

Aus der Klinik für Urologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. Peter Albers

**Analyse der molekularbiologischen Wirkmechanismen
von CDK4/6-Inhibitoren in (Cisplatin-resistenten)
Keimzelltumoren**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Anna Sophie Winkelhausen

2022

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Daniel Nettersheim

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Hans Neubauer

Auflistung der Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Skowron, M.A., Vermeulen, M., Winkelhausen, A., Becker, T.K., Bremmer, F., Petzsch, P., Schönberger, S., Calaminus, G., Köhrer, K., Albers, P., Nettersheim, D., (2020), *CDK4/6 inhibition presents as a therapeutic option for paediatric and adult germ cell tumours and induces cell cycle arrest and apoptosis via canonical and non-canonical mechanisms*, British Journal of Cancer (123), 378–391

Zusammenfassung

Testikuläre Keimzelltumoren (KZT) stellen die häufigsten soliden Malignome bei jungen Männern zwischen 15-44 Jahren dar. Auch wenn die bisher eingesetzten Therapieoptionen aus Orchiektomie kombiniert mit einer (Cisplatin-basierten) Chemotherapie und/oder Radiotherapie hohe Erfolge erzielen, leiden viele Patienten unter den gravierenden Nebenwirkungen der Therapie oder entwickeln im Verlauf Resistenzen gegenüber den Chemotherapeutika. Daher besteht noch immer die Notwendigkeit, nach neuen Therapieoptionen für die betroffenen Patienten zu forschen.

In dieser Arbeit werden die CDK4/6-Inhibitoren Palbociclib und Ribociclib auf ihre molekularbiologischen Wirkmechanismen und Effekte in KZT-Zelllinien untersucht.

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass in KZT-Zelllinien und -Geweben CDK4 hoch exprimiert ist und somit den potenziellen Angriffspunkt einer CDK4/6-Inhibition darstellt. Zudem führt der Einsatz der beiden Inhibitoren zur Apoptose von KZT-Zelllinien. Erwartungsgemäß wird in den meisten Zelllinien ein Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus erzielt, manche Zelllinien arretieren jedoch in der G2/M-Phase. Da dies ungewöhnlich für CDK4/6-Inhibitoren ist, wird ein alternativer Wirkmechanismus jenseits der kanonischen CDK4-RB1-Wirkkaskade vermutet.

Stellvertretend wurden für jede histologische Entität ein bis zwei (Cisplatin-resistente) KZT-Zelllinien und eine gesunde Fibroblasten-Kontrollzelllinie verwendet und mit Palbociclib bzw. Ribociclib behandelt, um anschließend Western Blot- und qRT-PCR-Analysen sowie eine RNA-Sequenzierung durchzuführen. Mit den gewonnenen Daten wurden dann STRING-Interaktionsprognosen und Gene Ontology-Funktionsanalysen durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass in KZT- und Kontrollzellen hauptsächlich Gene dereguliert wurden, die mit Zellwachstumsprozessen wie Proliferation, Zellzyklus und Mitose assoziiert werden können. Diese Faktoren stellen somit eine allgemeine Zellantwort auf CDK4/6-Inhibition dar. Darüber hinaus konnten aber auch Gen-Netzwerke aufgedeckt werden, die individuell in den untersuchten Zelltypen dereguliert wurden. Diese Netzwerke konnten ebenfalls mit der Zellzyklusregulation assoziiert werden. Dies zeigt, dass CDK4/6-Inhibitoren in KZT- und Kontrollzellen zum einen eine universelle Reaktion hervorrufen und zum anderen zellspezifische Mechanismen aktivieren, um den Zellzyklus zu regulieren. Im Gegensatz zu Fibroblasten tolerieren KZT-Zellen diese Beeinflussung des Zellzyklus deutlich schlechter und induzieren Apoptose.

Abschließend sei angemerkt, dass in KZT-Zelllinien eine CDK4/6-Inhibitorbehandlung zu einer Hochregulation von CDK4 führte, was möglicherweise auf einen Kompensationsmechanismus hinweist und zu einer Resistenz führen könnte. Diese Beobachtung muss zukünftig weiter untersucht werden.

Summary

Testicular germ cell tumors (GCT) represent the most common solid malignancies in young men aged 15-44 years. Even though the previously used therapy options consisting of orchiectomy combined with (cisplatin-based) chemotherapy and/or radiotherapy achieve high success rates, many patients suffer from the serious side effects of the therapy or develop resistance to the chemotherapeutic agents during the course. Therefore, there is still a need to research new therapeutic options for the affected patients.

In this work, the CDK4/6 inhibitors palbociclib and ribociclib are investigated for their molecular mechanisms of action and effects in CCT cell lines. Preliminary work has shown that in GCT lines and -tissues, CDK4 is highly expressed and thus represents the potential target of CDK4/6 inhibition. Moreover, the use of both inhibitors leads to apoptosis of germ cell tumor cell lines. As expected, arrest in G1 phase of the cell cycle is achieved in most cell lines, but some cell lines arrest in G2/M phase. Because this is unusual for CDK4/6 inhibitors, an alternative mechanism of action beyond the canonical CDK4-RB1 cascade of action is suspected.

As a proxy, one to two (cisplatin-resistant) GCT cell lines for each histological entity and a healthy fibroblast control cell line were used and treated with palbociclib and ribociclib, respectively, followed by Western blot and qRT-PCR analyses and RNA sequencing. STRING interaction predictions and gene ontology function analyses were then performed with the data obtained.

It was shown that genes that can be associated with cell growth processes such as proliferation, cell cycle, and mitosis were mainly deregulated in CCT and control cells. These factors thus represent a general cell response to CDK4/6 inhibition. In addition, however, gene networks were also uncovered that were individually deregulated in the cell types studied. These networks could also be associated with cell cycle regulation. This indicates that CDK4/6 inhibitors in germ cell tumor and control cells both elicit a universal response and activate cell-specific mechanisms to regulate the cell cycle. In contrast to fibroblasts, GCT cells tolerate this cell cycle interference much worse and induce apoptosis. Finally, it should be noted that in GCT cell lines, CDK4/6 inhibitor treatment resulted in upregulation of CDK4, possibly indicating a compensatory mechanism and could lead to resistance. This observation needs further investigation in the future.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
AURKB	Aurorakinase B
BCA	Bicinchoninic Acid (Bicinchoninsäure)
BEP	Bleomycin, etoposide and platinum (Chemotherapie mit der Kombination aus Bleomycin, Etoposid und Cisplatin)
CDC	engl. Cell division control protein (=Zellteilungs-Kontrollprotein)
CHEK1	engl. Check point kinase 1 (=Kontrollpunkt Kinase 1)
CIP/KIP	engl. CDK interacting protein/kinase inhibitory protein
CDK4/6	engl. Cyclin dependent kinase 4/6 (=Zyclin-abhängige Kinase 4/6)
cDNA	engl. complementary DNA (=komplementäre DNA)
DDIT4	engl. DNA damage inducible transcript 4 (DNA-Schaden induziertes Transkript 4)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. Desoxyribonucleic acid (=Desoxyribonukleinsäure)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	engl. Estrogen Receptor (=Östrogen-Rezeptor)
FBS	Fötales Bovines Kälberserum
FCS	engl. Fetal Calf Serum (=Fetales Kälberserum)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCNIS	engl. Germ cell neoplasia in situ (=Keimzell-Neoplasie in situ)
HAUS	engl. Human augmin complex subunit
HER2	engl. Human epidermal growth factor 2 (=Humaner epidermaler Wachstumsfaktor 2)
HRP	engl. Horseradish peroxidase (=Merretich-Peroxidase)
KZT	Keimzelltumor
mRNA	messenger RNA
OS	engl. Overall survival (=Gesamtüberleben)
(p)RB	(phosphoryliertes) Retinoblastom-Protein
PBS	engl. Phosphate buffered saline (=Phosphatgepufferte Salzlösung)
PFS	engl. Progression free survival (=Progressionsfreies Überleben)
PGC	engl. Premordial germ cell (=primordiale Keimzelle)
PLK3	engl. Polo-like kinase 3
P/S	Penicillin/Streptomycin

qRT-PCR	engl. quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction (=quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion)
RIPA	Radioimmunpräzipitations-Assay
RNA	engl. Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RPLND	engl. Retroperitoneal lymph node dissection (=Retroperitoneale Lymphknotendissektion)
Rpm	engl. Rounds per minute (=Drehungen pro Minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
SDS(-PAGE)	engl. Sodium dodecyl sulfate (=Natriumdodecylsulfat (-Polyacrylamid-Gelelektrophorese))
UHRF1	Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1
VEGFA	engl. Vascular Endothelial Growth Factor (=vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Testikuläre Keimzelltumoren.....	1
1.2	Die Tumorgenese von testikulären Keimzelltumoren	2
1.3	Therapieoptionen und deren Grenzen bei testikulären Keimzelltumoren	3
1.4	Die CDK4/6-RB1-Achse des Zellzyklus und ihre Rolle in der Karzinogenese	6
1.5	Die CDK4/6-Inhibitoren Palbociclib und Ribociclib	8
1.6	Zielstellung dieser Arbeit.....	9
2.	Material und Methoden	11
2.1	Material.....	11
2.1.1	Humane KZT- und Kontroll-Zelllinien.....	11
2.1.2	Medien und Supplemente.....	11
2.1.3	Zellkultur	12
2.1.4	Verwendete CDK4/6-Inhibitoren.....	12
2.1.5	Chemikalien und Kits	13
2.1.6	Puffer und Lösungen für Western Blot-Analysen.....	15
2.1.7	Verwendete Antikörper.....	17
2.1.8	Oligonukleotid-Primer.....	19
2.1.9	Verbrauchsmaterialien	20
2.1.10	Geräte.....	21
2.1.11	Software.....	23
2.2	Methoden	23
2.2.1	Microarray-Analysen	23
2.2.2	Kultivierung und Passagieren der Zelllinien.....	23
2.2.3	Zellzählung.....	24
2.2.4	Behandlung und Ernte der Zellen.....	24
2.2.5	Proteinextraktion	24
2.2.6	BCA-Protein-Assay	25
2.2.7	SDS-Page und Western Blot-Analyse	26
2.2.8	RNA-Isolation und -Aufreinigung	27

2.2.9	cDNA-Synthese	28
2.2.10	Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)	28
2.2.11	RNA-Sequenzierung (RNA-Seq)	30
2.2.12	Online-Analyse-Tools	31
2.2.13	Statistik und Auswertung der Daten	31
3.	Ergebnisse	33
3.1	Die Expression Zellzyklus-assoziiierter Faktoren in Keimzelltumor-Zelllinien	33
3.2	Die CDK4/6- Inhibitoren Palbociclib und Ribociclib induzieren Apoptose	
	in Keimzelltumor-Zelllinien	35
3.3	Transkriptomweite Veränderungen der Genexpression unter Behandlung	
	in Keimzelltumor-Zelllinien	36
3.4	Validierung der RNA-Sequenzierungsdaten auf RNA- und Protein-Ebene	47
3.5	CDK4-Proteinlevel in Keimzelltumor-Zelllinien unter Behandlung mit	
	CDK4/6-Inhibitoren	52
4.	Diskussion	54
4.1	Das grundlegende Expressionsprofil von Keimzelltumor-Zelllinien	54
4.2	Die molekularen Effekte in Keimzelltumor-Zelllinien durch die Behandlung	
	mit Palbociclib und Ribociclib	56
4.3	Hochregulierung von <i>CDK4</i> als möglicher Resistenzmechanismus	63
4.4	Schlussfolgerung und Ausblick	66
5.	Literaturverzeichnis	67
6.	Anhang	73

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entstehung und histologische Einteilung testikulärer Keimzelltumore.....	3
Abbildung 2: Die Rolle der Zyklin D-CDK4/6-Achse im Zellzyklus.....	7
Abbildung 3: Strukturformeln von Palbociclib (1) und Ribociclib (2)	12
Abbildung 4: Expression Zellzyklus-assoziierte Gene in Keimzelltumor-Zelllinien	13
Abbildung 5: Proteinexpression des Apoptose-Markerenzym PARP	135
Abbildung 6: RNA-Qualitätsmessung... ..	14
Abbildung 7: Hauptkomponentenanalyse der RNA-Seq-Daten	38
Abbildung 8: Deregulierte Transkripte in Keimzelltumor- und Kontroll-Zelllinien	39
Abbildung 9: STRING-basierte Interaktions-Vorhersage der in allen Zelllinien deregulierten..... Gene.....	40
Abbildung 10: DAVID-basierte Gene Ontology (GO)-Analyse.....	41
Abbildung 11: Protein-Protein-Interaktions- und Gene Ontology-Funktionsanalyse der.... deregulierten Gene in den einzelnen Keimzelltumor-Entitäten und der gesunden..... Fibroblasten-Zelllinie	43
Abbildung 12: Protein-Protein-Interaktionsanalyse deregulierter Gene in der..... Keimzelltumor-Zelllinie 2102EP	45
Abbildung 13: Unter Behandlung deregulierte Transkripte in Keimzelltumor-Zelllinien..... und der Kontroll-Zelllinie.....	46
Abbildung 14: Relative Quantifizierung der mRNA-Expression ausgewählter Gene in mit.... Palbociclib behandelten Keimzelltumor-Zelllinien und der gesunden..... Fibroblasten-Kontrollzelllinie mittels qRT-PCR	48
Abbildung 15: Relative Quantifizierung der mRNA-Expression ausgewählter Gene in mit.... Ribociclib behandelten Keimzelltumor-Zelllinien und der gesunden..... Fibroblasten-Kontrollzelllinie mittels qRT-PCR	49
Abbildung 16: Western Blot-Analyse der angegebenen Zellzyklus-Regulatoren in mit..... Palbociclib bzw. Ribociclib behandelten Keimzelltumor-Zelllinien.....	51
Abbildung 17: Western Blot-Analyse der Aurorakinase B unter Behandlung mit Palbociclib und Ribociclib in Keimzelltumor-Zelllinien	52
Abbildung 18: Western Blot-Analyse von CDK4 unter CDK4/6-Inhibition in..... Keimzelltumor- und Kontroll-Zelllinien.....	53

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete KZT- und Kontroll-Zelllinien.....	11
Tabelle 2: Medien und Supplemente zur Kultivierung der jeweiligen Zelllinien	11
Tabelle 3: In der Zellkultur verwendete Materialien	12
Tabelle 4: Verwendete Substrate für die Proteinextraktion.....	13
Tabelle 5: Materialien und Kits für das BCA-Protein-Assay.....	13
Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Materialien für die SDS-Page und Western Blot-Analysen...	14
Tabelle 7: Materialien und Kits für die RNA-Isolation.....	14
Tabelle 8: Verwendetes Kit für die RNA-Aufreinigung	14
Tabelle 9: Übersicht über verwendete Materialien für die cDNA-Synthese	15
Tabelle 10: Übersicht über verwendete Materialien für die qRT-PCR-Analysen	15
Tabelle 11: Übersicht über Puffer und Lösungen für Western Blot-Analysen	17
Tabelle 12: Bei den Western Blot-Analysen verwendete primäre Antikörper mit Angabe..... der jeweiligen Blocking-Pufferlösung und Verdünnung	18
Tabelle 13: Bei den Western Blot-Analysen verwendete sekundäre Antikörper mit Angabe..... der jeweiligen Blocking-Pufferlösung und Verdünnung	19
Tabelle 14: Übersicht der bei den qRT-PCR-Analysen verwendeten Primer in Form..... der jeweiligen Nukleotidsequenzen.....	20
Tabelle 15: Allgemeine Verbrauchsmaterialien bei durchgeführten Laborarbeiten	21
Tabelle 16: Bei Laborarbeiten verwendete Geräte	23
Tabelle 17: Zur Auswertung der Versuchsergebnisse verwendete Software	23

1. Einleitung

1.1 Testikuläre Keimzelltumoren

Testikuläre Keimzelltumoren (KZT) machen zwar lediglich 1% aller Krebsentitäten in der männlichen Bevölkerung weltweit aus, jedoch stellen sie die häufigsten soliden Malignome bei jungen Männern in der Altersgruppe von 15-44 Jahren dar (Schmidt *et al.*, 2001) (Batool *et al.*, 2019) (de Vries *et al.*, 2020). Jährlich werden weltweit 50.000 neue Fälle von Hodenkrebs diagnostiziert, 10.000 der Patienten sterben infolge der Erkrankung. Dabei variieren die Inzidenzen stark zwischen verschiedenen Regionen, vor allem in den USA und in europäischen Ländern sind diese besonders hoch und stiegen sogar in den letzten Jahren weiter an (Farmanfarma *et al.*, 2018). Bei näherer Betrachtung lässt sich herausstellen, dass insgesamt ein Drittel all dieser Krankheitsfälle allein in Europa auftreten (Znaor *et al.*, 2020). Derzeitige Studien sagen vorher, dass bis zum Jahr 2025 sogar 23.000 neue Fälle von Hodenkrebs jährlich in Europa auftreten werden (Znaor *et al.*, 2020) (Le Cornet *et al.*, 2014). Warum ein Anstieg der Inzidenzen zu verzeichnen ist, bleibt bisher ungeklärt, obgleich einige Risikofaktoren für die Entwicklung von Hodentumoren bekannt sind. Eine Hauptkomponente, die zu einer Anfälligkeit für Keimzelltumoren des Hodens führt, ist die genetische Veranlagung, welche zu über 40% der Fälle beiträgt (Cheng *et al.*, 2018). So haben Männer mit einer positiven Familienanamnese und an Hodenkrebs erkrankten Verwandten ersten Grades ein deutlich erhöhtes Risiko, selbst im Laufe ihres Lebens solch einen Tumor zu entwickeln (Cheng *et al.*, 2018). Des Weiteren scheinen Umweltfaktoren, wie beispielsweise endokrin wirksame Chemikalien, das Erkrankungsrisiko zu fördern, sowohl bei pränataler als auch bei postnataler Exposition gegenüber diesen Faktoren (Giannandrea *et al.*, 2017). Dies wiederum trägt zu der Entwicklung weiterer Risikofaktoren bei, welche oft bei Männern mit Hodenkrebs evaluiert werden können. Dazu zählen der Kryptorchismus (Hodenhochstand) bzw. der Maldescensus testis (eine angeborene Fehlanlage der Hoden), Hypospadie (der Harnröhrenausgang mündet nicht an der physiologischen Stelle), eine verminderte Spermienproduktion und Infertilität sowie andere Störungen der Geschlechtsentwicklung. Außerdem erhöht das Vorhandensein eines Tumors der einen Seite das Risiko für die spätere Entwicklung eines weiteren Tumors des kontralateralen Hodens (Cheng *et al.*, 2018) (Batool *et al.*, 2019).

Unabhängig von den individuellen Risikofaktoren konnten verschiedene Anomalien auf dem kurzen Arm des Chromosom 12 (12p) als Merkmal für testikuläre KZT identifiziert werden (Cheng *et al.*, 2018). Im Detail ist ein Zugewinn an Genmaterial von 12p infolge einer Isochromosomenformation in mehr als 80% der invasiven Typ II- KZT auszumachen

(Looijenga *et al.*, 2003). Ein Isochromosom beschreibt ein Chromosom, das entweder aus zwei kurzen oder zwei langen Armen besteht, was aus einer fehlerhaften Teilung des Zentromers resultiert. Bei dem hier relevanten Isochromosom 12p geht folglich der lange Arm von Chromosom 12 verloren und der kurze Arm liegt hingegen dupliziert vor. Bei der anschließenden Zellteilung kommt es dann demzufolge zu einer veränderten bzw. gestörten genetischen Struktur (Cheng *et al.*, 2018) (Halahleh *et al.*, 2015). Es wird vermutet, dass die so verstärkte Amplifikation von Regionen auf 12p zu der Expression von Genen führt, welche für das invasive Wachstum von KZT-Zellen verantwortlich sind. Dazu zählen unter anderem *NANOG*, *GDF3* und *CCND2* (Ezeh *et al.*, 2005) (Sheikine *et al.*, 2012). *NANOG* (codiert für Homeobox Protein *NANOG*) und *GDF3* (codiert für Growth/Differentiation Factor 3) spielen eine Rolle in biologischen Prozessen von embryonalen Stammzellen, welche zu der Beibehaltung eines undifferenzierten, also pluripotenten Status der Zellen beitragen und somit zu der Fähigkeit dieser, in multiple Zelltypen zu differenzieren (Levine *et al.*, 2005) (Darr *et al.*, 2006). Es wird vermutet, dass dies zu der Tumorgenese bzw. Progression eines Tumors beiträgt (Ezeh *et al.*, 2005), beispielsweise durch die Suppression von Apoptose oder die Akkumulation von Mutationen in Gonozyten (Sheikine *et al.*, 2012). Die Überexpression des oben genannten 12p-Gens *CCND2* wird wiederum mit einem deregulierten G1-S-Übergang im Zellzyklus assoziiert und trägt so ebenfalls zu der Entwicklung von malignen KZT bei (Looijenga *et al.*, 2003). Der Stellenwert dieser zytogenetischen Beobachtungen als Marker für die Diagnostik und Beurteilung der Prognose bleibt jedoch weiterhin Gegenstand der Forschung (Cheng *et al.*, 2018) (Schmidt *et al.*, 2001).

1.2 Die Tumorgenese von testikulären Keimzelltumoren

Durch eine Störung in der Spermatogenese entsteht aus entarteten primordialen Keimzellen (Engl. *PGC = Premordial germ cell*) die sogenannte Keimzell-Neoplasie in situ (Engl. *GCNIS = Germ cell neoplasia in situ*), welche eine allgemeine Vorläuferläsion für maligne testikuläre KZT darstellt (Cheng *et al.*, 2018) (Fukawa *et al.*, 2018). Maligne, invasive Tumore, die aus dieser GCNIS entstehen, werden als Typ II-KZT bezeichnet und treten vorrangig bei Jugendlichen und jungen Männern auf. Auf ebendiese Typ II-KZT konzentriert sich diese Arbeit. Daneben entwickeln sich Typ I-KZT präpubertär bei Kindern unter 14 Jahren, entwickeln sich nicht aus einer GCNIS und weisen ein begrenzteres histologisches Spektrum auf (Abb.1) (Cheng *et al.*, 2018) (Pierce *et al.*, 2018).

Typ II-KZT werden anhand ihrer Histologie und Ursprungszellen in zwei große Subtypen unterteilt, die Seminome und die Nicht-Seminome. Die Seminome repräsentieren die Abstammung von der embryonalen Keimzelle und ähneln somit morphologisch und immunphänotypisch den PGC bzw. GCNIS (Cheng *et al.*, 2018) (Sheikine *et al.*, 2012).

1. Einleitung

Unter anderem durch die Überexpression bestimmter Pluripotenz-assoziiierter Gene können wiederum Nicht-Seminome aus der GCNIS hervorgehen und in ihren pluripotenten Zellstatus zurückfallen. Dadurch können sich dann aus einem pluripotenten, undifferenzierten Embryonalzellkarzinom die weiteren Subtypen der Nicht-Seminome, die Teratome, Dottersacktumore und Chorionkarzinome ausdifferenzieren (Abb.1) (Batool *et al.*, 2019) (Pierce *et al.*, 2018) (Sheikine *et al.*, 2012).

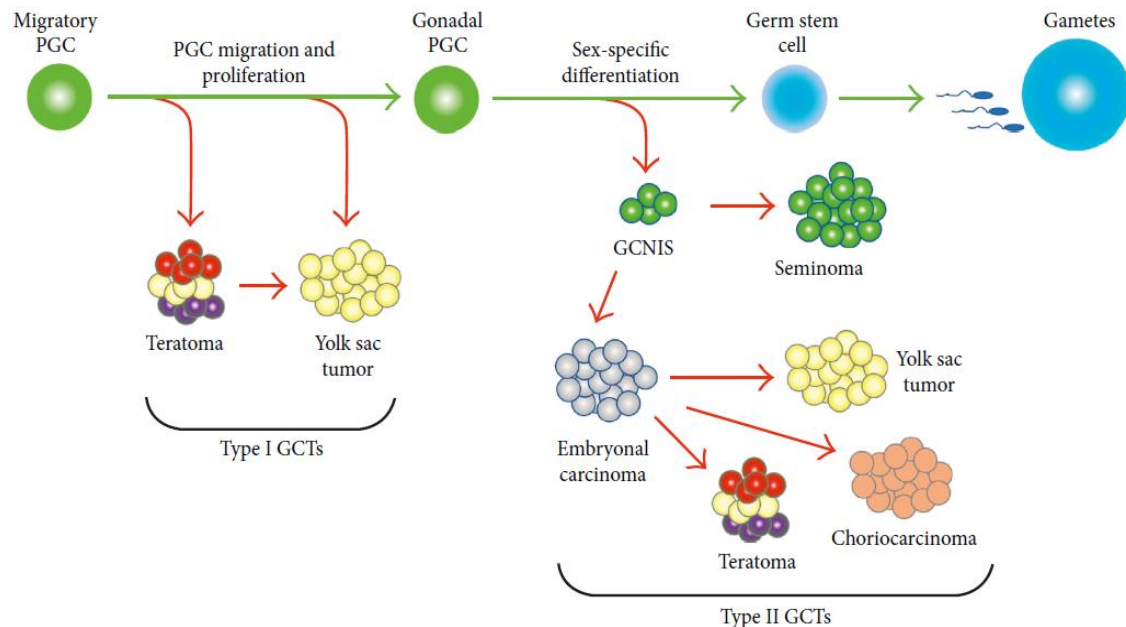


Abb.1: Entstehung und histologische Einteilung testikulärer Keimzelltumore

Typ I-KZT (links) entstehen in frühen Phasen der Embryogenese bei der Migration zur sich entwickelnden Gonade und weisen ein geringeres histologisches Spektrum auf (Teratome und Dottersacktumore). Typ II-KZT (rechts) entstehen hauptsächlich pubertär. Aus einer entarteten gonadalen primordialen Keimzelle (PGC= primordial germ cell) entstehen durch verschiedene Störungen der Spermiogenese GCNIS (Germ cell neoplasia in situ), die sich dann im Laufe der Zeit zu malignen, invasiven Karzinomen des Hodens weiterentwickeln können. Histologisch werden diese in Seminome und Nicht-Seminome eingeteilt. Zu den Nicht-Seminomen zählen, je nach weiterer Differenzierung, Embryonalkarzinome, Teratome, Dottersacktumore und Chorionkarzinome.

(Pierce *et al.*, 2018)

1.3 Therapieoptionen und deren Grenzen bei testikulären Keimzelltumoren

Welche Therapieform bei testikulären KZT gewählt wird, hängt zum einen vom klassifizierten Stadium des Tumors und zum anderen von dessen histologischer Entität ab. Ebenso wird die Prognose und die individuelle Vorstellung des Patienten vom therapeutischen Vorgehen miteinbezogen. Die Einteilung in die klinischen Stadien I (lokalisierter Tumor ohne Metastasierung), II (Beteiligung von Lymphknoten) oder III (Fernmetastasierung) erfolgt dabei anhand von Bildgebung und der Messung von Tumormarkern (Cheng *et al.*, 2018) (Albers *et al.*, 2011). Unabhängig von Tumorstadium und -entität erfolgt bei allen Patienten mit einem malignen Tumorbefund des Hodens zunächst eine primäre, radikale Orchiektomie (operative Entfernung des Hodens) der

betroffenen Seite. Anschließend folgt das individuelle Therapieregime, wobei dies wieder vom Tumorstadium und dem histologischen Befund abhängt (Baird *et al.*, 2018). Bei mehr als der Hälfte der Fälle handelt es sich um ein seminomatoßen Tumorbefund, davon wird die deutliche Mehrheit der Patienten bereits im Stadium I diagnostiziert (Baird *et al.*, 2018) (Cheng *et al.*, 2018). Bei diesen Patienten wird unter Berücksichtigung des Patientenwunsches und Risiko-adaptiert über die weitere Therapie entschieden. Sollten keine Risikofaktoren für einen Rückfall und somit eine gute Prognose vorliegen, so kann ein aktives, engmaschiges Überwachen des Patienten bereits ausreichen und sollte empfohlen werden. Bei einer Gefäßinfiltration des Rete testis und/oder einer Tumorgroße >4cm können zudem ein bis zwei Zyklen einer Chemotherapie mit Carboplatin erfolgen (Albers *et al.*, 2015) (Shin *et al.*, 2013).

