

Aus dem  
CharitéCentrum für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin  
mit Perinatalzentrum und Humangenetik  
Klinik für Kinderheilkunde m. S. Onkologie und Hämatologie  
Direktorin: Professorin Dr. med. Angelika Eggert

## **Habilitationsschrift**

# **Rekombinase-induzierte Mutationen in soliden Tumoren des Kindesalters**

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Experimentelle Pädiatrische Onkologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinische Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

**Dr. med. Anton G. Henssen**  
**geboren am 10.08.1985 in Düsseldorf**

Eingereicht: März 2019

Dekan: Herr Prof. Dr. Axel R. Pries

1. Gutachter/in: Herr Prof. Dr. Martin Eilers, Würzburg

2. Gutachter/in: Herr Prof. Dr. Stefan M. Pfister

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	3
1.1. Ursachen für die Entstehung embryonaler Tumore im Kindesalter	3
1.2. Aktive humane Transposasen können zur genomischen Instabilität von Zellen beitragen	5
1.3. Rekombinasen können onkogene genomische Aberrationen in Leukämien verursachen	8
1.4. Ziele	9
<b>2. Eigene Arbeiten</b>	11
2.1. Mutationsdynamik zwischen Primär- und Rezidivtumoren in Neuroblastopatienten	11
2.2. PGBD5 ist eine aktive humane DNA-Rekombinase/-Transposase	20
2.3. Ein genetischer Screen führt zur Entdeckung Rekombinase-induzierter genomischer Aberrationen in humanen Zellen	41
2.4. Die PGBD5-Rekombinase fördert die Entstehung sequenzspezifischer onkogener Mutationen in pädiatrischen Tumoren	51
2.5. Die PGBD5-Rekombinase-Aktivität führt zu einer therapeutisch angreifbaren DNA-Reparatur-Abhängigkeit in pädiatrischen Tumoren	67
<b>3. Diskussion</b>	81
<b>4. Zusammenfassung</b>	88
<b>5. Literaturverzeichnis</b>	89
<b>6. Abkürzungsverzeichnis</b>	95
<b>7. Danksagung</b>	96
<b>8. Erklärungen</b>	97

## **1. Einleitung**

Seitdem ich in der Kinderonkologie zu arbeiten begonnen habe, beschäftigen mich die Fragen: Wieso entwickeln junge Kinder Krebserkrankungen? Wie kann es sein, dass kindliche Zellen, die noch keinen äußeren Mutagenen (z. B. Rauch) ausgesetzt waren, komplexe Mutationen in ihrem Genom entwickeln?

Mein wissenschaftliches Interesse besteht also darin, Mechanismen der Mutationsentstehung in Kindern mit Tumoren besser zu verstehen, um auf Basis dieses Wissens neue Therapien und Diagnostiken entwickeln zu können. Aufgrund der im letzten Jahrzehnt entwickelten Ultra-Hochdurchsatz-Sequenziermethoden ist es nun möglich, diesen Fragen in Teilen nachzugehen. Außerdem wird die Ultra-Hochdurchsatz-Sequenzierung von DNA und RNA zunehmend zum Standard der klinischen Diagnostik von Patienten, die an malignen Tumoren leiden. Soweit ich erkennen kann werden die aus solchen Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse die Grundlage für die Entwicklung neuer Therapien und Diagnostik von Tumoren im Kindesalter bilden. Die genetischen Ursachen für Tumorerkrankungen in Kindern zu verstehen ist das Ziel meiner Arbeit, die in dieser Habilitationsschrift zusammengefasst werden soll.

### **1.1. Ursachen für die Entstehung embryonaler Tumore im Kindesalter**

Der nachfolgende Text basiert zu Großteilen auf einer freien Übersetzung einer von Dr. Alex Kentsis und mir publizierten Übersichtsarbeit(1). „Krebserkrankung ist die häufigste erkrankungsbedingte Todesursache von Kindern im Alter unter 15 Jahren(2). Tumore des Kindesalters sind sehr heterogen und können ihren Ursprung in vielen verschiedenen Organen haben. Sie werden zurzeit klinisch anhand ihres Ursprungsgewebes, des Zelltyps und des Differenzierungsgrades der Zellen klassifiziert. Mehr und mehr etabliert sich jedoch die Klassifizierung anhand molekularer Unterschiede, beispielsweise Genmutationen. Trotz in den letzten Jahrzehnten erfolgter großer Fortschritte in unserem Verständnis der molekularen Pathogenese von Tumoren im Kindesalter, ist unser Wissen um ihre Entstehungsursachen immer noch nicht ausreichend, um dieses Wissen effektiv für eine bessere Therapieentwicklung anzuwenden. Umweltfaktoren, zum Beispiel Infektionen während der Schwangerschaft oder während der frühen kindlichen Entwicklung, wurden als mögliche Ursachen für die Tumorentstehung untersucht, aber in den meisten Fällen ist deren Assoziation mit der Tumorentwicklung nur sehr schwach, statistisch kaum signifikant und biologisch daher nicht sehr plausibel(3). Um

die Pathogenese der Tumore im Kindesalter besser zu untersuchen, wurden in den letzten Jahren viele Studien durchgeführt, die die genetischen Mutationen in Tumoren beschreiben, indem Tumore sequenziert und deren Sequenzen verglichen wurden mit den Sequenzen normalen Gewebes(4). Ziel ist es, auf Basis neuer Erkenntnisse über die einzelnen Genmutationen Therapien zu entwickeln, die spezifisch mutationstragende Zellen angreifen und gesunde Zellen, die diese Mutationen nicht tragen, aussparen. Dieser Ansatz soll die Entwicklung besser verträglicher Therapien ermöglichen. In den letzten Jahren wurde dieser Ansatz mit dem Terminus der *personalisierten Therapie* als wichtiges Forschungsziel der nächsten Jahre definiert(5). Leider haben bisherige Hoch-Durchsatz-Genomsequenzierungsstudien einen erheblichen Unterschied in der Anzahl an Mutationen zwischen Tumoren des Erwachsenen- und des Kindesalters festgestellt. Insbesondere Tumore im sehr jungen Kindesalter scheinen nur sehr wenige tumor-spezifische Mutationen in Genen zu tragen(6, 7). Dies führt dazu, dass in vielen Fällen keine molekulare Ursache für die Tumorentstehung gefunden werden kann und somit häufig unklar ist, wie ein solcher Tumor am besten behandelt werden soll. Trotz der sehr geringen Anzahl an Genmutationen haben neuere Genomsequenzierungsstudien gezeigt, dass Tumore des Kindesalters relativ viele komplexe genomische Aberrationen aufweisen. Zum Beispiel lassen sich Chromosomenveränderungen wie Chromotripsis, Double-Minute Chromosomen etc. finden, die vor allem den nicht-kodierenden Bereich des Genoms betreffen(8-13). Da diese Veränderungen keine Gene direkt verändern, ist es bisher schwierig aufgrund dieser Veränderungen Rückschlüsse auf die molekularen Mechanismen zu ziehen, die diese Tumore antreibt. Außerdem bleibt weitgehend unklar, wie diese komplexen Veränderungen in so einem jungen Lebensalter entstehen. Denn im Vergleich zu Tumoren des Erwachsenenalters haben Tumore des Kindesalters nur selten somatische Mutationen wichtiger Tumorsuppressorgene, die eine genomische Instabilität fördern würden, zum Beispiel *TP53*(14). In ca. 10% der Kinder mit Krebserkrankungen bestehen Tumorprädispositionssyndrome (z. B. das Li-Fraumeni-Syndrom), in denen solche Tumorsuppressorgene mutiert sind und genetisch von den Eltern vererbt wurden(15-17). Auch wenn solche angeborenen Syndrome die Entstehung eines kleinen Teils der Tumore erklären könnten und einige Studien darauf hinweisen, dass Defekte in Genen, die für Faktoren der DNA-Reparatur kodieren, zur genomischen Instabilität beitragen könnten(16), ist die

Entstehungsursache solch komplexer Aberrationen für die Mehrheit der Tumore im Kindesalter noch weitestgehend unbekannt.“: Freie Übersetzung durch den Autor.

## 1.2. Aktive Humane Transposasen

Der nachfolgende Text basiert zu Großteilen auf einer freien Übersetzung einer von Dr. Alex Kentsis und mir publizierten Übersichtsarbeit(1). „Das Genom besteht größtenteils aus vormals mobilen genetischen Elementen, die im Rahmen der Evolution in das Genom eingefügt wurden. Ein Großteil dieser ehemals mobilen Elemente besteht aus Sequenzen, die Transposon-Elementen ähneln. Solche Sequenzen kann man in fast allen Lebewesen finden; sie machen ca. die Hälfte des humanen Genoms aus(15, 18, 19). Man unterteilt Transposons in RNA-basierte „copy-and-paste“-Transposons, die Retroviren ähneln(20), und DNA-basierte „cut-and-paste“-Transposons(15, 21). DNA-Transposons sind Substrate DNA-abhängiger Nukleasen, die man DNA-Transposasen bzw. -Rekombinasen nennt. DNA-Transposasen benutzen meist eine RNase-H-ähnliche Proteindomäne, die die Hydrolyse der DNA katalysiert, welche für den Transpositionsprozess notwendig ist(22-24). Die Mehrheit der humanen Gene, die von Transposasen abstammen, sind katalytisch inaktiv, und die meisten Transposons sind im Laufe der Evolution ebenfalls immobil geworden. Doch einige wenige Transposasen und Transposons sind aktiv geblieben und stellen daher eine potentielle Gefahr für die Stabilität des humanen Genoms dar(21).

Wieso enthält das Genom vieler Lebewesen heute noch aktive Transposasen bzw. Transposons? Einige der Elemente sind so domestiziert worden, dass sie heute physiologische Funktionen übernehmen. In der *Drosophila melanogaster* Fliege beispielsweise wurden die Telomer-Retroelemente HeT-A, TART und TAHRE als erste aktive RNA-Transposon-Elemente, bei denen eine physiologische Aktivität beobachtet wurde, entdeckt(25). Auch im Menschen zeigen die humane Telomerase (TERT) und die Retrotransposon-Reverse-Transkriptase eine Menge struktureller und mechanistischer Gemeinsamkeiten auf und stammen daher mit hoher Wahrscheinlichkeit beide von der gleichen Ursprungssequenz ab(25-27). Wie Retrotransposons benutzt die humane Telomerase RNA als Vorlage, um DNA an Telomerenden zu synthetisieren und die chromosomale Stabilität des Genoms zu gewährleisten. Dies verhindert die Aktivierung aberranter DNA-Reparatur an Telomeren, welche zu einer Fusion von Telomeren und dadurch zu einer mitotischen

Missegregation führen würde(28). Ein Transposon ist also heute in der Lage, die genomische Stabilität nicht nur nicht zu gefährden, sondern sogar zur Stabilität beizutragen. Nichtsdestotrotz hängen viele Tumore des Kindesalters von einer Überexpression von Telomerase ab, um ihre Telomere intakt zu halten und somit die Tumorzellen zu immortalisieren. Eine Überexpression von Telomerase wird häufig durch Mutationen und komplexe genomische Aberrationen in der Nähe des *TERT*-Gens gewährleistet(29). Es ist nicht bekannt, ob die onkogene Telomeraseaktivität nur an Telomeren wirkt oder ggf. auch an anderen genomischen Lokalisationen eine Aktivität haben könnte(28). Zusammenfassend ist Telomerase ein Beispiel für eine domestizierte Retrotransposase, die in Tumoren des Kindesalters häufig aktiv ist.

Auch andere Retrotransposons können im Menschen aktiv sein. Zum Beispiel ist das Long-Interspersed-Element-1(LINE-1)-Transposon häufig in neuronalen Vorläuferzellen sowie in manchen Tumoren aktiv(30-33). Die erste krankheitsverursachende Transposition, die jemals entdeckt wurde, war eine *de novo* Insertion eines LINE-1-Elementes in das *F8*-Gen, welches zur Hämophilie führt(34). In Tumoren scheinen die meisten Retrotranspositionereignisse genetisch neutral zu sein, aber einige wenige Ereignisse sind klonal in Tumoren zu finden und führen zur Inaktivierung bekannter Tumorsuppressorgene(35, 36). Es ist also anzunehmen, dass auch LINE-1-Retroelemente zur Entstehung von Tumoren beitragen können.

