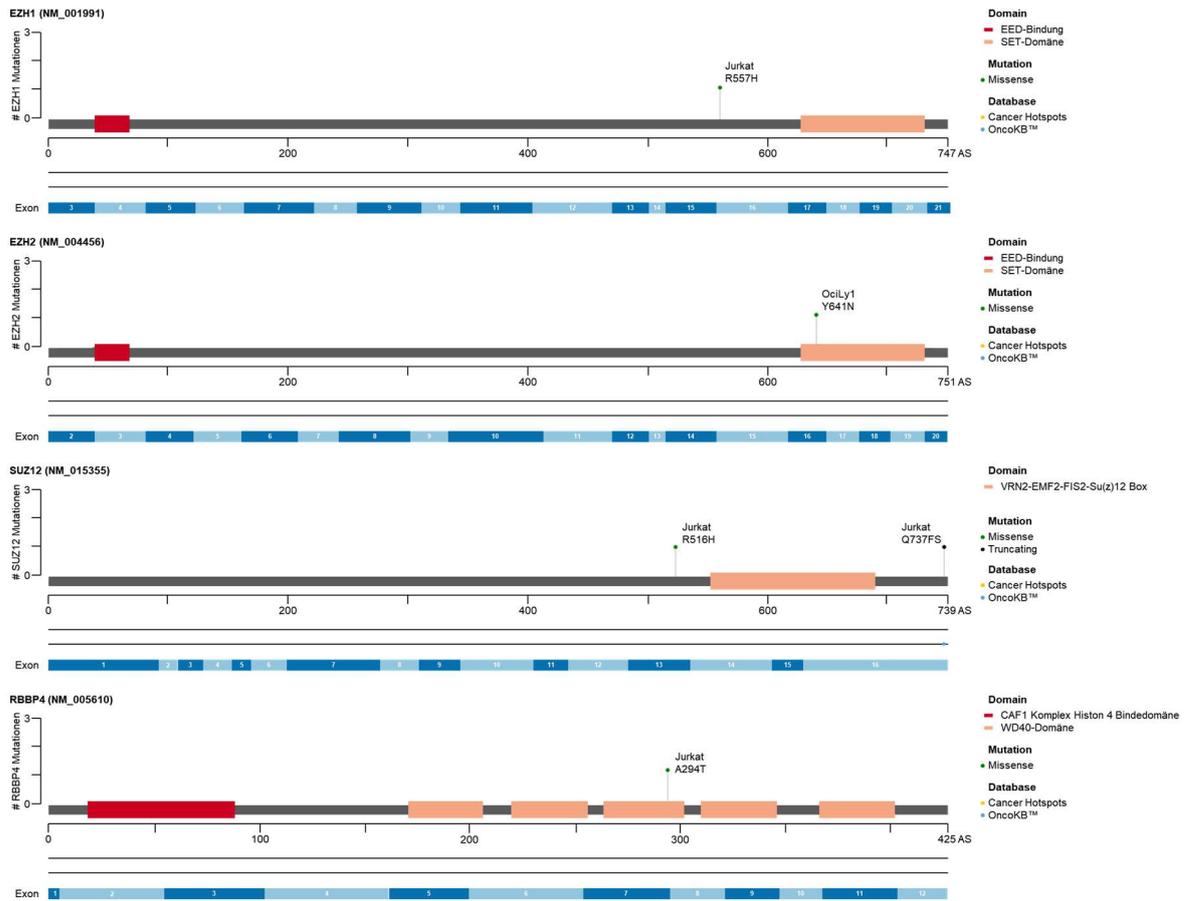


Abbildung 48 Lokalisation und Art der gefundenen Mutationen von PRC2 Komponenten in den Zelllinien. Die Analyse wurde für *EZH1*, *EZH2*, *SUZ12*, und *RBBP4* mittels cBioPortal Mutation Mapper durchgeführt (Cerami et al. 2012; Gao et al. 2013). Im *EED* Gen wurde keine Mutation gefunden. Das Auftreten bekannter Mutationen mit Einfluss auf das Tumorwachstum wurde anhand der OncoKB™ Datenbank analysiert (Chakravarty et al. 2017).

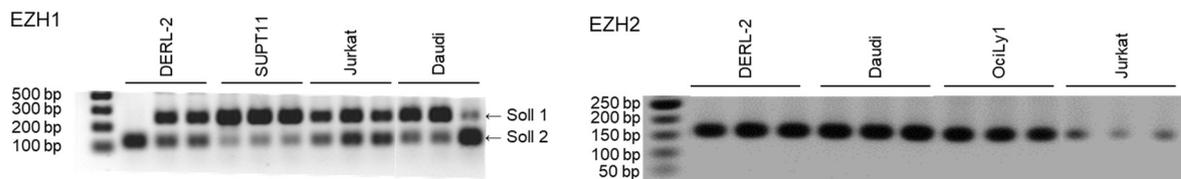


Abbildung 49 Validierung der Funktionalität und Spezifität der Primer zur EZH1/2 Expressionsanalyse mittels qPCR. Errechnete Produktgrößen: EZH1 Soll 1 – 249 bp und Soll 2 – 121 bp für verschiedene Transkriptionsvarianten; EZH2 – 159 bp.