Patienten mit einem Nicht-Seminom im Stadium I kann je nach Risiko ebenfalls ein aktives Überwachen angeboten werden. Patienten, die dies ablehnen oder bei denen eine Gefäßinfiltration vorliegt, wird zu einer Chemotherapie nach dem BEP-Schema geraten, welche sich aus Cisplatin, Bleomycin und Etoposid zusammensetzt (Cheng *et al.*, 2018). Bei Patienten im fortgeschrittenen Stadium IIA bzw. IIB mit regionalem Lymphknotenbefall (IIA: Lymphknoten <2cm, IIB: Lymphknoten 2-5cm) kommen im Falle eines Seminoms eine Chemotherapie mit drei Zyklen BEP oder eine Radiotherapie mit Bestrahlung der paraaortalen und ipsilateralen iliakalen Lymphknoten infrage. Die momentane Studienlage lässt dabei keine Aussage darüber zu, welche der beiden Optionen vorzuziehen ist (Albers *et al.*, 2015). Handelt es sich um ein Nicht-Seminom in Stadium IIA/IIB, wird die Höhe entsprechender Tumormarker in die Therapieentscheidung miteinbezogen. Bei erhöhten Tumormarkern erfolgen drei Zyklen einer BEP-Chemotherapie, gegebenenfalls gefolgt von der Resektion verbliebenen Tumorgewebes, während die Patienten mit niedrigen Tumormarkern zusätzlich einer radikalen RPLND (retroperitoneale Lymphadenektomie) unterzogen werden können (Cheng *et al.*, 2018) (Albers *et al.*, 2015).

Patienten mit KZT im weit fortgeschrittenen Stadium IIC (regionaler Lymphknoten >5cm) oder III (fortgeschrittene Lymphknoten- oder Fernmetastasierung) werden unabhängig der Histologie standardmäßig mit drei bis vier Zyklen einer BEP-Chemotherapie behandelt (Cheng *et al.*, 2018) (Shin *et al.*, 2013).

Insgesamt werden mit diesem Vorgehen hohe Heilungsraten erreicht. Nach der IGCCCG-Klassifikation (Engl. *International Germ Cell Cancer Collaborative Group*) werden Patienten zur Prognosebestimmung anhand vom Metastasierungszustand und Tumormarkerhöhe in drei Gruppen unterteilt. Im Vergleich zu Referenzmessungen der IGCCCG im Jahr 1997 stiegen die Raten bis 2019 für das 5-Jahres *PFS* (*Progression free survival*; Überleben ohne Fortschreiten der Krankheit) in der Gruppe der Patienten mit schlechter Prognose signifikant an, das *OS* (*Overall survival*; Gesamtüberleben) stieg in allen drei Prognosegruppen an (Gillesen *et al.*, 2019). Die prozentualen Angaben zu *PFS*- oder *OS*-

Rate variieren je nach Referenz in geringem Ausmaß, insgesamt werden ungeachtet der Tumorentität 5-Jahres *PFS*-Raten von ca. 80-90%, 65-75% und 41-48% in den Patienten mit guter, mittlerer bzw. schlechter Prognose erreicht, die 5-Jahres *OS*-Raten sind sogar etwas höher (Cheng *et al.*, 2018) (Gillesen *et al.*, 2019) (Hentrich *et al.*, 2021). So können zwar insgesamt Heilungsraten von über 90% erreicht werden, jedoch haben Patienten im metastasierten Stadium immer noch deutlich schlechtere Überlebenschancen. Es wurde beschrieben, dass zum Zeitpunkt der Diagnose bis zu 25% der Seminom- und 60% der Nicht Seminom-Patienten bereits metastatische Läsionen aufweisen und somit dieser Kategorie angehören (de Vries *et al.*, 2020) (Pietro *et al.*, 2005). Neben dieser Problematik gibt es weitere Faktoren, die den Therapieerfolg mindern. Beispielsweise treten bei manchen Patienten späte Rückfälle der Krankheit auf, wenn auch der Anteil mit 1,4% (Seminome) bzw. 3,2% (Nicht-Seminome) gering erscheint (de Vries *et al.*, 2020) (Albers *et al.*, 2015). Von einem späten Rückfall spricht man beim Auftreten eines Sekundärtumors nach zwei oder mehr Jahren Krankheitsfreiheit, wobei, dem jungen Alter der Patienten bei Diagnosestellung geschuldet, sogar Jahrzehnte bis zu solch einem Fall vergehen können (Shaughnessy *et al.*, 2015). Bei solch einem späten Rückfall müssen sich Patienten erneuten Chemotherapien und Operationen in spezialisierten Zentren unterziehen, die Prognose ist jedoch deutlich schlechter als bei der früheren Erkrankung (Shaughnessy *et al.*, 2015). Neben solchen Langzeitfolgen leiden einige Patienten auch unter unmittelbaren Krankheits- und Therapieauswirkungen. Unter anderem ist infolge einer Cisplatin-basierten Chemotherapie und Strahlentherapie das Risiko für sekundäre Malignitäten anderer Entitäten, wie z.B. Leukämie oder soliden Tumore des Magens, der Niere oder der Harnblase erhöht (Baird *et al.*, 2018), ebenso treten vermehrt kardiovaskuläre Erkrankungen auf (Cheng *et al.*, 2018). Allgemeine Nebenwirkungen der Chemotherapie, die die Lebensqualität der Patienten einschränken, sind darüber hinaus ein Verlust des Hörsinns oder periphere Neuropathien. Zusätzliche Folgen von Operationen wie der retroperitonealen Entfernung von Lymphknoten sind eine retrograde Ejakulation mit massiver Einschränkung oder Verlust der Fertilität (Cheng *et al.*, 2018).

Auch wenn die meisten Patienten all diese möglichen Nebenwirkungen und Folgeerscheinungen in Kauf nehmen, stellt ein übergreifendes Problem die Resistenzentwicklung gegenüber der Cisplatin-basierten Chemotherapie dar, auf der das therapeutische Management von KZT fußt. Ein Anteil von 3-5% der Patienten entwickeln im Verlauf eine Resistenz gegenüber Cisplatin durch bisher nicht gänzlich geklärte Mechanismen. Einen relevanten Faktor bei der Resistenzentwicklung können epigenetische Prozesse wie der DNA-Methylierungsstatus sein (de Vries *et al.*, 2020). Eine erhöhte DNA-Methylierung kann mit einer Cisplatin-Resistenz in Verbindung gebracht werden, das Maß an DNA-Methylierung beeinflusst dabei sogar, wie sensibel die einzelnen Tumorentitäten gegenüber Cisplatin sind (Singh *et al.*, 2019) (de Vries *et al.*, 2020). Des

Weiteren konnten die zelluläre Detoxifikation, die DNA-Reparatur und Modifikationen von apoptotischen Signalwegen hin zu einer durch DNA-Schäden induzierten Apoptose als mögliche Mechanismen für die erworbene Resistenz von testikulären KZT herausgestellt werden (Singh *et al.*, 2019).

Da alternative therapeutische Optionen für den Fall eines Therapieversagens fehlen, ist die Prognose schlecht und die meisten dieser Patienten versterben oft nach wenigen Monaten (Lobo *et al.*, 2020).

Zusammenfassend sind die schweren, unmittelbaren Nebenwirkungen der Therapie, deren Langzeitfolgen und die Resistenz gegenüber Cisplatin weiterhin präsent, limitierende Faktoren beim Management von Patienten mit Hodenkrebs.

1.4 Die CDK4/6-RB1-Achse des Zellzyklus und ihre Rolle in der Karzinogenese

Damit eine Zelle sich teilen kann, muss sie den Zellzyklus vollständig durchlaufen. Im Zellzyklus finden unter anderem die DNA-Replikation und die Chromosomensegregation statt. Diese Reihe an Prozessen wird streng an verschiedenen Stellen im Zellzyklus reguliert, um einerseits mögliche Schäden in der DNA rechtzeitig reparieren zu können und andererseits so die korrekt replizierten Chromosomen gleichermaßen auf zwei Tochterzellen aufzuteilen (Goel *et al.*, 2018). Der gesamte Zellzyklus-Prozess wird dabei hauptsächlich über die Komplexbildung zweier Untereinheiten, den Kinasen und deren Zyklin-Partnern, gesteuert. Diese Komplexe steuern über die Phosphorylierung verschiedener Proteine deren Aktivierung oder Inhibierung (Calzone *et al.*, 2008). Zu diesen Proteinen zählt unter anderem auch das Retinoblastom-Protein (RB oder RB1), ein Tumorsuppressor-Protein, das eine Schlüsselrolle am Kontrollpunkt vom Übergang der G1- zur S-Phase einnimmt und über den Zyklin D-CDK4/6-RB1-Signalweg reguliert wird (Calzone *et al.*, 2008). Über die Regulation dieses Kontrollpunktes am Anfang des Zellzyklus wird gewährleistet, dass vor Beginn der irreversiblen Zellteilung die nötigen Bedingungen herrschen und keine geschädigte DNA weiter durch den Zellzyklus geschleust wird (Jingwen *et al.*, 2017) (Tripathy *et al.*, 2017).

Sobald promotische Signale, beispielsweise durch die Aktivierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren und dem Einleiten verschiedener mitogener Signalwege, überwiegen, steigt die Expression von Typ D-Zyklinen an (Goel *et al.*, 2018). Daraufhin assoziiert Zyklin D mit CDK4 und CDK6 (Cyclin dependent kinase 4 bzw. 6) zu einem aktiven Komplex, welcher wiederum in den Zellkern eintritt und dort anschließend RB1 phosphoryliert (Abb.2) (O'Leary *et al.*, 2016). Solange RB1 hypophosphoryliert ist, unterdrückt es durch seine Bindung an Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie die Transkription von Genen, die für ein Fortschreiten im Zellzyklus notwendig sind. Durch die vermehrte Phosphorylierung und

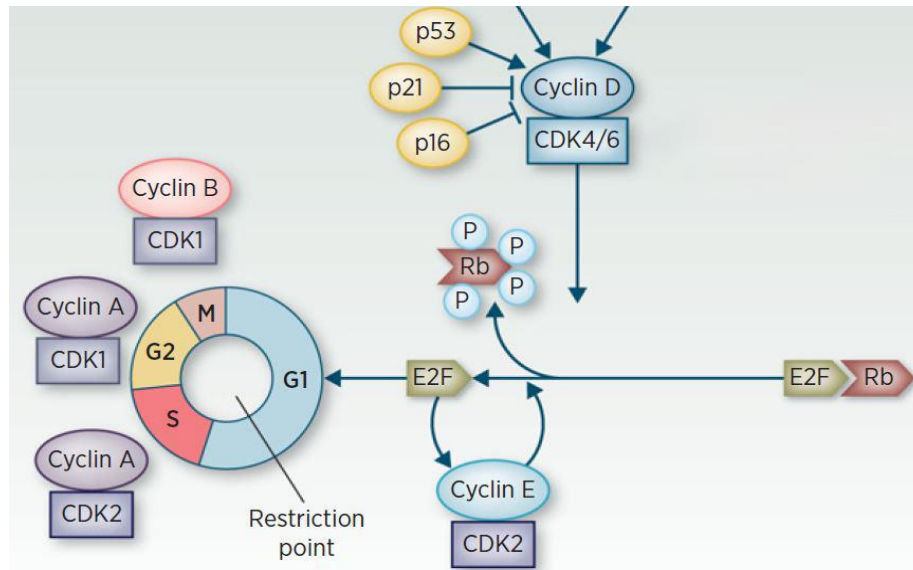


Abb.2: Die Rolle der Zyklin D-CDK4/6-RB-Achse im Zellzyklus

Dieser Signalweg findet in der späten G1-Phase bzw. am Übergang zur S-Phase am sogenannten Restriktionspunkt (*restriction point*) statt. Verschiedene mitogene Signalwege (hier im Bild abgeschnitten) initiieren die vermehrte Synthese von Zyklin D, welches dann einen Komplex mit CDK4/6 bildet und diese Kinasen damit aktiviert. Dieser aktive Komplex phosphoryliert RB, was die Bindung dieses Tumorsuppressor-Proteins an E2F-Transkriptionsfaktoren auflöst. So freigesetzte E2F können nun die Expression von Genen induzieren, die für die weiteren Zellzyklus-Phasen benötigt werden, wie zum Beispiel Zyklin E und CDK2. An folgenden Kontrollpunkten im Zellzyklus sind weitere Zyklin-CDK-Komplexe aktiv. Negative Regulatoren des Zyklin D-CDK4/6-Komplexes stellen p16 und p21 dar, p53 entfaltet indirekt über eine Induktion der p21-Expression ebenfalls eine inhibierende Wirkung.

Diese Abbildung wurde modifiziert nach (Tripathy *et al.*, 2017).

damit Inaktivierung von RB1 wird dessen inhibierende Wirkung auf die E2F-Transkriptionsfaktoren aufgehoben und ermöglicht nun so die Expression von E2F-Zielgenen (Abb.2) (Goel *et al.*, 2018) (O'Leary *et al.*, 2016). So werden dann durch eine positive Feedback-Schleife Typ E-Zykline exprimiert, welche wiederum CDK2 und andere Proteine aktivieren, die für die Initiierung der S-Phase relevant sind (Abb.2) (O'Leary *et al.*, 2016). Anschließend können die restlichen Phasen des Zellzyklus durchlaufen werden. Die so erreichte Zellproliferation ist vor allem wichtig für Wachstum und Regeneration eukaryotischer Zellen. Kommt es jedoch zu einer Dysregulation der Kontrollmechanismen im Zellzyklus, vermehren sich ungehindert aberrante Zellen, die im Verlauf entarten und so zu der Entwicklung von Krebs führen können (Jingwen *et al.*, 2017). Dysregulationen oder Mutationen speziell im Zyklin D-CDK4/6-RB-Signalweg können in nahezu allen Formen humaner Krebsarten nachgewiesen werden (Calzone *et al.*, 2008) und äußern sich häufig zugunsten einer Zellzyklus-Progression und fortwährendem Wachstum (Tripathy *et al.*, 2017). So konnte die Amplifikation von Genen, die für Typ D-Zykline kodieren, weithin in Krebszellen nachgewiesen und mit erhöhten Levels an Zyklin D-Proteinen korreliert werden (Goel *et al.*, 2018), beispielsweise in Brustkrebs, Lungenkrebs oder Ovarialkrebs (O'Leary

et al., 2016) (Tripathy *et al.*, 2017). Erhöhte Expressionslevel besonders von Zyklin D2 konnten in Hodentumoren gezeigt und mit einer Deregulation des Zyklin D-CDK4/6-Signalweges in Zusammenhang gebracht werden (Jingwen *et al.*, 2017). Darüber hinaus ist auch die Amplifikation von CDK4 und eine erhöhte CDK6-Expression in verschiedenen Krebsentitäten verbreitet, z.B. in Brustkrebs, Gebärmutterhalskrebs und Ovarialkrebs (Jingwen *et al.*, 2017) (Tripathy *et al.*, 2017) sowie Hodenkrebs (Schmidt *et al.*, 2001). Eine weitere verbreitete Dysregulation des beschriebenen Signalweges besteht in einer Inaktivierung oder dem Verlust des für p16 kodierenden Gens, was in einer verminderten inhibitorischen Bremse des CDK4/6-Komplexes mündet (O'Leary *et al.*, 2016) (Tripathy *et al.*, 2017). Neben diesen genannten Faktoren spielt außerdem die Inaktivierung oder Mutationen von RB1 und dem daraus resultierendem Verlust dessen tumorsuppressiver Funktionen eine entscheidende Rolle in der Tumorgenese vieler Krebsentitäten, auch von Hodenkrebs (Giacinti *et al.*, 2006) (Schmidt *et al.*, 2001) (Strohmeyer *et al.*, 1991). Zusammengefasst können viele Faktoren zu einer Dysregulation des Zyklin D-CDK4/6-RB-Signalweges beitragen und so durch einen inkorrekt regulierten und übermäßig aktiven Zellzyklus zu der Entwicklung von Krebs beitragen. Dabei spielen Mutationen, Amplifikationen oder auch epigenetische Mechanismen wie die DNA-Methylierung der in diesem Signalweg involvierten Gene eine Rolle (Goel *et al.*, 2018) (Jingwen *et al.*, 2017).

1.5 Die CDK4/6-Inhibitoren Palbociclib und Ribociclib

In dieser Arbeit wurde sich mit dem Einsatz der zwei CDK4/6-Inhibitoren Palbociclib und Ribociclib in KZT-Zelllinien sowie deren Wirkmechanismen in diesen befasst. Da die bisher eingesetzten Therapieansätze bei an Hodenkrebs erkrankten Patienten wie bereits beschrieben ab einem gewissen Punkt limitiert sind und an ihre Grenzen stoßen, ist die Suche nach neuen bzw. zusätzlichen Therapieoptionen Gegenstand aktueller Forschung. Durch die Dysregulation verschiedener Faktoren des CDK4/6-RB-Signalweges und der nachgewiesenen Expression entsprechender Zielgene wie *CDK4* oder *RB* in Keimzelltumoren, erscheint die Untersuchung von CDK4/6-Inhibitoren in KZT-Zelllinien sinnvoll und wurde daher näher beleuchtet.

Palbociclib (Synonym: PD-0332991; Handelsname: Ibrance®) von Pfizer und Ribociclib (Synonym: LEE011; Handelsname: Kisqali®) von Novartis sind zwei von insgesamt drei bekannten spezifischen CDK4/6-Inhibitoren, die zurzeit in mehreren klinischen Studien sowohl als Mono- als auch als Kombinationstherapie getestet und in bestimmten Patientengruppen bereits eingesetzt werden (Jingwen *et al.*, 2017) (Schettini *et al.*, 2018). Die oral aktiven Präparate Palbociclib und Ribociclib sind sich in der chemischen Struktur sehr ähnlich und binden an der Adenosintriphosphat-Bindungsstelle der Zyklin D-abhängigen Kinasen 4 und 6 (CDK4/6), was zur Inaktivierung des Zyklin D-CDK4/6-

1. Einleitung

Komplexes führt und in einem Zellzyklus-Arrest mit nachfolgender Apoptose der angegriffenen Zellen mündet (O’Leary *et al.*, 2016) (Schettini *et al.*, 2018).

Als erster Vertreter der Gruppe von CDK4/6-Inhibitoren wurde Palbociclib 2015 in Rahmen der PALOMA-1-Studie von der Food and Drug Administration (FDA) in den USA als Kombinationstherapie mit dem Aromataseinhibitor Letrozol für Patientinnen mit ER-positivem, HER2-negativem und metastasiertem Brustkrebs zugelassen. Mittlerweile haben auch Abemaciclib und Ribociclib die Zulassung durch die FDA erhalten und werden in zahlreichen präklinischen und klinischen Studien in Hinblick auf ihren therapeutischen Nutzen bei Brustkrebs und auch anderen Krebsentitäten untersucht (Wagner *et al.*, 2020) (Schettini *et al.*, 2018). Beispielhaft wird der Einsatz von CDK4/6-Inhibitoren allein oder in Kombination in malignen Tumoren der Lunge, des Pankreas, der Prostata oder des Gehirns erforscht (Zhao *et al.*, 2019) (O’Leary *et al.*, 2016) (Wagner *et al.*, 2020). Als weiteres Beispiel erwies sich Ribociclib als wirksam in der Inhibition von Ovarialkarzinom-Zellen und -Geweben, auch in solchen, die eine Resistenz gegen Cisplatin aufwiesen (Iyengar *et al.*, 2018).

Daher stellt sich an dieser Stelle die Frage, inwieweit die genannten Inhibitoren auch in testikulären KZT erfolgreich eingesetzt und auf lange Sicht Teil des Therapieregimes werden könnten.

1.6 Zielstellung dieser Arbeit

Vor dem Hintergrund, dass Hodenkrebs noch immer eine letale Bedrohung für viele junge Männer darstellt und das derzeitige therapeutische Vorgehen nicht für alle betroffenen Patienten suffiziente Erfolge erzielen kann, ist die Suche nach neuen oder ergänzenden Therapieoptionen von großer Bedeutung.

In Vorarbeiten des urologischen Forschungslabors wurde im Rahmen dessen das Potential der CDK4/6-Inhibitoren Palbociclib und Ribociclib als molekulare Wirkstoffe zur Behandlung von Cisplatin-sensitiven und -resistenten KZT-Zelllinien analysiert. Als Grundlage der Vorarbeiten und somit auch für dieses Projekt konnte zunächst eine im Vergleich zu Normal- bzw. Kontrollgeweben erhöhte Expression von CDK4 sowie dessen Zielprotein RB1 (und der durch Phosphorylierung aktivierten Form pRB1) auf RNA- und Proteinebene nachgewiesen werden (Anhang 1 und 2). Somit konnte an dieser Stelle CDK4 bzw. die CDK4-(p) RB1-Achse als potenzielles Primärziel der verwendeten Inhibitoren angenommen werden.

Des Weiteren konnte mit Hilfe von XTT-Assay basierten Viabilitätsprüfungen gezeigt werden, dass sowohl Cisplatin-sensitive als auch -resistente Zelllinien sensitiv auf die CDK4/6-Inhibition durch Palbociclib und Ribociclib reagieren (Anhang 3). Durch die Behandlung mit den Inhibitoren wird erwartungsgemäß ein Zellzyklusarrest in der G1-

1. Einleitung

Phase induziert. Allerdings konnte ebenfalls festgestellt werden, dass manche Zelllinien stattdessen in der G2- und M-Phase des Zellzyklus arretieren. Darüber hinaus konnte eine zusätzliche Apoptose-Induktion in manchen KZT-Zelllinien nachgewiesen werden (Anhang 4). Da beide Beobachtungen eher untypische bzw. unerwartete Effekte von CDK4/6-Inhibitoren sind, verleitete dies dazu zu postulieren, dass es einen alternativen Wirkmechanismus der CDK4/6-Inhibition abseits der kanonischen CDK4/6-RB1-Achse geben könnte.

Basierend auf den genannten Erkenntnissen gilt es nun in dieser Arbeit, die molekularbiologischen Effekte und Wirkmechanismen aufzuschlüsseln, welche in den KZT-Zelllinien durch die medikamentöse CDK4/6-Inhibition induziert werden. Dazu sollen sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene Faktoren herausgestellt werden, die durch eine Behandlung in ihrer Expression bzw. Translation verändert werden. Dies bezieht sich zunächst auf die direkten Zielgene bzw. -proteine, die wie zu erwarten durch eine CDK4/6-Inhibition dereguliert werden. Dadurch soll der kanonische Wirkmechanismus nachvollzogen werden. In einem nächsten Schritt werden dann weitere Faktoren aufgezeigt, die ebenfalls in relevantem Maße von einer CDK4/6-Inhibition beeinflusst werden, um so Rückschlüsse darauf ziehen zu können, welche Mechanismen für einen G2/M-Arrest und eine Apoptose-Induktion verantwortlich sein könnten. Dabei werden die Effekte von Palbociclib und Ribociclib miteinander verglichen und auch Auswirkungen auf eine gesunde Fibroblasten-Zelllinie als Kontrolle erfasst.

Insgesamt wird das Ziel gestellt, die durch eine CDK4/6-Inhibition induzierten Effekte in KZT-Zelllinien zu analysieren und aufzuschlüsseln. Dadurch soll langfristig der therapeutische Nutzen solcher Inhibitoren in der Behandlung von Hodenkrebs besser eingeschätzt werden können. Zudem werden Aspekte beleuchtet, welche sich als problematisch herausstellen und den Einsatz von Palbociclib bzw. Ribociclib limitieren könnten, damit dort in weiterer Forschung angesetzt werden kann.

2. Material und Methoden

Studiennummer des Ethikvotums: 2018-254-FmB

2.1 Material

2.1.1 Humane KZT- und Kontroll-Zelllinien

Hier aufgeführt sind die verwendeten KZT-Zelllinien und die Kontroll-Zelllinie sowie deren Ursprungsgewebe und das Geschlecht der Patienten, aus denen die jeweiligen Zellen gewonnen wurden.

Zelllinie	Ursprung	Geschlecht
TCam-2	Seminom	Männlich
2102EP (-R) *	Embryonalzellkarzinom	Männlich
NCCIT (-R) *	Embryonalzellkarzinom	Männlich
NT2/ D1 (-R) *	Embryonalzellkarzinom	Männlich
JAR	Chorionkarzinom	Weiblich
JEG-3	Chorionkarzinom	Weiblich
MPAF	Adulte Fibroblasten	Männlich

Tabelle 1: Verwendete KZT- und Kontroll-Zelllinien

* Mit (-R) markiert: Cisplatin-resistente Embryonalzellkarzinom-Zelllinien

Die Cisplatin-Resistenz wurde hervorgerufen durch die Kultivierung dieser Zelllinien mit steigenden, subletalen Konzentrationen von Cisplatin.

2.1.2 Medien und Supplemente

Zelllinie	Medium	Supplemente	Hersteller	Ort
TCam-2 NCCIT (-R)	RPMI Medium 1640 (1x)	10% FCS 1% Penicillin, Streptomycin 1% L-Glutamin	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Schwerte (Dtl.)
2102EP (-R) JAR JEG-3 NT2/ D1 (-R)	DMEM (1x) GlutaMAX-I	10% FCS Penicillin, Streptomycin L-Glutamin	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Schwerte (Dtl.)
MPAF	DMEM (1x) GlutaMAX-I	10% FCS 1% Penicillin, Streptomycin 1% L-Glutamin NEAA	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Schwerte (Dtl.)

Tabelle 2: Medien und Supplemente zur Kultivierung der jeweiligen Zelllinien

2.1.3 Zellkultur

Material	Hersteller	Ort
0,05% Trypsin-EDTA (1x)	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Schwerte (Dtl.)
Penicillin / Streptomycin 1000 U/ml	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Schwerte (Dtl.)
Dulbeccos phosphate buffered saline (DPBS)	Sigma-Aldrich Life Science	Darmstadt (Dtl.)
Fetales bovines Kälberserum (FBS, FCS)	Biochrom/ Merck	Berlin (Dtl.)
L-Glutamin 200 mM (100x)	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Schwerte (Dtl.)
MEM NEAA (100x) Minimum Essential Medium, Non-essential Amino Acids	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Schwerte (Dtl.)
Trypanblau	Sigma-Aldrich Life Science	Darmstadt (Dtl.)

Tabelle 3: In der Zellkultur verwendete Materialien

2.1.4 Verwendete CDK4/6-Inhibitoren

- (1) Palbociclib (Ibrance®) *Pfizer Inc.*
- (2) Ribociclib (Kisqali®) *Novartis Pharma AG*

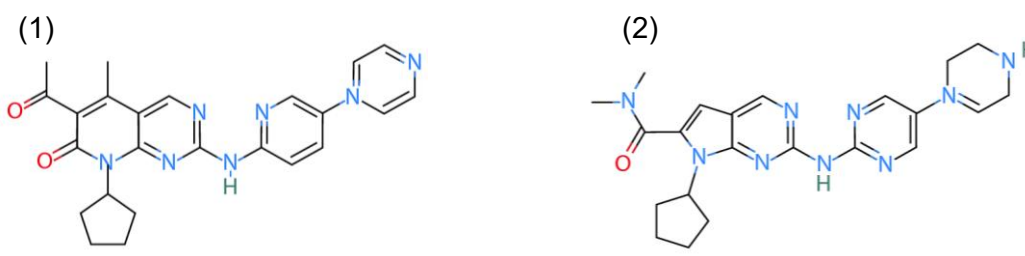


Abb.3: Strukturformeln von Palbociclib (1) und Ribociclib (2)

(Freissmuth, 2020)

Palbociclib wurde in destilliertem Wasser (Aq. dest, pH 3) und Ribociclib in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst.

Diese verwendeten CDK4/6-Inhibitoren wurden von Pfizer bzw. Novartis unentgeltlich zur Verfügung gestellt (MTA-Nr. WI238366 und PLSMTA18FEB46 an Prof. Dr. Daniel Nettersheim).