Abgesehen von Retrotransposons beinhaltet das humane Genom über 20 Gene, die Ähnlichkeiten mit DNA-Transposasen aufweisen. Manche dieser Gene scheinen für aktive Rekombinasen zu kodieren(15). Das bekannteste Beispiel für eine solche Rekombinase ist die RAG1/2-Rekombinase, die einer sog. Transib-DNA-Transposase ähnelt. Im Menschen führt RAG1/2 die Rekombination von V(D)J-Rezeptor-Genen an variablen Immunglobulin und T-Zell-Rezeptor-Loki durch(37, 38). Die RAG1-Endonuklease und ihr Kofaktor RAG2 erkennen V(D)J-Regionen, indem sie spezifische Sequenzen, sog. Recombination-Signal-Sequences (RSS), binden und schneiden(39). Dieser Prozess führt zur somatischen genetischen Diversifikation der V(D)J-Loki, welches die Entwicklung eines Repertoires an Lymphozyten ermöglicht, das eine Unmenge an Antigenen erkennen kann(40). Die RAG1/2-Rekombinase hat also einige ihrer Transposaseaktivitäten beibehalten und sich evolutionär so entwickelt, dass sie in Lymphozyten wichtige physiologische Aufgaben in der Rezeptordiversifikation übernommen hat.

Eine andere DNA-Transposase, die einige ihrer ursprünglichen Aktivitäten behalten hat, ist SETMAR/METNASE(41, 42). Diese Transposase stammt von der Klasse der Marinertransposasen ab und kann Einzelstrang-DNA resezieren, welches vor allem bei der DNA-Reparatur von Bedeutung ist. In biochemischen *In-vitro*-Ansätzen außerhalb der Zelle kann SETMAR sogar die volle Transpositionsreaktion durchführen(41, 42). Die SETMAR-Rekombinase hat also einige Eigenschaften der Hsmar1-Mariner-Transposase behalten und hat während der Evolution neue Eigenschaften dazugewonnen, die für die physiologischen Funktionen der Zelle wichtig sind(42). Interessanterweise scheint SETMAR bei der Chromosomendekatenation und der DNA-Replikation wichtig zu sein und unterstützt so die chromosomale Stabilität der Zelle, eine Eigenschaft, die im starken Kontrast zur chromosomalen Instabilität steht, die normalerweise mit Transposasen in Verbindung gebracht wird(42). Zusätzlich zu RAG1/2 und SETMAR wurde vor einigen Jahren gezeigt, dass auch das humane Protein THAP9 DNA-Transposition in humanen Zellen durchführen kann(43). THAP9 ist mit der P-Element-Transposase in *Drosophila melanogaster* verwandt und kann *Drosophila-melanogaster*-P-Elemente in humane Zellen integrieren. Die physiologischen oder ggf. pathologischen Funktionen von THAP9 sind bisher noch nicht bekannt.

Das humane Genom enthält zudem fünf Gene, die von sog. PiggyBac-DNA-Transposasen abstammen, sog. *PiggyBac-Transposable-Element-Derived-Protein-1-5*-Gene (*PGBD1-5*)(44, 45). *PGBD1* und *PGBD2* sind scheinbar zur gleichen Zeit in einen unserer evolutionären Säugetiervorfahren eingewandert, wohingegen *PGBD3* und *PGBD4* nur in Primaten zu finden sind. *PGBD1-4* existieren jeweils als einzelnes Exon in unserem Genom und liegen zu einem anderen Gen fusioniert vor(18). Eines der *PGBD*-derivierten Transposase-Fusionsgene ist das Cockayne-Syndrome-B-Gen (*CSB*)-*PGBD3*(45). *CSB-PGBD3* kann humane PiggyBac-ähnliche Transposonsequenzen in unserem Genom binden, scheint aber keine katalytische Aktivität mehr zu besitzen. Manche Studien zeigen, dass *CSB-PGBD3* ähnlich zu SETMAR bei der DNA-Reparatur eine Rolle spielt(46, 47). Auch dieses Beispiel zeigt, dass Transposons häufig keine genomische Instabilität mehr fördern, sondern in ihren physiologischen Eigenschaften sogar dieser entgegenwirken.

*PGBD5* ist im Vergleich zu *PGBD1-4* sehr unterschiedlich. Das Gen ist sehr viel früher in der Evolution in unser Genom eingewandert, nämlich ca. vor 500 Millionen Jahren(45, 48). Außerdem ist die Expression von *PGBD5* sehr gewebspezifisch und

wird nur während der Embryogenese und in Geweben neuroektodermalen Ursprungs sowie Tumoren dieses Ursprungs exprimiert, wohingegen die anderen Gene sehr viel ubiquitärer exprimiert werden(48-50).“: Freie Übersetzung durch den Autor. In dieser Habilitationsschrift werde ich darlegen, wie wir vor kurzem herausgefunden haben, dass *PGBD5* eine aktive Transposase ist(49) und eine wichtige Rolle bei der Tumorgenese zu spielen scheint. Welche physiologischen Funktionen *PGBD5* hat, ist bisher unklar. Zusammenfassend gibt es bei Menschen Transposons und Transposasen/Rekombinasen, die weiterhin aktiv sind und zur genomischen Stabilität/Instabilität beitragen können.

### **1.3. Rekombinase-induzierte onkogene genomische Aberrationen in Leukämien**

Der nachfolgende Text basiert zu Großteilen auf eine von Dr. Alex Kentsis und mir publizierte Übersichtsarbeit(1). „1946 hat Barbara McClintock zum ersten Mal die Vermutung geäußert, dass Transposons zur Entstehung chromosomaler Brüche und somit zur genomischen Instabilität einer Zelle beitragen können(51-54). Diese Vermutung wurde später durch Daten in Pflanzen unterstützt, die zeigten, dass Transposons dort zur Entstehung chromosomaler Aberrationen, zum Beispiel Translokationen, Inversionen, Deletionen, Duplikationen und chromosomalen Fragmentationen, führen können(55). Die ersten Hinweise, dass Transposasen zur Entstehung chromosomaler Aberrationen in Menschen beitragen können, wurden in Akuten-Lymphoblastischen-Leukämien (ALL) gefunden. Ähnlich wie in anderen Tumoren des Kindesalters wird die ALL durch rekurrente chromosomale Translokationen und Deletionen getrieben, die zum Teil schon während der fetalen Entwicklung in Lymphozyten Vorläuferzellen entstehen(56-58). Da schon früh beobachtet wurde, dass RAG1/2 in Lymphozyten statt an V(D)J-Stellen an alternativen Lokalisationen binden und dort zu einer Rekombination führen kann(59, 60), wurde schon früh die Hypothese aufgestellt, dass RAG1/2 vielleicht zur Entstehung genomischer Aberrationen in ALL beitragen könnte. In der Tat wurden an manchen genomischen Veränderungen in ALL-Zellen V(D)J-Rekombinations-Signal-Sequenzen (RSS) gefunden(61). Die Hypothese wurde außerdem durch die Beobachtung gestützt, dass an Bruchpunkten chromosomaler Aberrationen der *ETV6-RUNX1*-Translokation auch RSS-Sequenzen überproportional häufig zu finden sind(62). Interessanterweise wird RAG1/2 in *ETV6-RUNX1*-getriebenen Leukämien weiter hoch exprimiert und führt daher in den Leukämiezellen zur ununterbrochenen



V(D)J-Rekombination, welche sich in oligoklonalen V(D)J-Bruchpunkten in den Leukämien äußert(63). Es scheint also, als sei die Aktivität von RAG1/2 in den Leukämiezellen nicht gut kontrolliert. Es ist noch nicht klar, ob die RAG1/2-Expression ausreichend ist, um diese Aberrationen zu bilden und somit der einzige Grund für deren Entstehung ist. Nichtsdestotrotz ist es sehr wahrscheinlich, dass RAG1/2 eines der ersten Beispiele einer humanen Rekombinase ist, die zu onkogenen Mutationen in Krebserkrankungen des Kindesalters führen kann. Dies wird unter anderem dadurch unterstützt, dass RAG1/2 für die Entstehung von Leukämien zumindest zum Teil in Mausmodellen notwendig ist (64). Diese Entdeckung könnte also zumindest teilweise erklären, wieso ALL in Kindern so gehäuft vorkommt, obwohl diese Kinder äußeren Mutagenen nicht ausgesetzt waren. Denn die Zeit, in der RAG1/2 in Lymphozyten Vorläuferzellen am meisten aktiv ist, ist in den ersten Lebensjahren. Ob dieses Prinzip der Rekombinase-induzierten onkogenen Mutagenese auch in anderen Tumoren eine Rolle spielt, war bis vor kurzem noch weitgehend unerforscht.“: Freie Übersetzung durch den Autor.

**Tabelle 1. Humane Transposase ähnlicher Gene und deren Aktivität (aus einem Review Artikel adaptiert (1)).**

<b>Humanes Transposase-Gen</b>	<b><i>In-vitro</i>-Transposase-Aktivität</b>	<b><i>In-vivo</i>-Transposase-Aktivität</b>	<b>Beitrag zu Mutationen in Tumoren</b>	<b>Tumorentität</b>
<i>RAG1/2</i>	Ja	Nein	Ja	Lymphatische Krebserkrankungen (ALL, Lymphome etc.)
<i>PGBD5</i>	Ja	Ja	Ja	Embryonale Tumore (z. B. Rhabdoid Tumore)
<i>THAP9</i>	Ja	Ja	Unbekannt	Nicht zutreffend
<i>SETMAR</i>	Ja	Nein	Unbekannt	Nicht zutreffend

#### **1.4. Ziele**

Das Ziel der hier dargelegten Arbeit war es, herauszufinden, ob und wie Transposasen zur Entstehung genomischer Veränderungen in Tumoren des Kindesalters beitragen.

Wie in der ALL des Kindesalters schon für RAG1/2 gezeigt, war es naheliegend zu vermuten, dass auch andere Transposasen im Menschen aktiv zur genomischen Instabilität von Tumoren beitragen könnten. Da PGBD5 eine lange domestizierte Transposase im Menschen darstellt, fokussierten wir unsere Analyse auf dieses Gen. Unsere Hypothese zu Beginn dieser Studien war, dass PGBD5 eine aktive DNA-Rekombinase sei und diese Aktivität zur Entstehung genomischer Veränderungen beitragen könne.

## 2. Eigene Arbeiten

### 2.1. Mutationsdynamik zwischen Primär- und Rezidivtumoren in Neuroblastompatienten

Schramm A., Köster J., Assenov Y., Althoff K., Peifer M., Mahlow E., Odersky A., Beisser D., Ernst C., **Henssen A.G.**, Stephan H., Schröder C., Heukamp L., Engesser A., Kahlert Y., Theissen J., Hero B., Roels F., Altmüller J., Nürnberg P., Astrahantseff K., Gloeckner C., De Preter K., Plass C., Lee S., Lode H.N., Henrich K.O., Gartlgruber M., Speleman F., Schmezer P., Westermann F., Rahmann S., Fischer M., Eggert A., Schulte J.H.

Mutational dynamics between primary and relapse neuroblastomas.

*Nat Genet.* 2015 Aug;47(8):872-7. doi: 10.1038/ng.3349.