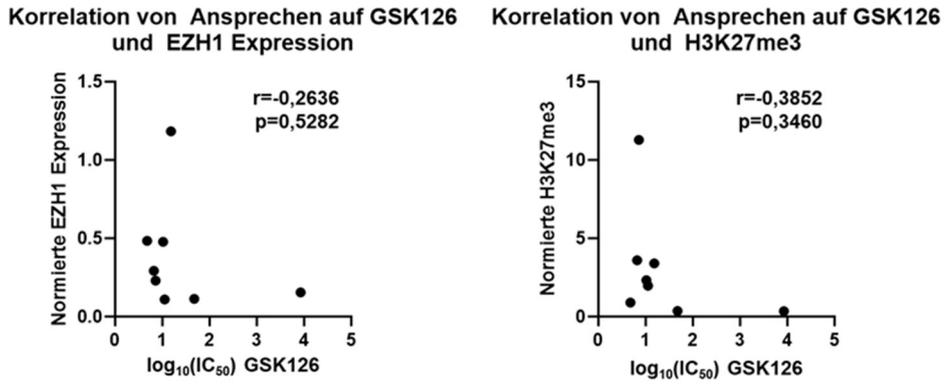


Abbildung 50 Korrelation zwischen Ansprechen auf GSK126 und EZH1 Expression oder H3K27me3.

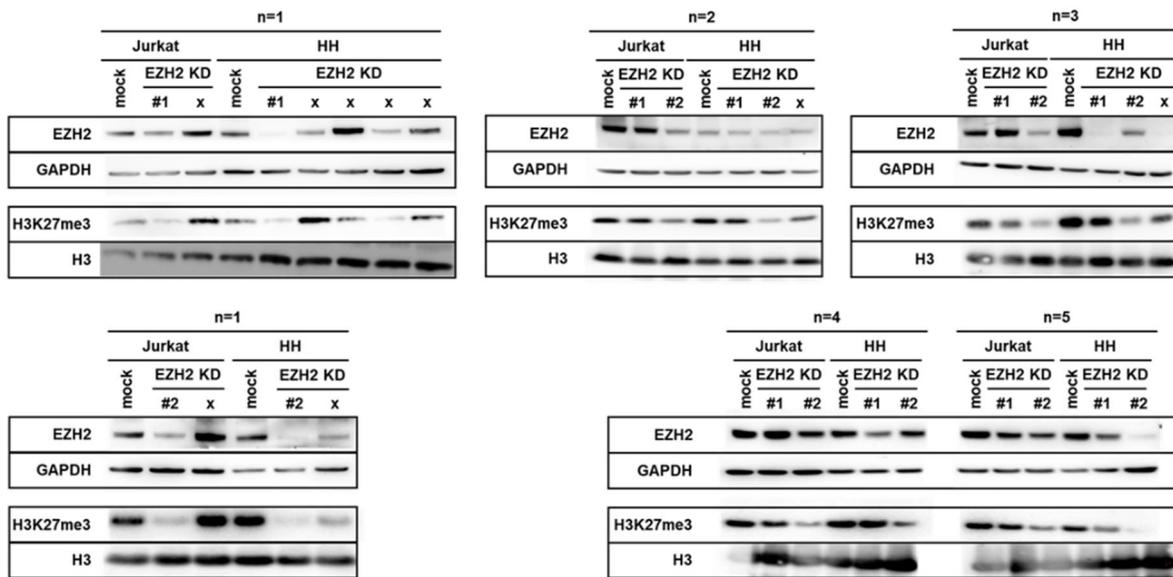


Abbildung 51 Biologische Replikate des EZH2 Knockdown Nachweises auf Proteinebene. Knockdownzelllinien, die nicht weiterverwendet wurden, wurden mit x beschriftet.