2.Material und Methoden

2.1.5 Chemikalien und Kits

Proteinextraktion

Material	Hersteller	Ort
Phosphatase-Inhibitor Cocktail 3	Sigma-Aldrich Life Science	Darmstadt
Protease-Inhibitor	Sigma-Aldrich Life Science	Darmstadt

Tabelle 4: Verwendete Substrate für die Proteinextraktion

BCA-Protein-Assay

Material	Hersteller	Ort
Albumin Standard	Thermo Scientific	Rockford (USA)
Ampuwa® Wasser für Injektionszwecke	Fresenius Kabi GmbH	Bad Homburg (Dtl.)
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific	Rockford (USA)

Tabelle 5: Materialien und Kits für das BCA-Protein-Assay

SDS-Page und Western-Blot

Material	Hersteller	Ort
Rotiphorese Gel 30, Acrylamid-Stammlösung mit 0,8% Bisacrylamid (PAA)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe (Dtl.)
Tris (hydroxymethyl) aminomethane (TRIS, Trometamol)	VWR Prolabo Chemicals	Darmstadt (Dtl.)
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich Life Science	Darmstadt (Dtl.)
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (Temed)	Sigma-Aldrich Life Science	Darmstadt (Dtl.)
RotiLoad (4x Konz.)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe (Dtl.)
Proteinleiter Page Ruler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific	Litauen
Ponceau S	Carl Roth GmbH	Karlsruhe (Dtl.)

2.Material und Methoden

Essigsäure 100%	Merck	Darmstadt (Dtl.)
10x Tris/ Glycin/ SDS (TGS)	Bio-Rad Laboratories GmbH	München (Dtl.)
Methanol	VWR Chemicals BDH Prolabo	Darmstadt (Dtl.)
10x Tris/Glycine Puffer (TG)	Bio-Rad Laboratories GmbH	München (Dtl.)
SDS ultra pure (Dodecylsulfat)	CarlRoth GmbH	Karlsruhe (Dtl.)
Whatman™ Gel Blot Papier	GE Healthcare	Buckinghamshire (GB)
Nitrocellulose Immobilon-P Transfer Membranen	Merck	Darmstadt (Dtl.)
Milchpulver	Carl Roth GmbH	Karlsruhe (Dtl.)
BSA (Bovine Serum Albumin)	PAN Biotech	Aidenbach (Dtl.)
Natriumchlorid (NaCl)	Merck	Darmstadt (Dtl.)
Salzsäure (HCl, 25%)	Merck	Darmstadt (Dtl.)
Tween	Merck	Darmstadt (Dtl.)
2-Mercaptoethanol	Sigma Life Science	Darmstadt (Dtl.)
Detektionsreagent Clarity Western ECL Substrate	Bio-Rad Laboratories	München (Dtl.)

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Materialien für die SDS-Page und Western Blot-Analysen

RNA-Isolation

Material	Hersteller	Ort
RNeasy® Mini Kit (250)	Qiagen GmbH	Hilden (Dtl.)
Ethanol absolute	VWR International GmbH	Darmstadt (Dtl.)
2-Mercaptoethanol	Sigma Life Science	Darmstadt (Dtl.)

Tabelle 7: Materialien und Kits für die RNA-Isolation

RNA-Aufreinigung

Material	Hersteller	Ort
RNA Clean & Concentrator-Kit	Zymo Research	Freiburg (Dtl.)

Tabelle 8: Verwendetes Kit für die RNA-Aufreinigung

2.Material und Methoden

cDNA-Synthese

Material	Hersteller	Ort
RNase freies Wasser	Sigma Aldrich	Darmstadt (Dtl.)
dNTP-Mix (10 mM)	Thermo Fisher Scientific	Schwerte (Dtl.)
Oligo(dT) ₁₈ Primer	Thermo Fisher Scientific	Schwerte (Dtl.)
RT Buffer	Thermo Fisher Scientific	Schwerte (Dtl.)
Maxima H Minus Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific	Schwerte (Dtl.)
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific	Schwerte (Dtl.)

Tabelle 9: Übersicht über verwendete Materialien für die cDNA-Synthese

Quantitative Realtime-PCR

Material	Hersteller	Ort
Luna Universal qPCR Master Mix	New England BioLabs GmbH	Frankfurt am Main (Dtl.)
384-Well PCT Platten	Bio-Rad Laboratories GmbH	München (Dtl.)
384-Well Skirted PCR Platten	4titude/ Brooks Life Sciences	Berlin (Dtl.)
Schutzklebefolien für PCR-Platten (Microseal B)	Bio-Rad Laboratories GmbH	München (Dtl.)

Tabelle 10: Übersicht über verwendete Materialien für die qRT-PCR-Analysen

2.1.6 Puffer und Lösungen für Western Blot-Analysen

Puffer/ Lösung	Endkonzentration	Menge
<u>RIPA-Protein-Lyse-Puffer</u>		
NaCl	150mM	3ml
NP-40	1%	1ml
DOC	0,5%	0,5g
SDS 10%	0,1%	1ml
EDTA 0,5 M	1mM	200µl
Tris (pH 7,6) 1 M	50mM	5ml
Millipore H ₂ O		auf 100ml
Protase Inhibitor	1%	10µl auf 1ml
Phosphatase Inhibitor	1%	10µl auf 1ml
<u>Tris (pH 6,8) *</u>	1M	24,33g auf 200ml
Tris (MW= 121,14 g/l)		

2.Material und Methoden

Millipore H ₂ O		
<u>Tris (pH 8,8) *</u> Tris (MW= 121,4 g/l) Millipore H ₂ O	1,5M	36,3g auf 200ml
<u>Trenngel (2 Gele)</u> Millipore H ₂ O PAA 30% 1,5 M Tris (pH 8,8) SDS (10%) APS (10%) Tetramethylethyldiamin (Temed)	12%	3,3ml 4ml 2,5ml 0,1ml 0,1ml 0,005ml
<u>Sammelgel (2 Gele)</u> Millipore H ₂ O PAA 30% 1M Tris (pH 6,8) SDS (10%) APS (10%) Tetramethylethyldiamin (Temed)		3,4ml 0,83ml 0,63ml 0,05ml 0,05ml 0,005ml
<u>Elektrophoresepuffer</u> 10x Tris/Glycin/SDS (TGS) Millipore H ₂ O	1x	100ml auf 1l
<u>Blottingspuffer/ Transferpuffer</u> Methanol 10% Tris/Glycin (TG) Millipore H ₂ O	10% 1%	200ml 100ml auf 1l
<u>Ponceau-Färbung</u> Millipore H ₂ O Essigsäure (100%) Ponceau-S Farbstoffpulver	0,5% 10%	45ml 5ml 0,25g
<u>Blocking-Lösung (5% Milch)</u> Milchpulver TBS-T	5%	2,5g auf 50ml
<u>Blocking-Lösung (5% BSA)</u> BSA TBS-T	5%	2,5g auf 50ml

2.Material und Methoden

<u>SDS (20%)</u>		
SDS	20%	10g
Millipore H ₂ O		auf 50ml
<u>10x TBS (pH 7,6)*</u>		
Tris	0,5 M	24g
NaCl	1,5 M	88g
Millipore H ₂ O		auf 1L
<u>Waschlösung (TBS-T)</u>		
10x TBS	1x	200ml
Tween		2ml
Millipore H ₂ O		auf 2l
<u>Strippingpuffer</u>		
SDS (20%)		5ml
Tris (pH 8,8)		3,125ml
2-Mercaptoethanol		390µl
Millipore H ₂ O		auf 50ml

Tabelle 11: Übersicht über Puffer und Lösungen für Western Blot-Analysen

* die jeweiligen pH-Werte wurden mit 25% HCl eingestellt.

2.1.7 Verwendete Antikörper

Primäre Antikörper

Antikörper/ Zielprotein	Klon	Hersteller	Ort	Katalog- Nr.	Blocking- Puffer	Verdünnung
β-ACTIN	AC-15	Sigma-Aldrich	Darmstadt (Dtl.)	Sc- 47778	5% Milch	1:10000- 1:30000
GAPDH	6C5	Abcam	Cambridge (GB)	Ab8245	5% Milch	1:30000
RB1	D20	Cell Signaling Technology	Frankfurt am Main (Dtl.)	9319S	5% Milch/ 5% BSA	1:500
pRB1	ab4784	Abcam	Cambridge (GB)	40615	5% Milch	1:1000
CDK4	DCS31	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg (Dtl.)	56277	5% Milch	1:1500

2.Material und Methoden

CDK6	B10	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg (Dtl.)	Sc-7961	5% Milch	1:1000
Cyclin D1	92G2	Cell Signaling Technology	Frankfurt am Main (Dtl.)	2978	5% Milch	1:1000
Cyclin D2	G132-43	BD Pharmingen	Franklin Lakes (New Jersey, USA)	554200	5% Milch	1:500
Cyclin A	H-432	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg (Dtl.)	Sc-751	5% Milch	1:1000
Cyclin B1	H-433	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg (Dtl.)	Sc-752	5% Milch	1:1000
Cyclin E	HE-12	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg (Dtl.)	Sc-247	5% Milch	1:1000
E2F-1	KH95	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg (Dtl.)	Sc-251	5% Milch	1:1000
E2F-3	PG30	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg (Dtl.)	Sc-5665	5% Milch	1:1000
CDC37	E-4	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg (Dtl.)	13129	5%Milch	1:1000
Cleaved PARP	D214	Cell Signaling Technology	Frankfurt am Main (Dtl.)	9541S	5% Milch	1:500
PARP	46D11	Cell Signaling Technology	Frankfurt am Main (Dtl.)	9532S	5% Milch	1:1000

Tabelle 12: Bei den Western Blot-Analysen verwendete primäre Antikörper mit Angabe der jeweiligen Blocking-Pufferlösung und Verdünnung

2.Material und Methoden

Sekundäre Antikörper

Antikörper/ Zielprotein	Hersteller	Ort	Katalog- Nr	Blocking- Puffer	Verdünnung
Goat Anti- Mouse IgG- HRP	Dako	Darmstadt (Dtl.)	P026002-2	5% Milch/ 5% BSA	1:1000
Goat Anti- Rabbit IgG- HRP	Dako	Darmstadt (Dtl.)	P044801-2	5% Milch/ 5% BSA	1:2000

Tabelle 13: Bei den Western Blot-Analysen verwendete sekundäre Antikörper mit Angabe der jeweiligen Blocking-Pufferlösung und Verdünnung

2.1.8 Oligonukleotid-Primer

Die folgenden Oligonukleotid-Primer für die quantitative Realtime-PCR wurden bei Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Dtl.) kommerziell erworben. Zuvor wurden diese mit Hilfe der Webseiten <https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/> bzw. <http://www.rtpimerdb.org/> gesucht und anhand einer In-silico-PCR eine Qualitätskontrolle durchgeführt (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>).

Die Primer wurden entsprechend der Angaben des dazugehörigen Datasheets gelöst und vor ihrer Verwendung 1:10 mit RNase freiem Wasser verdünnt.

Die Schmelztemperatur beträgt bei allen Primern 60°C.

Gen	Forward primer	Reverse primer
CDK1	AAACTACAGGTCAAGTGGTAGCC	TCCTGCATAAGCACATCCTGA
CDK4	ATGGCTACCTCTCGATATGAGC	CATTGGGGACTCTCACACTCT
CDKN1A	TGGAGACTCTCAGGGTCGAAA	GCGTTTGGAGTGGTAGAAATC
CCND1	TACTACCGCCTCACACGCTTC	TTCGATCTGCTCCTGGCAG
CCND2	GCTGGCTAAGATCACCAACACA	CCTCAATCTGCTCCTGGCAA
CCND3	TACCCGCCATCCATGATCG	AGGCAGTCCACTTCAGTGC
CCNA1	TAGACACCGGCACACTCAAG	AGGAGAGATGAATCTACCAGCAT
CCNA2	CGCTGGCGGTACTGAAGTC	GAGGAACGGTGACATGCTCAT
CCNB1	AGCTGCTGCCTGGTGAAGAG	GCCATGTTGATCTTCGCCTTA
CCNB2	CCGACGGTGTCCAGTGATTT	TGTTGTTTTGGTGGGTTGAACT
CCNE1	CCACACCTGACAAAGAAGATGAT GAC	GAGCCTCTGGATGGTGCAATAAT
E2F1	ACGTGACGTGTCAGGACCT	GATCGGGCCTTGTTTGCTCTT

2.Material und Methoden

E2F3	AAAGCCCCTCCAGAAACAAGA	CCTTGGGTACTTGCCAAATGT
E2F4	CACCACCAAGTTCGTGTCCC	GCGTACAGCTAGGGTGTCA
E2F5	TGGCAACTCAAAATCTGCCTG	TTGTAGTCATCTGCCGGGGTA
E2F6	TCCATGAACAGATCGTCATTGC	TCCGTTGGTGCTCCTTATGTG
E2F7	TAGCTCGCTATCCAAGTTATCCC	CAATGTCATAGATGCGTCTCCTT
RB1	ATGGCTACCTCTCGATATGAGC	GCTTGGTTAACTTGGGAGAA
VEGFA	AGGGCAGAATCATCACGAAGT	AGGGTCTCGATTGGATGGCA
DDIT4	GGACCAAGTGTGTTTGTGTTTG	CACCCACCCCTTCCTACTCTT
AURKB	CGCAGAGAGATCGAAATCCAG	AGATCCTCCTCCGGTCATAAAA
UHRF1	GCCATACCCTCTTCGACTACG	GCCCCAATTCCGTCTCATCC
FOS	GAGAGCTGGTAGTTAGTAGCATG TTGA	AATTCCAATAATGAACCCAATAGA TTAGTTA
GAPDH	TGCCAAATATGATGACATCAAGAA	GGAGTGGGTGTCGCTGTTG

Tabelle 14: Übersicht der bei den qRT-PCR-Analysen verwendeten Primer in Form der jeweiligen Nukleotidsequenzen

2.1.9 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller	Ort
Pipette 10µl, mittelgrau	Eppendorf	Hamburg (Dtl.)
Pipette 100µl, gelb	Eppendorf	Hamburg (Dtl.)
Pipette 1000µl, blau	Eppendorf	Hamburg (Dtl.)
Pipettenspitzen TipOne Gratuated Filter Tips (sterile) 1-200µl, 100µl, 1000µl	Star Lab	Ahrensberg (Dtl.)
Gestopfte Pipettenspitzen 10µl, 100µl, 1250µl	Greiner Bio One International GmbH	Frickenhausen (Dtl.)
Mikroreaktionsgefäß Safe-Lock Tubes 0,5ml, 1,5ml, 2,0ml	Eppendorf	Hamburg (Dtl.)
qRT-PCR Stripes, Multiply®-µStrip Pro 8er Kette	Sarstedt AG	Nümbrecht (Dtl.)
Glas-Pasteur-Pipetten	Brand GmbH+CO KG	Wertheim (Dtl.)
15ml, 50ml Greinerröhrchen	Greiner Bio One International GmbH	Frickenhausen (Dtl.)

2.Material und Methoden

Corning™ Stripette 2ml, 5ml, 10ml, 25ml	Fisher Scientific GmbH	Schwerte (Dtl.)
Gelektrophoresekammer PowerPac Basic 300V/400mA/75W	Bio-Rad Laboratories GmbH	München (Dtl.)
Gel-Glasplatten Mini- PROTEAN® Glass Plates	Bio-Rad Laboratories GmbH	München (Dtl.)
Gel-Kurzglasplatten Mini- PROTEAN® Short plates	Bio-Rad Laboratories GmbH	München (Dtl.)
Zellzähler-Glaskammern Counting slides Dual Chamber for Cell Counter	Bio-Rad Laboratories GmbH	München (Dtl.)
Wägepapier 250 Blatt 10x13cm	neoLab Migge GmbH	Heidelberg, Deutschland

Tabelle 15: Allgemeine Verbrauchsmaterialien bei durchgeführten Laborarbeiten

2.1.10 Geräte

Material	Hersteller	Ort
Transfergerät BioRAD Trans- Blot®Turbo Transfer System	Bio-Rad Laboratories GmbH	München (Dtl.)
Western Blot Detektionsgerät BioRAD ChemiDoc™ Imaging System	Bio-Rad Laboratories GmbH	München (Dtl.)
Vortexer Vortex Genie 2	Scientific Industries	New York (USA)
Pipettierhelfer PipetusÖ	Hirschmann Laborgeräte	Eberstadt (Dtl.)
Minizentrifuge myFuge™Mini	Benchmark Scientific Inc.	Edison (USA)
Zentrifuge Microcentrifuge ventilated Micro Star12	VWR International GmbH	Darmstadt (Dtl.)
Rollschüttler ST5 CAT	neoLab Migge GmbH	Heidelberg (Dtl.)
Thermozykler S1000TM Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH	München (Dtl.)
qRT-PCR Thermalzykler	Bio-Rad Laboratories GmbH	München (Dtl.)

2.Material und Methoden

CFX384 Real-Time System C1000 Touch Thermal Cycler		
Kühlzentrifuge Allegra™ 2IR Centrifuge	Beckman Coulter GmbH	Krefeld (Dtl.)
Waage LC3201D Max 3200 g	Sartorius Corporate Administration GmbH Sartorius	Göttingen (Dtl.)
Eppendorf Thermomixer comfort 1,5 ml	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf (Dtl.)
Wasserbad	Köttermann GmbH	Uetze (Dtl.)
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH	Burgwedel (Dtl.)
Zentrifuge Eppendorf Centrifuge 5810	Eppendorf	Hamburg (Dtl.)
ELISA Plattenlesegerät FluoStar Optima Microplate Reader	BMG Labtech	Ortenberg (Dtl.)
Spektrophotometer Nano Drop 2000	Thermo Fisher Scientific	Waltham (Massachusetts, USA)
Inkubator HERACELL 150i CO2 Incubator	Thermo Fisher Scientific	Waltham (Massachusetts, USA)
Zellzähler BioRAD TC20™ Automated Cell Counter	Bio-Rad Laboratories GmbH	München (Dtl.)
Sterilbank Gelaire Flow Laboratories BSB4A	Scientific Partners Australia	Canning Vale (Austr.)
Mikroskop Nikon Eclipse Ts ²	Nikon GmbH	Düsseldorf (Dtl.)
Mikroskop Nikon Eclipse TE2000-S	Nikon GmbH	Düsseldorf (Dtl.)
Nikon Quecksilberdampf- Kurzbogenlampe HBO	Nikon GmbH	Düsseldorf (Dtl.)

2.Material und Methoden

103W/2		
Conrad Power Manager	Conrad Electronic SE	Düsseldorf (Dtl.)
Nikon Digital Sight DS-U3	Nikon GmbH	Düsseldorf (Dtl.)
Hula Mixer Sample Mixere	Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific	Carlsbad (Kalifornien, USA)

Tabelle 16: Bei Laborarbeiten verwendete Geräte

2.1.11 Software

Name	Hersteller	Version
Bio-Rad CFX Maestro	Bio-Rad Laboratories GmbH	1.1(4.1.2433.1219)
NanoDrop 2000/2000c	Thermo Fisher Scientific	1.6
OPTIMA	BMG Labtech	
ImageJ	Wayne Rasband	1.52a

Tabelle 17: Zur Auswertung der Versuchsergebnisse verwendete Software

2.2 Methoden

2.2.1 Microarray-Analysen

Das Verfahren der Microarray- Analysen dient dazu, Aussagen über das Expressionsprofil der mRNA von tausenden Genen in einer Probe machen zu können. Vorausgehend wurde für die Analyse von KZT-Geweben dazu ein Affymetrix-Expressions-Array verwendet (Eckert et al.,2008) und im Kontext dieser Arbeit reevaluiert. Bei den KZT-Zelllinien wurden die Daten eines Illumina-Expressions-Arrays früherer Studien genutzt, welche via Gene Expression Omnibus (GEO; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) frei verfügbar sind (GSE71239, GSE71269, GSE79065, GSE60698).

2.2.2 Kultivierung und Passagieren der Zelllinien

Um ein konstantes Wachstum zu gewährleisten, wurden die Zelllinien zusammen mit ihren spezifischen Supplementen (siehe Tabelle 2) in T-75 Zellkultur-Flaschen in DMEM- bzw. RPMI-Medium inkubiert. Die Temperatur im Inkubator betrug dabei 37 °C bei einem CO₂-Gehalt von 5%.

Die humanen Zelllinien wurden bei einer Konfluenz von 70% (KZT-Zelllinien und resistente Subklone) bzw. 90% (Kontroll-Zelllinie) unter sterilen Bedingungen alle drei bis vier Tage in der Zellkultur passagiert. Dazu wurde zuerst das Zellkulturmedium der T-75-Flasche abgesaugt und die adhärennten Zellen mit 4 ml PBS gewaschen. Um die Zellen wieder von dem Boden der Flasche zu lösen, wurde das PBS wieder abgesaugt und 1 ml Trypsin (0,05%) hinzugegeben. Diese Trypsinierung für ca. drei Minuten bei 37°C führt zu einer

2. Material und Methoden

Auflösung von Zellkontakten bzw. –adhäsionen. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von 4 ml FCS-haltigem Medium gestoppt.

Zum Schluss wurde in eine neue T-75-Flasche jeweils 15 ml des entsprechenden Zellmediums vorgelegt und in dieses ein Teil der Zellsuspension in einem bestimmten Splittungsverhältnis überführt.

2.2.3 Zellzählung

Zur Zellzählung wurde ein automatischer Zellzähler (TC20™, BioRad) verwendet. Dafür wurden 10 µl Trypanblau (0,4%) mit 10 µl der jeweiligen Zellsuspension in einem Reaktionsgefäß durch Auf- und Abpipettieren miteinander vermischt und davon wiederum 10 µl in eine Zählkammer gegeben. Der Zellzähler ermittelte die Zellzahl pro Milliliter und die Anzahl vitaler Zellen in Prozent.

Zum Aussäen der Zellen wurde dann die gewünschte Menge ausgezählter Zellen in einem entsprechenden Volumen an Medium angesetzt und in Zellkultur-Platten pipettiert.

2.2.4 Behandlung und Ernte der Zellen

Zur Behandlung der Zellen mit den CK4/6-Inhibitoren wurden pro 10 cm-Schale 2×10^6 Zellen in 8 ml Medium ausgesät und nach ca. 24 Stunden mit den Inhibitoren behandelt. Palbociclib wurde dabei in einer Konzentration von 10 µM und Ribociclib in einer Konzentration von 25 µM verwendet. Wie unter 2.1.4 angegeben wurden die Inhibitoren jeweils in Aq. dest. pH 3 bzw. DMSO gelöst.

Das alte Medium wurde aus den Schalen abgesaugt und die adhärenen Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Inhibitoren zusammen mit dem jeweiligen Lösungsmittel in 8 ml neuem Medium gelöst und auf die jeweiligen Schalen appliziert. Die Behandlung der Zellen mit den Inhibitoren erfolgte über 16 Stunden bei 37°C im Inkubator. Nach dieser Inkubationszeit wurde zum Ernten der behandelten Zellen das Medium wieder abgenommen, die adhärenen Zellen mit 1 ml PBS pro Well gewaschen und 300 µl Trypsin hinzugegeben. Dadurch lösten sich die Zellen von den Böden der Platten nach ca. 3 Minuten Inkubation bei 37°C. Zum Stoppen der Trypsinierung wurde Medium hinzugefügt und die Zellsuspension zu selben Anteilen entsprechend ihres Volumens auf Reaktionsgefäße oder Zentrifugenröhrchen für eine darauffolgende Protein- und RNA-Extraktion aufgeteilt.

2.2.5 Proteinextraktion

Um die Proteine extrahieren zu können, wurden die Zellsuspensionen für fünf Minuten bei 10.000 rpm abzentrifugiert. Danach wurde das Medium bis auf das Zellpellet abgenommen. Dieses Pellet wurde dann mit PBS gewaschen und erneut für fünf Minuten bei 10.000 rpm abzentrifugiert. Das PBS wurde anschließend bis auf das Zellpellet abgesaugt und diesem,

2.Material und Methoden

entsprechend seiner Größe, 50-70 µl RIPA-Proteinlyse-Puffer (mit 1% Phosphatase- und 1% Protease-Inhibitor) zugefügt und darin gelöst. Daraufhin folgte eine weitere Zentrifugation in der Kühltzentrifuge für 15 Minuten bei 6°C und 11.400 rpm. Danach konnte der Überstand mit den darin enthaltenen Proteinen von den restlichen Zellbestandteilen im Pellet getrennt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Die so gewonnenen Proteine wurden bei -20°C gelagert.

2.2.6 BCA-Protein-Assay

Das BCA (Bicinchoninsäure)-Protein-Assay dient der kolorimetrischen Bestimmung der Menge an Proteinen in einer Probe.

Für dieses Verfahren wurde das BCA Protein Assay Kit angewendet. Der Assay wurde entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt.

Zunächst wurden 22,5 µl steriles H₂O mit je 2,5 µl der Proteinproben vorgelegt und daraus 10 µl jeder Probe als Duplikate auf eine 96-Well-Platte einpipettiert. Zudem wurden auf derselben Platte je 10 µl der Albumin-Standardverdünnungsreihe (Konzentrationen 2000 µl, 1000 µl, 500 µl, 250 µl, 125µl, 63 µl und 32 µl), auch als Duplikate, einpipettiert. Als „Blank“ wurden drei Wells zu je 10 µl mit sterilem H₂O befüllt. Das BCA Protein Assay Reagent A wurde im Verhältnis 50:1 mit Reagent B angesetzt und vermischt. Davon wurden auf jedes befüllte Well je 200 µl aufgetragen. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 37 °C konnte mit Hilfe des ELISA-Mikroplatten-Lesegerätes „FLUOstar Optima“ die Absorption bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen werden. Mit den Mittelwerten der gemessenen Absorptionen wurden anhand einer Geradengleichung die Konzentrationen der Proteine in den Proben errechnet. Aus den Standardwerten wird dazu eine Eichgerade berechnet.

Anhand der errechneten Proteinkonzentrationen (in µg/ µl) konnte dann die Menge der Probe berechnet werden, die notwendig war, um ein Lysat mit insgesamt 20 µg Protein zu erhalten. Anschließend wurde so viel steriles H₂O hinzugegeben, bis die Lysate in einem Volumen von 12,5 µl vorlagen. Zu jeder Probe wurden schließlich noch 4 µl Roti-Load hinzugegeben, welches in der nachfolgenden Gelelektrophorese eine negative, gleichmäßige Ladung der Proteine gewährleistet. Dadurch ergab sich ein Gesamtvolumen von 16,5 µl mit einer darin erhaltenen Proteinmenge von 20 µg.

Zum Schluss wurden die Proben bei 95 °C für fünf Minuten im Thermomixer denaturiert, um ein vollständig entfaltetes Protein zu erhalten. Die Proben konnten anschließend direkt für die Gelelektrophorese verwendet oder bei – 20 °C gelagert werden.

2.2.7 SDS-Page und Western Blot-Analyse

Der SDS-Page (Gelelektrophorese) mit anschließendem Western-Blot sind molekularbiologische Verfahren, um Proteine zunächst ihrer Größe nach aufzutrennen, um dann durch die Übertragung auf eine Trägermembran einzelne Proteine qualitativ nachweisen zu können.

Für die Gelelektrophorese wurden Trenn- und Sammelgele in entsprechender Konzentration hergestellt. In dieser Arbeit wurden 12%ige Trenngele verwendet (siehe Tabelle 11). Die Gele wurden zunächst in die mit Gelelektrophoresepuffer gefüllte SDS-Page-Kammer eingespannt. Danach wurden nach Auswaschen der Geltaschen die 16,5 µl vorbereiteten Proteinproben und 5 µl Proteinleiter (10-180 kDa) in diese pipettiert. Um einen gleichmäßigen elektrischen Widerstand in der Kammer aufrecht zu erhalten, wurden die restlichen Geltaschen mit je 5 µl Roti-Load beladen. Die Gelelektrophorese wurde mit einer Spannung von 70 V gestartet und nach Einlaufen der Proben in das Trenngel auf 99 V gesteigert.