Bevor wir uns dem Thema der Rekombinase zuwandten, untersuchten wir zunächst die Genmutationen in Tumoren des Kindesalters. Wir konzentrierten uns hierbei auf das Neuroblastom. Denn das Neuroblastom ist ein Tumor, der sich aus neuroektodermalen Vorläuferzellen entwickelt und schon im sehr frühen Kindesalter, meist schon in den ersten zwei Lebensjahren, auftritt. Es ist der häufigste Tumor des Kindesalters, und beim Rezidiv ist er häufig letal. Der nachfolgende Text entspricht in Großteilen einer freien Übersetzung des Abstrakt der o.g. Arbeit(65). „Um die Ursachen der Neuroblastomentstehung und der Tumorevolution vom Primärtumor zum Rezidivtumor zu untersuchen, haben wir in dieser Studie Exom- und RNA-Sequenzierung mit Array-CGH und DNA-Methylierungsanalysen kombiniert und 16 Paare von Neuroblastomen zum Zeitpunkt der Diagnose und des Rezidivs untersucht. Wir fanden heraus, dass die Zahl der Mutationen ab der Diagnose bis zum Rezidiv anstieg und vor allem neue Mutationssignaturen in den Rezidivtumoren zu finden waren, die bei Diagnose nicht gefunden werden konnten. Dies lies zu vermuten, dass der Prozess der Mutationsentstehung sich während der Behandlung verändert haben könnte und nicht mehr dem gleichen Prozess entsprach wie noch bei der Entstehung des Primärtumors. Außerdem fanden wir, dass es beim Rezidiv zu einer reduzierten Klonalität des Tumors kam. War der Tumor bei Diagnose noch viel polyklonal, waren zum Zeitpunkt des Rezidivs nur weniger Klone vorhanden und diese nahmen einen größeren Anteil des Tumors ein. Die Allelfrequenz der Mutationen wurde hierzu untersucht, und wir stellten fest, dass global die Allelfrequenz stark im Rezidiv zunahm, was darauf hindeutet, dass diese Klone sich während der Therapie durchsetzen konnten und einen Überlebensvorteil gegenüber den anderen Klonen zu haben

schiene. Wieso diese Klone einen Vorteil gegenüber den anderen Klonen hatten, konnten wir nicht herausfinden. Die Promotermethylierung, ein Zeichen für eine epigenetische Markierung, änderte sich interessanterweise nicht im Verlauf der Tumorerkrankung und war zwischen Diagnose und Rezidiv sehr stabil. Dies lässt rückschließen, dass der Zelltyp bzw. Differenzierungsgrad der Zellen sich im Rahmen der Tumorevolution kaum veränderte. Wir fanden nur sehr wenige Genmutationen, die für das Rezidiv spezifisch waren. Dies ließ uns vermuten, dass nicht-kodierende komplexe Mutationen gegebenenfalls eine größere Rolle bei der Tumorevolution spielen könnten. Rekurrente Mutationen, die für das Rezidiv spezifisch waren, wurden im Tumorsuppressorgen *CDH5* gefunden. Außerdem waren gehäuft Chromosom-9p-Verlust, *DOCK8*-Mutationen und inaktivierende Mutationen von *PTPN14* im Falle der Rezidive zu finden. Die inaktivierenden *PTPN14*-Mutationen waren mit einem rezidiv-spezifischen Aktivitätsmuster im YAP-Signalweg assoziiert. Außerdem wurden rekurrente Mutationen im RAS-MAPK-Signalweg und damit assoziierte Mutationen in Zell-Zell-Interaktionsfaktoren in 13 von 16 Rezidivtumoren gefunden.“: Freie Übersetzung durch den Autor. Diese Studie zeigte also zusammenfassend, dass Neuroblastom-Tumore eine bedeutende Evolution während der Therapie durchlaufen, nämlich eine, die auf einer Veränderung der genomischen DNA-Sequenz beruht. Es zeigte sich aber auch, dass nur wenige Mutationen in Genen zu finden waren und dass wahrscheinlich mehr Veränderungen im nichtkodierenden Bereich eine Rolle spielen könnten. Wie Mutationen, die zu einer solchen genomischen Evolution führen, entstehen, war zum Zeitpunkt dieser Studie noch sehr unklar. Dies war einer der Gründe für mein weiteres Interesse an diesem Thema, welches ich in den darauf folgenden Arbeiten weiter verfolgte.

<https://doi.org/10.1038/ng.3349>















## **2.2. PGBD5 ist eine aktive humane DNA-Rekombinase/-Transposase**

**Henssen A.G.**, Henaff E., Jiang E., Eisenberg A.R., Carson J.R., Villasante C.M., Ray M., Still E., Burns M., Gandara J., Feschotte C., Mason C.E., Kentsis A.

Genomic DNA transposition induced by human PGBD5.

*Elife*. 2015 Sep 25;4. pii: e10565. doi: 10.7554/eLife.10565.

Da wir im Neuroblastom-Rezidiv nur wenige Genmutationen finden konnten, vermuteten wir, dass nicht-kodierende Mutationen eine Rolle bei der Entstehung von Tumoren des Kindesalters spielen könnten. Da der größte Teil des nicht-kodierenden Genoms im Menschen aus Transposons besteht und die Mobilisation von DNA Transposons und die Aktivität von Transposasen zur genomischen Instabilität in Zellen beitragen können, haben wir uns die Frage gestellt, welche Transposasen im Menschen noch aktiv sein und ob diese aktiven Transposasen zur genomischen Instabilität in pädiatrischen Tumoren beitragen könnten. In der nachstehenden Publikation beschreiben wir, dass das Protein, welches durch das humane *PGBD5*-Gen kodiert wird, in menschlichen Zellen weiterhin Transposons mobilisieren kann. Diese Aktivität hängt von bestimmten Aminosäuren ab, die für die katalytische Aktivität von Bedeutung sind. Die Transposase PGBD5 erkennt sehr spezifisch terminale Sequenzen an den Enden von Transposons, sog. Terminal Repeats, welche den kanonischen PiggyBac-Transposons ähneln. Die DNA-Transposition synthetischer Transposon-Substrate kann durch PGBD5 genomweit erfolgen und hat deutliche Präferenzen für TTAA-Sequenzen im menschlichen Genom. Ob die katalytische Aktivität von PGBD5 auch im physiologischen oder pathologischen Kontext, z. B. bei der Tumorentwicklung, eine Rolle spielt, ist aufgrund der hier dargestellten Ergebnisse noch nicht klar gewesen. Doch da für andere Transposase-ähnliche Rekombinasen wie RAG1/2 bereits eine Rolle in der Entstehung genomischer Veränderungen in Leukämien offenbart wurde, ließ sich erahnen, dass auch PGBD5 solch tumorogene Aktivitäten haben könnte.

<https://doi.org/10.7554/eLife.10565.001>













































### **2.3. Ein genetischer Screen führt zur Entdeckung Rekombinase-induzierter genomischer Aberrationen in humanen Zellen**

**Henssen A.G.**, Jiang E., Zhuang J., Pinello L., Socci N.D., Koche R., Gonen M., Villasante C.M., Armstrong S.A., Bauer D.E., Weng Z., Kentsis A.

Forward genetic screen of human transposase genomic rearrangements.

*BMC Genomics*. 2016 Aug 4;17:548. doi: 10.1186/s12864-016-2877-x.

Der nachfolgende Text entspricht in Großteilen einer freien Übersetzung des Abstrakt der o.g. Arbeit(66). „Viele humane Gene kodieren für potentiell aktive DNA-Transposasen/-Rekombinasen. Da die Aktivität der meisten Transposasen nur an synthetischen Konstrukten/Transposonsequenzen getestet werden, ist es jedoch schwierig herauszufinden, ob diese Rekombinasen ihre Aktivität auch auf das humane Genom ausüben können oder ob sie dort gegebenenfalls inaktiviert werden. Um dies herauszufinden, bedarf es zusätzlicher Methoden, die feststellen können, ob und wo Rekombinasen DNA schneiden und so zu genomischen Veränderungen führen. Um eine Untersuchung der Aktivität Transposase-ähnlicher Proteine in menschlichen Zellen zu ermöglichen, haben wir einen klassischen genetischen Screen adaptiert, der auf die Inaktivierung des Hypoxanthine-Guanine-Phosphoribosyltransferase-1- (*HPRT1*)-Gens basiert. Es ist möglich, spezifisch nach inaktivierenden Mutationen in diesem Gen zu suchen, indem man Zellen einem Selektionsdruck mit 6-Thioguanine aussetzt. Zellen, die eine inaktivierende Mutation in *HPRT1* haben, sind resistent gegenüber einer Behandlung mit 6-Thioguanin. Wir nutzten diesen Screen also in Kombination mit modernen Hoch-Durchsatz-Sequenzierungsmethoden sowie neuen Algorithmen zur Detektion genomischer Aberrationen, um herauszufinden, ob und wie PGBD5 zu Mutationen in humanen Zellen beitragen könnte. Wir fanden heraus, dass die PGBD5-Expression zur Entstehung von *HPRT1*-Genmutationen beitragen kann und dies an spezifischen Signalsequenzen tut, die wir PGBD5-Signal-Sequenzen (PSS) nannten. Wir fanden diese PSS an Bruchpunkten komplexer genomischer Aberrationen im *HPRT1*-Gen.“: Freie Übersetzung durch den Autor. Da dieses Auftreten von Sequenzen an Bruchpunkten denen an RAG1/2-induzierten Veränderungen ähnelten, ließ sich vermuten, dass PGBD5 ggf. auch zur Entstehung genomischer Aberrationen in Menschen beitragen könnte. Außerdem könnte die Methode des *HPRT1*-basierten genetischen Screens auch hilfreich sein, um Mutationen zu entdecken, die durch andere Rekombinasen induziert werden.

<https://doi.org/10.1186/s12864-016-2877-x>



















## **2.4. Die PGBD5-Rekombinase fördert die Entstehung sequenzspezifischer onkogener Mutationen in pädiatrischen Tumoren**

**Henssen A.G.**, Koche R., Zhuang J., Jiang E., Reed C., Eisenberg A., Still E., MacArthur I.C., Rodríguez-Fos E., Gonzalez S., Puiggròs M., Blackford A.N., Mason C.E., de Stanchina E., Gönen M., Emde A.K., Shah M., Arora K., Reeves C., Socci N.D., Perlman E., Antonescu C.R., Roberts C.W.M., Steen H., Mullen E., Jackson S.P., Torrents D., Weng Z., Armstrong S.A., Kentsis A.

PGBD5 promotes site-specific oncogenic mutations in human tumors.

*Nat Genet.* 2017 Jul;49(7):1005-1014. doi: 10.1038/ng.3866.

Auf Basis der Entdeckung PGBD5-induzierter Mutationen im *HPRT1*-Gen vermuteten wir, dass PGBD5 auch in Tumoren zu solchen Veränderungen führen könnte. Da RAG1/2 fast ausschließlich in Lymphozyten-Vorstufen exprimiert wird und die Entartung dieser Zellen zu ALL führen kann und darüber hinaus PGBD5 nur in Zellen neuroektodermalen Ursprungs exprimiert wird, stellten wir die Hypothese auf, dass PGBD5 zur Entstehung von Tumoren neuroektodermalen Ursprungs beitragen könnte. Passend zu dieser Vermutung fanden wir, dass PGBD5 in der Mehrheit der embryonalen Tumore neuroektodermalen Ursprungs des Kindesalters, z. B. in Neuroblastomen, Medulloblastomen, Ewing-Sarkomen und Rhabdoid-Tumoren, exprimiert ist(48-50). Interessanterweise fanden wir zudem heraus, dass die Expression von PGBD5 alleine ausreichend ist, um die Entstehung genomischer Aberrationen zu fördern und zu einer Entartung humaner Zellen zu führen. Die Expression von PGBD5 in humanen, nicht-transformierten RPE-Zellen führte nämlich zu einem rapiden Wachstum von Tumoren in subkutanen Maus-Xenograftmodellen, wohingegen die Expression einer inaktiven Form von PGBD5 dies nicht tat. Um diese Transformation durchzuführen, war die katalytische Domäne von PGBD5 entscheidend, denn wenn wir diese mutierten, kam es zu keiner Transformation der Zellen mehr. Mittels Hoch-Durchsatz-Genomsequenzierung in Kombination mit neuen Genomanalysealgorithmen fanden wir außerdem heraus, dass die durch PGBD5 transformierten Zellen komplexe genomische Veränderungen enthielten. An vielen dieser genomischen Veränderungen fanden wir PGBD5-Signal-Sequenzen (PSS) an den Bruchpunkten. Dies unterstützte unsere Vermutung, dass PGBD5 an deren Entstehung beteiligt war. Darüber hinaus fanden wir auch in Rhabdoid-Tumorgenomen an Bruchpunkten komplexer Aberrationen PGBD5-Signal-Sequenzen. Wir führten auch eine Chromatin-Immunpräzipitation mit PGBD5-Antikörpern durch und fanden,

dass PGBD5 an PGBD5-Signal-Sequenzen binden kann. Zusammenfassend fanden wir also heraus, dass PGBD5 mit hoher Wahrscheinlichkeit die Entstehung komplexer genomischer Aberrationen in Rhabdoid-Tumoren des frühen Kindesalters fördert. Da PGBD5 besonders in der frühen embryologischen Entwicklung exprimiert wird, ist zu vermuten, dass PGBD5 schon embryonal zur Entstehung der Tumorentwicklung beitragen kann.

<https://doi.org/10.1038/ng.3866>































## **2.5. Die PGBD5-Rekombinase-Aktivität führt zu einer therapeutisch angreifbaren DNA-Reparatur-Abhängigkeit in pädiatrischen Tumoren**

**Henssen A.G.**, Reed C., Jiang E., Garcia H.D., von Stebut J., MacArthur I.C., Hundsdoerfer P., Kim J.H., de Stanchina E., Kuwahara Y., Hosoi H., Ganem N.J., Dela Cruz F., Kung A.L., Schulte J.H., Petrini J.H., Kentsis A.