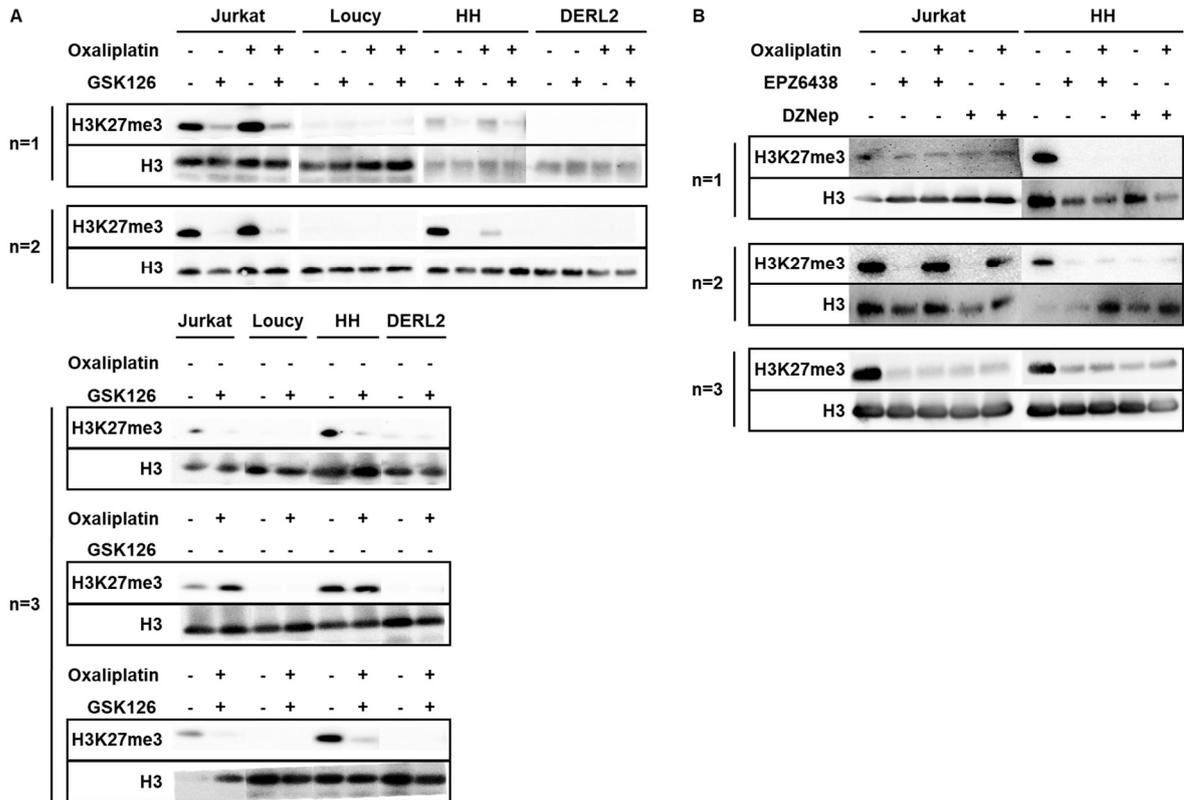


Abbildung 52 Biologische Replikate des Nachweises der Funktionalität der pharmakologischen EZH2 Inhibitoren auf Proteinebene.

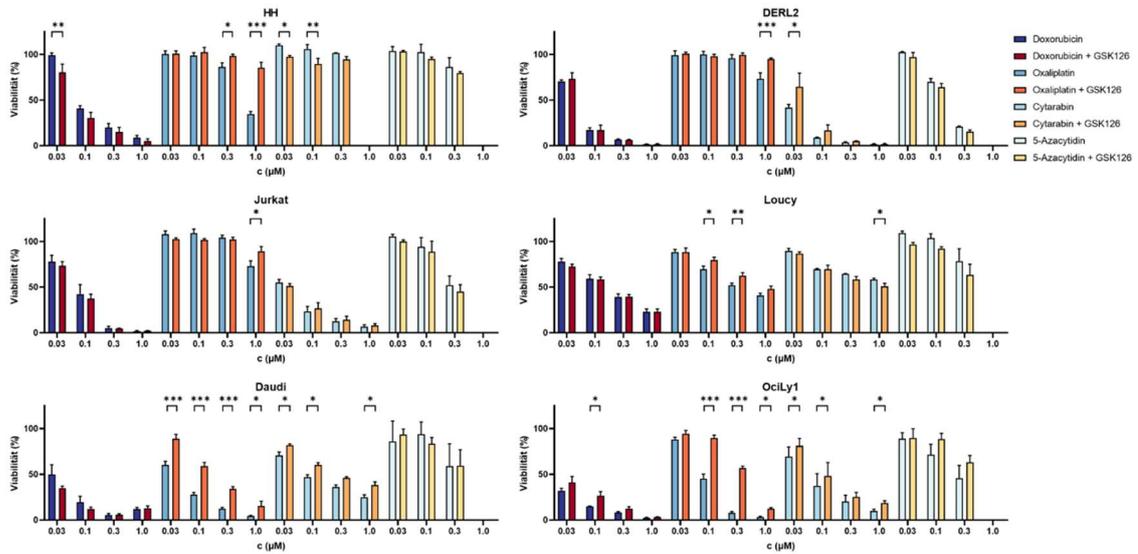


Abbildung 53 Detaillierte Analyse des Screenings zur Sensitivitätsmodulation mittels pharmakologischer EZH2 Inhibition.

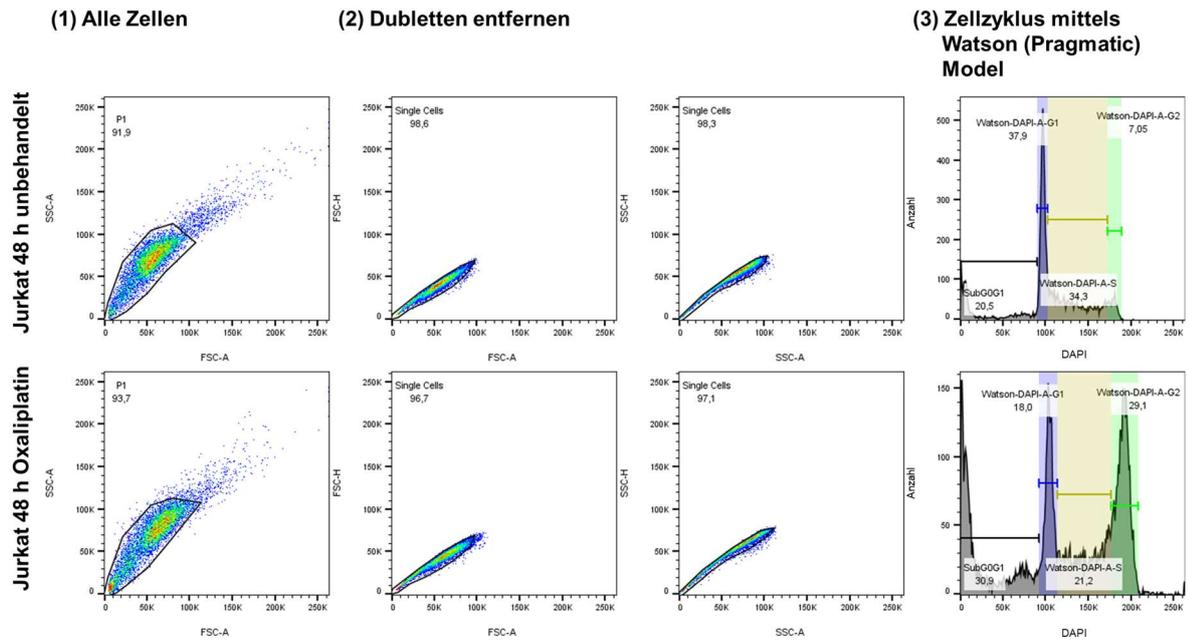


Abbildung 54 Beispielhafte Darstellung der Gatingstrategie der Zellzyklusanalyse.