Für den anschließenden Membran-Transfer („Blotting“) wurde das Whatman-Papier in Blotting-Puffer eingeweicht und die Transfer-Membran zur Aktivierung 15 Sekunden in 100% Methanol, zwei Minuten in Millipore-Wasser und dann mindestens fünf Minuten in Blotting-Puffer inkubiert. Danach wurden die Kammern des Transfersystems in der Reihenfolge Whatman-Papier / Gel / Membran / Whatman-Papier beladen. Das Blotten erfolgte dann mit dem TransBlot-Turbo Transfer System (Bio-Rad) für 20 Minuten bei 25 V. Als Qualitätskontrolle bzw. zur Überprüfung eines erfolgreichen Transfers wurde eine Ponceau-Färbung angeschlossen. Dazu wurden die Membranen für fünf Minuten unter ständigem Schwenken in 0,5% Ponceau-Lösung inkubiert. Mit destilliertem Wasser wurden die Membranen so weit entfärbt, dass man nur noch die Banden rosa angefärbt sehen konnte. Bei gleichmäßiger Färbung und Verteilung der Banden konnte von einem erfolgreichen Transfer ausgegangen und nach dem Waschen der Membranen mit TBS-T mit dem Western-Blot fortgefahren werden.

Je nach Angabe der Hersteller des primären Antikörpers (2.1.7) wurden die Membranen schließlich in je 5 ml 5%iger Milch oder 5%igem BSA für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Rollschüttler geblockt. Dies sorgt für eine Blockung freier, nicht Protein-gebundener Bindungsstellen auf der Membran. Nachfolgend wurde der primäre Antikörper je nach Herstellerangaben in 5%iger Milch bzw. 5%igem BSA verdünnt und die Membranen darin über Nacht bei 4°C im Kühlschrank auf dem Rollschüttler zur gleichmäßigen Verteilung inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Membranen dreimal für je fünf Minuten in TBS-T gewaschen und daraufhin mit dem jeweiligen sekundären Antikörper, wieder gelöst in 5%iger Milch bzw. 5%igem BSA, für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Membranen wieder dreimal mit TBS-T gewaschen.

2.Material und Methoden

Zur Vorbereitung der Detektion wurden die Membranen dann für jeweils fünf Minuten im Dunkeln mit dem Detektionsreagenz Clarity Western ECL-Substrate inkubiert. Daraufhin erfolgte die Detektion mit dem ChemiDoc System.

Um die aufgetragenen Antikörper wieder von der Membran zu entfernen, um diese zur Detektion anderer Proteine nutzen zu können, wurde ein milder Stripping-Puffer angewendet (siehe Tabelle 2.1.6).

Die Membranen wurden dann in einer Box mit dem angesetzten Stripping-Puffer für 30 Minuten bei 60°C im Wasserbad unter stetigem Schwenken inkubiert. Danach konnte nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBS-T und erneutem Blocken in 5%iger Milch/ 5%igem BSA ein neuer Antikörper aufgetragen werden.

2.2.8 RNA-Isolation und -Aufreinigung

Die RNA-Isolation und -Aufreinigung erfolgte zunächst mit Trizol. Dazu wurden die geernteten Zellen für fünf Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet mit 1 ml PBS gewaschen. Darauf folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt. Die Nukleinsäure-haltige Probe wurde dann in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, 500 µl Trizol hinzugefügt und durch Auf- und Abpipettieren durchmischt. Danach wurden die Proben bei 25°C für fünf Minuten bei leichtem Schwenken auf dem Thermomixer inkubiert. Der Probe wurden 100 µl Chloroform zugefügt, das Reaktionsgefäß ca. 15 Sekunden per Hand invertiert und dann für drei Minuten auf dem HulaMixer-Probenmischer durchmischt. Darauf folgte ein erster Zentrifugationsschritt für 15 Minuten bei 12.000g und 4°C. Dadurch trennt sich die Probe in drei Phasen. Die obere, wässrige Phase enthält die RNA und wurde daher vorsichtig in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, der restliche Teil verworfen. Nach Zugabe von 500 µl Isopropanol folgte die zweite Zentrifugation bei 4°C für zehn Minuten. Dies führt dazu, dass sich der RNA-haltige Anteil der Probe als Pellet am Boden absetzt und der Überstand verworfen werden kann. Das Pellet wurde mit 1 ml 75%igem Ethanol (37,5 ml Ethanol mit 12,5 ml RNase- und DNase freiem-H₂O) gewaschen und anschließend bei 8.400 rpm und 4°C für fünf Minuten zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde noch einmal wiederholt. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Das RNA-haltige Pellet wurde für ca. eine Minute an der Luft getrocknet, um es vom letzten Rest Ethanol zu befreien. Das Pellet wurde dann in 50 µl RNase / DNase-freies H₂O aufgenommen und für zehn Minuten bei 55°C im Thermomixer bei 800 rpm inkubiert. Diese Verfahren wurde grundsätzlich mit gestopften Pipettenspitzen und mit auf Eis gelagerten Proben durchgeführt, um eine Verunreinigung oder Beschädigung der RNA abzuwenden. Anschließend wurde das Spektrophotometer NanoDrop eingesetzt, um sowohl die Konzentration der RNA als auch deren Reinheit zu bestimmen. Ein Wert von 2,0 bei A260 / A280 nm und A260 / 230 nm-Absorptionsverhältnissen wurde angestrebt und sprach für die Reinheit der RNA.

2.Material und Methoden

Bei nicht zufriedenstellender RNA-Qualität wurde eine erneute Aufreinigung mit dem RNA Clean & Concentrator-Kit entsprechend den Herstellerangaben angeschlossen und noch einmal eine NanoDrop-Messung durchgeführt.

Im Laufe der Arbeit wurden zudem RNA-Proben mit dem RNEasy Mini Kit entsprechend den Herstellerangaben isoliert und aufgereinigt. Diese wurden für die RNA-Sequenzierung genutzt.

2.2.9 cDNA-Synthese

Die cDNA (complementary DNA) ist eine Form der DNA, welche durch die Reverse Transkriptase mittels RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion) aus der mRNA synthetisiert wird, komplementär zur RNA ist und daher keine Introns mehr enthält. In einer weiteren Prozessierung wird die einzelsträngige cDNA mittels einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase zur doppelsträngigen cDNA umgeschrieben. Die so gewonnene cDNA wird dann genutzt, um mit einer anschließenden quantitativen Real-Time PCR die Expressionsrate der zugrundeliegenden mRNA für Genexpressionsanalysen zu bestimmen.

Im Anschluss an die NanoDrop-Messung wurde die RNA zur Vorbereitung der folgenden cDNA-Synthese entsprechend ihrer gemessenen Konzentration (ng / µl) mit RNase freiem Wasser verdünnt, sodass man insgesamt 1.000 ng RNA in einem Endvolumen von 12,5 µl (Wasser/ RNA) erhielt. Die Mastermixe wurden wie folgt vorbereitet:

Mastermix 1: 1 µl dNTP-Mix

1 µl Oligo(dT)₁₈ Primer

Mastermix 2: 4 µl RT Buffer

1 µl Maxima H Minus Reverse Transcriptase

0,5 ml RiboLock RNase Inhibitor

Diese Mastermixe wurden dann zusammen mit der Wasser / RNA-Probe in PCR-Tubes angesetzt und die cDNA-Synthese mit Hilfe des PCR-Thermozyklers (Bio-Rad, München, Dtl.) umgesetzt. Insgesamt wurde so cDNA in einem Volumen von insgesamt 20 µl gewonnen. Daraus wurden 19 µl entnommen und mit 304 µl RNase freiem Wasser gemischt, sodass 38 fertige cDNA-Proben für folgende qRT-PCR zur Verfügung standen und bei -20°C gelagert werden konnten.

2.2.10 Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

Die qRT-PCR erlaubt neben der Amplifizierung von Nukleinsäuren (cDNA) zusätzlich eine Quantifizierung der gewonnen DNA. Dies geschieht durch Fluoreszenz-Messungen, die während eines Zyklus in Echtzeit erfasst werden und proportional der Menge der PCR-Produkte zunehmen. Das Real-Time PCR Gerät kombiniert dazu einen Thermozykler mit einem Fluoreszenz-Analysator. Das gewünschte, zu amplifizierende Produkt wird dabei

2.Material und Methoden

durch den jeweiligen Oligonukleotid-Primer festgelegt. Bei diesem Verfahren können die Expressionsmuster mehrerer Gene parallel analysiert und auch Kontrollen mit behandelten Zelllinien miteinander verglichen werden.

Zunächst wurden zwei Mastermixe in folgender Zusammensetzung vorbereitet:

Mastermix 1 (pro Zelllinie): 0,5 µl cDNA (1000 ng / 20 µl)

8,0 µl RNase freies Wasser

Mastermix 2 (pro Gen): 7,5 µl SYBR-green-based Luna Universal qPCR Master Mix

0,5 µl Primer forward

0,5 µl Primer reverse

→ Ergibt insgesamt 17 µl, davon wurden Triplikate mit je 5 µl pro Well pipettiert.

Die übrigen 2 µl dienten dabei als Puffer zum vereinfachten Pipettieren und wurden verworfen.

Dann wurden je 8,5 µl beider Mastermixe in PCR-Reaktionsgefäße pipettiert und nach kurzem Zentrifugieren in Triplikaten mit 5 µl pro Well auf eine 384-Well-PCR-Platte aufgetragen (siehe oben). Als Housekeeper-Gen wurden bei jeder PCR-Platte *GAPDH* inkludiert.

Nach diesem Schritt wurde die PCR-Platte mit einer Klebeschutzfolie versiegelt und kurz zentrifugiert. Die qRT-PCR erfolgte dann die qRT-PCR mit dem CFX384 Real-Time System C1000 Touch Thermozykler. Die Temperatur und Zeitangaben der Zyklen eines Laufs sind in folgender Tabelle angegeben:

	Temperatur	Zeit
39-44 Zyklen	95 °C	2 Min
	95 °C	10 Sek
	60 °C	30 Sek
		Auslesen der Platte
	95 °C	
Schmelzkurve	95 °C – 65 °C in 0,5 °C Schritten	5 Sek

Nach dem zweistündigen Lauf wurden die Daten der qRT-PCR mit Hilfe der dazugehörigen Bio-Rad CFX Maestro-Software ausgewertet und Schmelzkurven-Analysen durchgeführt. Mittels Excel wurden in einem weiteren Schritt die relative Quantifizierung der gesuchten Gene berechnet, um eine übersichtliche graphische Auswertung darstellen zu können. Dazu wurde die Genexpression des Zielgens gegen ein weiteres, nicht-reguliertes Housekeeping-Gen, hier *GAPDH*, normalisiert (siehe unten). Für jede Berechnung wurden bei der graphischen Darstellung zudem eine Standardabweichung berechnet. Folgende Formeln wurden verwendet:

2. Material und Methoden

$$1) \Delta CT = CT_{\text{Zielgen}} - CT_{\text{Mittelwert des Referenzgens (Housekeeping-Gen)}}$$

Entspricht der Normierung des Zielgens gegenüber des Housekeeping-Gens.

$$2) \Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{behandelte Probe}} - \Delta CT_{\text{Mittelwert unbehandelte Kontrolle}}$$

$$3) \text{ Relativer Expressionsunterschied (Ratio): } 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Entspricht der relativen Expressionsunterschiede ($\triangleq$ Engl. Fold Change) einer Probe zwischen der Behandlung und Kontrolle, normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine Standard- / Kontrollprobe.

2.2.11 RNA-Sequenzierung (RNA-Seq)

Als RNA-Sequenzierung (kurz RNA-Seq), oder auch Gesamt-Transkriptom-Sequenzierung, wird die Bestimmung der Nukleotidabfolge der RNA bezeichnet, welche auf einer Hochdurchsatzmethode beruht. Dabei kann die gesamte Genexpression aufgeschlüsselt und posttranskriptionelle Modifikationen erkannt werden, wie beispielsweise eine Veränderung der Basensequenz der RNA (RNA-Editing) oder das Herausschneiden von Introns mit variablem Zusammenfügen der Exons (alternatives Splicing). Im direkten Vergleich der behandelten Proben gegenüber den unbehandelten Kontrollen können so Rückschlüsse auf behandlungsbedingte Veränderungen der Genexpression gezogen werden.

Für die Transkriptom-Analyse wurden die RNA-Proben zunächst mit Hilfe des Invitrogen Qubit RNA Assay quantifiziert und die Qualität durch eine Kapillarelektrophorese mittels des Fragment Analyzer Systems sowie des Total RNA Standard Sensitivity Assay (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA) gemessen. Die Generierung von DNA-Fragmenten in Vorbereitung für die anschließende Sequenzierung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt (VAHTS™ Stranded mRNA-Seq Library Prep Kit). Für die mRNA-Erfassung, Fragmentierung, cDNA-Synthese, Adapter-Ligation und Amplifizierung wurden 300ng totaler RNA verwendet. Die Sequenzierung der RNA wurde schließlich mit Hilfe des HiSeq 3000/4000 Systems (Illumina Inc., San Diego, USA) umgesetzt. Anschließend wurde die Software „bcl2fastq“ genutzt, um die gewonnenen BCL (Binary Base Call) - Rohdaten in FASTQ-Daten zu konvertieren, um diese so dauerhaft samt Qualitätsfaktoren speichern und für folgende Analysen nutzen zu können. Dazu erfolgte mit dieser Software auch das Demultiplexen der Sequenzierungsdaten. Die Auswertung der FASTQ-Daten wurde mit der CLC Genomics Workbench (Version 12.0.2, Qiagen, Hilden, Dtl.) durchgeführt. Um eine hohe Qualität der gelesenen Fragmente (Reads) zu gewährleisten, wurden die Adapter-Sequenzen wieder von den Reads getrennt (Illumina TrueSeq) und bestimmte Qualitätsmerkmale festgelegt. Die Zuordnung zum Referenzgenom (Read Mapping) wurde mit Hilfe der Homo sapiens (hg 38) Genomsequenz durchgeführt. Um die differentielle Genexpression, also die quantitativen Veränderungen in der Genexpression zwischen den

2.Material und Methoden

behandelten gegenüber den Kontrollgruppen statistisch auszuwerten, wurde das „Differential Expression in Two Groups“-Tool (Qiagen, Hilden, Dtl.) angewendet.

Die oben beschriebene RNA-Sequenzierung wurde von Prof. Dr. Karl Köhrer im Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf als Dienstleistung durchgeführt.

2.2.12 Online-Analyse-Tools

Die Venn-Diagramme wurden mit Hilfe von Venny 2.1 (<https://biofoggp.cnb.csis.es/tools/venny/>) generiert (Oliveros, 2007).

Um interaktive Netzwerke aus den RNA-Seq-Daten zu prognostizieren, wurde der STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes / Proteins) - Algorithmus genutzt ([https://string-db.org.](https://string-db.org/)) (Szklarczyk *et al.*, 2019). Bei der STRING-Interaktionsanalyse wurden folgende Einstellungen gewählt: als Netzwerk-Typ wurde ein „full STRING network“ gewählt und die Dicke der Verbindungslinien des abgebildeten Netzwerks spiegelt die Stärke der vorhergesagten Proteininteraktion wider (Einstellung unter „meaning of network edges“ → „confidence“). Als Interaktionsquellen wurde alle anwählbaren Kategorien eingeschlossen, die sind „Textmining“, „Experiments“, „Databases“, „Co-expression“, „Neighborhood“, „Gene fusion“ und „Co-occurrence“. Als minimal erforderlicher Interaktions-Score wurde „medium confidence (0,400)“ gewählt. Zur übersichtlicheren Darstellung wurden nicht interagierende Proteine aus der Darstellung herausgenommen. Als Datenbank für die Analyse wurde „Biological Process (Gene Ontology)“ gewählt, die jeweils ausgewählten GO-Terms sind in den entsprechenden Legenden der Abbildungen angegeben.

Für die Analyse der Genom-Annotation wurde das DAVID (Database for annotation, visualization and integrated discovery) - Online-Tool verwendet (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>) (Jiao *et al.*, 2012). Für die DAVID-Gene Ontology-Analyse wurden mehrere Annotations-Datenbanken genutzt, dazu zählen „UP_Keywords“, „GOTERM_BP_DIRECT“, „GOTERM_MF_DIRECT“, „GOTERM_CC_DIRECT“, „KEGG_Pathway“ und „INTERPRO“. Es wurde zudem ein p-Wert berechnet inklusive einer Fehlerkorrektur nach Benjamini und FDR. Ein p-Wert < 0,05 wurde dabei als statistisch signifikant angenommen

2.2.13 Statistik und Auswertung der Daten

qRT-PCR: Für die statistische Auswertung der qRT-PCR wurden je Kondition Triplikate (n=3) verwendet, um Mittelwerte sowie Standardabweichungen zu berechnen. Zudem wurde die Gleichheit bzw. Unterschiedlichkeit der Varianzen durch einen F-Test herausgestellt, anschließend wurden mit Hilfe eines zweiseitigen T-Tests die Unterschiede zwischen den unbehandelten gegenüber den behandelten Populationen (in den jeweiligen

2.Material und Methoden

Graphen als „x-fache Genexpression“ oder „*Fold change*“ bezeichnet) analysiert. Dabei wurde bei beiden Tests jeweils ein P-Wert von $<0,05$ als statistisch signifikant angenommen. Solche signifikanten *Fold changes* wurden in den Graphen mit Asterisken kenntlich gemacht (* $<0,05$, ** $<0,005$).

3. Ergebnisse

3.1 Die Expression Zellzyklus-assoziiierter Faktoren in Keimzelltumor-Zelllinien

Um die molekularbiologischen Wirkmechanismen von CDK4/6-Inhibitoren in Keimzelltumoren aufschlüsseln zu können und alternative Angriffspunkte jenseits des kanonischen Wirkmechanismus zu finden, wurde eine Re-Analyse bereits bestehender, umfassender Microarray-Daten durchgeführt und so nach möglichen Zielgenen gescreent (Eckert *et al.*, 2008) (Nettersheim *et al.*, 2015). Dabei wurden vor allem Zellzyklus-assoziierte Faktoren wie Zykline, Zyklin-abhängige Kinasen (CDK), Inhibitoren Zyklin-abhängiger Kinasen und notwendige Ko-Faktoren bzw. Transkriptionsfaktoren betrachtet. Wie aus Abbildung 4 ersichtlich, sind viele unterschiedliche Zellzyklus-assoziierte Faktoren in einer relevanten Stärke exprimiert. Dabei sind gleichzeitig Gene hoch exprimiert, welche in verschiedenen Stadien des Zellzyklus eine Rolle spielen. Die Zyklin-abhängigen Kinasen CDK1 ($\triangleq$ CDC2), CDK2 und CDK4 sind in allen Zelllinien deutlich höher exprimiert als CDK6 (Abb.4). Bei den dazugehörigen Zyklinen zeigt sich ein ungleichmäßigeres Bild. Das zum CDK4/6-Komplex gehörende Zyklin D ist in seinen Isoformen (CCND1,2,3) in den meisten KZT-Zelllinien hoch exprimiert (Abb.4).

Auch die Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie zeigen sich bis auf E2F8 in allen Zelllinien als hoch exprimiert. Die Zyklin-abhängige Kinase-Inhibitoren sind insgesamt bis auf CDKN1A (p21) und CDKN1B (p27) als zwei Vertreter der CIP/KIP- Familie insgesamt eher schwach exprimiert.

Somit könnten auch andere Zielproteine als CDK4 und (p)RB1, die eine Funktion bei der Kontrolle des Zellzyklus erfüllen, durch eine Behandlung mit den CDK4/6-Inhibitoren tangiert und deren Expressionsstärke verändert werden.

3. Ergebnisse

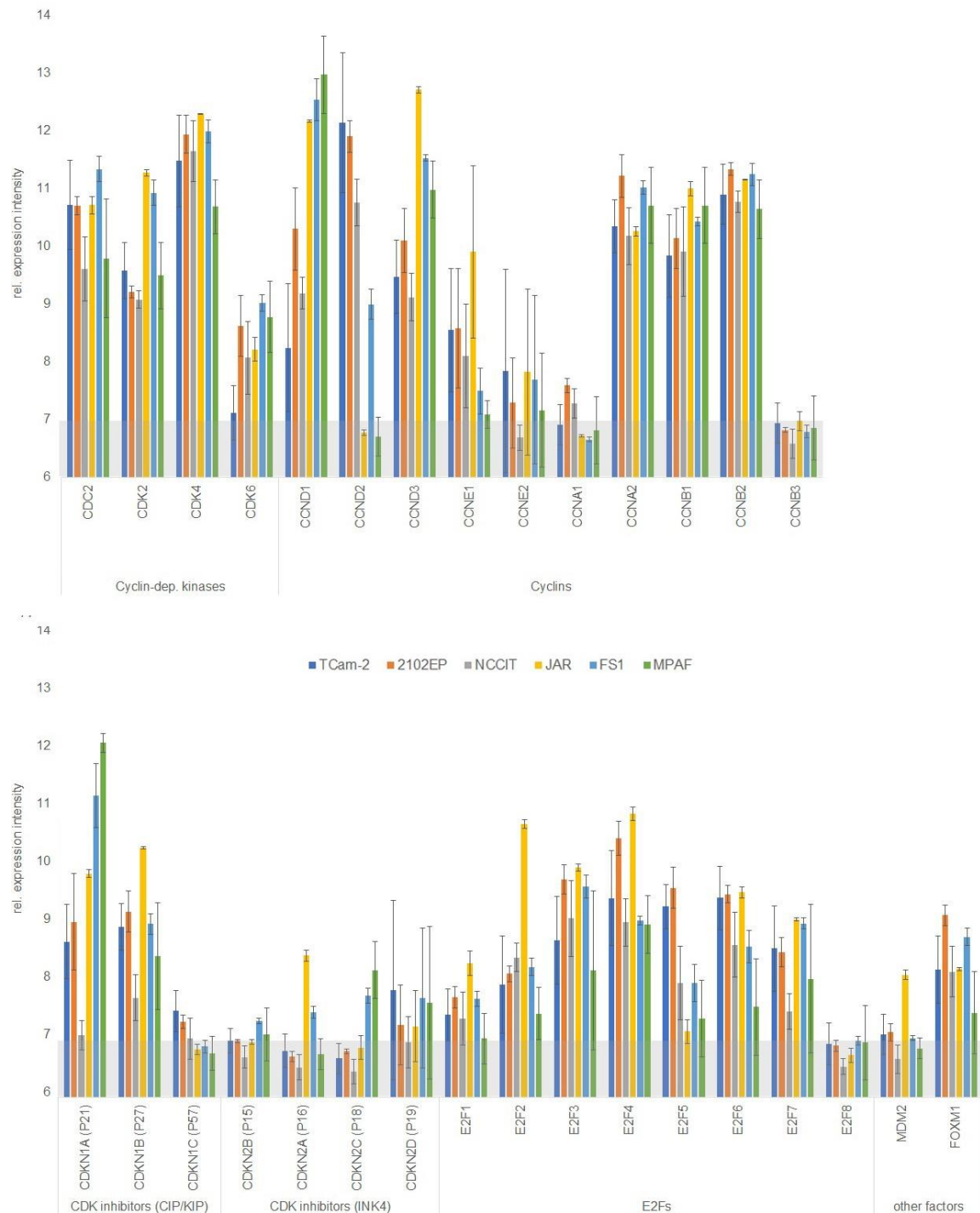


Abb.4: Expression Zellzyklus-assoziierter Gene in Keimzelltumor-Zelllinien

Hier abgebildet sind Microarray-Daten zur RNA- Expressionsintensität der auf der x-Achse aufgeführten Gene in den KZT-Zelllinien (TCam-2, 2102EP, NCCIT, JAR) und Kontroll-Zelllinien (FS1, MPAF). Expressionslevel über dem grau unterlegten Bereich (*threshold* bei $\text{Log}_2(7)$) werden dabei als relevant betrachtet. Die jeweilige Standardabweichung ist über den Balken des Diagramms eingefügt.

3. Ergebnisse

3.2 Die CDK4/6- Inhibitoren Palbociclib und Ribociclib induzieren Apoptose in Keimzelltumor-Zelllinien

Wie bereits erwähnt, konnte im Rahmen dieses Projektes in Vorarbeiten gezeigt werden, dass die KZT-Zelllinien unter Behandlung mit den CDK4/6-Inhibitoren Apoptose induzieren (Anhang 4). Diese Ergebnisse Durchflusszytometrie-basierter Analysen galt es in dieser Arbeit auch auf Proteinebene zu bestätigen. Dazu wurde zunächst mit dem Nachweis von tPARP (total PARP) das Vorhandensein des Enzyms Poly (-ADP-Ribose) - Polymerase (kurz PARP) in allen KZT-Zelllinien bestätigt (Abb.5). Im Rahmen der Apoptose von Zellen stellt die Proteolyse von PARP einen wichtigen Zwischenschritt dar. Der Nachweis der Spaltprodukte kann somit eine stattgehabte Apoptose in Zellen nachweisen. Dazu wurde in diesem Western Blot cPARP (cleaved PARP), das Spaltprodukt von tPARP, als Indikator für Apoptose verwendet. Wie aus Abbildung 5 ersichtlich, zeigten alle KZT-Zelllinien eine deutliche Protein-Grundexpression von totalPARP sowohl in unbehandelter als auch in mit Palbociclib bzw. Ribociclib behandelter Form. Lediglich die Kontroll-Zelllinie MPAF zeigte im Vergleich eine geringere Expression von totalPARP, auch nach längerer Expositionsdauer.

In Bezug auf das Spaltprodukt cleavedPARP wurden im Vergleich der unbehandelten Lösemittel-Kontrollen gegenüber den behandelten KZT-Zelllinien deutliche Unterschiede sichtbar. Unter Behandlung zeigt sich in diesen eine höhere Proteinexpression von cleavedPARP als ohne Behandlung. Nur die Kontroll-Zelllinie MPAF zeigt weder ohne noch mit Behandlung eine Expression von cleavedPARP. Dabei sind bei den beiden CDK4/6-Inhibitoren Palbociclib und Ribociclib sehr ähnliche Effekte zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass durch eine Behandlung mit den CDK4/6-Inhibitoren in den KZT-Zelllinien das Enzym PARP vermehrt gespalten und somit Apoptose induziert wurde.

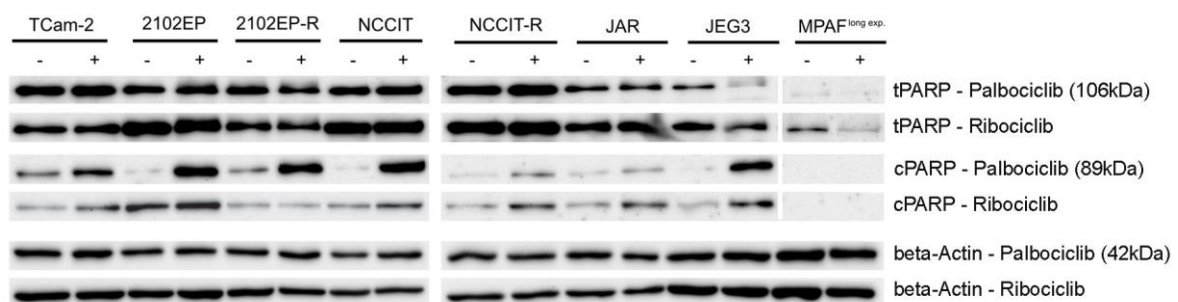


Abb.5: Proteinexpression des Apoptose-Markerenzym PARP

Hier dargestellt sind die detektierten Proteine (Banden) einer Western-Blot-Analyse der KZT-Zelllinien (TCam-2, 2102EP(-R), NCCIT(-R), NT2/D1, JAG, JEG-3) sowie der Kontroll-Zelllinie (MPAF=Fibroblasten; *long exp.* = *Long exposure*). Verglichen werden die unbehandelten Lösemittel-Kontrollen (-) mit den behandelten Zelllinien (+). Rechts angegeben sind die primären Antikörper (*tPARP*= *total Poly (-ADP-Ribose) -Polymerase*; *cPARP* = *cleaved Poly (-ADP-Ribose) -Polymerase*) mit der jeweiligen Molekülmasse in Kilodalton (kDa) und der eingesetzte CDK4/6-Inhibitor. β -Actin diente als Ladekontrolle.