Therapeutic targeting of PGBD5-induced DNA repair dependency in pediatric solid tumors.

*Sci Transl Med.* 2017 Nov 1;9(414). pii: eaam9078. doi: 10.1126/scitranslmed.aam9078.

In akuten lymphoblastischen Leukämien wurde gezeigt, dass RAG1/2 auch nach der Entstehung der Leukämie weiter aktiv ist und weiter zur Instabilität des Genoms beiträgt. Wir stellten uns also die Frage: Könnten Tumore, die eine aktive DNA-Transposase exprimieren, von der Reparatur der durch diese Aktivität hervorgerufenen DNA-Schäden abhängen? Denn Individuen, die Defekte in DNA-Reparatur-Signalwegen vorweisen, zeigen üblicherweise Phänotypen, die darauf hinweisen, dass Gewebe, die Transposasen exprimieren, unter diesen Defekten am meisten leiden. Denn z. B. Lymphozyten, die RAG1/2 exprimieren, benötigen DNA-Reparatur, um die Defekte, die durch RAG1/2 induziert werden, zu reparieren. In Patienten mit DNA-Reparaturdefekten, zum Beispiel in der ATM-Kinase im Rahmen des Ataxia-Telangiectasia(A-T)-Syndroms, kommt es zu schwerer Immundefizienz. Außerdem kommt es in solchen Syndromen zur chromosomalen Instabilität in anderen Geweben. Diese Instabilität führt wiederum zu einer erhöhten Inzidenz an Tumoren. Könnten DNA-Transposasen zu deren Entstehung beitragen?

In der folgenden Studie prüften wir, ob PGBD5-exprimierende Zellen von gewissen DNA-Reparaturfaktoren abhängen, bzw. ob diese Zellen gewisse Faktoren benötigen, um die Aktivität von PGBD5 zu ertragen und zu vermeiden, dass das Genom nicht durch dessen Aktivität vollkommen zerstört wird und so zum Zelltod führt. Wir zeigten, dass Zellen, die PGBD5 exprimieren, einen Defekt in DNA-Reparatur-Faktoren nicht vertragen. Die Expression von PGBD5, aber nicht der katalytischen Mutanten-Version von PGBD5, führte in Zellen, denen wichtige Faktoren der DNA-Reparatur (z. B. ATM und ATR) fehlten, zum Zelltod durch eine Akkumulation von DNA-Schäden. Dies führte zu der Hypothese, dass wir diese Abhängigkeit für eine Therapie von Tumoren nutzen könnten, die PGBD5 exprimieren. In der Tat fanden wir heraus, dass Tumore, die PGBD5 exprimieren, sehr sensibel auf eine

pharmakologische Inhibition der ATR- und ATM-Kinasen reagierten. Insbesondere Neuroblastome, Ewing-Sarkome, Medulloblastome und Rhabdoid-Tumore reagierten sehr sensibel auf eine ATR-Inhibition mit dem Molekül AZD6738. Diese Sensibilität hing direkt von dem PGBD5-Expressionsniveau ab, denn ein Knock-down von PGBD5 mittels shRNA führte zu einer reduzierten Sensibilität gegenüber AZD6738. Wir testeten daher die Aktivität von AZD6738 in primären patientenderivierten Xenograft-Mausmodellen und fanden, dass eine Behandlung mit AZD6738 in einigen PGBD5-exprimierenden Tumoren zu einer dramatischen Reduktion des Tumolvolumens bzw. Tumorwachstums führte. Diese Experimente könnten also als proof-of-principle dafür dienen, dass die Expression einer aktiven Transposase in Tumoren zu einer Suszeptibilität gegenüber pharmakologischer Inhibition von DNA-Reparatursignalwegen führen kann. Dies könnte weitreichende Auswirkungen auf die Entwicklung neuer Therapieoptionen in der Onkologie haben und zeigt, dass die Untersuchung grundlegender molekularbiologischer Prozesse in Tumoren auch zu klinisch relevanten Erkenntnissen führen kann.

<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aam9078>





















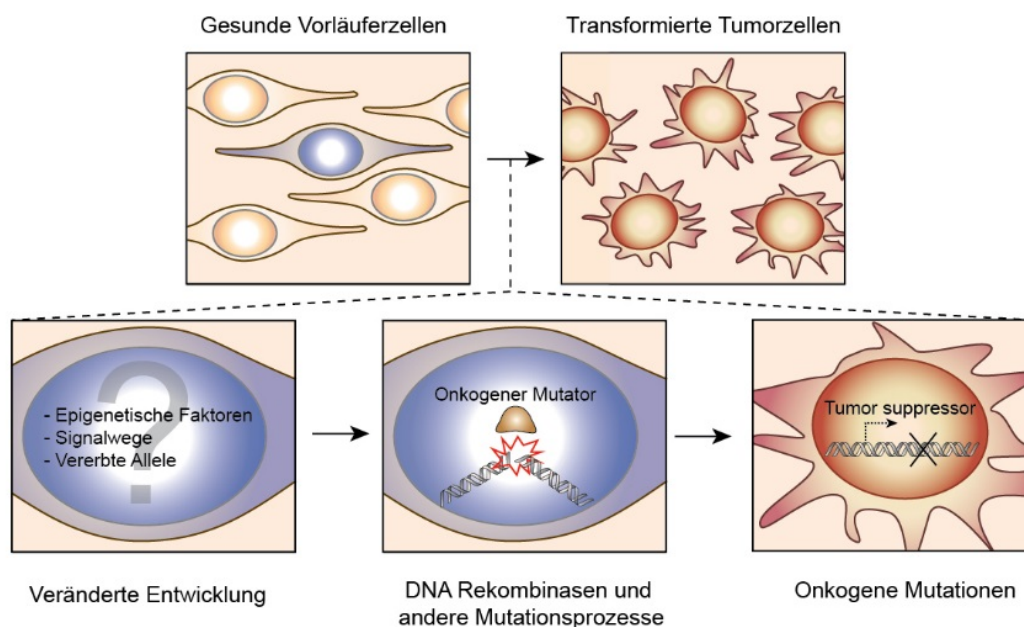






### 3. Diskussion

Auf Basis der hier zusammengestellten Publikationen sowie Arbeiten anderer Forschungsgruppen ist nun bekannt, dass RAG1/2 in Leukämien und PGBD5 in Tumoren neuroektodermalen Ursprungs im Kindesalter zur Entstehung komplexer genomischer Aberrationen beitragen können(1, 50). Basierend auf unsere bisherigen Ergebnisse lässt sich das folgende Modell der Transposase-induzierten malignen Transformation postulieren (siehe Abbildung 1): Eine gesunde Vorläuferzelle erfährt auf epigenetischer Ebene, in Signalwegen oder durch genetisch vererbte Allele eine Veränderung, die zu einer Aktivierung endogener Mutationsprozesse, zum Beispiel humaner DNA-Rekombinasen, führt. Diese Mutationsprozesse wiederum können zur Entstehung von Mutationen in Tumor-Suppressor-Genen, Onkogenen oder anderen bisher unbekanntem tumor-treibenden genomischen Regionen führen, die zur vollständigen malignen Entartung der Zellen beitragen. Auch wenn unsere Arbeit zeigt, dass Transposasen wie PGBD5 in pädiatrischen Tumoren zur Entstehung genomischer Veränderungen beitragen können, bleibt das beschriebene Modell in weiten Teilen noch unerforscht und erfordert eine zukünftige tiefergehende Untersuchung. Einige offene Fragen werde ich im Folgenden diskutieren.



**Abbildung 1. Übersicht des Modells, wie aktive DNA Rekombinasen gesunde Vorläuferzellen in maligne Tumorzellen transformieren (adaptiert aus (1)).** Die Veränderung von Vorläuferzellen durch epigenetische oder andere bisher unbekannte Faktoren führt zur Aktivierung endogener Mutationsprozesse (z. B. Transposasen), die zu Mutationen führen, welche wiederum die maligne Transformation der Zellen verursacht.

Da das humane Genom viele Gene mit Ähnlichkeit zu DNA-Transposasen beinhaltet, kann es sein, dass noch weitere humane Rekombinasen zur Entstehung genomischer

Mutationen in Tumoren beitragen. Zum Beispiel ist die THAP9-Transposase im Menschen aktiv(43). Ob THAP9 in Tumoren zur Entstehung von Mutationen beiträgt, ist jedoch nicht bekannt. Da diese Information zur Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten führen könnte, ist es meiner Meinung nach überaus wichtig, die Aktivität dieser bisher unbekanntes Transposasen zu beschreiben und z. B. mithilfe des von uns adaptierten HPRT1-basierten genetischen Screens zu untersuchen(66). Um die Entdeckung komplexer Transposase-induzierter Mutationen besser vorantreiben zu können, ist es außerdem wichtig, neue Arten der DNA-Sequenzierung, zum Beispiel *Single molecule real time sequencing* (SMRT), zu nutzen, mithilfe derer man komplexe Aberrationen besser darstellen kann(67, 68). Denn es ist weiterhin schwierig, einige der komplexen Aberrationen genau zu beschreiben, weil die Länge der Sequenzierungsläufe (reads) aus der Illuminotechnologie zum Teil zu kurz ist und die Sequenzierungsreads schwer einem spezifischen Ort im Genom zuzuordnen sind (sog. Misalignment). Lange Sequenzierungsreads würden den Prozess ungemein vereinfachen, indem sie einem erlauben würden, komplexe Veränderungen besser zu rekonstruieren(68). Es ist zusätzlich meines Erachtens notwendig, die Analysen von Genomsequenzierungsdaten weiter zu verfeinern. Denn noch immer ist die Rate der falsch-positiven oder falsch-negativen Entdeckungen genomischer Aberrationen bei den meisten Algorithmen relativ hoch(69-71). Zurzeit sind die Algorithmen so aufgebaut, dass häufig eine niedrige Sensitivität in Kauf genommen wird, um zu vermeiden, dass zu viele falsch-positive Veränderungen entdeckt werden. Dies führt aber häufig dazu, dass bisher unbekanntes Veränderungen nicht entdeckt werden. Andererseits ist es sicherlich notwendig, viele der Veränderungen durch orthogonale Methoden zu verifizieren, denn bei hoher Sensitivität mancher Algorithmen kommt es zu einer hohen Zahl an falsch-positiven Ergebnissen. Insgesamt ist es zurzeit noch schwierig, einen gemeinsamen Analysestandard festzulegen – dieser würde es einem ermöglichen, Entdeckungen aus verschiedenen Gruppen miteinander zu vergleichen und auf Basis dieser Vergleiche ggf. ähnliche Schlussfolgerungen ziehen zu können. Auch wenn bereits Vergleiche zwischen Algorithmen, Sequenzierungsmethoden etc. durchgeführt wurden(72), gibt es noch immer keine Einigkeit darüber, wie man Mutationen am besten detektiert. Es wird also meiner Meinung nach besonders wichtig, in den nächsten Jahren die Arten der Sequenzierung, der Analyse und der Auswertung so zu standardisieren, dass sie einem ermöglichen, neue genomische

Veränderungen zu finden und diese mit anderen Gruppen zu teilen und zu vergleichbaren Ergebnissen zu kommen.

Durch die Entwicklung neuer Hoch-Durchsatz-DNA-Sequenziermethoden gelingt es uns zunehmend, die Mutationsprozesse in menschlichen Tumoren auf DNA- und RNA-Ebene zu untersuchen. Es ist mittlerweile bekannt, dass Tumore mehr als 50 unterschiedliche Mutationsmuster und mindestens 17 Klassen komplexerer Deletionen und Aberrationen aufweisen können(9, 73). Manche dieser Mutationsprozesse scheinen dadurch zustande zu kommen, dass den Tumoren gewisse DNA-Reparaturmechanismen fehlen. Für die meisten Mutationsprozesse ist die Ursache bisher noch weitgehend unbekannt. Zum Beispiel gibt es eine Signatur namens SBS18, die fast nur in Neuroblastomen zu finden ist und der ein bisher unbekannter oxidativer Prozess zugrunde liegt(73). Da die meisten Prozesse, die bei der Entstehung dieser Mutationen involviert sind, bisher unbekannt sind, ist es wichtig, die Mutationsprozesse in Tumoren genauer zu untersuchen. Denn ohne ein besseres Verständnis solcher Prozesse wird es meiner Kenntnis nach nicht zu einer Verbesserung der Diagnostik, Klassifizierung und Therapie solcher Tumore kommen. Unsere Arbeit steuert einen kleinen Teil dazu bei, die Mechanismen der Mutationsentstehung besser zu verstehen. Interessanterweise zeigt keines der bereits publizierten Mutationsmuster eine Ähnlichkeit mit der PGBD5-Signal-Sequenz. Ich vermute, dass dies daran liegt, dass viele der Mutationsmechanismen nicht häufig genug auftreten, um in einer solchen unsupervidierten Analyse von Mutationsprofilen gefunden zu werden. Außerdem werden die meisten Analysen in Tumoren des erwachsenen Alters durchgeführt. Da PGBD5 jedoch vor allem in der frühen, embryonalen Entwicklung exprimiert wird, könnten Prozesse, die zu diesem Zeitpunkt stattfinden, in solchen Analysen unterrepräsentiert sein. Auch wenn Analysen von Mutationsmustern sehr wichtig sind, um Mutationsursachen zu untersuchen, ist es unzureichend, nach diesen Mustern zu suchen, denn viele Mechanismen für die Entstehung von Mutationen lassen sich nur herausfinden, indem man den spezifischen Mutationsprozess untersucht.