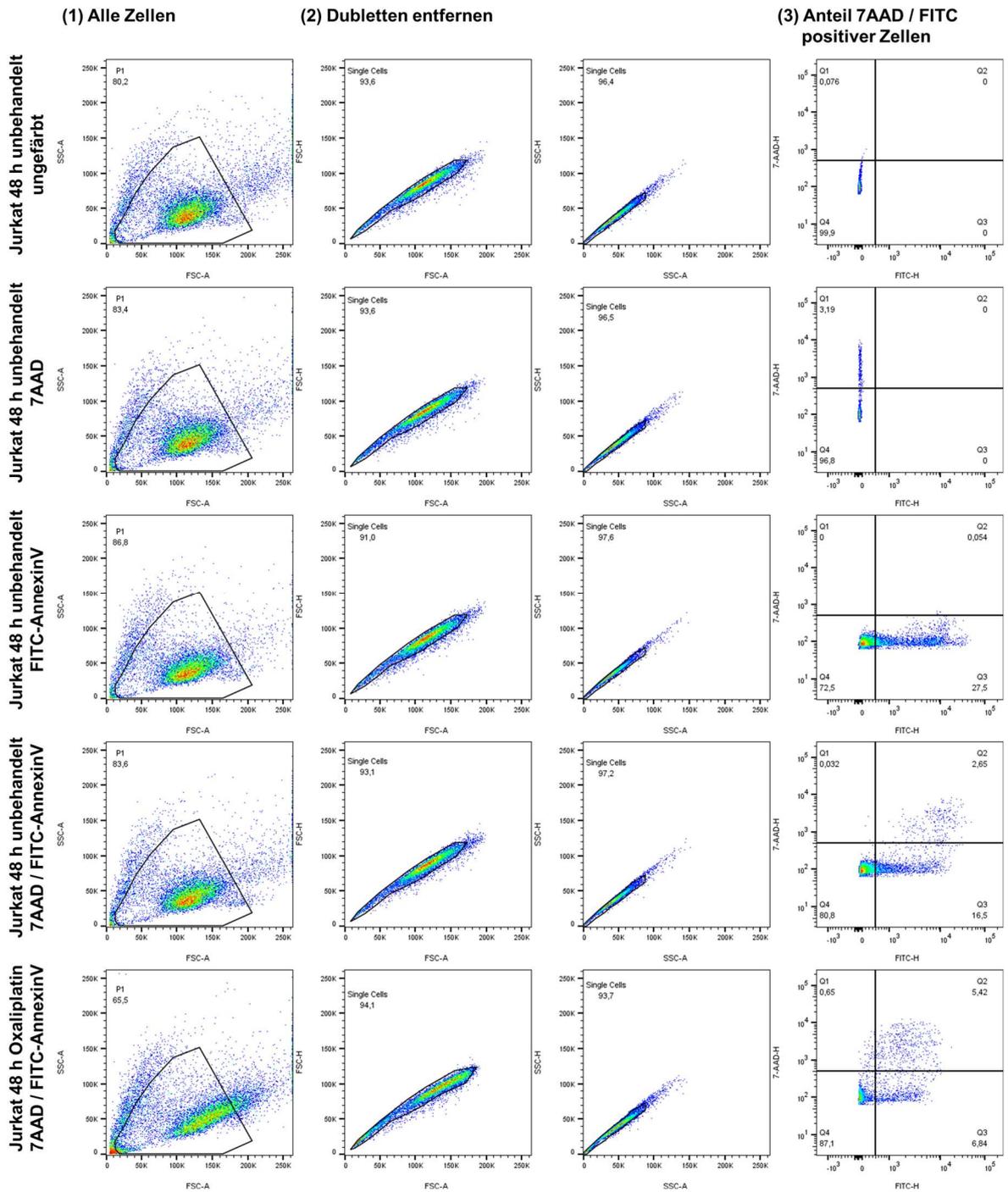


Abbildung 55 Beispielhafte Darstellung der Gatingstrategie der Analyse von Apoptose und Nekrose.

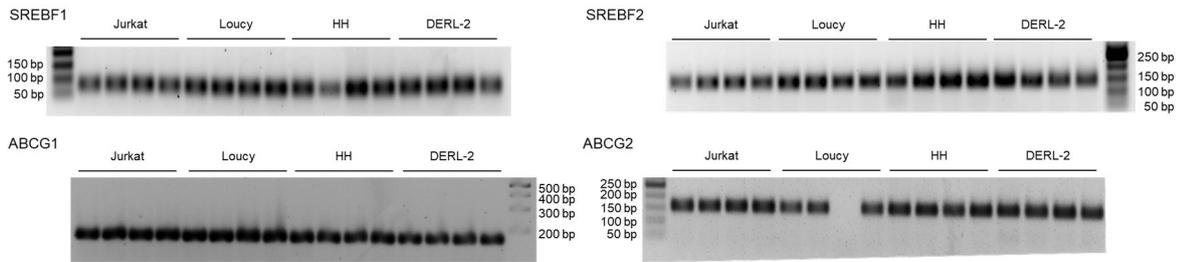


Abbildung 56 Validierung der Funktionalität und Spezifität der Primer zur *SREBF1/2* und *ABCG1/2* Expressionsanalyse mittels qPCR. Errechnete Produktgrößen: *SREBF1* – 67 bp; *SREBF2* – 133 bp; *ABCG1* – 175 bp; *ABCG2* – 154 bp.