Diese Abbildung wurde modifiziert nach Skowron et.al; 2020.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass auch auf Proteinebene in allen KZT-Zelllinien, nicht aber in der Kontroll-Zelllinie die Einleitung von Apoptose validiert werden kann. Dass Apoptose induziert wurde, spricht dafür, dass die CDK4/6-Inhibitoren eventuell nicht nur über ihren bekannten Wirkmechanismus wirken und veranlasste zu dem nächsten Schritt, die Behandlungseffekte in einem umfassenderen Maße zu analysieren.

3.3 Transkriptomweite Veränderungen der Genexpression unter Behandlung in Keimzelltumor-Zelllinien

Die Akkumulation der KZT-Zelllinien in der G1/G0 oder G2/M-Phase des Zellzyklus sowie die Induktion von Apoptose gaben Hinweise auf einen möglichen alternativen Wirkmechanismus abseits der kanonischen CDK4/6-Achse. Dies veranlasste dazu, die molekularen Effekte der Behandlung in den KZT-Zelllinien im Detail aufzuschlüsseln. Dazu wurde eine RNA-Seq (RNA-Sequenzierung) durchgeführt. Mit diesem Verfahren wird das gesamte Transkriptom erschlossen und so nach Veränderungen in der Genexpression gesucht, die durch eine Behandlung induziert werden. Für die RNA-Seq wurden die in Abbildung 6 angegebenen KZT-Zelllinien nach Behandlung mit 10 μ M Palbociclib für 16 Stunden verwendet. Zunächst wurde nach der RNA-Isolation- und Aufreinigung eine Qualitätskontrolle der gewonnenen RNA-Proben durchgeführt.

3. Ergebnisse

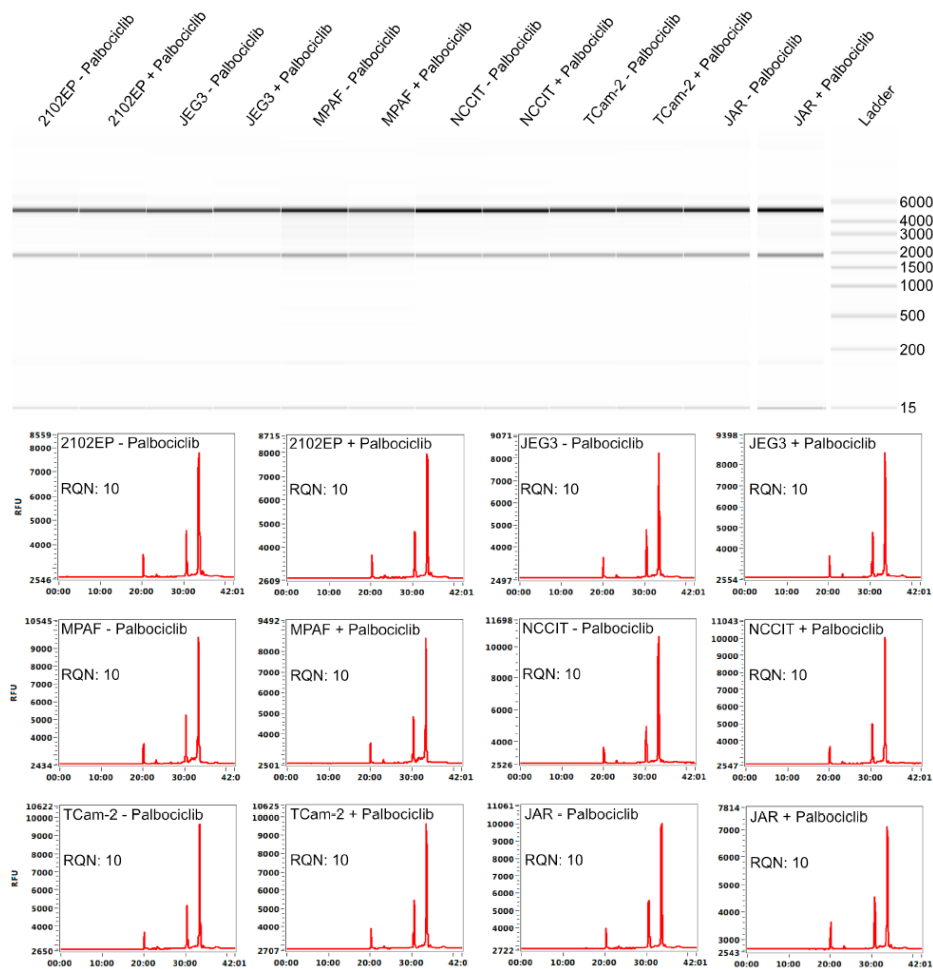


Abb.6: RNA-Qualitätsmessung

Angegeben sind die Ergebnisse der automatisierten Kapillar-Elektrophorese mit dem *Fragment Bioanalyzer (Agilent Technologies)* zur Qualitätskontrolle der isolierten RNA. *RQN= RNA Quality Number*

Diese Abbildung wurde modifiziert nach Skowron et.al; 2020.

Die *RNA Quality Number* 10 (Abb.6) in allen behandelten Zelllinien zeigt an, dass ausschließlich intakte, nicht fragmentierte oder degradierte RNA hoher Qualität isoliert wurde.

Eine anschließende Hauptkomponentenanalyse sollte in einem ersten Schritt die umfangreichen Datensätze der RNA-Seq strukturieren und vereinfachen, um einen Überblick über das Ausmaß der Transkriptionsveränderungen unter Behandlung zu schaffen.

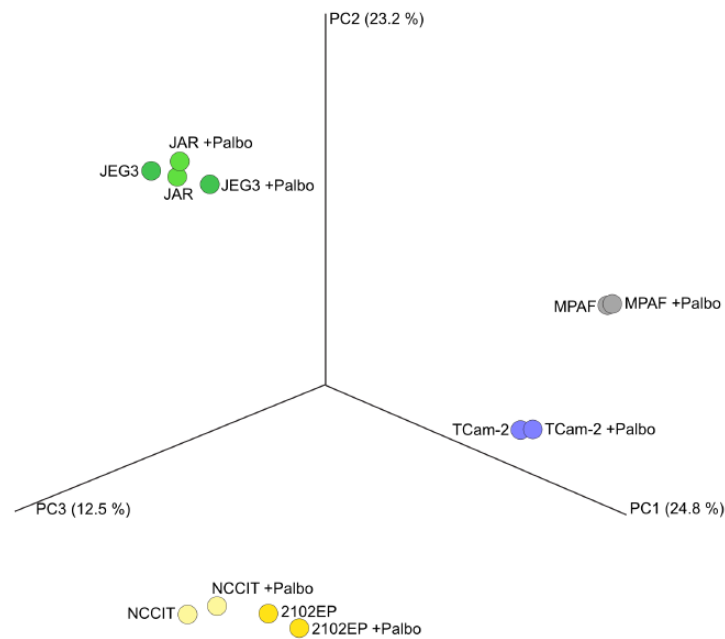


Abb.7: Hauptkomponentenanalyse der RNA-Seq-Daten

Dargestellt ist das Ausmaß der durch eine Behandlung mit Palbociclib induzierten Veränderungen in jeder KZT-Zelllinie sowie der Kontroll-Zelllinie.

PC = *Principal Component* (Hauptkomponente)

Diese Abbildung wurde modifiziert nach Skowron et.al; 2020.

Wie aus Abbildung 7 ersichtlich, führte die Behandlung mit Palbociclib zu den stärksten Veränderungen des Transkriptoms in den beiden Chorionkarzinom-Zelllinien JAR (dunkelgrün) und JEG-3 (hellgrün) sowie in den beiden Embryonalzellkarzinom-Zelllinien 2102EP (dunkelgelb) und NCCIT (hellgelb). In der Seminom-Zelllinie TCam-2 (blau) zeigten sich geringere Veränderungen. Die schwächsten Effekte waren bei der Kontroll-Zelllinie MPAF zu beobachten. Insgesamt ist festzuhalten, dass die Behandlung mit Palbociclib zu eher moderaten Differenzen des Transkriptoms in den analysierten Zelllinien führt. Allerdings waren die verzeichneten Veränderungen in den KZT-Zelllinien insgesamt größer als in der Kontroll-Zelllinie.

In einem nächsten Schritt wurden die gewonnen RNA-Seq-Daten detaillierter aufgeschlüsselt und eine Übersicht über die deregulierten Transkripte erstellt (Abb.8).

Wie durch das Venn-Diagramm in Abbildung 8 erkennbar, stellten sich 39 Transkripte als dereguliert in allen getesteten Zelllinien dar.

Von diesen 39 Transkripten wurden dann solche exkludiert, welche keinem offiziellen Gen-Symbol des *Gene-Ontology*-Klassifikationssystems zugeordnet werden konnten oder im Vergleich der KZT-Entitäten untereinander auf unterschiedliche Weise exprimiert wurden.

3. Ergebnisse

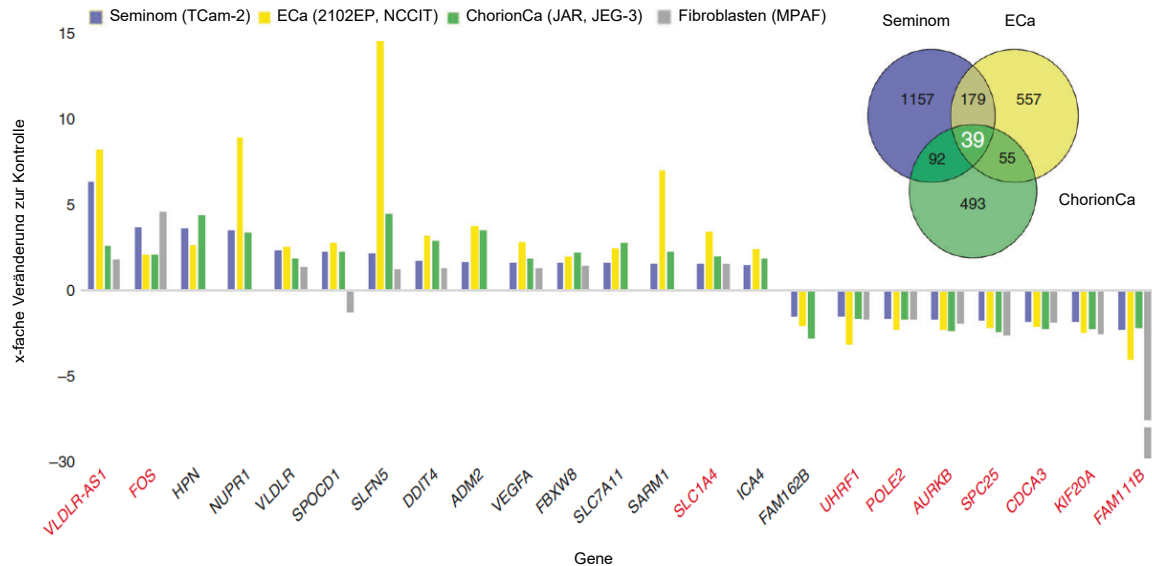


Abb.8: Deregulierte Transkripte in Keimzelltumor- und Kontroll-Zelllinien

Hier aufgezeigt sind die allgemein deregulierten Transkripte bzw. Gene in KZT- und Kontroll-Zelllinien nach Behandlung mit 10µM Palbociclib für 16 Stunden in Relation zu den unbehandelten Lösemittel-Kontrollen (n=1). Sortiert sind die Gene nach der Zelllinie TCam-2 (blau), absteigend von der höchsten zur niedrigsten Expression. Rot gekennzeichnet sind die zehn Transkripte, welche auch in der Fibroblasten-Zelllinie MPAF dereguliert sind und über dem gesetzten Schwellenwert (*threshold*) von 1,5 liegen.

ECa=Embryonalzellkarzinom; ChorionCa=Chorionkarzinom

Rechts oben: Venn-Diagramm zur Veranschaulichung der Anzahl an deregulierten Genen in einzelnen KZT-Entitäten sowie aller Interferenzen dieser Mengen untereinander.

Diese Abbildung wurde modifiziert nach Skowron et.al; 2020.

Die dadurch identifizierten 23 Transkripte, die in allen Zelllinien dereguliert waren, sind in Abbildung 8 graphisch dargestellt. Davon waren 15 hoch- und 8 herunterreguliert und zehn ebenfalls in der Kontroll-Zelllinie MPAF dereguliert. Mit diesen gewonnenen Daten wurde in einem nächsten Schritt mit Hilfe des *STRING* - (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) Algorithmus eine Protein-Protein-Interaktionsprognose durchgeführt, um Interaktionsnetzwerke dieser Gene zu identifizieren. Dadurch konnten insgesamt drei interaktive Netzwerke prognostiziert werden (Abb.9). Aufsteigend vom kleinsten zum größten Netzwerk sind dies folgende: Netzwerk (1), bestehend aus *SLC7A11* und *SLC1A4*, Netzwerk (2), bestehend aus *VLDLR*, *FOS*, *VEGFA* und *DDIT4* und Netzwerk (3), bestehend aus *POLE2*, *SPC25*, *KIF20A*, *AURKB*, *UHRF1* und *CDC43*. In allen drei Netzwerken liegen jeweils Gene vor, die auch in der Kontroll-Zelllinie MPAF dereguliert sind, allerdings findet sich eine Häufung dieser Gene in Netzwerk (3).

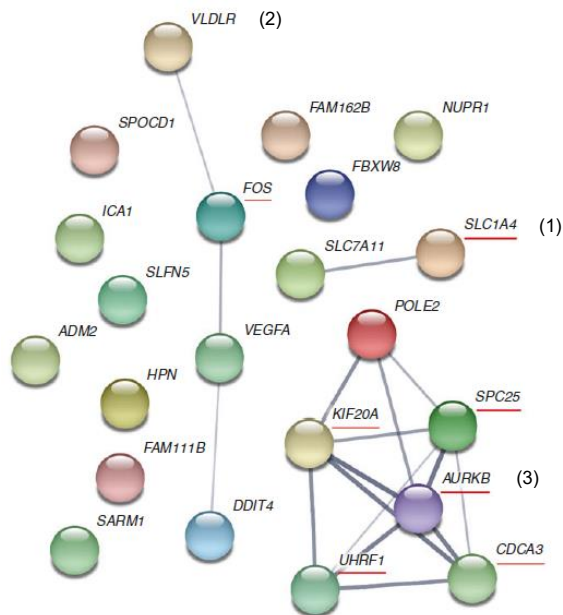


Abb.9: STRING-basierte Interaktions-Vorhersage der in allen Zelllinien deregulierten Gene

Hier veranschaulicht sind die in Abb.8 im Graphen aufgeführten Gene in Netzwerken. Die Verbindungslinien zwischen den durch Kreise symbolisierten Genen zeigen dabei potenzielle Interaktionen an. Die vorhergesagten Netzwerke sind aufsteigend nach ihrer Größe von 1-3 durchnummeriert. Rot unterstrichen sind die Gene, die auch in der Kontroll-Zelllinie MPAF dereguliert sind.

Diese Abbildung wurde modifiziert nach Skowron et.al; 2020.

Anschließend galt es den identifizierten deregulierten Genen bzw. Netzwerken ihre Funktionen zuzuordnen und diese in Kategorien zusammenzufassen. Dafür wurde mit Hilfe des *DAVID* (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) - Internettools eine Analyse des *Gene Ontology* (GO; Gen-Ontologie) - Klassifikationssystems durchgeführt. *Gene Ontology* benennt und charakterisiert die molekularen Funktionen von Genprodukten und damit assoziierten biologischen Prozessen. Anhand dessen kann dann analysiert werden, welche dieser Funktionen und Prozesse in einem großen Set an gegebenen Genen überrepräsentiert sind bzw. sich durch eine Behandlung angereichert haben. In Abbildung 10 dargestellt sind die Ergebnisse dieser Analyse in den unter Behandlung mit Palbociclib deregulierten Genen. Die Genprodukte konnten dabei insgesamt sieben übergeordneten Kategorien an Funktionen bzw. Prozessen zugeordnet werden: Medikamentenwirkung, Zellwachstum, Proteinregulation, Transkription, Entwicklung, Krankheit und Zelloberfläche (Abb.10).

Es wird deutlich, dass vor allem Gene dereguliert sind, deren Funktionen in Zusammenhang mit zellulären Wachstumsprozessen stehen, wie Zellproliferation, Zellzyklus, Mitose, mitotische Zellkernteilung und Zellteilung (Abb.10, hellblau).

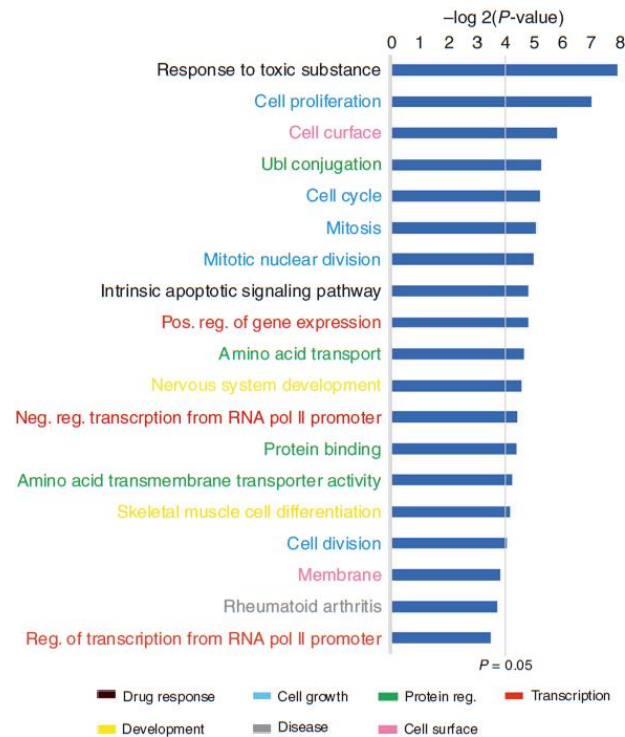


Abb.10: DAVID-basierte Gene Ontology (GO)-Analyse

Hier dargestellt ist eine Übersicht über die funktionsbezogenen Kategorien, denen die deregulierten Gene in den mit Palbociclib behandelten KZT- und Kontroll-Zelllinien zugeordnet werden können. Diese sieben Kategorien sind jeweils farblich markiert und in der Legende mit einem übergeordneten Terminus bezeichnet. Die farblich beschrifteten Balken des Diagramms geben einzelne Funktionen wieder, die diesen jeweils farblich passenden übergeordneten Kategorien zugeordnet werden können. Es wurden lediglich Kategorien mit mindestens fünf zuordenbaren Genen (Count=5) und einem p-Wert von <0,05 als signifikant angenommen.

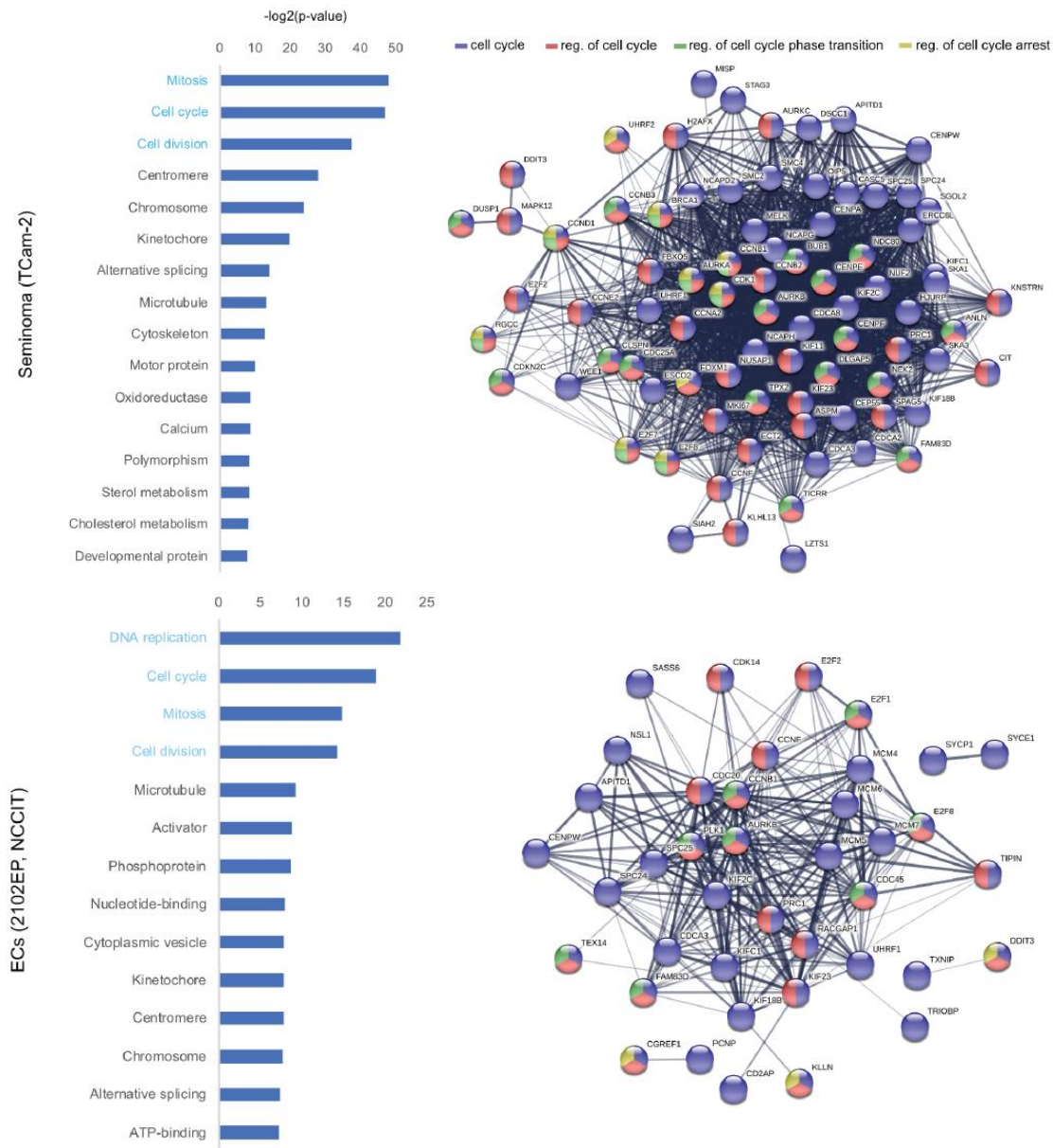
Diese Abbildung wurde modifiziert nach Skowron et.al; 2020.

Außerdem sind erkennbar viele Gene überrepräsentiert, die assoziiert sind mit Proteinregulations-Prozessen wie beispielsweise Aminosäuretransport und Proteinbindung (Abb.10, grün).

Die oben genannten Ergebnisse der Gene Ontology- und der Protein-Protein-Interaktionsprognose beziehen sich auf die Gesamtheit der deregulierten Gene in allen KZT- bzw. Kontroll-Zelllinien. Daher wurden zusätzlich die individuellen Effekte von Palbociclib auf jede KZT-Entität, also Seminome, Embryonalzellkarzinome und Chorionkarzinome, sowie auf die Fibroblasten-Kontrolle analysiert. Dafür wurde für jede einzelne KZT-Entität und die Kontrolle noch einmal eine *DAVID*-basierte *Gene Ontology*-Analyse der deregulierten Gene durchgeführt. Auch in den einzelnen KZT-Entitäten zeigten sich hauptsächlich Gene als dereguliert, die eine Rolle im Zellzyklus spielen (Abb.11). Mit all diesen deregulierten Genen, die so der Kategorie „Zellzyklus“ zugeordnet werden konnten, wurde anschließend eine *STRING*-basierte Protein-Protein-Interaktionsanalyse

3. Ergebnisse

durchgeführt. So sollten Netzwerke von Genen aufgedeckt werden, die in der jeweiligen KZT-Entität eine Schlüsselrolle in der Regulation des Zellzyklus als Reaktion auf eine Behandlung mit Palbociclib einnehmen.



3. Ergebnisse

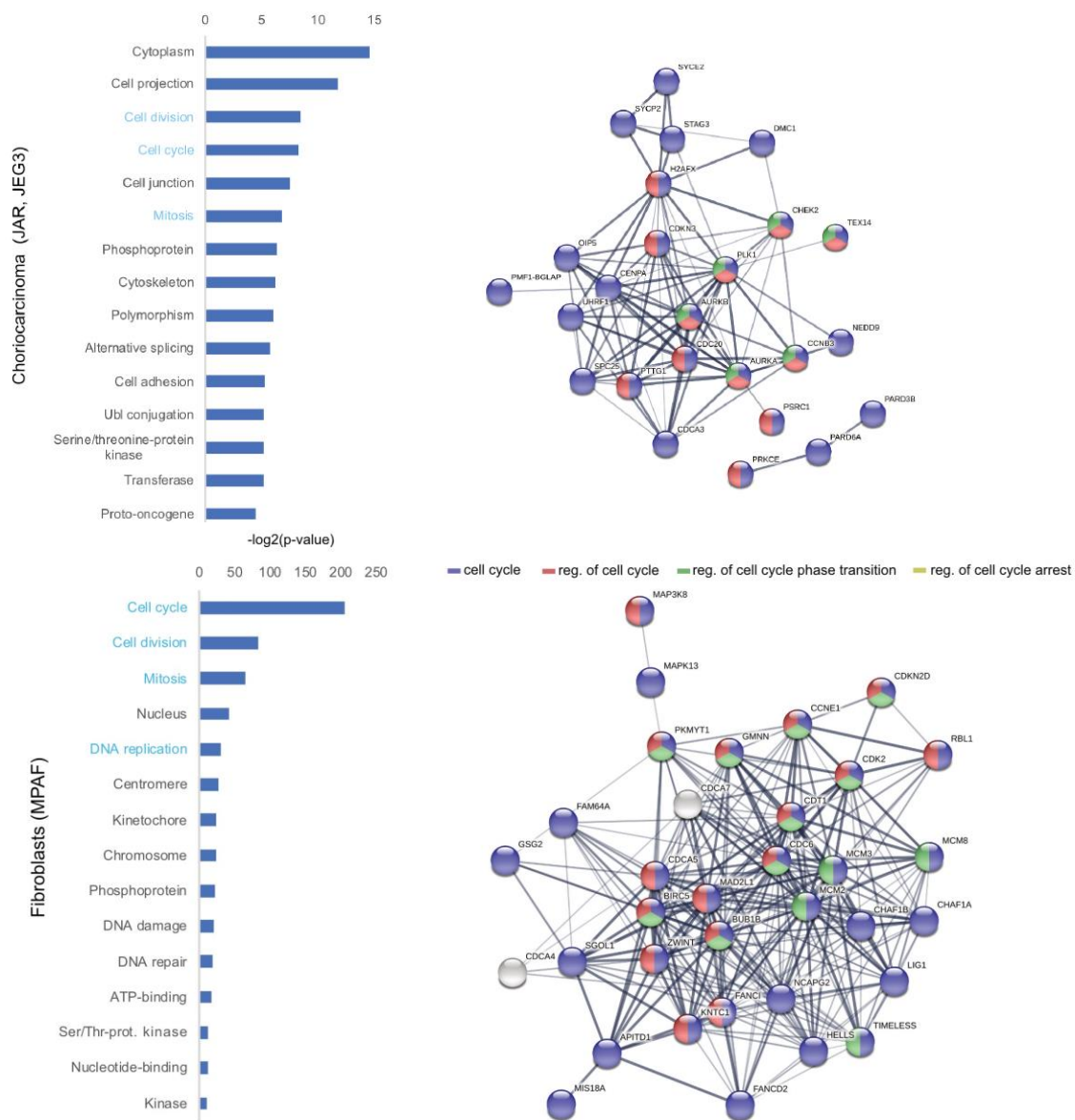


Abb.11: Protein-Protein-Interaktions- und Gene Ontology-Funktionsanalyse der deregulierten Gene in den einzelnen Keimzelltumor-Entitäten und der gesunden Fibroblasten-Zelllinie

Linksseitig abgebildet sind die funktionsbezogenen Kategorien, denen die unter Behandlung deregulierten Gene der jeweiligen KZT-Entität bzw. der Kontroll-Zelllinie zugeordnet werden können. Die KZT-Entität ist jeweils links vermerkt, in Klammern sind die dazugehörige Zelllinien angegeben. Hellblau hervorgehoben sind die *Gene Ontology*-Kategorien, die weitestgehend mit Zellzyklus-Prozessen assoziiert werden können. Es wurden lediglich Kategorien mit mindestens zehn zuordenbaren Genen (Count=10) und einem p-Wert von <0,05 als signifikant angenommen. Rechtsseitig dargestellt sind die Protein-Protein-Interaktionsprognosen der Gene aus der Kategorie „Zellzyklus“ (blau). In der Legende darüber angegeben sind zusätzliche *Gene Ontology*-Kategorien, die assoziiert sind mit Zellzyklus-Regulationsprozessen. Die Zuordnung eines Gens zu den verschiedenen Kategorien ist jeweils in unterschiedlichen Farben hervorgehoben (rot: Regulation des Zellzyklus, grün: Regulation der Übergänge zwischen den Zellzyklus-Phasen, gelb: Regulation von Zellzyklus-Arrest). Diese Abbildung wurde modifiziert nach Skowron et.al; 2020.