Auch wenn wir hier beschreiben, dass PGBD5 zur Entstehung genomischer Veränderungen beiträgt, ist bisher nicht bekannt, wie diese Veränderungen zu einer Entartung der Zellen führt. Die meisten Veränderungen, die wir in PGBD5-transformierten Zellen gefunden haben, fanden wir im nicht-kodierenden Bereich. Dies ist zu erwarten, denn dort befinden sich gehäuft Transposons und auch dort

beobachten wir Veränderungen in Genomen von Tumoren des Kindesalters. In vielen Fällen sind keine bekannten tumor-relevanten Gene in der Nähe der Veränderungen zu finden. Außerdem führten die Veränderungen häufig zu keiner Veränderung in der Expression der Gene, die in der Nähe der Veränderung zu finden waren. Es bleibt also unbekannt, ob und wie diese Veränderungen zu einer Entartung beitragen. Viele Veränderungen könnten zum Beispiel „nur“ als sog. *passenger events* entstanden sein und keine tumortreibende Funktion haben. Dieselbe Frage stellt sich für viele Veränderungen, die wir in Tumoren finden. Besonders komplexe Veränderungen, zum Beispiel Chromothripsis, führen zu solch komplexen Veränderungen der Genomstruktur, dass sich noch nicht klar ableiten lässt, welche Konsequenz diese Veränderungen genau auf die Expression von Genen und somit auf die Zellen haben. Um dies besser zu verstehen, müsste man sich auch die Konsequenz auf die dreidimensionale Architektur des Genoms anschauen(74). Denn nur so ließe sich erkennen, mit welchen Genen gewisse nichtkodierende Bereiche assoziieren und somit gegebenenfalls regulieren. Auch sollte man die beobachteten Veränderungen einzeln modellieren, z. B. mittels CRISPR-Cas9, um deren Konsequenzen eindeutig zuordnen zu können. Insgesamt wird es vonnöten sein, noch einige Untersuchungen durchzuführen, um die funktionelle Konsequenz der komplexen genomischen Veränderungen besser zu verstehen.

Um die Bedeutung der Transposase-induzierten Mutationen für die Tumorentwicklung besser begreifen zu können, ist es darüber hinaus unabdinglich, akkurate Tiermodelle zu entwickeln, in denen man die Expression der Transposasen beeinflussen und somit ihre Wirkung genauer untersuchen kann. Denn es ist, außer bei RAG1/2, noch nicht klar, zu welchem Zeitpunkt und in welchen Vorläuferzellen Transposasen zu einer malignen Transformation führen können. Die Untersuchung der entwicklungsabhängigen und gewebsspezifischen Expression von Transposasen mit Hilfe transgener Tiermodelle sollte es ermöglichen, die genauen physiologischen und kanzerogenen Funktionen der humanen Transposasen besser zu verstehen. Zum Beispiel ist es bisher vollkommen unklar, wieso Transposasen in gewissen Geweben physiologisch exprimiert werden, dort jedoch nicht zu Mutationen führen, die zu einer Entartung des Gewebes führen können. Gibt es, wie auch bei RAG1/2, bei PGBD5 Faktoren, die die Aktivität dieser Transposase limitieren? Oder wird die Aktivität von PGBD5 dadurch beschränkt, dass die Signalsequenzen (z. B. PSS) in den Zellen, in denen PGBD5 physiologisch exprimiert wird, durch andere Elemente geschützt

werden? Wird dies gegebenenfalls epigenetisch durch Chromatin-Veränderungen, zum Beispiel Heterochromatinisierung, festgelegt? Diese Fragen experimentell zu beantworten wird meiner Meinung nach von großer Wichtigkeit sein, wenn man die physiologische und pathologische Funktion von Transposasen besser verstehen möchte. Um dies sinnvoll zu tun, wird es notwendig sein, dies in dem Menschen entwicklungsbiologisch nahen Modellen zu untersuchen. Auch wenn Mausmodelle einige Unterschiede zum Menschen aufweisen, scheinen transgene Mausmodelle zurzeit die akkuratesten Modelle zu sein, um solche Fragen zu beantworten.

Wir haben in unseren Studien beschrieben, dass Transposasen zu einer therapeutisch angreifbaren Schwachstelle in Tumorzellen führen können. Diese Strategie könnte auch für Tumore mit einer Expression anderer Transposasen zutreffen. Da viele Moleküle, die verschiedenste DNA-Reparatur-Signalwege inhibieren, zurzeit von der Pharma- und Biotechindustrie entwickelt werden, stellt sich die Frage, welche dieser Moleküle am besten dafür geeignet sind, um diese Transposase-induzierten Schwachstellen anzugreifen. Um dies besser verstehen zu können, wird es wichtig sein herauszufinden, welche DNA-Reparatur-Faktoren bei der Rekombinationsaktivität der einzelnen DNA-Transposasen zu welchem Zeitpunkt wichtig sind. Um dies zu untersuchen, könnte man mithilfe von neu-etablierten CRISPR-Cas9-Screens die uns bekannten DNA-Reparatur-Faktoren untersuchen und versuchen festzustellen, welche dieser Faktoren mit einer Expression von DNA-Transposasen im synthetisch letalen Verhältnis stehen. Dies ist von besonderer Wichtigkeit, da viele der Faktoren auch in Abwesenheit einer Transposase für humane Zellen von großer Wichtigkeit sind. Um eine Toxizität der Inhibitoren zu vermeiden, ist es also ausschlaggebend besser zu verstehen, welche Faktoren für welche Prozesse verantwortlich sind. Dies ist für manche Faktoren, wie ATR, schon in großem Maße geschehen(75, 76). Für manch andere Faktoren ist unser Verständnis ihrer Funktion jedoch zurzeit noch unzureichend und die therapeutische Wirkung ihrer Inhibition daher noch nicht vorhersehbar. Außerdem ist der Mechanismus, mit dem DNA-Reparatur-Inhibitoren wie AZD6738 zum Tumorzelltod führen, noch weitgehend nicht untersucht worden. Ein besseres Verständnis dieser Prozesse könnte dazu führen, dass wir bessere Kombinationstherapien entwickeln können. Man könnte sich zum Beispiel vorstellen, dass eine Kombination aus einem ATR-Inhibitor synergistisch mit einem Molekül wirken könnte, welches eine Art des Zelltods spezifisch fördert (z. B. BCL2-Inhibitoren etc.). Denn es ist abzusehen, dass auch ATR-Inhibitoren, wie so

viele andere zielgerichtete Therapien, nicht alleine eine kurative Wirkung in Patienten ausüben wird. Auch in unseren Xenograft-Modellen war eine alleinige Therapie mit AZD6738 keineswegs kurativ(77). Denn Tumoren zeigen eine solch ausgeprägte Plastizität, dass eine Resistenz gegenüber einem einzigen Therapeutikum meist sehr schnell durch den Tumor erreicht wird. Es ist daher dringend nötig, neue Strategien für Kombinationstherapien zu entwickeln. Wie auch bei zytotoxischen Chemotherapien in den letzten Jahrzehnten beobachtet(78), wird wohl in den meisten Fällen nur eine Kombination aus mehreren zielgerichteten Therapien zu einem kurativen Effekt in Patienten führen können. Abgesehen von synergistischen Effekten mit anderen zielgerichteten Therapien ist es außerdem notwendig zu untersuchen, wie man neue zielgerichtete Therapien, zum Beispiel AZD6738, am besten mit bestehenden zytotoxischen Therapien oder mit neuartigen Immuntherapien (wie CAR-T-Zellen oder Checkpoint-Inhibitoren) am besten kombiniert, ohne die Wirkung der jeweiligen anderen Therapie zu schwächen oder zu unnötigen Nebenwirkungen durch additive Toxizität zu führen. Insgesamt denke ich, dass die Entwicklung zielgerichteter Therapien, die auf synthetisch letalen molekularen Eigenschaften beruhen, zum Beispiel AZD6738 in PGBD5-exprimierenden Tumoren, wichtige Therapieoptionen der Zukunft darstellen, wenngleich sie noch in vielerlei Hinsicht untersucht werden müssen.

Abgesehen von tumorrelevanten Funktionen von Transposasen wäre es interessant, die physiologischen Funktionen von Transposasen, wie PGBD5 und THAP9, zu untersuchen. Denn wie bei RAG1/2 oder TERT könnten auch PGBD5 und THAP9 in humanen Zellen eine wichtige Funktion übernehmen. Ob diese Funktionen mit der DNA-Rekombinationsaktivität zusammenhängen, ist bisher vollkommen unklar. Wäre dies der Fall, würde sich folgende Frage stellen: Welche Regionen des Genoms PGBD5 und THAP9 rekombinieren, und wieso? Könnte die Rekombination gewisser genomischer Abschnitte in neuronalen Zellen durch PGBD5 etwa zu einer somatischen Diversifizierung neuronaler Zellen führen? Oder könnte diese Funktion zum Alterungsprozess oder zur Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen beitragen, indem sie in Neuronen im Gehirn zu Veränderungen führt? Auch ist unklar, ob und welche Rekombinase-unabhängige Funktionen domestizierte Transposasen haben könnten. Es ist nicht auszuschließen, dass die Rekombinase-Aktivität nicht zur physiologisch relevanten Funktion der Transposasen beiträgt. Insgesamt ist die

Funktion domestizierter Transposasen bisher noch zu wenig erforscht, um eine Aussage über ihren Stellenwert in der menschlichen Biologie zu machen.

#### **4. Zusammenfassung**

In dieser Habilitationsschrift habe ich fünf Publikationen vorgestellt, die sich mit der Frage befassen, welche Mutationsarten sich in Tumoren des Kindesalters finden lassen und wie Transposasen zu deren Entstehung beitragen könnten. 2015 stellten wir mit Herrn Dr. Schramm und Kollegen fest, dass Neuroblastome nur eine geringe Zahl an Punktmutationen in Genen aufweisen, die sich im Rahmen der Rezidive zum Teil verstärkt im Tumor klonal durchsetzen. Diese geringe Zahl an Punktmutationen kann die Entstehung und Evolution der Neuroblastome nur schwer alleine erklären. Da Tumore des Kindesalters auch komplexe genomische Veränderungen, z. B. Deletionen, Translokationen etc., vorweisen, vermuteten wir, dass diese vielleicht eine ebenso wichtige Rolle in der Tumorgenese im Kindesalter spielen könnten. Da die Entstehungsmechanismen solch komplexer Veränderungen jedoch bisher fast unerforscht waren, untersuchte ich gemeinsam mit der Gruppe von Dr. Kentsis die Rolle von Transposasen in der Entstehung solcher Veränderungen. Wir fanden heraus, dass PGBD5 eine bisher unbekannte aktive DNA-Transposase ist, die in Tumoren des Kindesalters hoch exprimiert wird. Mithilfe eines genetischen Screens konnten wir herausfinden, dass PGBD5 auch außerhalb von Transposons zu Mutationen an Signal-Sequenzen beitragen kann. Dies führte dazu, dass wir die Aktivität von PGBD5 in Rhabdoid-Tumoren des frühen Kindesalters untersuchten. Wir fanden heraus, dass auch in Rhabdoid-Tumoren Zeichen einer PGBD5-Aktivität zu finden sind. Außerdem zeigte sich, dass die PGBD5-Expression alleine ausreicht, um in humanen Zellen genomische Veränderungen zu induzieren. Da diese Aktivität auch eine DNA-Reparatur benötigt, testeten wir, ob PGBD5-exprimierende Tumore mit DNA-Reparatur-Inhibitoren behandelt werden könnten. In der Tat fanden wir, dass PGBD5 zu einer Abhängigkeit der Tumorzellen gegenüber ATR führt. Dies führt dazu, dass PGBD5-exprimierende Tumore des Kindesalters präklinisch gut auf eine Behandlung mit dem ATR-Inhibitor AZD6738 ansprechen. Insgesamt konnten wir also feststellen, dass PGBD5 die Entstehung eines Teils der genomischen Veränderungen in Tumoren des Kindesalters verursachen könnte und dass diese Aktivität neue Ansatzpunkte für Therapien schafft.