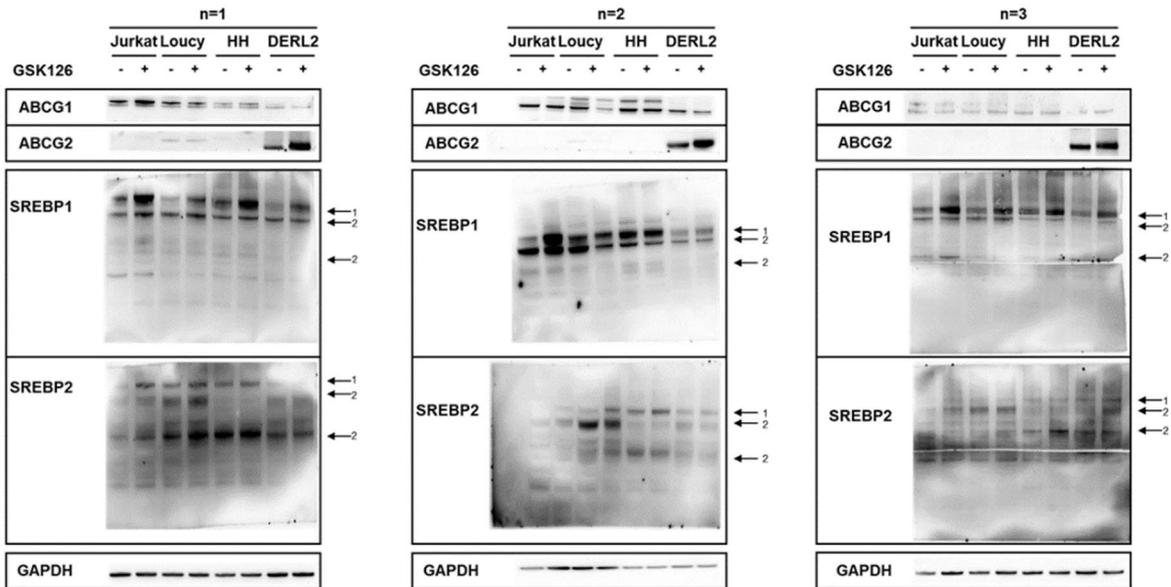


Abbildung 57 Biologische Replikate des Nachweises der Regulation von Zielproteinen durch den pharmakologischen EZH2 Inhibitor GSK126 auf Proteinebene.

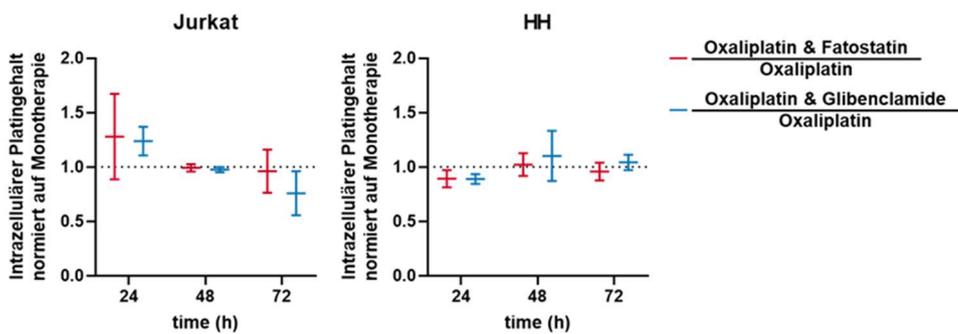


Abbildung 58 Regulation des intrazellulären Platingehalts unter Fatostatatin oder Glibenclamide Inkubation.

Offenlegung des Eigenanteils

4.1 Mutationsanalyse MEITL

- DNA Isolation: Katrin Nerger und Jenny Wehde
- Exomsequenzierung: Omega Bioservices, Norcross, Georgia, USA
- Zielgerichteter Sequenzierung: Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Deutschland
- Bioinformatische Mutationsanalyse: PD Dr. Sarah Sandmann
- Überprüfung der Validität und funktioneller Konsequenzen bioinformatisch identifizierter genetischer Aberrationen: Elisabeth Groß
- PCR zur Verifikation fraglicher Mutationen: Elisabeth Groß
- Sangersequenzierung: Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland
- Expressionsanalyse mittels Immunhistochemie inkl. Quantifizierung: Franziska Lea Schümann und Dr. Marcus Bauer
- Analyse der Zusammenhänge von Mutationsstatus und H3K36me3 sowie Korrelation von EZH2 Expression und H3K27me3: Elisabeth Groß

4.2 SETD2

4.2.1 Basale H3K36 Trimethylierung in Zelllinienpanel von T-Zell Neoplasien

- Datenbankanalyse: Elisabeth Groß
- Kultivierung der Zellen: Elisabeth Groß
- RNA-Isolation, RT-qPCR inkl. Analyse: Elisabeth Groß
- Protein-Volllyse, Histonlyse und Westerblot inkl. Analyse: Elisabeth Groß

4.2.2 Einfluss von SETD2 Verlust auf Wachstum von T-Zell Neoplasien

- Wachstumskinetiken von wildtypischen und SETD2 Knockdownzelllinien inkl. Analyse: Elisabeth Groß
- Transduktion und Validierung SETD2 Knockdown: Elisabeth Groß

4.2.3 Einfluss von SETD2 Verlust auf Chemotherapieansprechen von T-Zell Neoplasien

- Viabilitätsassays inkl. Analyse: Elisabeth Groß

4.2.4 Einfluss von SETD2 Verlust auf Funktionalität der *DNA-Damage-Response*

- Bioinformatische Bestimmung kurzer Insertionen und Deletionen: Christoph Bartenhagen
- Analyse der Zusammenhänge von Mutationsstatus und Anzahl kurzer Insertionen und Deletionen: Elisabeth Groß
- Inkubation der Zellen und Fixierung: Elisabeth Groß
- Durchflusszytometrische Färbungen für γ H2AX-Positivität und Zellzyklusprogression inkl. Analyse: Elisabeth Groß