In Hinblick auf die prognostizierten Netzwerke stellte sich heraus, dass zwar unter Behandlung mit Palbociclib in allen KZT-Entitäten Gene dereguliert werden, die mit verschiedenen Zellzyklus-Prozessen assoziiert sind, jedoch jeweils unterschiedliche Interaktionspartner daran beteiligt zu sein scheinen (Abb.11). In der Seminom-Zelllinie

3. Ergebnisse

TCam-2 wurden mit Abstand die meisten Netzwerke an interagierenden Genen vorhergesagt, gefolgt von den Embryonalzellkarzinom-Zelllinien 2102EP und NCCIT und der gesunden Fibroblasten-Zelllinie MPAF. Die geringste Anzahl an Netzwerken konnte in den Chorionkarzinom-Zelllinien JAR und JEG-3 vorhergesagt werden (Abb.11). Genprodukte, die auch eine Funktion bei der Regulation des Zellzyklus-Arrestes spielen, konnten nur in den Seminom- und Embryonalzellkarzinom-Zelllinien als dereguliert bestimmt werden (Abb.11, gelb).

In einem weiteren Schritt wurde die Embryonalzellkarzinom-Zelllinie 2102EP isoliert in Hinblick auf darin deregulierte Zellzyklus-assoziierte Gene betrachtet. Dazu wurde eine STRING-basierte Interaktionsanalyse der Gene durchgeführt, die nach Palbociclib-Behandlung ausschließlich in der Zelllinie 2102EP dereguliert waren und der *Gene Ontology*-Kategorie „Zellzyklus“ zugeordnet werden konnten. Diese Analyse wurde zusätzlich durchgeführt, da wie erwähnt vor allem die Embryonalzellkarzinom-Zelllinien 2102EP(-R) und NT2D1(-R) in der G2/M-Phase des Zellzyklus akkumulierten und nicht wie erwartet in der G1/G0-Phase (Anhang 4). Daher sollten Faktoren gefunden werden, die diesen Effekt erzielen bzw. beeinflussen. In den Netzwerken der Gene, die so aufgeschlüsselt wurden, konnten solche identifiziert werden, welche eine Rolle bei der Regulation des Übergangs von der G2 in die M-Phase des Zellzyklus spielen (Abb.12A). Zwei der Gene (*NAE1*, *HMGA2*) konnten zu allen in Abbildung 12A genannten *Gene Ontology*-Kategorien zugeordnet werden. Sechs Gene (*CDC25C*, *CDC7*, *CNTRL*, *HAUS1*, *HAUS2*, *HAUS6*) wurden vier von fünf aufgedeckten Kategorien zugeordnet, zwei Gene (*CDK3*, *CHEK1*) zählten zu drei von fünf Kategorien und fünf Gene (*TERF1*, *BORA*, *PPM1D*, *MASTL*, *PLK3*) zu zwei von fünf Kategorien (Abb.12A). Von diesen insgesamt 15 Genen stellten sich 13 als herunterreguliert und zwei als hochreguliert dar (Abb.12B)

3. Ergebnisse

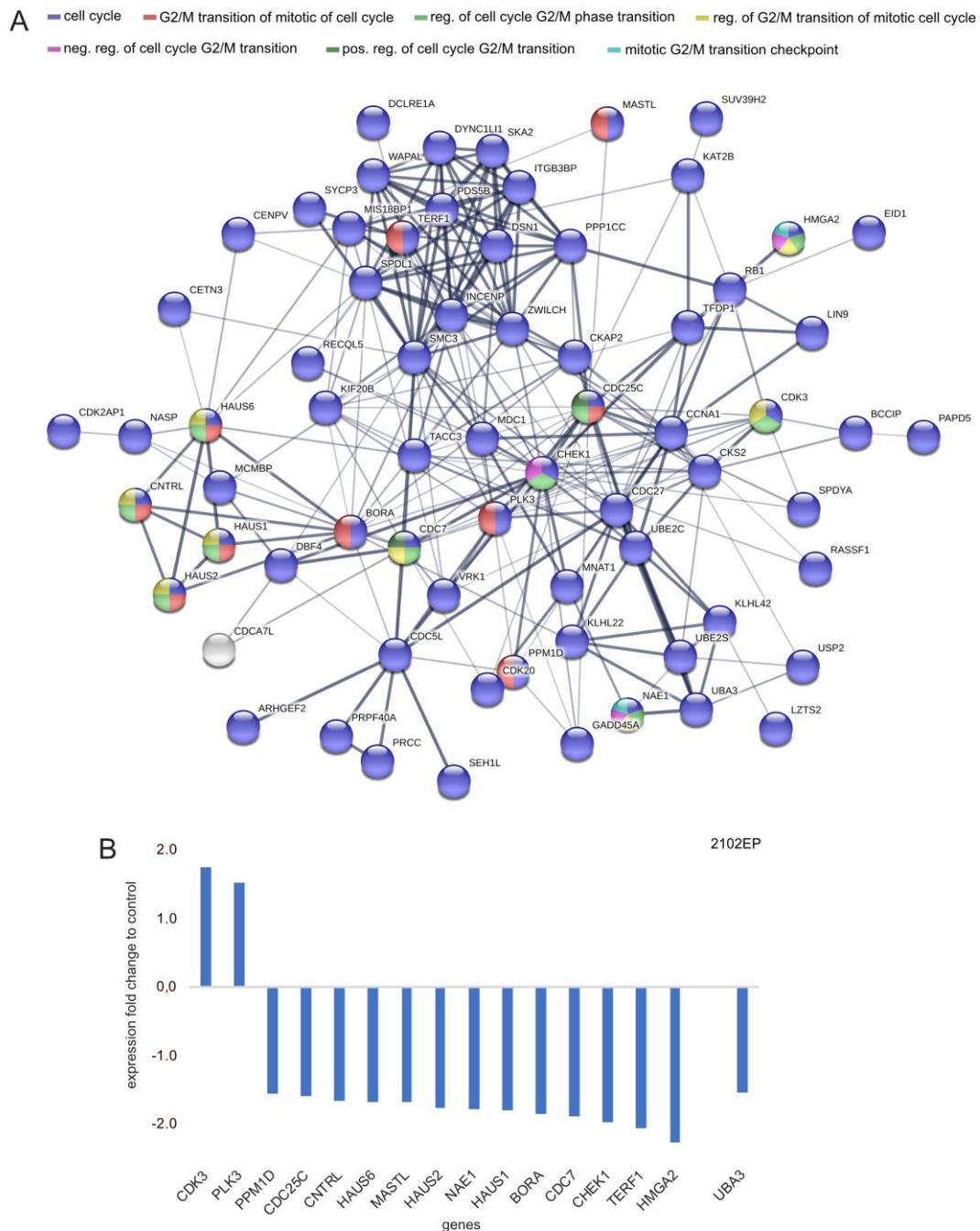


Abb.12: Protein-Protein-Interaktionsanalyse deregulierter Gene in der KZT-Zelllinie 2102EP

(A): Abgebildet ist eine STRING-basierte Interaktionsanalyse von unter Behandlung mit Palbociclib deregulierten Genen in der KZT-Zelllinie 2102EP, die der Kategorie „Zellzyklus“ (blau) zugeordnet werden konnten. Diese Faktoren wurden wiederum dahingehend untersucht, ob sie in verschiedenen G2/M-Phase-assoziierten *Gene Ontology*-Prozessen involviert sind (verschiedene Farben in obiger Legende).

(B): Als Wasserfalldiagramm dargestellt ist die Veränderung der Expressionsrate dieser G2/M-Phase-assoziierten Faktoren in der mit 10 μ M Palbociclib behandelten Zelllinie 2102EP. Die Expressionsänderung wird dabei in Relation zur unbehandelten Lösemittel-Kontrolle angegeben. Miteinbezogen sind lediglich Gene, die mindestens zwei der in (A) aufgezeigten Kategorien zugeordnet werden können.

Diese Abbildung wurde modifiziert nach Skowron et.al; 2020

3. Ergebnisse

Zuletzt wurden die RNA-Sequenzierung-Daten unabhängig von dem gesetzten Grenzwert, ab dem die Expression von Genen als signifikant stark angenommen wird, analysiert. Dabei wurde nach Zellzyklus-assoziierten Faktoren wie Zyklinen, CKDs (engl. *Cyclin dependent kinases*, Zyklin abhängige Kinasen), CDK-Inhibitoren und Ko-Faktoren untersucht.

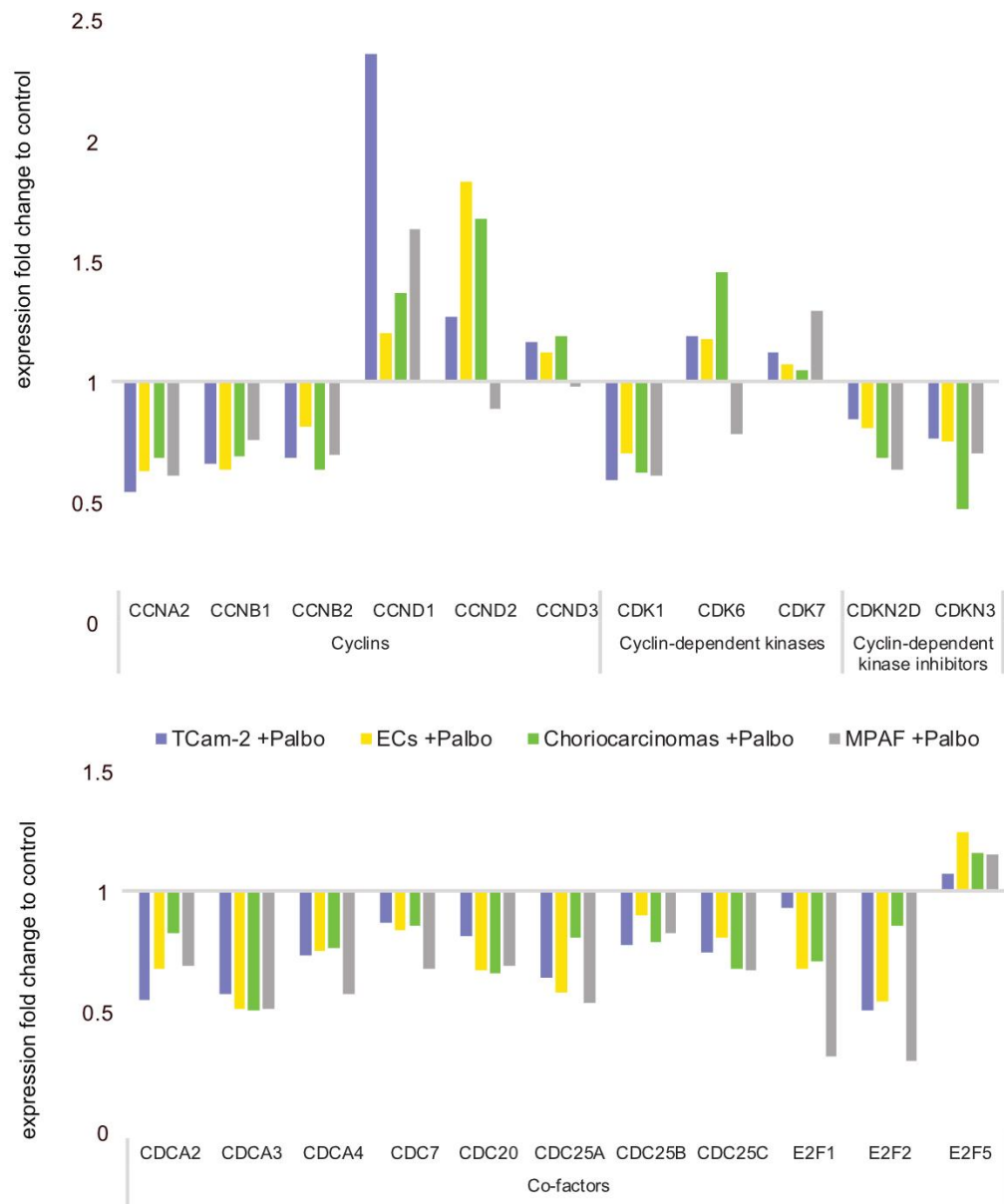


Abb.13: Unter Behandlung deregulierte Transkripte in Keimzelltumor-Zelllinien und der Kontroll-Zelllinie

Hier dargestellt sind die x-fachen Veränderungen der Expression der angegebenen Gene (X-Achse) in den behandelten KZT-Zelllinien im Vergleich zu den jeweiligen unbehandelten Lösemittel-Kontrollen. Es wurde kein Grenzwert für einen minimalen Expressionslevel oder p-Wert gesetzt.

Diese Abbildung wurde modifiziert nach Skowron et.al; 2020.

Wie aus Abbildung 13 ersichtlich, zeigten sich im Vergleich der Zelllinien untereinander größtenteils ähnliche Effekte durch die Behandlung mit Palbociclib. Die Zykline A2 (CCNA2) und B1/B2 (CCNB1/B2) waren in allen Zelllinien herunterreguliert im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Zyklin D in seinen drei Isoformen (CCND1/D2/D3) zeigte sich

3. Ergebnisse

dagegen als hochreguliert. Die Zyklin-abhängigen Kinasen 6 und 7 (*CDK6*, *CDK7*) waren allgemein hoch-, die Zyklin-abhängige Kinase 1 (*CDK1*) herunterreguliert. Die aufgeführten Ko-Faktoren wurden bis auf den Transkriptionsfaktor E2F5 unter Behandlung herunterreguliert im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die gesunde Fibroblasten-Zelllinie MPAF zeigte weitestgehend dieselben Tendenzen bezüglich der Gen-Deregulationen wie die KZT-Zelllinien, Ausnahmen bilden dabei lediglich die Herunterregulation von Zyklin D2/D3 (*CCND2/D3*) und der Zyklin-abhängigen Kinase 6 (*CDK6*) (Abb.13).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass durch eine Behandlung mit Palbociclib auf Transkriptom-Ebene gesehen in den KZT- bzw. der Kontroll-Zelllinie insgesamt Gene dereguliert werden, deren Produkte im weitesten Sinne eine Rolle bei der Regulation des Zellzyklus spielen. Dabei werden unter Behandlung Gene herunterreguliert, deren Genprodukte involviert sind in der Regulation früher Phasen des Zellzyklus, wie beispielsweise *E2Fs*, *CDKN2D*, *CDKN3* (Abb.13) oder *UHRF1* (Abb.8).

Gleichzeitig werden Gene herunterreguliert, die für den Eintritt oder die Vollendung der G2- und M-Phase des Zellzyklus relevant sind, wie beispielsweise Aurorakinase B (*AURKB*, Abb.8) oder die Zykline A2 und B1/B2 (Abb.13).

In allen KZT- und in der Kontroll-Zelllinie zeigte eine Behandlung mit Palbociclib Auswirkungen auf die Expression von Genen, die an Zellzyklus-assoziierten Prozessen beteiligt sind. Allerdings sind daran je nach Tumorentität andere Netzwerke an interagierenden Genen beteiligt (Abb.11).

3.4 Validierung der RNA-Sequenzierungsdaten auf RNA- und Protein-Ebene

Als nächstes sollten die gewonnenen RNA-Sequenzierungsdaten (RNA-Seq) mit Hilfe von quantitativen Real-Time-PCR (qRT-PCR) validiert werden. Dabei wurde bei der Auswahl der Primer vor allem auf die Gene fokussiert, welche sich bei der RNA-Seq als dereguliert herausstellten. Für die qRT-PCR wurden sowohl mit Palbociclib als auch mit Ribociclib behandelte KZT- und Kontroll-Zelllinien verwendet.

Insgesamt zeigten sich in den Deregulationen der getesteten Gene unter Behandlung mit den CDK4/6-Inhibitoren ähnliche Tendenzen bei den qRT-PCR wie in der RNA-Sequenzierung. Beispielsweise wurde unter Behandlung mit Palbociclib die Genexpression der Zykline A2, B1 und B2 (= *CCNA2/B1/B2*) in den meisten KZT- sowie der Kontroll-Zelllinie MPAF im Vergleich zur unbehandelten Lösemittel-Kontrolle signifikant herunterreguliert (Abb.14).

3. Ergebnisse

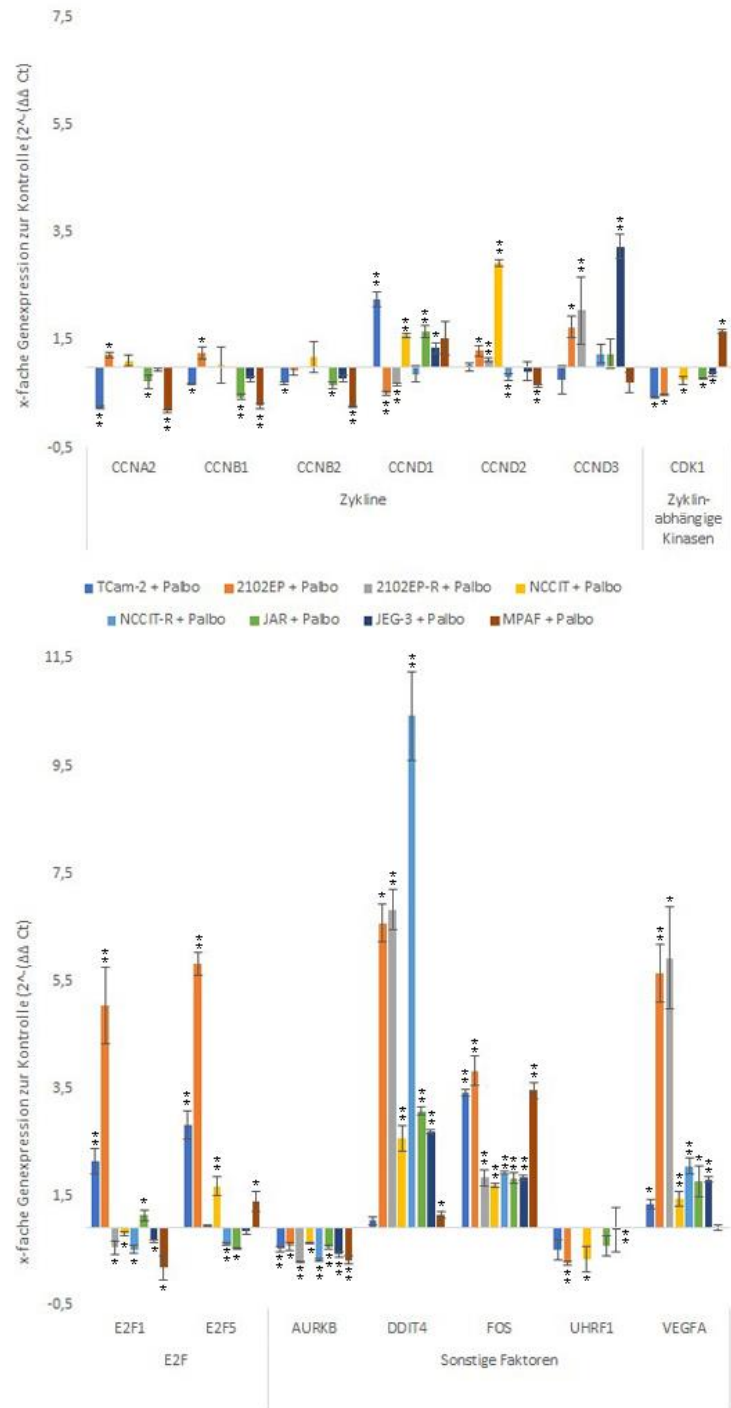


Abb.14: Relative Quantifizierung der mRNA-Expression ausgewählter Gene in mit Palbociclib behandelten Keimzelltumor- Zelllinien und der gesunden Fibroblasten-Kontrollzelllinie mittels qRT-PCR

qRT-PCR Analyse von *CCNA2/B1/B2/D1/D2/D3* und *CDK1* (obere Abbildung), sowie *E2F1/F5*, *AURKB*, *DDIT4*, *FOS*, *UHRF1* und *VEGFA* (untere Abbildung) in mit Palbociclib-behandelten (10 μ M) KZT- und Kontroll-Zelllinien in Relation zu der jeweiligen Lösemittelkontrolle (H₂O, pH3) (n=3, Relative Quantifizierung = 2^{- (ΔΔCt)}). Als Referenzgen zur Normalisierung wurde *GAPDH* verwendet. Standardabweichungen sind über den Balken angegeben. Ein *P*-Wert von <0,05 wurde als signifikant angenommen.

* *P*-Wert <0,05, ** *P*-Wert <0,005.

3. Ergebnisse

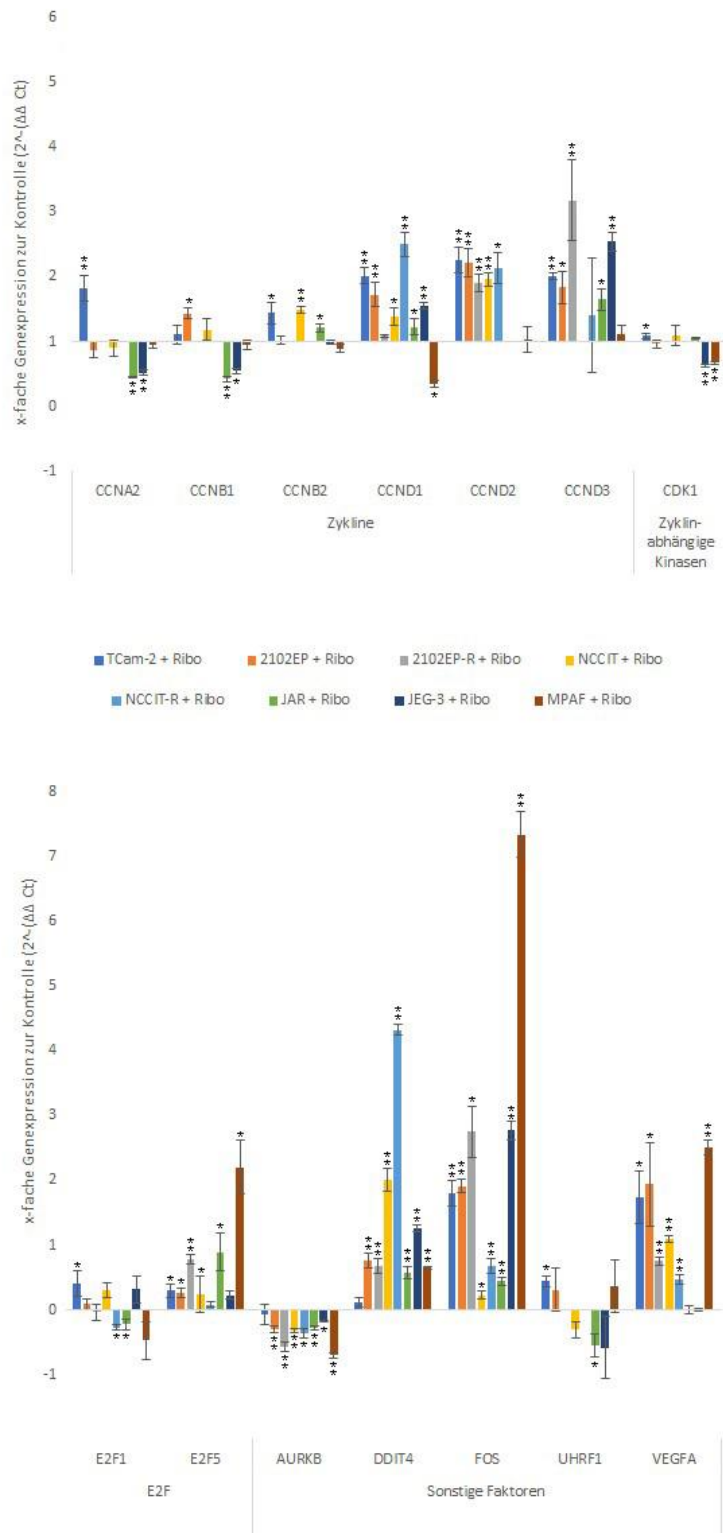


Abb.15: Relative Quantifizierung der mRNA-Expression ausgewählter Gene in mit Ribociclib behandelten Keimzelltumor- Zelllinien und der gesunden Fibroblasten-Kontrollzelllinie mittels qRT-PCR

qRT-PCR Analyse von *CCNA2/B1/B2/D1/D2/D3* und *CDK1* (obere Abbildung), sowie *E2F1/F5*, *AURKB*, *DDIT4*, *FOS*, *UHRF1* und *VEGFA* (untere Abbildung) in mit Ribociclib-behandelten (25 μ M) KZT- und Kontroll-Zelllinien in Relation zu der jeweiligen Lösemittelkontrolle (DMSO) (n=3, Relative Quantifizierung = $2^{-\Delta\Delta Ct}$). Als Referenzen zur Normalisierung wurde *GAPDH* verwendet. Standardabweichungen sind über den Balken angegeben. Ein *P*-Wert von < 0,05 wurde als signifikant angenommen.

* *P*-Wert <0,05, ** *P*-Wert <0,005.

3. Ergebnisse

Bei Zyklin D in seinen drei Isoformen (=CCND1/D2/D3) stellte sich unter Behandlung mit Palbociclib ein bunteres Bild dar. Bei der Isoform Zyklin D1 (CCND1) wurde in den Zelllinien 2102EP und den beiden Cisplatin-resistenten Subzelllinien 2102EP-R und NCCIT-R eine geringere Expression induziert, wohingegen in den anderen Zelllinien eine bis zu zweifach höhere Expression durch eine Behandlung induziert wurde (Abb.14). Die Isoformen Zyklin D2 und D3 zeigten in den meisten KZT-Zelllinien eine höhere oder nahezu gleichbleibende Expressionsrate durch die Behandlung, während bei der Kontroll-Zelllinie MPAF niedrigere Expressionslevel erzielt wurden (Abb.14). Die Expression der Zyklin-abhängigen Kinase 1 (CDK1) wurde unter Palbociclib-Behandlung in den KZT-Zelllinien verringert, in der Kontroll-Zelllinie MPAF zeigten sich erhöhte Expressionswerte (Abb.14). Die beiden getesteten Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie E2F1 und E2F5 werden unter Behandlung vor allem in den Zelllinien TCam-2 und 2102EP in signifikantem Maße höher exprimiert (Abb.14).

Durch die Behandlung mit Ribociclib konnten insgesamt vergleichbare Effekte erzielt werden wie mit Palbociclib, was als ein Hinweis auf einen gemeinsamen Wirkmechanismus gedeutet werden kann. Die Zykline A2 und B1/B2 (CCNA2/B1/B2) wurden tendenziell verringert oder gleichbleibend exprimiert, während Zyklin D in seinen drei Isoformen unter Behandlung höhere Expressionslevel erreichte. Bei der Zyklin-abhängigen Kinase 1 (CDK1) wurden durch die Behandlung mit Ribociclib zumeist gleichbleibende Expressionsraten erzielt, nur in den Zelllinien JEG-3 und MPAF war diese erniedrigt. Die zwei Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie wurden in den meisten Zelllinien in höherem Maße exprimiert (Abb.15).