## 5. Literaturverzeichnis

1. A. G. Henssen, A. Kentsis, Emerging functions of DNA transposases and oncogenic mutators in childhood cancer development. *JCI Insight* **3**, (2018).
2. A. M. Noone, N. Howlader, M. Krapcho, D. Miller, A. Brest, M. Yu, J. Ruhl, Z. Tatalovich, A. Mariotto, D. R. Lewis, H. S. Chen, E. J. Feuer, K. A. Cronin, SEER Cancer Statistics Review 1975-2015, National Cancer Institute. Bethesda, MD. *based on November 2017 SEER data submission, posted to the SEER web site.*, (April 2018).
3. M. Greaves, Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nature reviews. Cancer* **6**, 193-203 (2006).
4. S. N. Grobner, B. C. Worst, J. Weischenfeldt, I. Buchhalter, K. Kleinheinz, V. A. Rudneva, P. D. Johann, G. P. Balasubramanian, M. Segura-Wang, S. Brabetz, S. Bender, B. Hutter, D. Sturm, E. Pfaff, D. Hubschmann, G. Zipprich, M. Heinold, J. Eils, C. Lawerenz, S. Erkek, S. Lambo, S. Waszak, C. Blattmann, A. Borkhardt, M. Kuhlen, A. Eggert, S. Fulda, M. Gessler, J. Wegert, R. Kappler, D. Baumhoer, S. Burdach, R. Kirschner-Schwabe, U. Kontny, A. E. Kulozik, D. Lohmann, S. Hettmer, C. Eckert, S. Bielack, M. Nathrath, C. Niemeyer, G. H. Richter, J. Schulte, R. Siebert, F. Westermann, J. J. Molenaar, G. Vassal, H. Witt, I. P.-S. Project, I. M.-S. Project, B. Burkhardt, C. P. Kratz, O. Witt, C. M. van Tilburg, C. M. Kramm, G. Fleischhack, U. Dirksen, S. Rutkowski, M. Fruhwald, K. von Hoff, S. Wolf, T. Klingebiel, E. Koscielniak, P. Landgraf, J. Koster, A. C. Resnick, J. Zhang, Y. Liu, X. Zhou, A. J. Waanders, D. A. Zwijnenburg, P. Raman, B. Brors, U. D. Weber, P. A. Northcott, K. W. Pajtler, M. Kool, R. M. Piro, J. O. Korbel, M. Schlesner, R. Eils, D. T. W. Jones, P. Lichter, L. Chavez, M. Zapatka, S. M. Pfister, The landscape of genomic alterations across childhood cancers. *Nature* **555**, 321-327 (2018).
5. S. Schleidgen, C. Klingler, T. Bertram, W. H. Rogowski, G. Marckmann, What is personalized medicine: sharpening a vague term based on a systematic literature review. *BMC Med Ethics* **14**, 55 (2013).
6. D. T. Jones, N. Jager, M. Kool, T. Zichner, B. Hutter, M. Sultan, Y. J. Cho, T. J. Pugh, V. Hovestadt, A. M. Stutz, T. Rausch, H. J. Warnatz, M. Ryzhova, S. Bender, D. Sturm, S. Pleier, H. Cin, E. Pfaff, L. Sieber, A. Wittmann, M. Remke, H. Witt, S. Hutter, T. Tzaridis, J. Weischenfeldt, B. Raeder, M. Avci, V. Amstislavskiy, M. Zapatka, U. D. Weber, Q. Wang, B. Lasitschka, C. C. Bartholomae, M. Schmidt, C. von Kalle, V. Ast, C. Lawerenz, J. Eils, R. Kabbe, V. Benes, P. van Sluis, J. Koster, R. Volckmann, D. Shih, M. J. Betts, R. B. Russell, S. Coco, G. P. Tonini, U. Schuller, V. Hans, N. Graf, Y. J. Kim, C. Monoranu, W. Roggendorf, A. Unterberg, C. Herold-Mende, T. Milde, A. E. Kulozik, A. von Deimling, O. Witt, E. Maass, J. Rossler, M. Ebinger, M. U. Schuhmann, M. C. Fruhwald, M. Hasselblatt, N. Jabado, S. Rutkowski, A. O. von Bueren, D. Williamson, S. C. Clifford, M. G. McCabe, V. P. Collins, S. Wolf, S. Wiemann, H. Lehrach, B. Brors, W. Scheurlen, J. Felsberg, G. Reifemberger, P. A. Northcott, M. D. Taylor, M. Meyerson, S. L. Pomeroy, M. L. Yaspo, J. O. Korbel, A. Korshunov, R. Eils, S. M. Pfister, P. Lichter, Dissecting the genomic complexity underlying medulloblastoma. *Nature* **488**, 100-105 (2012).
7. R. Huether, L. Dong, X. Chen, G. Wu, M. Parker, L. Wei, J. Ma, M. N. Edmonson, E. K. Hedlund, M. C. Rusch, S. A. Shurtleff, H. L. Mulder, K. Boggs, B. Vadordaria, J. Cheng, D. Yergeau, G. Song, J. Becksfort, G. Lemmon, C. Weber, Z. Cai, J. Dang, M. Walsh, A. L. Gedman, Z. Faber, J. Easton, T. Gruber, R. W. Kriwacki, J. F. Partridge, L. Ding, R. K. Wilson, E. R. Mardis, C. G. Mullighan, R. J. Gilbertson, S. J. Baker, G. Zambetti, D. W. Ellison, J. Zhang, J. R. Downing, The landscape of somatic mutations in epigenetic regulators across 1,000 paediatric cancer genomes. *Nature communications* **5**, 3630 (2014).
8. B. Vogelstein, N. Papadopoulos, V. E. Velculescu, S. Zhou, L. A. Diaz, Jr., K. W. Kinzler, Cancer genome landscapes. *Science* **339**, 1546-1558 (2013).
9. L. B. Alexandrov, S. Nik-Zainal, D. C. Wedge, S. A. Aparicio, S. Behjati, A. V. Biankin, G. R. Bignell, N. Bolli, A. Borg, A. L. Borresen-Dale, S. Boyault, B. Burkhardt, A. P. Butler, C. Caldas, H. R. Davies, C. Desmedt, R. Eils, J. E. Eyfjord, J. A. Foekens, M. Greaves, F. Hosoda, B. Hutter, T. Ilicic, S. Imbeaud, M. Imielinski, N. Jager, D. T. Jones, D. Jones, S. Knappskog, M. Kool, S. R. Lakhani, C. Lopez-Otin, S. Martin, N. C. Munshi, H. Nakamura, P. A. Northcott, M. Pajic, E.

- Papaemmanuil, A. Paradiso, J. V. Pearson, X. S. Puente, K. Raine, M. Ramakrishna, A. L. Richardson, J. Richter, P. Rosenstiel, M. Schlesner, T. N. Schumacher, P. N. Span, J. W. Teague, Y. Totoki, A. N. Tutt, R. Valdes-Mas, M. M. van Buuren, L. van 't Veer, A. Vincent-Salomon, N. Waddell, L. R. Yates, I. Australian Pancreatic Cancer Genome, I. B. C. Consortium, I. M.-S. Consortium, I. PedBrain, J. Zucman-Rossi, P. A. Futreal, U. McDermott, P. Lichter, M. Meyerson, S. M. Grimmond, R. Siebert, E. Campo, T. Shibata, S. M. Pfister, P. J. Campbell, M. R. Stratton, Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* **500**, 415-421 (2013).
10. M. R. Mansour, B. J. Abraham, L. Anders, A. Berezovskaya, A. Gutierrez, A. D. Durbin, J. Echin, L. Lawton, S. E. Sallan, L. B. Silverman, M. L. Loh, S. P. Hunger, T. Sanda, R. A. Young, A. T. Look, An oncogenic super-enhancer formed through somatic mutation of a noncoding intergenic element. *Science*, (2014).
  11. P. A. Northcott, C. Lee, T. Zichner, A. M. Stutz, S. Erkek, D. Kawauchi, D. J. Shih, V. Hovestadt, M. Zapatka, D. Sturm, D. T. Jones, M. Kool, M. Remke, F. M. Cavalli, S. Zuyderduyn, G. D. Bader, S. VandenBerg, L. A. Esparza, M. Ryzhova, W. Wang, A. Wittmann, S. Stark, L. Sieber, H. Seker-Cin, L. Linke, F. Kratochwil, N. Jager, I. Buchhalter, C. D. Imbusch, G. Zipprich, B. Raeder, S. Schmidt, N. Diessl, S. Wolf, S. Wiemann, B. Brors, C. Lawerenz, J. Eils, H. J. Warnatz, T. Risch, M. L. Yaspo, U. D. Weber, C. C. Bartholomae, C. von Kalle, E. Turanyi, P. Hauser, E. Sanden, A. Darabi, P. Siesjo, J. Sterba, K. Zitterbart, D. Sumerauer, P. van Sluis, R. Versteeg, R. Volckmann, J. Koster, M. U. Schuhmann, M. Ebinger, H. L. Grimes, G. W. Robinson, A. Gajjar, M. Mynarek, K. von Hoff, S. Rutkowski, T. Pietsch, W. Scheurlen, J. Felsberg, G. Reifenberger, A. E. Kulozik, A. von Deimling, O. Witt, R. Eils, R. J. Gilbertson, A. Korshunov, M. D. Taylor, P. Lichter, J. O. Korbel, R. J. Wechsler-Reya, S. M. Pfister, Enhancer hijacking activates GFI1 family oncogenes in medulloblastoma. *Nature* **511**, 428-434 (2014).
  12. J. J. Molenaar, J. Koster, D. A. Zwijnenburg, P. van Sluis, L. J. Valentijn, I. van der Ploeg, M. Hamdi, J. van Nes, B. A. Westerman, J. van Arkel, M. E. Ebus, F. Haneveld, A. Lakeman, L. Schild, P. Molenaar, P. Stroeken, M. M. van Noesel, I. Ora, E. E. Santo, H. N. Caron, E. M. Westerhout, R. Versteeg, Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neuritogenesis genes. *Nature* **483**, 589-593 (2012).
  13. N. E. Kohl, N. Kanda, R. R. Schreck, G. Bruns, S. A. Latt, F. Gilbert, F. W. Alt, Transposition and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastomas. *Cell* **35**, 359-367 (1983).
  14. T. J. Pugh, O. Morozova, E. F. Attiyeh, S. Asgharzadeh, J. S. Wei, D. Auclair, S. L. Carter, K. Cibulskis, M. Hanna, A. Kiezun, J. Kim, M. S. Lawrence, L. Lichtenstein, A. McKenna, C. S. Peadarallu, A. H. Ramos, E. Shefler, A. Sivachenko, C. Sougnez, C. Stewart, A. Ally, I. Birol, R. Chiu, R. D. Corbett, M. Hirst, S. D. Jackman, B. Kamoh, A. H. Khodabakshi, M. Krzywinski, A. Lo, R. A. Moore, K. L. Mungall, J. Qian, A. Tam, N. Thiessen, Y. Zhao, K. A. Cole, M. Diamond, S. J. Diskin, Y. P. Mosse, A. C. Wood, L. Ji, R. Sposto, T. Badgett, W. B. London, Y. Moyer, J. M. Gastier-Foster, M. A. Smith, J. M. Guidry Auvil, D. S. Gerhard, M. D. Hogarty, S. J. Jones, E. S. Lander, S. B. Gabriel, G. Getz, R. C. Seeger, J. Khan, M. A. Marra, M. Meyerson, J. M. Maris, The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. *Nat Genet* **45**, 279-284 (2013).
  15. A. F. Smit, Interspersed repeats and other mementos of transposable elements in mammalian genomes. *Curr Opin Genet Dev* **9**, 657-663 (1999).
  16. J. Zhang, M. F. Walsh, G. Wu, M. N. Edmonson, T. A. Gruber, J. Easton, D. Hedges, X. Ma, X. Zhou, D. A. Yergeau, M. R. Wilkinson, B. Vadodaria, X. Chen, R. B. McGee, S. Hines-Dowell, R. Nuccio, E. Quinn, S. A. Shurtleff, M. Rusch, A. Patel, J. B. Becksfors, S. Wang, M. S. Weaver, L. Ding, E. R. Mardis, R. K. Wilson, A. Gajjar, D. W. Ellison, A. S. Pappo, C. H. Pui, K. E. Nichols, J. R. Downing, Germline Mutations in Predisposition Genes in Pediatric Cancer. *The New England journal of medicine* **373**, 2336-2346 (2015).
  17. G. M. Brodeur, K. E. Nichols, S. E. Plon, J. D. Schiffman, D. Malkin, Pediatric Cancer Predisposition and Surveillance: An Overview, and a Tribute to Alfred G. Knudson Jr. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **23**, e1-e5 (2017).