4.2.5 Zusätzliche Aktivierung proliferationsstreibender Signalwege verschiebt den Einfluss des SETD2 Verlusts zum potenziellen Wachstumsvorteil

- Etablierung der GFP, ITK-SYK und TEL-SYK transduzierten Jurkat: Forschungsgruppe von Frau Professorin Christine Dierks
- Validierung der GFP-Positivität inkl. Analyse: Elisabeth Groß
- Protein-Volllyse und Westerblot zur Validierung der STAT5 Aktivierung inkl. Analyse: Elisabeth Groß
- Transduktion mit SETD2 shRNAs und Validierung SETD2 Knockdown: Elisabeth Groß
- Wachstumskinetiken von SETD2 Knockdownzelllinien inkl. Analyse: Elisabeth Groß
- Viabilitätsassays inkl. Analyse: Elisabeth Groß
- Inkubation der Zellen und Fixierung: Elisabeth Groß
- Durchflusszytometrische γ H2AX-Positivität Färbung inkl. Analyse: Elisabeth Groß

4.3 EZH2

4.3.1 Basale Expression von EZH1, EZH2 und H3K27 Trimethylierung in Zelllinienpanel von T-Neoplasien

- Datenbankanalyse: Elisabeth Groß
- Kultivierung der Zellen: Elisabeth Groß
- RNA-Isolation, RT-qPCR inkl. Analyse: Elisabeth Groß
- Protein-Volllyse, Histonlyse und Westerblot inkl. Analyse: Elisabeth Groß

4.3.2 Einfluss von EZH2 Inhibition und Knockdown auf Wachstum von T-Zell Neoplasien

- Wachstumskinetiken von wildtypischen und EZH2 Knockdownzelllinien inkl. Analyse: Elisabeth Groß
- Transduktion und Validierung des EZH2 Knockdowns: Elisabeth Groß
- Viabilitätsassay unter pharmakologischer EZH2 Inhibition inkl. Analyse: Elisabeth Groß
- Analyse der Korrelation von EZH2 Expression und Ansprechen auf pharmakologische EZH2 Inhibition: Elisabeth Groß

4.3.3 Einfluss von EZH2 Inhibition und Knockdown auf Chemotherapieansprechen von T-Zell Neoplasien

- Cytotoxizitätsscreen inkl. Analyse: Elisabeth Groß
- Viabilitätsassays inkl. Analyse: Elisabeth Groß

4.3.4 Mechanistische Analyse der Erhöhung der Oxaliplatinresistenz unter EZH2 Inhibition

- Inkubation der Zellen mit Inhibitoren und Oxaliplatin: Elisabeth Groß
- Durchflusszytometrische Färbungen für AnnexinV- bzw. 7-AAD-Positivität inkl. Analyse: Elisabeth Groß
- Fixierung und durchflusszytometrische Färbungen für Zellzyklusprogression inkl. Analyse: Elisabeth Groß

- Inkubation der Pellets in Salpetersäure für ICP-MS: Elisabeth Groß
- ICP-MS inkl. Standardkurve: Dr. Ralf-Axel Hilger
- Analyse der ICP-MS Daten: Elisabeth Groß

4.3.5 Analyse transkriptioneller Veränderungen

- Inkubation der Zellen mit Inhibitoren und Oxaliplatin: Elisabeth Groß
- RNA-Isolation: Elisabeth Groß
- mRNA-Sequenzierung inkl. Qualitätskontrolle: Genewiz, Leipzig, Deutschland
- Bioinformatische Analyse: Edith Willscher
- RT-qPCR inkl. Analyse: Elisabeth Groß
- Protein-Volllyse, Histonlyse und Westerblot inkl. Analyse: Elisabeth Groß
- Viabilitätsassays inkl. Analyse: Elisabeth Groß

4.3.6 Zusätzliche Inhibition von Sterol Regulatory Element Bindenden Proteinen oder ABC Transporter verringert die Erhöhung der Oxaliplatinresistenz unter EZH2 Inhibition

- Viabilitätsassays: Elisabeth Groß
- Inkubation der Zellen mit Inhibitoren und Oxaliplatin: Elisabeth Groß
- Inkubation der Pellets in Salpetersäure für ICP-MS: Elisabeth Groß
- ICP-MS inkl. Standardkurve: Dr. Ralf-Axel Hilger
- Analyse der ICP-MS Daten: Elisabeth Groß

Publikationsliste

Publikationen:

- Gebhardt K, Edemir B, Groß E, Nemetschke L, Kewitz-Hempel S, Moritz RKC, Sunderkötter C, Gerloff D (2021): BRAF/EZH2 Signaling Represses miR-129-5p Inhibition of SOX4 Thereby Modulating BRAFi Resistance in Melanoma. *Cancers* 13(10), 2393. doi:10.3390/cancers13102393
- Schümann FL, Bauer M, Groß E, Terziev D, Wienke A, Wickenhauser C, Binder M, Weber T (2021): RBMX Protein Expression in T-Cell Lymphomas Predicts Chemotherapy Response and Prognosis. *Cancers* 13(19), 4788. doi:10.3390/cancers13194788
- Schümann FL, Groß E, Bauer M, Rohde C, Sandmann S, Terziev D, Müller LP, Posern G, Wienke A, Fend F, Hansmann ML, Klapper W, Rosenwald A, Stein H, Dugas M, Müller-Tidow C, Wickenhauser C, Binder M, Weber T (2021): Divergent Effects of EZH1 and EZH2 Protein Expression on the Prognosis of Patients with T-Cell Lymphomas. *Biomedicines* 9(12), 1842. doi:10.3390/biomedicines9121842
- Groß E, Hilger RA, Schümann FL, Bauer M, Bouska A, Rohde C, Willscher E, Lützkendorf J, Müller LP, Edemir B, Mueller T, Herling M, Binder M, Wickenhauser C, Iqbal J, Posern G, Weber T (2023): SAM-Competitive EZH2-Inhibitors Induce Platinum-Resistance by EZH2-Independent Induction of ABC-Transporters. *Cancers* 15(11), 3043. doi:10.3390/cancers15113043
- Schleser SW, Krytovych O, Ziegelmeier T, Groß E, Kasparkova J, Brabec V, Weber T, Schobert R, Mueller T (2023): Palladium and Platinum Complexes of the Antimetabolite Fludarabine with Vastly Enhanced Selectivity for Tumour over Non-Malignant Cells. *Molecules* 28(13), 5173. doi:10.3390/molecules28135173