Die Gene, die in der RNA-Sequenzierung als gleichermaßen dereguliert in allen mit Palbociclib behandelten Zelllinien identifiziert wurden, wurden nochmals mittels qRT-PCR in Palbociclib- sowie Ribociclib-behandelten KZT- und Kontroll-Zelllinien analysiert. Diese sind in Abbildung 14 und 15 mit „Sonstige Faktoren“ bezeichnet. Aurokinase B (AURKB) und *Ubiquitin-Like PHD and RING Finger Domain-Containing Protein 1* (UHRF1) zeigten sowohl bei der Behandlung mit Palbociclib als auch mit Ribociclib bis auf wenige Ausnahmen signifikant geringere Expressionslevel im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb.14 und 15). Bezüglich der Gene *DNA-damage-inducible transcript 4* (DDIT4), *FOS* (kodiert für das Protein c-Fos, ein Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP-1 und Protoonkogen) und *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGFA) induzierte eine Behandlung sowohl mit Palbociclib als auch mit Ribociclib eine signifikant erhöhte Expression in beinahe allen KZT-Zelllinien und der gesunden Kontroll-Zelllinie (Abb.14 und 15). Dies bestätigt insgesamt die Ergebnisse, die in Hinsicht auf diese genannten Gene durch die RNA-Sequenzierung gewonnen werden konnten. Des Weiteren konnten so insgesamt ähnliche Effekte der beiden CDK4/6-Inhibitoren Palbociclib und Ribociclib nachgewiesen werden, was auch hier auf einen gemeinsamen Wirkmechanismus hindeutet.

3. Ergebnisse

Darüber hinaus sollten Teile der RNA-Seq-Daten auch auf Proteinebene mit Hilfe von Western Blot-Analysen validiert werden. Dazu wurden auch hier behandelte mit den nicht behandelten Proben derselben Zelllinie verglichen. Dabei wurde der Fokus vor allem auf die Zellzyklus-assoziierten Gene gelegt, um Rückschlüsse darüber ziehen zu können, in welcher Phase des Zellzyklus die KZT-Zelllinien durch eine CDK4/6-Inhibition akkumulieren könnten.

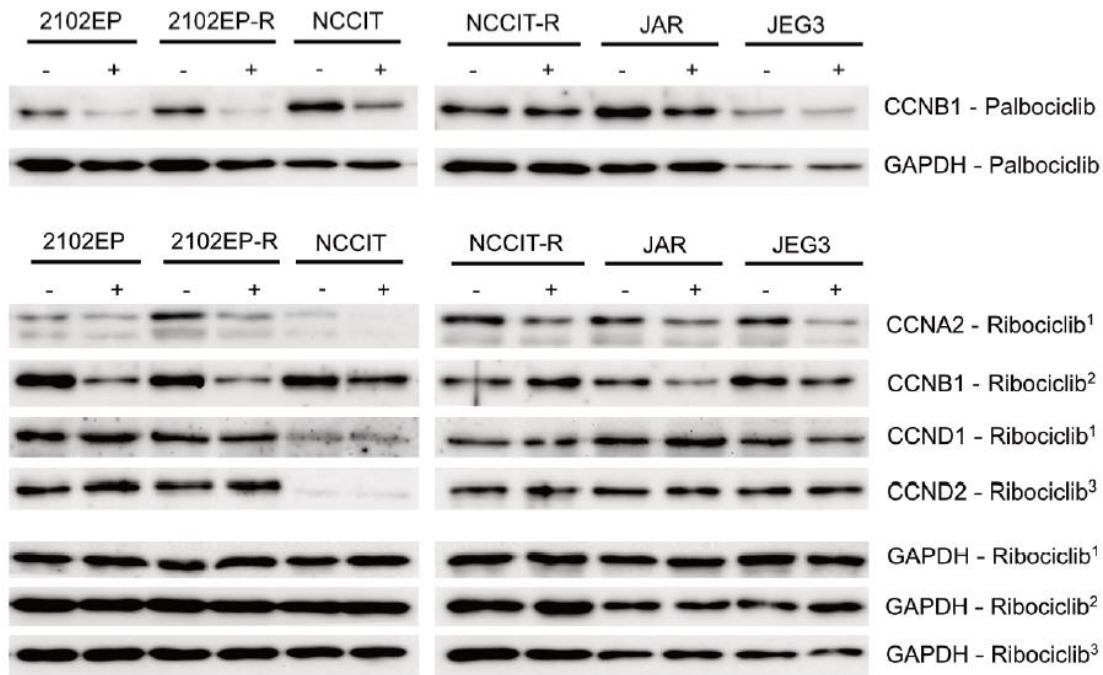


Abb.16: Western Blot-Analyse der angegebenen Zellzyklus-Regulatoren in mit Palbociclib bzw. Ribociclib behandelten Keimzelltumor-Zelllinien

Hier aufgezeigt sind die detektierten Proteine (Banden) einer Western-Blot-Analyse der KZT-Zelllinien mit den rechtsseitig aufgeführten primären Antikörpern. Es wurden die unbehandelten Lösemittel-Kontrollen (-) mit den behandelten Proben (+) verglichen. GAPDH wurde als Ladekontrolle (*Housekeeper*) eingesetzt. Die hochgestellten Zahlen zeigen die Zugehörigkeit der Ladekontrolle zu den entsprechenden Proben.

CCNB1 = Zyklin B1; *CCNA2* = Zyklin A2; *CCND1/D2* = Zyklin D1/D2.

Diese Abbildung wurde modifiziert nach Skowron et.al; 2020.

Die Herunterregulierung von Zyklin B1 (*CCNB1*) und Zyklin A2 (*CCNA2*) durch eine CDK4/6-Inhibition, die sich in der RNA-Sequenzierung abzeichnete, konnte auch auf Proteinebene bestätigt werden (Abb.16). Anders verhielt es sich bei Zyklin D in seinen Isoformen D1 und D2. Bei der RNA-Seq und größtenteils auch in den qRT-PCR-Analysen zeichnete sich eine Hochregulierung von Zyklin D1/D2 ab (Abb.13, Abb.14 und 15). Auf Proteinebene zeigten sich aber unter Behandlung keine Veränderungen in der Expressionsstärke verglichen zur unbehandelten Probe (Abb.16).

Des Weiteren wurde eine Western Blot-Analyse mit dem primären Antikörper Aurorakinase B durchgeführt, um die Veränderung des entsprechenden Gens AURKB in der RNA-Seq bzw. qRT-PCR zu validieren. Es konnte auch auf Proteinebene eine Herunterregulation der Aurorakinase B in den KZT-Zelllinien nachgewiesen werden (Abb.17).

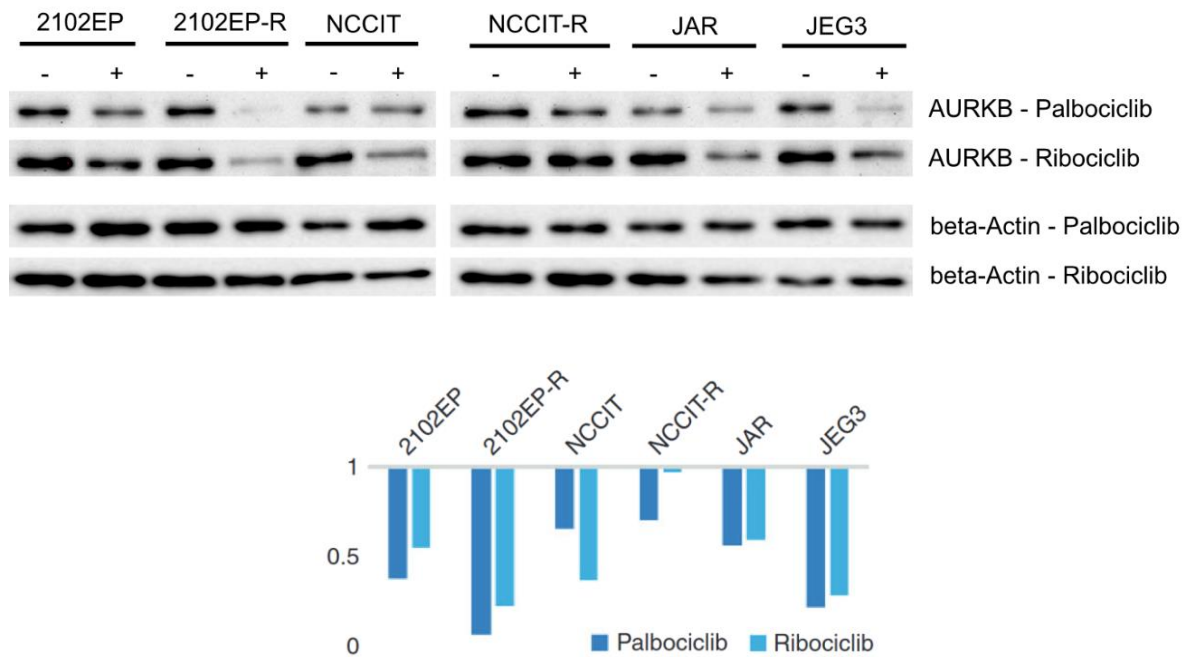


Abb.17: Western Blot-Analyse der Aurorakinase B unter Behandlung mit Palbociclib und Ribociclib in Keimzelltumor-Zelllinien

Oben: Dargestellt ist die Detektion der Proteinexpression von Aurorakinase B (*AURKB*) in behandelten KZT-Zelllinien (+) im Vergleich zu der jeweiligen unbehandelten Lösemittel-Kontrolle (-). β -Actin wurde als Ladekontrolle (*Housekeeper*) verwendet.

Unten: Zur vereinfachten Darstellung der Western Blot- Ergebnisse und aufgrund von Ungleichmäßigkeiten in der Expression der Ladekontrolle wurde eine densitometrische Auswertung angeschlossen.

Diese Abbildung wurde modifiziert nach Skowron et.al; 2020.

3.5 CDK4-Proteinlevel in Keimzelltumor-Zelllinien unter Behandlung mit CDK4/6-Inhibitoren

In einem letzten Schritt wurde analysiert, wie sich das primäre Target von CDK4/6-Inhibitoren, die Zyklin-abhängige Kinase 4 (*CDK4*), unter einer Behandlung mit diesen in den KZT-Zelllinien und der Kontroll-Zelllinie verhält. Dazu wurde eine Western Blot-Analyse mit einem primären Antikörper gegen das Protein CDK4 durchgeführt und sowohl unbehandelte als auch mit Palbociclib bzw. Ribociclib behandelte Proben miteinbezogen. In Vorarbeiten wurde eine ähnliche Analyse bereits durchgeführt (siehe Anhang 5), an dieser Stelle jedoch um mit Ribociclib behandelte sowie resistente Subklone der Zelllinien erweitert, die Fibroblasten-Zelllinie MPAF als Kontrolle miteinbezogen und eine densitometrische Auswertung angeschlossen.

3. Ergebnisse

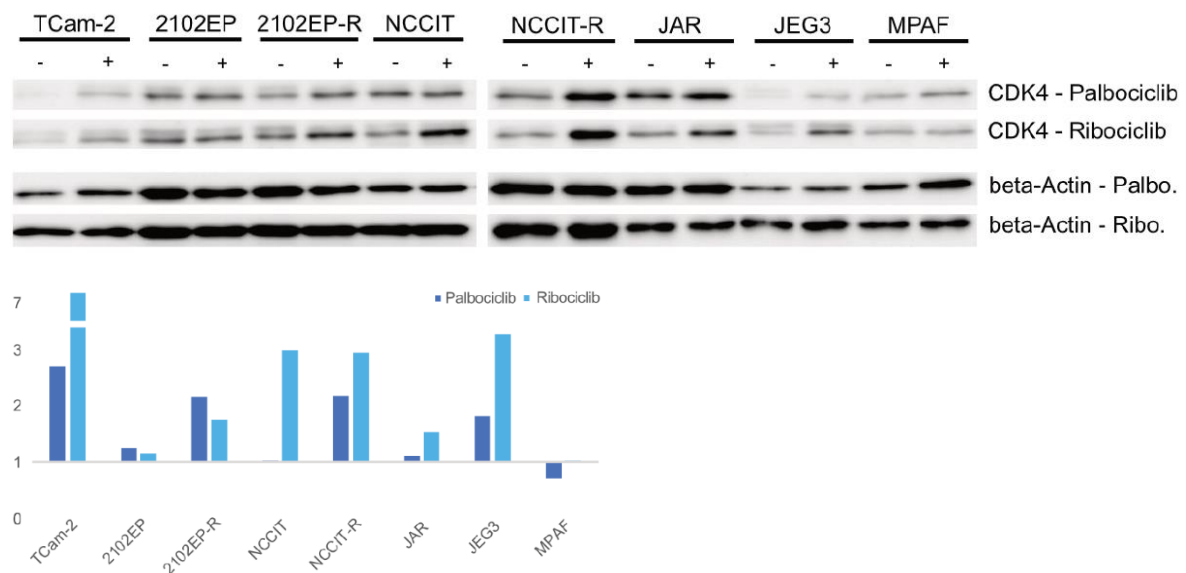


Abb.18: Western Blot-Analyse von CDK4 unter CDK4/6-Inhibition in Keimzelltumor- und Kontroll-Zelllinien

Oben: Abgebildet sind die detektierten Banden, die die Proteinexpression von CDK4 in den unbehandelten (-) und behandelten (+, Palbo = Palbociclib / Ribo = Ribociclib) KZT- und der Kontroll-Zelllinie MPAF widerspiegeln. β -Actin wurde als Ladekontrolle (*Housekeeper*) verwendet.

Unten: Zur übersichtlicheren Darstellung und wegen ungleichmäßiger Banden der Ladekontrolle wurden die Ergebnisse densitometrisch ausgewertet.

Diese Abbildung wurde modifiziert nach Skowron et.al; 2020.

Wie aus Abbildung 18 ersichtlich, führte eine Behandlung mit CDK4/6-Inhibitoren in den getesteten KZT-Zelllinien und auch in den zwei Cisplatin-resistenten Subklonen (2102EP-R; NCCIT-R) zu einer Erhöhung der Proteinlevel von CDK4. Dies gilt für beide eingesetzte Inhibitoren, was für einen gemeinsamen Wirkeffekt spricht. Nur in der gesunden Fibroblasten-Zelllinie MPAF wurden geringere oder nicht veränderte Proteinlevel erzielt (Abb.18).

4. Diskussion

4.1 Das grundlegende Expressionsprofil von Keimzelltumor-Zelllinien

Um die Wirksamkeit und Effekte von CDK4/6-Inhibitoren in KZT-Zelllinien testen zu können, galt es zunächst durch Vorarbeiten eine signifikante Grundexpression der Zielgene- bzw. Proteine CDK4, CDK6 sowie (p)RB1 nachzuweisen, um eine Grundlage aufzubauen, auf die sich diese Arbeit beziehen kann. Es konnte eine erhöhte Expression von CDK4 (im Vergleich zum entsprechenden Normalgewebe) sowohl in den KZT-Geweben als auch in den einzelnen KZT-Zelllinien gezeigt werden. CDK6 stellte als nicht im relevanten Maße erhöht heraus. Im Gegensatz dazu wies die gesunde Fibroblasten-Kontrollzelllinie MPAF keine erhöhte CDK4-Expression auf (Anhang 1). Sich deckende Beobachtungen konnten bereits in KZT-Geweben gemacht werden. Dabei wurden in 41% aller getesteten Tumorgeweben eine erhöhte CDK4-Expression (im Vergleich zum entsprechenden Normalgewebe) gefunden, am stärksten ausgeprägt war diese hier ebenfalls in Embryonalkarzinomen (Schmidt *et al.*, 2001). Des Weiteren wurden in 64% der Seminome und in 23% der Nicht-Seminome eine deutlich geringere Expression von CDK6 gefunden (Schmidt *et al.*, 2001). Dies stimmt ebenfalls mit den Erkenntnissen der in Anhang 1 genannten Microarray-Daten überein.

Darüber hinaus wurde als direktes Zielprotein des CDK4/6-Komplexes das Retinoblastom-Protein (RB1) auf seine Expression in KZT-Zelllinien hin untersucht. Es stellte sich heraus, dass in allen KZT-Zelllinien RB1 exprimiert wird. Wie bei CDK4 zeigte sich in der Kontroll-Zelllinie MPAF keine erhöhte RB1-Expression (Anhang 2).

Durch ihre erhöhte Expression in KZT-Zelllinien stellen CDK4 bzw. die CDK4-RB1-Achse generell potenzielle Zielproteine für den therapeutischen Einsatz der CDK4/6-Inhibitoren Palbociclib bzw. Ribociclib dar.

Die Rolle des Tumorsuppressorproteins (p)RB1 als Marker für den erfolgreichen Einsatz von CDK4/6-Inhibitoren ist jedoch kritisch zu betrachten. Es ist zu beachten, dass in Seminomen und Embryonalkarzinomen bereits ein Fehlen von pRB beobachtet wurde und dies ein allgemeines Merkmal zu sein scheint, das zu der molekularen Pathogenese von Keimzelltumoren beiträgt (Bartkova *et al.*, 2003). Gleichzeitig wurden in derselben Studie aber auch pRB-positive Zellen in invasiven Tumoren nachgewiesen (Bartkova *et al.*, 2003). Auch andere Studien belegten eine verringerte mRNA-Expression von RB, während eine fehlende RB-Proteinexpression lediglich in undifferenzierten Zellen der Keimzelltumoren aufgezeigt wurde. Somit scheint bei Betrachtung der RB-Proteinexpression weniger der histologische Subtyp, sondern vielmehr der Reife- oder Differenzierungsstatus der Krebszellen in den Keimzelltumoren von Relevanz zu sein (Strohmeyer *et al.*, 1991).

Welche Aussagekraft die erhöhte Proteinexpression von RB1 in den hier getesteten KZT-Zelllinien hat, scheint somit nur schwer zu beurteilen, zumal der CDK4/6-Signalweg in Keimzelltumoren in sehr komplexer Weise dereguliert ist (Calzone *et al.*, 2008).

Dass CDK4 und RB1 in den Kontrollzelllinien (Fibroblasten) nicht erhöht exprimiert werden, könnte als positiver Aspekt gewertet werden, da dies ein Hinweis darauf sein könnte, dass gesunde Zellen in der Nähe des Tumorgewebes von der Behandlung mit CDK4/6-Inhibitoren eher verschont bleiben.

Des Weiteren wurden Expressions-Microarray-Daten re-analysiert und dabei der Fokus auf Zellzyklus-assoziierte Faktoren gelegt. Dadurch sollte untersucht werden, welche solcher Gene in den KZT-Zelllinien exprimiert werden und damit als weitere potenzielle Angriffspunkte einer CDK4/6-Inhibition dienen bzw. eine Bedeutung bei der Aufschlüsselung von deren Wirkmechanismen haben könnten. Es stellte sich heraus, dass in KZT-Zelllinien insgesamt Gene hoch exprimiert sind, die jeweils in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus eine Funktion haben (Abb.4). Beispielsweise wird nicht nur CKD4, sondern auch das mit dem CDK4/6-Komplex interagierende Zyklin D in seinen drei Isoformen (*CCND1/2/3*) hoch exprimiert. Erhöhte Zyklin D1-Level und, wenn auch weniger häufig, erhöhte Zyklin D2- und D3-Level wurden bereits in mehreren Tumorentitäten entdeckt (Goel *et al.*, 2018). Die damit einhergehende Erhöhung der CDK4/6-Aktivität konnte sogar mit einer Sensitivität gegenüber CDK4/6-Inhibitoren in Verbindung gebracht werden (Goel *et al.*, 2018) (Gong *et al.*, 2017). Inwieweit dies auf Keimzelltumoren übertragbar und die Zyklin D-Expression ein Hinweis auf das Ansprechen auf eine CDK4/6-Inhibition ist bleibt offen, da sich diese Studien auf Tumoren anderen Ursprungs beziehen. Darüber hinaus sind Zykline hoch exprimiert, die z.B. in der G2-Phase bzw. dem Übergang zur Mitose-Phase des Zellzyklus wichtig sind, wie Zyklin A2 (*CCNA2*), Zyklin B1/B2 (*CCNB1*) oder Zyklin E1/2 (*CCNE1/2*). Der Zyklin-abhängige Kinase-Inhibitor p27 (*CDKN1B*), welcher die Aktivierung der Zylin E-CDK2- und Zyklin D-CDK4-Komplexe verhindert (Lee *et al.*, 2009) war ebenso in allen KZT-Zelllinien erhöht (Abb.4). Eine erhöhte Expression von Zyklin E und p27 (*CDKNB1*) wurde bereits in Keimzelltumoren des Mannes beschrieben, jedoch auf Proteinebene durch immunohistochemische Anfärbungen von Tumorgeweben (Bartkova *et al.*, 2000). Diese mögliche Korrelation könnte als Hinweis darauf gedeutet werden, dass sich Tumor-Zelllinien ähnlich wie Tumorgewebe verhalten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass allgemein Zellzyklus-assoziierte Gene in den getesteten KZT-Zelllinien exprimiert werden und damit CDK4/6-Inhibitoren über die CDK4/6-RB-Achse wirken können, aber auch abseits des kanonischen Wirkmechanismus bzw. an anderen Stellen im Zellzyklus Angriffspunkte bestehen.

4.2 Die molekularen Effekte in Keimzelltumor-Zelllinien durch die Behandlung mit Palbociclib und Ribociclib

Wie in Kapitel 1.6 beschrieben, gaben vorhergehende Arbeiten Hinweise darauf, dass die CDK4/6-Inhibitoren Palbociclib und Ribociclib nicht nur über die kanonische CDK4/6-RB-Achse wirken. Die Behandlung mit Palbociclib bzw. Ribociclib führte in den meisten KZT-Zelllinien zu einem pseudoseneszenten Zustand und damit zu einer Akkumulation in der G1/G0-Phase des Zellzyklus, die Embryonalkarzinom-Zelllinien mit ihren Cisplatin-resistenten Subklonen akkumulierten jedoch unerwarteterweise in der G2/M-Phase (Skowron *et al.*, 2020, Anhang 4). Darüber hinaus induzierte die Behandlung mit Palbociclib bzw. Ribociclib in beinahe allen KZT-Zelllinien Apoptose (Skowron *et al.*, 2020, Anhang 4). Positiverweise wurde in den gesunden Kontroll-Zelllinien nur ein geringes Ausmaß an Zelltod induziert. Diese Beobachtung konnte in dieser Arbeit auch auf Proteinebene werden (Abb.5). Die Induktion von Apoptose durch den Einsatz von Palbociclib konnte schon in Harnblasenkarzinom-Zelllinien beobachtet werden. Dabei wird durch die CDK4/6-Inhibition anstelle eines Zellzyklus-Arrestes über verschiedene Wirkkaskaden direkt Apoptose induziert (Zhang *et al.*, 2019). Auch in weiteren Tumorentitäten wurde eine durch Palbociclib bewirkte Apoptose beschrieben, wie beispielsweise in T-Zellen akuter lymphatischer Leukämie (Choi *et al.*, 2012). Gegensätzlich war in Adenokarzinomen des Pankreasganges Palbociclib allein nicht in der Lage, Apoptose zu induzieren (Franco *et al.*, 2016). Somit scheint es von der Tumorentität abzuhängen, ob als Reaktion auf eine CDK4/6-Inhibition Apoptose in den Krebszellen ausgelöst wird. Allgemein kann die Apoptose in den KZT-Zellen als positive Therapiefolge angesehen werden, vor allem da die gesunden Fibroblasten nicht von diesem Effekt betroffen zu sein scheinen.

Die Akkumulation von Zelllinien in der G2/M-Phase und die Apoptose-Induktion wiesen dabei auf einen alternativen Wirkmechanismus abseits der kanonischen CDK4/6-Achse hin. Über welche Prozesse der G2/M-Arrest und Apoptose in den KZT-Zelllinien eingeleitet wird, blieb an dieser Stelle offen und führte dazu, die Therapieeffekte von Palbociclib bzw. Ribociclib weiter im Detail zu beleuchten. Dazu wurde eine umfassende RNA-Sequenzierung von mit Palbociclib behandelten KZT- bzw. Kontroll-Zelllinien durchgeführt, um durch die Behandlung induzierte Veränderungen im gesamten Transkriptom aufzuschlüsseln. Insgesamt wurden in den KZT-Zelllinien mehr Effekte im Sinne von Genexpressionsveränderungen erzielt als in der gesunden Fibroblasten-Zelllinie MPAF (Abb.7). Dies kann dahingehend als positiv gewertet werden, als dass die Behandlung eher wie gewünscht in den Krebszellen Auswirkungen zu haben scheint. Zunächst wurden die Transkripte näher betrachtet, die in allen KZT- bzw. Kontroll-Zelllinien auf ähnliche Weise durch die Behandlung dereguliert wurden. Es stellte sich heraus, dass von den so identifizierten 23 Genen acht durch die Palbociclib-Behandlung herunterreguliert wurden im

Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Zelllinie, darunter beispielsweise *UHRF1*, *CDCA3*, *KIF20A*, *SPC25* und *AURKB* (Abb.8). Durch eine anschließende Interaktionsanalyse ergab sich zudem, dass diese Gene ein interagierendes Netzwerk bilden und somit funktionell zusammenhängen. Dieses beinhaltet im Vergleich zu zwei weiteren identifizierten Netzwerken die meisten interagierenden Gene (Abb.9) und wurde daher näher betrachtet. In Hinblick auf die Funktionen der Proteine, für die diese Gene kodieren, ergaben sich einige Gemeinsamkeiten. *UHRF1* (*Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1*) beispielsweise kodiert für das gleichnamige Protein UHRF1, welches essenziell ist für die zelluläre Proliferation und unter anderem als direktes Ziel von E2F1 den Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus fördert. Eine Runterregulierung von *UHRF1* erfolgt durch eine hochregulierte Transkription von p21 (*CDKN1A*) und Inaktivierung von E2F1 (Unoki *et al.*, 2009). Durch ein „knock down“ von *UHRF1* konnte bereits ein vermindertes Zellwachstum von Harnblasen-Krebszellen nachgewiesen werden (Unoki *et al.*, 2009). Das Gen *CDCA3*, das für das *Cell division cycle-associated-Protein 3* kodiert und ebenfalls durch die Palbociclib-Behandlung in den KZT-Zelllinien herunterreguliert wurde, hat allgemein betrachtet vergleichbare Funktionen wie UHRF1. Als Trigger für den Eintritt in die Mitose spielt das CDCA3-Protein ebenfalls eine Rolle bei der Zellzyklus-Progression (Qian *et al.*, 2018). Ein Knockdown von CDCA3 in einer kolorektalen Krebs-Zelllinie führte zu einer erhöhten *p21* (*CDKN1A*)-Expression, was wiederum die Akkumulation dieser Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus durch den blockierten G1-S-Phasenübergang erklärt (Qian *et al.*, 2018) (Adams *et al.*, 2017).

Die übrigen der genannten Gene, welche in den KZT-Zelllinien unter dem Einfluss von Palbociclib herunterreguliert wurden im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen, haben ebenso Einfluss auf die Zellzyklus-Regulation, wenn auch über andere Mechanismen. *KIF20A* (*Kinesin family member 20A*) als ein Mitglied der *Kinesin superfamily-6* ist unter anderem involviert in der Ausbildung des Spindelapparats während der Mitose und wichtig bei der Zytokinese (Wang *et al.*, 2017). Durch ein „knock down“ von *KIF20A* konnte ein Zellzyklus-Arrest in der G0/G1-Phase sowie eine Induktion von Apoptose in Glioblastom-Zelllinien beobachtet werden (Wang *et al.*, 2017). Im Gegensatz dazu wurde nachgewiesen, dass es durch die Gen-Inaktivierung von *KIF20A* in Magenkrebs-Zellen zu einem Arrest in der G2/M-Phase kommt (Yan *et al.*, 2012). Shen *et al.*, 2019 stellten heraus, dass durch ein „knock down“ von *KIF20A* die Proliferation von Harnblasen-Krebszellen gehemmt und Apoptose induziert wird, die molekularen Mechanismen dahinter bleiben bisher jedoch offen. Insgesamt scheint es also von der Tumorentität abzuhängen, welche bestimmten Auswirkungen eine reduzierte Expression von *KIF20A* auf den Zellzyklus von Krebszellen hat.