18. C. Feschotte, E. J. Pritham, DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. *Annu Rev Genet* **41**, 331-368 (2007).
19. R. Cordaux, M. A. Batzer, The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nat Rev Genet* **10**, 691-703 (2009).
20. D. Baltimore, Retroviruses and retrotransposons: the role of reverse transcription in shaping the eukaryotic genome. *Cell* **40**, 481-482 (1985).
21. M. Munoz-Lopez, J. L. Garcia-Perez, DNA transposons: nature and applications in genomics. *Curr Genomics* **11**, 115-128 (2010).
22. J. H. Keith, C. A. Schaeper, T. S. Fraser, M. J. Fraser, Jr., Mutational analysis of highly conserved aspartate residues essential to the catalytic core of the piggyBac transposase. *BMC Mol Biol* **9**, 73 (2008).
23. R. Mitra, J. Fain-Thornton, N. L. Craig, piggyBac can bypass DNA synthesis during cut and paste transposition. *EMBO J* **27**, 1097-1109 (2008).
24. A. B. Hickman, F. Dyda, Mechanisms of DNA Transposition. *Microbiol Spectr* **3**, MDNA3-0034-2014 (2015).
25. M. L. Pardue, O. N. Danilevskaya, K. L. Traverse, K. Lowenhaupt, Evolutionary links between telomeres and transposable elements. *Genetica* **100**, 73-84 (1997).
26. T. H. Eickbush, Telomerase and retrotransposons: which came first? *Science* **277**, 911-912 (1997).
27. T. M. Nakamura, G. B. Morin, K. B. Chapman, S. L. Weinrich, W. H. Andrews, J. Lingner, C. B. Harley, T. R. Cech, Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* **277**, 955-959 (1997).
28. P. Martinez, M. A. Blasco, Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. *Nature reviews. Cancer* **11**, 161-176 (2011).
29. M. Peifer, F. Hartwig, F. Roels, D. Dreidax, M. Gartlgruber, R. Menon, A. Kramer, J. L. Roncaioli, F. Sand, J. M. Heuckmann, F. Ikram, R. Schmidt, S. Ackermann, A. Engesser, Y. Kahlert, W. Vogel, J. Altmuller, P. Nurnberg, J. Thierry-Mieg, D. Thierry-Mieg, A. Mariappan, S. Heynck, E. Mariotti, K. O. Henrich, C. Gloeckner, G. Bosco, I. Leuschner, M. R. Schweiger, L. Savelyeva, S. C. Watkins, C. Shao, E. Bell, T. Hofer, V. Achter, U. Lang, J. Theissen, R. Volland, M. Saadati, A. Eggert, B. de Wilde, F. Berthold, Z. Peng, C. Zhao, L. Shi, M. Ortmann, R. Buttner, S. Perner, B. Hero, A. Schramm, J. H. Schulte, C. Herrmann, R. J. O'Sullivan, F. Westermann, R. K. Thomas, M. Fischer, Telomerase activation by genomic rearrangements in high-risk neuroblastoma. *Nature* **526**, 700-704 (2015).
30. A. R. Muotri, V. T. Chu, M. C. Marchetto, W. Deng, J. V. Moran, F. H. Gage, Somatic mosaicism in neuronal precursor cells mediated by L1 retrotransposition. *Nature* **435**, 903-910 (2005).
31. S. N. Schauer, P. E. Carreira, R. Shukla, D. J. Gerhardt, P. Gerdes, F. J. Sanchez-Luque, P. Nicoli, M. Kindlova, S. Ghisletti, A. D. Santos, D. Rapoud, D. Samuel, J. Faivre, A. D. Ewing, S. R. Richardson, G. J. Faulkner, L1 retrotransposition is a common feature of mammalian hepatocarcinogenesis. *Genome Res* **28**, 639-653 (2018).
32. K. H. Burns, Transposable elements in cancer. *Nature reviews. Cancer* **17**, 415-424 (2017).
33. A. D. Ewing, A. Gacita, L. D. Wood, F. Ma, D. Xing, M. S. Kim, S. S. Manda, G. Abril, G. Pereira, A. Makohon-Moore, L. H. Looijenga, A. J. Gillis, R. H. Hruban, R. A. Anders, K. E. Romans, A. Pandey, C. A. Iacobuzio-Donahue, B. Vogelstein, K. W. Kinzler, H. H. Kazazian, Jr., S. Solyom, Widespread somatic L1 retrotransposition occurs early during gastrointestinal cancer evolution. *Genome Res* **25**, 1536-1545 (2015).
34. H. H. Kazazian, Jr., C. Wong, H. Youssoufian, A. F. Scott, D. G. Phillips, S. E. Antonarakis, Haemophilia A resulting from de novo insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man. *Nature* **332**, 164-166 (1988).
35. E. C. Scott, E. J. Gardner, A. Masood, N. T. Chuang, P. M. Vertino, S. E. Devine, A hot L1 retrotransposon evades somatic repression and initiates human colorectal cancer. *Genome Res* **26**, 745-755 (2016).
36. E. Lee, R. Iskow, L. Yang, O. Gokcumen, P. Haseley, L. J. Luquette, 3rd, J. G. Lohr, C. C. Harris, L. Ding, R. K. Wilson, D. A. Wheeler, R. A. Gibbs, R. Kucherlapati, C. Lee, P. V. Kharchenko, P. J.

- Park, N. Cancer Genome Atlas Research, Landscape of somatic retrotransposition in human cancers. *Science* **337**, 967-971 (2012).
37. K. Hiom, M. Melek, M. Gellert, DNA transposition by the RAG1 and RAG2 proteins: a possible source of oncogenic translocations. *Cell* **94**, 463-470 (1998).
  38. D. G. Schatz, P. C. Swanson, V(D)J recombination: mechanisms of initiation. *Annu Rev Genet* **45**, 167-202 (2011).
  39. S. D. Fugmann, A. I. Lee, P. E. Shockett, I. J. Villey, D. G. Schatz, The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Annu Rev Immunol* **18**, 495-527 (2000).
  40. T. Komori, A. Okada, V. Stewart, F. W. Alt, Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes. *Science* **261**, 1171-1175 (1993).
  41. D. Liu, J. Bischerour, A. Siddique, N. Buisine, Y. Bigot, R. Chalmers, The human SETMAR protein preserves most of the activities of the ancestral Hsmar1 transposase. *Mol Cell Biol* **27**, 1125-1132 (2007).
  42. M. Shaheen, E. Williamson, J. Nickoloff, S. H. Lee, R. Hromas, Metnase/SETMAR: a domesticated primate transposase that enhances DNA repair, replication, and decatenation. *Genetica* **138**, 559-566 (2010).
  43. S. Majumdar, A. Singh, D. C. Rio, The human THAP9 gene encodes an active P-element DNA transposase. *Science* **339**, 446-448 (2013).
  44. A. F. Smit, A. D. Riggs, Tiggers and DNA transposon fossils in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1443-1448 (1996).
  45. A. Sarkar, C. Sim, Y. S. Hong, J. R. Hogan, M. J. Fraser, H. M. Robertson, F. H. Collins, Molecular evolutionary analysis of the widespread piggyBac transposon family and related "domesticated" sequences. *Mol Genet Genomics* **270**, 173-180 (2003).
  46. A. D. Bailey, L. T. Gray, T. Pavelitz, J. C. Newman, K. Horibata, K. Tanaka, A. M. Weiner, The conserved Cockayne syndrome B-piggyBac fusion protein (CSB-PGBD3) affects DNA repair and induces both interferon-like and innate antiviral responses in CSB-null cells. *DNA Repair (Amst)* **11**, 488-501 (2012).
  47. L. T. Gray, K. K. Fong, T. Pavelitz, A. M. Weiner, Tethering of the conserved piggyBac transposase fusion protein CSB-PGBD3 to chromosomal AP-1 proteins regulates expression of nearby genes in humans. *PLoS Genet* **8**, e1002972 (2012).
  48. T. Pavelitz, L. T. Gray, S. L. Padilla, A. D. Bailey, A. M. Weiner, PGBD5: a neural-specific intron-containing piggyBac transposase domesticated over 500 million years ago and conserved from cephalochordates to humans. *Mob DNA* **4**, 23 (2013).
  49. A. G. Henssen, E. Henaff, E. Jiang, A. R. Eisenberg, J. R. Carson, C. M. Villasante, M. Ray, E. Still, M. Burns, J. Gandara, C. Feschotte, C. E. Mason, A. Kentsis, Genomic DNA transposition induced by human PGBD5. *Elife* **4**, (2015).
  50. A. G. Henssen, R. Koche, J. Zhuang, E. Jiang, C. Reed, A. Eisenberg, E. Still, I. C. MacArthur, E. Rodriguez-Fos, S. Gonzalez, M. Puiggros, A. N. Blackford, C. E. Mason, E. de Stanchina, M. Gonen, A. K. Emde, M. Shah, K. Arora, C. Reeves, N. D. Socci, E. Perlman, C. R. Antonescu, C. W. M. Roberts, H. Steen, E. Mullen, S. P. Jackson, D. Torrents, Z. Weng, S. A. Armstrong, A. Kentsis, PGBD5 promotes site-specific oncogenic mutations in human tumors. *Nat Genet* **49**, 1005-1014 (2017).
  51. C. B. Mc, Maize genetics. *Year B Carnegie Inst Wash* **45**, 176-186 (1946).
  52. M. E. Halpern, Barbara McClintock on Defining the Unstable Genome. *Genetics* **204**, 3-4 (2016).
  53. B. McClintock, The significance of responses of the genome to challenge. *Science* **226**, 792-801 (1984).
  54. B. McClintock, The Fusion of Broken Ends of Chromosomes Following Nuclear Fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **28**, 458-463 (1942).
  55. Y. H. Gray, It takes two transposons to tango: transposable-element-mediated chromosomal rearrangements. *Trends Genet* **16**, 461-468 (2000).
  56. M. F. Greaves, J. Wiemels, Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nature reviews. Cancer* **3**, 639-649 (2003).