Wissenschaftliche Präsentationen:

- Posterpräsentation *Epigenetics: Playing with the Game of Life*: Gross E, Wehde J, Rohde C, Weber T (2019) EZH2 Expression and Mutation Status as well as Effects of EZH2 Inhibition in T-Cell Lymphoma and Leukemia.
- Posterpräsentation 6. Forschungstag der Universitätsmedizin Halle: Gross E, Wehde J, Göllner S, Rohde C, Wickenhauser C, Posern G, Weber T (2019) Recurrent Genetic Alterations in Epigenetic Modifiers and JAK-STAT Signalling Components in MEITL.
- Vortrag 7. Forschungstag der Universitätsmedizin Halle: Groß E, Hilger RA, Wehde J, Schümann FL, Rohde C, Willscher E, Lützkendorf J, Müller LP, Edemir B, Müller T, Binder M, Posern G, Weber T (2022) EZH2 Inhibitors Mediate Platinum Resistance by Enhanced Efflux.
- Posterpräsentation *European Hematology Association Congress*: Groß E; Hilger RA; Wehde J; Schümann FL; Rohde C; Willscher E, Lützkendorf J, Müller LP, Edemir B, Müller T, Binder M, Posern G, Weber T (2022) P1262: EZH2 Inhibitors Mediate Platinum Resistance by Enhanced Efflux. *HemaSphere* 6 (S3) doi:10.1097/01.HS9.0000847912.76818.7a.
- Vortrag Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie: Groß E, Hilger RA, Wehde J, Schümann FL, Rohde C, Willscher E, Lützkendorf J, Müller LP, Edemir B, Müller T, Binder M, Posern G, Weber T (2022) V142: EZH2 Inhibitoren vermitteln Platinresistenz durch verstärkten Efflux. *Oncol Res Treat* 45 (suppl 2): doi:10.1159/000526456.
- Posterpräsentation 8. Forschungstag der Universitätsmedizin Halle: Groß E; Schümann FL; Bauer M; Rohde C; Willscher E; Lützkendorf J, Müller LP, Edemir B, Müller T, Binder M, Posern G, Wickenhauser C, Weber T (2023) PB14: SETD2 alterations influence both proliferation and chemotherapy resistance in lymphoid and solid tumors.
- Vortrag Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie: Groß E, Schümann FL, Bauer M, Rohde C, Müller LP, Posern G, Wickenhauser C, Weber T (2023) V661: SETD2 Funktionsverlust beeinflusst sowohl Proliferation als auch Chemotherapiesensitivität in lymphoiden und soliden Tumoren. *Oncol Res Treat* 46 (suppl 5): doi:10.1159/000533576.

Danksagung

Zum Schluss möchte ich mich herzlichst bei allen Personen bedanken, die mich in der Erarbeitung der Doktorarbeit unterstützt haben.

An erster Stelle danke ich Herrn Professor Dr. Guido Posern, da er mir jederzeit mit konstruktivem Rat beiseite stand, gern den nötigen Blickwinkel von außen auf die verschiedenen Problematiken eingebracht und auch von universitärer Seite die Betreuung der Doktorarbeit übernommen und das Erstgutachten erstellt hat.

Als nächstes möchte ich Herrn Professor Dr. Ralf Benndorf für die spontane Übernahme des Zweitgutachtens danken, ohne welche die Einreichung an der naturwissenschaftlichen Fakultät nicht möglich gewesen wäre.

Vielen Dank auch an meinen externen Gutachter Herrn Professor Dr. Marco Herling, der mir ebenfalls im kompletten Verlauf der Erstellung der Doktorarbeit gern mit Ratschlägen zur Seite stand und mit dessen Hilfe auch besonders meine Erstautorenpublikation aufgewertet werden konnte.

Den größten Dank möchte ich der AG Maligne Lymphome, insbesondere Thomas, aussprechen, zum einen für die Bereitstellung des Themas, aber auch für die gute Betreuung und dass du mir die Möglichkeiten gegeben hast, Fragestellungen selbst zu entwickeln und diesen eigenständig nachzugehen. Als "die andere Hälfte" der AG danke ich auch Franziska für die gute und zielstrebige Zusammenarbeit. Neben der direkten Arbeitsgruppe danke ich natürlich auch allen Mitgliedern der Forschungslabore der Klinik für Innere Medizin IV, insbesondere Frau Professorin Dr. Christine Dierks und Herrn apl. Professor Dr. Lutz Müller, sowie den technischen Assistentinnen Jenny und Katrin für jede Anleitung, Zusammenarbeit und Aushilfe bei schwierigen Fragen, die sich über die Jahre angesammelt haben, sowie die eine oder andere Kaffeepause. Ein besonderer Dank gilt auch Edith, die mir besonders mit jeglichen bioinformatischen Analysen geholfen hat. Alle Postdocs, Doktorand*innen oder Studierende (aktuelle wie vergangene) der Klinik haben stets zu einem großartigen Gemeinschaftsgefühl beigetragen, selbst in Zeiten, in denen wir uns nicht persönlich sehen konnten, wofür ich euch auch erneut einen großen Dank aussprechen möchte.

Des Weiteren danke ich allen Kollaborationspartner*innen und Co-Autor*innen, die mich in der Erstellung dieser Arbeit mit ihrer Expertise unterstützt haben, insbesondere Herrn Christoph Bartenhagen, Herrn Dr. Christian Rohde und Frau PD Dr. Sarah Sandmann für ihre Beiträge zu den bioinformatischen Analysen, Frau Professorin Dr. Claudia Wickenhauser und Herrn Dr. Marcus Bauer für die Anleitung von Franzi und die Bereitstellung der immunohistochemischen Analysen und Herrn Dr. Ralf-Axel Hilger für die massenspektrometrischen Analysen, die am Ende den entscheidenden Dreh zur Entschlüsselung der Probleme meiner Erstautorenpublikation eingebracht hat. Ich danke auch den Mitarbeitern der *Core Facility* Durchflusszytometrie Herrn Dr. Alexander Navarrete-Santos und Frau Annika Weißenborn,

die mir sowohl ganz praktisch beim Erlernen des Umgangs mit Durchflusszytometern als auch bei fragwürdigen Ergebnissen mit Ratschlägen geholfen haben. Ich bin des Weiteren auch der Wilhelm Roux Stiftung der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für die Finanzierung der in der Zeit meiner Doktorarbeit durchgeführten Forschung dankbar. Ich danke auch den Mitgliedern des Halleschen Promotionskolleg Medizin für die gemeinsamen Seminare.

Zu guter Letzt möchte ich an dieser Stelle natürlich auch meiner ganzen Familie und allen Freunden danken, ohne die ich diese doch sehr strapaziöse Zeit der Doktorarbeit nie geschafft hätte. Ich danke euch für alle kleinen Ausflüge und großen Urlaube, entspannten Wochenenden, lustigen Faschingsfeiern (BioTOP!) mit Anne, Fritz, Johanna, Lui und Vicky und durchfeierten Nächte mit Chris, Emy, Jule und Korbi, *fancy* Abendessen oder einfach nur ruhigen Ausspannen auf der Couch, dem Balkon oder am See, die meine Gedanken auch einmal von der Arbeit weggebracht haben und die nötige Energie gespendet haben. Einen ganz besonderen Dank auch an Mutti, Papa und Oma, die sich gern und mit viel Geduld mein Geplapper über Epigenetik, launische Zelllinien und endlose FACSe angehört haben (berechtigte Frage, warum ich stundenlang am "Fax" sitze), wahrscheinlich ohne allzu viel zu verstehen. Um diesen Text nun endlich zu einem Ende zu bringen, danke ich auch meinen drei Engelchen Manki, Hotte und Evchen, die mir, auch wenn sie nicht mehr mit Händen greifbar sind, doch noch jeden Tag nahe und in Gedanken bleiben und die bewiesen haben, wie die tiefe Liebe zu Haustieren auch zum Mindern von Stress dient (Referenz außer der Reihe: Peel *et al.*, "The Impact of Campus-Based Therapy Dogs on the Mood and Affect of University Students." *Int J Environ Res Public Health* 2023 20(6):4759).

„Ein bisschen Größenwahnsinn kann nicht schaden.“

Deichkind – Denken Sie Groß

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich mich bisher weder mit dieser noch einer anderen Arbeit weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg noch einer anderen Einrichtung um die Erlangung eines akademischen Grades beworben habe.

Ich versichere weiterhin, dass die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt wurde. Den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Halle (Saale), 30.04.2024

Ort, Datum

Elisabeth Groß

Angaben zur Person

Name: Groß
 Vorname: Elisabeth
 Geburtsdatum: 18. Januar 1994
 Geburtsort: Chemnitz
 Geschlecht: weiblich
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Fachgebiet der Promotion: Biochemie

Werdegang:

2000 – 2004 Anton-Semjonowitsch-Makarenko-Grundschule Chemnitz
 2004 – 2012 Georgius-Agricola-Gymnasium Chemnitz
 Abitur (Abschlussnote 1,5)
 09/2012 – 08/2013 Heim gGmbH des Klinikum Chemnitz
 Freiwilliges Soziales Jahr
 10/2013 – 09/2016 Universität Leipzig:
Bachelor of Science, Biochemie (Abschlussnote 2,2)
 Thema der Bachelorarbeit: „Modifying Natural Occurring Peptide
 Hormones –Relaxin-2“
 10/2016 – 09/2018 Universität Leipzig:
Master of Science, Biochemie (Abschlussnote 1,5)
 Thema der Masterarbeit: „Semaphorin Antagonists as Peptide Drugs“
 09/2017 – 02/2018 Eötvös Loránd Universität Budapest
 Erasmus+ Auslandsaufenthalt, Forschungspraktikum
 seit 10/2018 Klinik für Innere Medizin IV des Universitätsklinikum Halle (Saale)
 Wissenschaftliche Mitarbeiterin zum Ziel der Promotion
 AG Maligne Lymphome von Herrn PD Dr. Thomas Weber
 seit 04/2019 Mitglied des Halleschen Promotionskollegs Medizin (HAPKOM),
 Sektion 2
 seit 01/2023 Klinik für Innere Medizin IV des Universitätsklinikum Halle (Saale)
 Projektkoordinatorin

Halle (Saale), 30.04.2024

Ort, Datum

Elisabeth Groß