57. Y. Liu, J. Easton, Y. Shao, J. Maciaszek, Z. Wang, M. R. Wilkinson, K. McCastlain, M. Edmonson, S. B. Pounds, L. Shi, X. Zhou, X. Ma, E. Sioson, Y. Li, M. Rusch, P. Gupta, D. Pei, C. Cheng, M. A. Smith, J. G. Auvil, D. S. Gerhard, M. V. Relling, N. J. Winick, A. J. Carroll, N. A. Heerema, E. Raetz, M. Devidas, C. L. Willman, R. C. Harvey, W. L. Carroll, K. P. Dunsmore, S. S. Winter, B. L. Wood, B. P. Sorrentino, J. R. Downing, M. L. Loh, S. P. Hunger, J. Zhang, C. G. Mullighan, The genomic landscape of pediatric and young adult T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* **49**, 1211-1218 (2017).
58. C. G. Mullighan, The genomic landscape of acute lymphoblastic leukemia in children and young adults. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2014**, 174-180 (2014).
59. S. C. Raghavan, P. C. Swanson, Y. Ma, M. R. Lieber, Double-strand break formation by the RAG complex at the bcl-2 major breakpoint region and at other non-B DNA structures in vitro. *Mol Cell Biol* **25**, 5904-5919 (2005).
60. A. G. Tsai, H. Lu, S. C. Raghavan, M. Muschen, C. L. Hsieh, M. R. Lieber, Human chromosomal translocations at CpG sites and a theoretical basis for their lineage and stage specificity. *Cell* **135**, 1130-1142 (2008).
61. C. G. Mullighan, L. A. Phillips, X. Su, J. Ma, C. B. Miller, S. A. Shurtleff, J. R. Downing, Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science* **322**, 1377-1380 (2008).
62. E. Papaemmanuil, I. Rapado, Y. Li, N. E. Potter, D. C. Wedge, J. Tubio, L. B. Alexandrov, P. Van Loo, S. L. Cooke, J. Marshall, I. Martincorena, J. Hinton, G. Gundem, F. W. van Delft, S. Nik-Zainal, D. R. Jones, M. Ramakrishna, I. Titley, L. Stebbings, C. Leroy, A. Menzies, J. Gamble, B. Robinson, L. Mudie, K. Raine, S. O'Meara, J. W. Teague, A. P. Butler, G. Cazzaniga, A. Biondi, J. Zuna, H. Kempiski, M. Muschen, A. M. Ford, M. R. Stratton, M. Greaves, P. J. Campbell, RAG-mediated recombination is the predominant driver of oncogenic rearrangement in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* **46**, 116-125 (2014).
63. S. Hubner, G. Cazzaniga, T. Flohr, V. H. van der Velden, M. Konrad, U. Potschger, G. Basso, M. Schrappe, J. J. van Dongen, C. R. Bartram, A. Biondi, E. R. Panzer-Grumayer, High incidence and unique features of antigen receptor gene rearrangements in TEL-AML1-positive leukemias. *Leukemia* **18**, 84-91 (2004).
64. S. Swaminathan, L. Klemm, E. Park, E. Papaemmanuil, A. Ford, S. M. Kweon, D. Trageser, B. Hasselfeld, N. Henke, J. Mooster, H. Geng, K. Schwarz, S. C. Kogan, R. Casellas, D. G. Schatz, M. R. Lieber, M. F. Greaves, M. Muschen, Mechanisms of clonal evolution in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Immunol* **16**, 766-774 (2015).
65. A. Schramm, J. Koster, Y. Assenov, K. Althoff, M. Peifer, E. Mahlow, A. Odersky, D. Beisser, C. Ernst, A. G. Henssen, H. Stephan, C. Schroder, L. Heukamp, A. Engesser, Y. Kahlert, J. Theissen, B. Hero, F. Roels, J. Altmuller, P. Nurnberg, K. Astrahantseff, C. Gloeckner, K. De Preter, C. Plass, S. Lee, H. N. Lode, K. O. Henrich, M. Gartlgruber, F. Speleman, P. Schmezer, F. Westermann, S. Rahmann, M. Fischer, A. Eggert, J. H. Schulte, Mutational dynamics between primary and relapse neuroblastomas. *Nat Genet* **47**, 872-877 (2015).
66. A. G. Henssen, E. Jiang, J. Zhuang, L. Pinello, N. D. Socci, R. Koche, M. Gonen, C. M. Villasante, S. A. Armstrong, D. E. Bauer, Z. Weng, A. Kentsis, Forward genetic screen of human transposase genomic rearrangements *BMC Genomics* **17**, 548 (2016).
67. A. Ritz, A. Bashir, S. Sindi, D. Hsu, I. Hajirasouliha, B. J. Raphael, Characterization of structural variants with single molecule and hybrid sequencing approaches. *Bioinformatics* **30**, 3458-3466 (2014).
68. E. Disdero, J. Filee, LoRTE: Detecting transposon-induced genomic variants using low coverage PacBio long read sequences. *Mob DNA* **8**, 5 (2017).
69. T. Rausch, T. Zichner, A. Schlattl, A. M. Stutz, V. Benes, J. O. Korb, DELLY: structural variant discovery by integrated paired-end and split-read analysis. *Bioinformatics* **28**, i333-i339 (2012).
70. Z. Chong, J. Ruan, M. Gao, W. Zhou, T. Chen, X. Fan, L. Ding, A. Y. Lee, P. Boutros, J. Chen, K. Chen, novoBreak: local assembly for breakpoint detection in cancer genomes. *Nat Methods* **14**, 65-67 (2017).

71. V. Moncunill, S. Gonzalez, S. Bea, L. O. Andrieux, I. Salaverria, C. Royo, L. Martinez, M. Puiggros, M. Segura-Wang, A. M. Stutz, A. Navarro, R. Royo, J. L. Gelpi, I. G. Gut, C. Lopez-Otin, M. Orozco, J. O. Korbil, E. Campo, X. S. Puente, D. Torrents, Comprehensive characterization of complex structural variations in cancer by directly comparing genome sequence reads. *Nat Biotechnol* **32**, 1106-1112 (2014).
72. T. S. Alioto, I. Buchhalter, S. Derdak, B. Hutter, M. D. Eldridge, E. Hovig, L. E. Heisler, T. A. Beck, J. T. Simpson, L. Tonon, A. S. Sertier, A. M. Patch, N. Jager, P. Ginsbach, R. Drews, N. Paramasivam, R. Kabbe, S. Chotewutmontri, N. Diessl, C. Previti, S. Schmidt, B. Brors, L. Feuerbach, M. Heinold, S. Grobner, A. Korshunov, P. S. Tarpey, A. P. Butler, J. Hinton, D. Jones, A. Menzies, K. Raine, R. Shepherd, L. Stebbings, J. W. Teague, P. Ribeca, F. C. Giner, S. Beltran, E. Raineri, M. Dabad, S. C. Heath, M. Gut, R. E. Denroche, N. J. Harding, T. N. Yamaguchi, A. Fujimoto, H. Nakagawa, V. Quesada, R. Valdes-Mas, S. Nakken, D. Vodak, L. Bower, A. G. Lynch, C. L. Anderson, N. Waddell, J. V. Pearson, S. M. Grimmond, M. Peto, P. Spellman, M. He, C. Kandoth, S. Lee, J. Zhang, L. Letourneau, S. Ma, S. Seth, D. Torrents, L. Xi, D. A. Wheeler, C. Lopez-Otin, E. Campo, P. J. Campbell, P. C. Boutros, X. S. Puente, D. S. Gerhard, S. M. Pfister, J. D. McPherson, T. J. Hudson, M. Schlesner, P. Lichter, R. Eils, D. T. Jones, I. G. Gut, A comprehensive assessment of somatic mutation detection in cancer using whole-genome sequencing. *Nat Commun* **6**, 10001 (2015).
73. L. K. Alexandrov, J.; Haradhvala, N., J.; Huang, M., N.; Ng, A., W., T.; Boot, A.; Covington, K., R.; Gordenin, D., A.; Bergstrom, E.; Lopez-Bigas, N.; Klimczak, L., J.; McPherson, J., R.; Morganella, S.; Sabarinathan, R.; Wheeler, D., A.; Mustonen, V.; Getz, G.; Rozen, S., G.; Stratton, M. R., The Repertoire of Mutational Signatures in Human Cancer. *BioRxiv*, (2018).
74. M. Spielmann, D. G. Lupianez, S. Mundlos, Structural variation in the 3D genome. *Nat Rev Genet* **19**, 453-467 (2018).
75. O. L. Kantidze, A. K. Velichko, A. V. Luzhin, N. V. Petrova, S. V. Razin, Synthetically Lethal Interactions of ATM, ATR, and DNA-PKcs. *Trends Cancer* **4**, 755-768 (2018).
76. E. Lecona, O. Fernandez-Capetillo, Targeting ATR in cancer. *Nature reviews. Cancer* **18**, 586-595 (2018).
77. A. G. Henssen, C. Reed, E. Jiang, H. D. Garcia, J. von Stebut, I. C. MacArthur, P. Hundsdoerfer, J. H. Kim, E. de Stanchina, Y. Kuwahara, H. Hosoi, N. J. Ganem, F. Dela Cruz, A. L. Kung, J. H. Schulte, J. H. Petrini, A. Kentsis, Therapeutic targeting of PGBD5-induced DNA repair dependency in pediatric solid tumors. *Science translational medicine* **9**, (2017).
78. V. T. DeVita, Jr., E. Chu, A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res* **68**, 8643-8653 (2008).

## 6. Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
ATM	<i>“Ataxia Telangiectasia Mutated”</i> Kinase
ATR	<i>“Ataxia Telangiectasia And Rad3-Related”</i> Kinase
BCL2	<i>“B-Cell CLL/Lymphoma 2”</i> Protein
CAR	Chimärer Antigenrezeptor
CDH5	<i>“Cadherin 5, Type 2”</i> Protein
CGH	<i>“Comparative Genomic Hybridization”</i>
CRISPR	<i>“Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats”</i>
CSB	<i>“Cockayne Syndrome Protein”</i>
DNA	<i>“Deoxyribonucleic acid”</i>
DOCK8	<i>“Dedicator Of Cytokinesis 8”</i>
ETV6-RUNX1	<i>“Ets Variant Gene 6- Runt Related Transcription Factor 1”</i>
HPRT1	<i>“Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase”</i>
LINE-1	<i>“Long Interspersed Nuclear Element-1”</i>
MAPK	<i>“Mitogen-Activated Protein Kinase”</i>
PGBD1-5	<i>“PiggyBac Transposable Element-Derived Proteins 1-5”</i>
PSS	PGBD5 Signal Sequenz
PTPN14	<i>“Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 14”</i>
RAG1/2	<i>“Recombination-Activating Genes 1/2”</i>
RAS	<i>“Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog”</i>
RNA	<i>“Ribonucleic acid”</i>
RPE	<i>“Retinal Pigmental Epithelial Cells“</i>
RSS	<i>“Recombination Signal Sequences“</i>
shRNA	<i>“short hairpin RNA”</i>
SMRT	<i>“Single-Molecule Real-Time Sequencing”</i>
TERT	<i>“Telomerase Reverse Transcriptase”</i>
THAP9	<i>“THAP Domain-Containing Protein 9”</i>
TP53	Tumor Protein P53
V(D)J	<i>“Variable (V), diversity (D), joining (J) gene segments”</i>
YAP	<i>“Yes-Associated Protein 1”</i>

## **7. Danksagung**

Als erstes möchte ich Frau Prof. Dr. Angelika Eggert danken. Ohne Ihre Überzeugungsarbeit hätte ich meine Tätigkeit in der kinderonkologischen Forschung nicht aufgenommen. Sie hat mir nicht nur meinen Auslandsaufenthalt in den USA ermöglicht, sondern bestärkt mich stets darin, meinen eigenen Forschungs-Interessen und -Ideen zu folgen. Sie dient mir seit meinem Beginn in der Kinderonkologie als wichtiges Vorbild. Auch möchte ich Herrn Prof. Dr. Johannes H. Schulte sehr dafür danken, dass er mir meine ersten Schritte in der kinderonkologischen Forschung in seinem Labor ermöglicht hat und mir während meiner Arbeit an PGBD5 beratend zur Seite stand. Großer Dank gilt auch Dr. Alex Kentsis, bei dem ich als post-doctoral Research Fellow am Memorial Sloan Kettering Cancer Center in New York an PGBD5 arbeiten durfte, und der für mich ein sehr wichtiger wissenschaftlicher Mentor war und immer noch ist. Allen Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe verdanke ich, dass ich die hier aufgeführten Experimente durchführen konnte und viele der hier erwähnten Experimente wurden mit ihrer Hilfe durchgeführt. Insbesondere möchte ich Casie Reed, Fiona Brown, Eileen Jiang, Ian MacArthur, Avantika Dhabaria, Amy Eisenberg, Eric Still, Paolo Cifani, Michael Ortiz, Elizabeth Henaff und Richard Koche danken. Außerdem möchte ich der Arbeitsgruppe von Dr. Scott Armstrong und Dr. Christopher Mason danken. Beide Arbeitsgruppen waren mir wichtige Kooperationspartner und Mentoren während meines USA-Aufenthaltes. Nicht zuletzt möchte ich den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe in Berlin danken. Ohne Ihren Einsatz wäre es mir nicht möglich, neben Klinik und Lehre in diesem Maße Forschung zu betreiben.

Meinen Eltern Karen und Ulrich und meinen Schwestern Clara und Valerie möchte ich von ganzem Herzen danken, da sie mir zu jeder Zeit zur Seite standen und mich auch in Zeiten der Verzweiflung haben motivieren können. Clara möchte ich außerdem sehr für Ihre lektorische Hilfe danken. Meinen Freunden Amit Datta, Johannes Bommers und Konstantin Werhahn möchte ich dafür danken, dass sie auch während meiner Zeit in den USA stets präsent geblieben sind. Zuletzt möchte ich meiner Frau Amandine Rouillard danken, die mit ihrer großzügigen und fröhlichen Art mein Leben neben der Arbeit mit viel Glück erfüllt, und ohne die ich meine Arbeit sicherlich nicht so motiviert durchführen würde.



## 8. Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,

- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen

Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,

- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....  
Datum

.....  
Unterschrift