Die übrigen zwei unter Palbociclib-Behandlung runterregulierten Gene, die an dieser Stelle näher betrachtet werden sollten, *SPC25* und *AURKB*, kodieren für Proteine mit ähnlichen

4.Diskussion

Funktionen. Beide sind unter anderem wichtig für die Chromosomensegregation und Zytokinese (Cui *et al.*, 2018) (Chieffi, 2018). Cui *et al.*, 2018 untersuchten den Einfluss eines Knockdowns des *Kinetochore Proteins SPC25* auf den Zellzyklus in Prostatakrebs-Zelllinien. Sie fanden heraus, dass die Krebszellen durch eine geminderte *SPC25*-Expression weniger in der S-Phase und vermehrt in der G2/M-Phase arretierten, während der Prozentsatz an Zellen in der G1-Phase unverändert blieb. Darüber hinaus gingen die Krebszellen vermehrt in Apoptose. In Bezug auf *AURKB* (Protein: Aurorakinase B) scheinen die Effekte infolge einer Minderung dieses Gens von der Tumorentität abzuhängen. Manche Tumor-Zelllinien gehen infolge einer *AURKB*-Verminderung in Apoptose oder einen Pseudo-G1-Arrest (Chieffi, 2018).

Übergreifend betrachtet entfalten die Genprodukte der oben genannten Gene, die unter der Behandlung mit Palbociclib in allen KZT- und der Kontroll-Zelllinie herunterreguliert werden (im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle) ähnliche Funktionen, die wichtig sind bei der Regulation von Zellzyklus-Prozessen. Bei Betrachtung der bisherigen Forschung fällt auf, dass durch die experimentelle Herunterregulierung dieser Gene eine geringere Proliferation von Krebszellen anderer Entitäten erreicht werden konnte. Dabei scheinen vor allem frühe Zellzyklus-Phasen beeinflusst zu werden, da es unter anderem zum Arrest der Krebszellen in der G0/G1-Phase kam. Somit ist es möglich, dass auch in den KZT-Zelllinien durch die herunterregulierte Expression dieser Gene ähnliche Mechanismen wie oben beschrieben eingeleitet werden und dies den Arrest der meisten Zelllinien in der G0/G1-Phase erklärt. Allerdings ist zu beachten, dass diese Effekte in Bezug auf die betrachtete Tumorentität auch variieren können.

Die Herunterregulierung der Gene *UHRF1*, *CDCA3*, *SPC25* und *AURKB* unter Palbociclib-Behandlung konnte in dieser Arbeit auf RNA-Ebene (Abb.14-16) und die verringerte Expression von *AURKB* auf Proteinebene bestätigt werden (Abb.17), was die Tendenzen der RNA-Seq untermauert. Dabei wurden ergänzend auch mit Ribociclib behandelte KZT- bzw. Kontroll-Zelllinien miteinbezogen und mit den unbehandelten Lösemittel-Kontrollen verglichen. Unter der Behandlung mit Ribociclib zeigten sich dieselben Tendenzen einer herunterregulierten Gen- bzw. Proteinexpression der genannten Faktoren wie unter der Palbociclib-Behandlung. Dies weist darauf hin, dass die beiden getesteten CDK4/6-Inhibitoren durch gemeinsame Wirkmechanismen ihre Effekte in den Zelllinien entfalten.

Zusätzlich zu der Auflistung an deregulierten Transkripten in der RNA-Seq wurde eine *Gene Ontology*-Analyse durchgeführt, um einen Überblick über die Funktionen der Genprodukte zu erhalten und diese zur übersichtlichen Darstellung in übergeordnete Kategorien zusammenzufassen. Wie sich herausstellte, wurden vor allem Gene dereguliert, die relevant sind für Prozesse des Zellwachstums, darunter Zellproliferation, Zellzyklus, Mitose,

mitotische Zellkernteilung und Zellteilung (Abb.10) Dies passt zu den oben genannten, beispielhaften Ausführungen bezüglich der Funktionen einzelner deregulierter Gene. Darüber hinaus scheinen aber auch die restlichen deregulierten Transkripte hauptsächlich dieser funktionellen Kategorie zugeordnet werden zu können.

Da sich diese Daten lediglich auf Transkripte beziehen, die sich in allen KZT-Zelllinien und der gesunden Fibroblasten-Zelllinie als dereguliert herausstellten und dieselben Trends einer Hoch- oder Runterregulierung zeigten, wurden die gleichen Analysen nochmals getrennt mit jeder einzelnen KZT-Entität durchgeführt. Erneut ergab sich, dass hauptsächlich Gene unter der Palbociclib-Behandlung dereguliert wurden, die relevant sind für Prozesse im Zellzyklus und dessen Regulation (Abb.11). Jedoch sind die beteiligten Gene und deren interagierende Netzwerke, die diese Effekte vermitteln, bei jeder Entität unterschiedlich. Da schließlich aber dieselben übergeordneten funktionellen Kategorien, also Prozesse im Zellzyklus, in allen KZT-Entitäten im relevanten Maß durch die Behandlung beeinflusst werden, scheint dies die allgemeine Antwort auf den Einsatz von dem CDK4/6-Inhibitor Palbociclib zu sein. Diese Antwort steht dabei im Zusammenhang mit zellulären Wachstums- und Proliferationsprozessen, besonders scheint der Zellzyklus dabei beeinflusst zu werden. Dies steht im Einklang mit den erwarteten molekularen Effekten einer Palbociclib-vermittelten CDK4/6-Inhibition, sprich einem pseudo-seneszenten Zellstatus bzw. einem G1/S-Phasen Arrest.

Warum wenige Zelllinien wie bereits erläutert aber in der G2/M-Phase des Zellzyklus akkumulieren, wird hierdurch jedoch nicht hinreichend deutlich. Beispielsweise arretierte vor allem die Embryonalzellkarzinom-Zelllinie 2102EP sowie ihre Cisplatin-resistente Sublinie in der G2/M-Phase (Anhang 4). Daher wurden die RNA-Seq-Daten bezüglich 2102EP im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich isoliert betrachtet. Dabei wurden nur solche Gene herausgestellt, welche allein in dieser Zelllinie exprimiert und dereguliert wurden sowie der *GeneOntology*-Kategorie „Zellzyklus“ zugeordnet werden konnten. Tatsächlich konnten Gene und Gennetzwerke identifiziert werden, die Einfluss nehmen auf den Übergang von der G2- zur M-Phase. Es wurden 15 Gene herausgestellt, die zwei oder mehr Subkategorien an Funktionen in der G2/M-Regulation zugeordnet werden konnten. Davon wurde lediglich die Expression zweier Gene unter der Behandlung mit Palbociclib im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle hochreguliert, bei den restlichen 13 Genen herunterreguliert (Abb.12).

Bei einem der hoch regulierten Gene handelte es sich um *CDK3*. *CDK3* kodiert für die Zyklin-abhängige Kinase 3, die ein wichtiger Regulator des Zellzyklus ist und Einfluss hat auf Zellproliferation und Zelltransformation, auch wenn die genaue Funktion in der Karzinogenese noch nicht vollständig entschlüsselt wurde (Zheng *et al.*, 2008). Bekannt ist, dass *CDK3* unter anderem durch eine Aktivierung von verschiedenen E2F-Transkriptionsfaktoren den Übergang von der G1- zur S-Phase fördert. Interessanterweise

kann dies unabhängig von dem RB1/E2F-Signalweg geschehen (Hofmann *et al.*, 1996). Die Hochregulierung von *CDK3* könnte somit den Embryonalkarzinom-Zelllinien ein Fortschreiten im Zellzyklus jenseits des G1/S-Kontrollpunktes ermöglichen, unabhängig von der Palbociclib-inhibierten *CDK4/RB1*-Achse. Allerdings ergab die RNA-Seq auch, dass in mit Palbociclib-behandelten Embryonalkarzinom-Zelllinien tendenziell Mitglieder der E2F-Familie herunterreguliert werden (Abb.13). Inwieweit *CDK3* also hier über eine Aktivierung von E2F-Transkriptionsfaktoren zu einer Progression im Zellzyklus beiträgt, bleibt offen. Hofmann *et al.*, 1996 argumentiert jedoch, dass es möglich sei, dass *CDK3* auch noch zu weiteren Effekten beiträgt, die jenseits der Aktivierung von E2F-Mitgliedern den Eintritt in die S-Phase möglich machen.

Neben *CDK3* wurde in der Tumorzelllinie 2102EP auch *PLK3* im Vergleich zu der nicht behandelten Kontrolle durch die Behandlung mit Palbociclib hochreguliert (Abb.12). *PLK3* kodiert für die *Polo-like kinase 3*, einem wichtigen Regulator des Zellzyklus, besonders während der G2- und M-Phase (Myer *et al.*, 2005). Eine Überexpression von *PLK3* scheint stets toxische Effekte nach sich zu ziehen, beispielsweise ein Verlust der zellulären Adhäsion oder die Induktion von Apoptose (Myer *et al.*, 2005) (Conn *et al.*, 2000). Neben Apoptose wurde zudem ein Zellzyklus-Arrest, ausgelöst durch eine deregulierte *PLK3*-Expression, beobachtet (Wang *et al.*, 2002). Die erhöhte Expression von *PLK3* durch den Einsatz von Palbociclib könnte somit erwünschte Effekte in der betrachteten Embryonalzellkarzinom-Zelllinie erwirken. *PLK3* interagiert unter anderem mit *CDC25C* (*Cell division cycle 25C*), einer Phosphatase, die essentiell ist für die Regulation des G2-M-Überganges (Myer *et al.*, 2005). Als eine Antwort auf zellulären Stress, wie z.B. einem DNA-Schaden, inaktiviert *PLK3* durch Phosphorylierung *CDC25C*, was in einen Zellzyklus-Arrest in der G2-Phase und/oder in Apoptose mündet (Helmke *et al.*, 2016). Die hochregulierte Expression von *PLK3* in 2102EP als Reaktion auf die Behandlung mit Palbociclib könnte somit zu der Herunterregulation von *CDC25C* geführt haben und den vermehrten Arrest dieser Zelllinie in der G2- bzw. M-Phase des Zellzyklus erklären. *CDC25C* wiederum interagiert unter anderem mit *CHEK1*, der Checkpoint Kinase 1, deren kodierendes Gen ebenfalls in 2102EP unter Behandlung herunterreguliert wird. *CHEK1* reguliert wichtige Kontrollpunkte im Zellzyklus und kann im Falle von DNA-Schäden über verschiedene Mechanismen einen Zellzyklus-Arrest in der jeweiligen Phase induzieren. Beispielsweise kann *CHEK1* durch eine Phosphorylierung von *CDC25C* diese Phosphatase inaktivieren, was in einer Inaktivierung von *CDK1* und damit einem G2-Arrest mündet (Patil *et al.*, 2013). Da *CHEK1* unter Behandlung mit Palbociclib jedoch herunterreguliert wird bleibt es fraglich, inwieweit dies zu einer Akkumulation von 2102EP in der G2/M-Phase beiträgt. Allerdings konnten bereits interessante Beobachtungen dazu gemacht werden, was aus einer verringerten Expression von *CHEK1* in (Krebs-)Zellen resultiert. Ein *CHEK1*-„knock out“ führt z.B. zu einer vermehrten Akkumulation von Zellen in der S-Phase, einem gestörten

G2/M-Kontrollpunkt, einer Akkumulation von DNA-Schäden, verfrühtem Eintritt in die Mitose und letzten Endes zum Zelltod (Patil et al., 2013). Darüber hinaus konnte zudem nachgewiesen werden, dass mehrere in der Krebstherapie eingesetzte Medikamente durch einen Block von *CHEK1* den G2-Kontrollpunkt außer Kraft setzen und damit Krebszellen gegenüber dem Einsatz weiterer DNA-schädigender Agenzien sensitivieren können (Luo et al., 2001). Beispielsweise wurde durch eine Inhibierung von *CHEK1* der G2-Kontrollpunkt in mit Doxorubicin und Etoposid behandelten Krebszellen aufgehoben und dadurch eine erhöhte zytotoxische Aktivität dieser Medikamente beobachtet (Carrassa et al., 2004). Passend dazu greift der Einsatz des Proteinkinase-Inhibitors UCN-01 in die *CHEK1*-Funktion ein und durch eine verfrühte Aktivierung von *CDK1* werden DNA-geschädigte Zellen weiter durch den Zellzyklus geschleust. So kann durch den Einsatz von UCN-01 eine erhöhte Sensitivität gegenüber anderen Chemotherapeutika erreicht werden, z.B. gegenüber Cisplatin (Carrassa et al., 2004) (Graves et al., 2000). Dies wirft die Frage auf, ob unter dem Einsatz von CDK4/6-Inhibitoren durch die folgende Herunterregulierung von *CHEK1* ähnliche Mechanismen einsetzen und so zu einer Sensitivierung beispielsweise gegenüber Cisplatin führen könnten, zumal Resistenzen gegen dieses Chemotherapeutikum wie erwähnt ein Problem darstellen. Allerdings stellte Graves et al., 2000 heraus, dass eher Krebsentitäten mit einem mutierten p53-Status anfällig dafür sind, gegenüber dem Einsatz eines weiteren Chemotherapeutikums zusätzlich zu dem Proteinkinaseinhibitor UCN01 sensitiviert zu werden. Somit müsste gegebenenfalls bei dieser Fragestellung der p53-Status in Keimzelltumoren berücksichtigt werden.

Eine weitere Interaktion besteht darüber hinaus zwischen *CHEK1* und *AURKB*. *CHEK1* reguliert die Chromosomen-Segregation während der Mitose über eine Aktivierung der Aurorakinase B, wodurch eine genomische Instabilität verhindert wird (Patil et al., 2013). Die RNA-Seq ergab, dass *AURKB* in den Embryonalzellkarzinom-Zelllinien unter Behandlung mit Palbociclib herunterreguliert wurde im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb.8). Aus der Herunterregulation von *CHEK1* in 2102EP durch die Behandlung mit Palbociclib könnte somit eine verminderte Aktivierung und Herunterregulation von *AURKB* erfolgt sein. Dies könnte dazu beigetragen haben, dass wichtige Prozesse der Mitose-Phase gestört wurden und die Zellen so in der G2-Phase arretierten oder in die M-Phase zwar eintreten, diese jedoch nicht beenden konnten.

Des Weiteren zeigte sich in der Embryonalzellkarzinom-Zelllinie 2102EP unter der Behandlung mit Palbociclib im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle eine Herunterregulation der *Human augmin complex-Gene 1,2 und 6* (kurz *HAUS1/2/6*). Dieser Komplex ist relevant für die Bildung des Spindelapparates und für die Integrität des Zentrosoms während der Mitose (Lawo et al., 2009). Es wurde nachgewiesen, dass eine Verminderung oder der „knock down“ von Genen des *HAUS*-Komplexes zu desorganisierten mitotischen Spindeln und zu einer Fragmentierung der Zentrosomen führt

(Lawo *et al.*, 2009). In einer Zervixkarzinom-Zelllinie führte ein „knock down“ des *HAUS*-Komplexes unter anderem zu einem gestörten Ablauf der Metaphase und verursachte Fehler in der Zytokinese (Uehara *et al.*, 2009).

Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass in der Embryonalzellkarzinom-Zelllinie 2102EP unter dem Einfluss von Palbociclib Gene dereguliert wurden, die Prozesse in der G2- und/oder Mitose-Phase des Zellzyklus direkt oder indirekt beeinflussen. Eine Kombination dieser Effekte könnte dazu beitragen, dass wichtige Funktionen in diesen Zellzyklus-Phasen gestört werden und es somit zu einer Akkumulation der Zellen in der G2-Phase kommt oder die begonnene Mitose nicht vollendet werden kann.

Unterstützend zu dieser Hypothese können zudem weitere Ergebnisse aus der RNA-Seq herangezogen werden. Bei Betrachtung verschiedener Zykline fällt auf, dass in Embryonalkarzinom-Zelllinien solche für Zykline kodierenden Gene unter Palbociclib-Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle herunterreguliert wurden, welche am G2/M-Übergang und der M-Phase maßgeblich beteiligt sind. So wurde *CCNA2*, das für Zyklin A2 kodierende Gen unter Behandlung herunterreguliert (Abb.13). Deckend dazu konnte auch eine verringerte Proteinexpression von Zyklin A2 nachgewiesen werden (Abb. 17). Zyklin A ist unter anderem an der Regulation von der G2-Phase bzw. dem Übergang zur Mitose-Phase beteiligt und koordiniert darüber hinaus mitotische Prozesse. Durch einen experimentellen „knock down“ von Zyklin A konnte so beispielsweise in Zervixkarzinom-Zellen ein G2/M-Arrest provoziert werden (De Boer *et al.*, 2008). Ebenso wurde durch Palbociclib *CCNB1*, das für Zyklin B1 kodierende Gen, herunterreguliert (Abb.13), was auch auf Proteinebene bestätigt werden konnte (Abb.16). Eine fehlerfreie Regulation von Zyklin B1 ist essenziell für den Eintritt und das Durchlaufen der Mitose-Phase. Eine Herunterregulierung von Zyklin B1 induzierte in Studien ebenfalls einen G2/M-Arrest von Tumorzellen und leitete im Anschluss Apoptose ein (Yuan *et al.*, 2004). Zudem wurde dadurch die Kinaseaktivität der mit Zyklin B1 interagierenden Zyklin-abhängigen Kinase 1 (*CDK1*) aufgehoben (Yuan *et al.*, 2004). *CDK1* wurde nach Ergebnissen der RNA-Seq in Embryonalkarzinom-Zelllinien unter Palbociclib-Behandlung ebenfalls herunterreguliert (Abb.13), was auch auf RNA-Ebene validiert werden konnte (Abb.14 und 15). Dies könnte mit der verminderten Expression von *CCNB1* in Verbindung gebracht werden.

Die verminderte Expression der Zykline A2 und B1 sowie von *CDK1* unterstützt so die Annahme, dass unter Einfluss des *CDK4/6*-Inhibitors Palbociclib in der Embryonalkarzinom-Zelllinie 2102EP ein G2/M-Arrest durch die Deregulation von Faktoren initiiert wurde, die diese Zellzyklus-Phasen regulieren. Diese Daten konnten zusätzlich auf RNA- und Proteinebene bestätigt werden und überdies vergleichbare Effekte zwischen den

beiden eingesetzten Inhibitoren Palbociclib und Ribociclib gezeigt werden. Dies weist auch hier auf einen vergleichbaren Wirkmechanismen dieser hin.

Abschließend lassen sich die Erkenntnisse zur molekularbiologischen Wirkungsweise der CDK4/6-Inhibitoren Palbociclib und Ribociclib wie folgt zusammenfassen:

Zunächst scheinen die CDK4/6-Inhibitoren über die kanonische CDK4/6-RB1-Achse zu agieren, da die meisten KZT-Zelllinien unter Behandlung mit diesen in einen G0/G1-Arrest gehen bzw. einen pseudo-seneszenten Status am G1/S-Kontrollpunkt einnehmen. Dies scheint aus der Herunterregulation von verschiedenen Regulatoren früher Zellzyklus-Phasen zu resultieren, wie beispielsweise *CDCA3*, *UHRF1* oder *SPC25* (s.o.). Dies konnte hauptsächlich in den Seminom- und Chorionkarzinom-Zelllinien nachgewiesen werden.

Ungeachtet dessen akkumulierten wie aus genannten Vorarbeiten ersichtlich zwei Embryonalkarzinom-Zelllinien in der G2/M-Phase (Anhang 4). Diese Progression der Zellen über die G1- und S-Phase hinaus könnte eine Folge der Hochregulation von *CDK3* und *PLK3* und der Herunterregulation weiterer für die G2- oder M-Phase wichtiger Faktoren wie Zyklin A2 oder ZyklinB1/CDK1 sein. Der G1/S- Kontrollpunkt scheint hier unabhängig der CDK4/6-RB1-Achse umgangen worden zu sein, aufgrund der Deregulation jener Gene konnte die G2-Phase jedoch nicht erfolgreich abgeschlossen bzw. die Mitose-Phase nicht begonnen werden, was zu der Akkumulation der Zellen an diesem Punkt des Zellzyklus führte.

Darüber hinaus kam es zu einer Herunterregulation wichtiger Regulatoren der Mitose, wie beispielsweise der Gene des *HAUS*-Komplexes oder *CHEK1*. Die unerwartete Akkumulation mancher Zelllinien in der G2/M-Phase könnte somit auch eine Folge der gestörten und daher nicht vollendeten Mitose gewesen sein.

Daraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die KZT-Zellen nicht in der Lage sind, den pseudo-seneszenten Status, sei es im G0/G1- oder G2/M-Arrest im Zellzyklus oder die gestörten Mitose-Prozesse zu tolerieren. Daraufgehend wurde in einigen KZT-Zellen die Apoptose eingeleitet. Die Apoptose ist dabei möglicherweise nicht als direkter Effekt von Palbociclib bzw. Ribociclib anzusehen, sondern eher als eine Folge des Unvermögens der Zellen, Veränderungen oder Störungen im Zellzyklus Stand zu halten.

4.3 Hochregulierung von *CDK4* als möglicher Resistenzmechanismus

Da CDK4 als ein direktes Zielprotein von CDK4/6-Inhibitoren angenommen werden kann, sollte dessen Veränderungen des Proteinlevels unter dem Einfluss von Palbociclib und Ribociclib untersucht werden. Unerwarteterweise führte eine Behandlung mit beiden Inhibitoren zu einer Anreicherung des Proteinlevels von *CDK4* in den getesteten KZT-Zelllinien im Vergleich zu der jeweiligen unbehandelten Kontrolle, nicht aber in der gesunden Fibroblasten-Zelllinie MPAF (Abb.18). Dieses Ergebnis ist in Hinblick auf

vorherige Arbeiten jedoch kritisch zu betrachten. Im Rahmen von Vorarbeiten kam es bei einer ersten Analyse der CDK4-Proteinlevel unter CDK4/6-Inhibition unter dem Einsatz von Palbociclib in den meisten KZT-Zelllinien zu einer Abnahme der Proteinproduktion, in den restlichen Zelllinien wurde keine Veränderung im Vergleich zu den jeweiligen unbehandelten Zelllinien festgestellt (siehe Anhang 5). Hier zeigt sich also eine gewisse Diskrepanz zu den in dieser Arbeit erhobenen Daten. Insgesamt kommt es hier unter dem Einsatz beider CDK4/6-Inhibitoren wie genannt eher zu erhöhten Proteinleveln in den KZT-Zelllinien, wenn auch in unterschiedlich starker Ausprägung je nach Entität (Abb.18). Beispielfhaft kam es in den Vorarbeiten zu einer Abnahme der Proteinproduktion von CDK4 in 2102EP und JAR (Anhang 5), während es in dieser Arbeit eine geringe Zunahme der Proteinlevel von CDK4 in diesen Zelllinien unter Palbociclib-Behandlung kam (Abb.18). Während im ersten Setting gleichbleibende Proteinlevel in TCam-2 und NCCIT beobachtet wurden (Anhang 5), konnten in dieser Arbeit deutliche CDK4-Anreicherungen gezeigt werden (Abb.18). Es ist jedoch anzumerken, dass im Rahmen dieser Arbeit das Setting um einige Faktoren erweitert wurde, indem auch mit Ribociclib behandelte Zelllinien und MPAF als gesunde Kontrolle miteinbezogen wurden und eine densitometrische Auswertung angeschlossen wurde, um die Daten genauer bzw. übersichtlicher auswerten und vergleichen zu können. Um die genannten Vorarbeiten und die hier erhobenen Daten vergleichen und mögliche Diskrepanzen erklären zu können, müssten weitere Schritte unternommen werden. Beispielsweise könnten verschiedene Expositionsdauern der Zelllinien gegenüber den Inhibitoren und mehrere Konzentrationen dieser getestet und miteinander verglichen werden, um Dynamiken bzw. Kinetiken ausmachen zu können. In einem weiteren Schritt wäre eine entsprechende Untersuchung in KZT-Geweben interessant, um dies mit den Effekten in den KZT-Zelllinien zu vergleichen.

Geht man vor dem Hintergrund der in Abbildung 18 gezeigten Daten von einer Anreicherung des CDK4-Proteins unter Einsatz der CDK4/6-Inhibitoren aus, könnte dies als ein Hinweis darauf gewertet werden, dass die KZT-Zellen durch die Erhöhung von *CDK4* versuchen, der CDK4-Inhibition entgegenzuwirken. Dadurch wäre es möglich, dass dies die Wirkung von Palbociclib und Ribociclib konterkariert und die KZT-Zellen auf lange Sicht eine Resistenz entwickeln.

Die Entwicklung einer Resistenz gegenüber CDK4/6-Inhibitoren wurde bereits in anderen Krebsentitäten beobachtet. Beispielsweise stellt die erworbene Resistenz gegenüber CDK4/6-Inhibitoren ein bekanntes Problem in der Behandlung von bestimmten Brustkrebs-Typen dar. Hier kam es durch die CDK4/6-Inhibition zum Erwerb von RB1-Mutationen, was über einen Funktionsverlust von RB1 zu einer Resistenz gegenüber Palbociclib führte (Xu *et al.*, 2020) (Condorelli *et al.*, 2018). Neben der erworbenen RB1-Mutation werden weitere Mechanismen, die zu einer Resistenzbildung führen, diskutiert. Dies sind unter anderem

weitere Veränderungen im ZyklinD-CDK4/6-RB-Signalweg, wie z.B. eine Amplifikation von *CDK4* und *CDK6* oder eine Überexpression von *Zyklin D1*, *Zyklin E* oder *E2F* und die Suppression verschiedener *CDK2*-Inhibitoren (Knudsen and Witkiewicz, 2018) (Xu *et al.*, 2020). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass es auch über die Aktivierung verschiedener alternativer Signalwege, beispielhaft des PIK3/AKT/mTOR-Signalweges und durch die Modulation des Immun-Mikromilieus der Tumorzellen zu einer erworbenen Resistenz gegenüber der CDK4/6-Inhibition kommen kann (Xu *et al.*, 2020). Eingehend untersucht wurde bisher eine Resistenzentwicklung über die Aktivierung des PIK3/AKT/mTOR-Signalweges in Brustkrebs-Zelllinien. Über diesen Weg kam es hier zu einer Überwindung der durch Palbociclib induzierten Zytostase durch einen ZyklinD1-CDK2-vermittelten Eintritt in die S-Phase (Herrera-Abreu *et al.*, 2016) (Xu *et al.*, 2020). Allerdings zeigten sich in den KZT-Zelllinien unter CDK4/6-Inhibition gleichbleibende Proteinlevel des CDK4/6-Zielgens Zyklin D in seinen beiden Isoformen D1 und D2 (Abb.16) sowie keine Hochregulation von *CDK2*. Außerdem akkumulierten die KZT-Zellen vorwiegend in der G1/G0-Phase des Zellzyklus. Somit scheinen sie diesen Mechanismus zu umgehen und andere Effekte zu der Resistenzentwicklung beizutragen. Es bleibt außerdem offen, ob eine Kombination der CDK4/6-Inhibitoren mit einem PI3K-Inhibitor Erfolge erzielen könnte. Beim Einsatz dieser Kombitherapie in Brustkrebs-Zellen konnten synergistische Effekte nachgewiesen werden, die zu einer Blockade früher Anpassungsreaktionen sowie vermehrter Apoptose dieser Zellen führte und sogar eine Tumorregression *in vivo* bewirkte (Herrera-Abreu *et al.*, 2016). Aufgrund dieser vielversprechenden Ergebnisse könnte es sich eventuell lohnen, die Auswirkungen einer Kombination von CDK4/6-Inhibitoren mit einem PI3K-Inhibitor auch in KZT-Zellen zu beleuchten.

Abschließend sei anzumerken, dass auch die Cisplatin-resistenten Subklone mit einer vermehrten CDK4-Produktion reagierten (Abb.18). Dies wirft die Frage auf, ob eine bestehende Cisplatin-Resistenz zu einer zusätzlichen Resistenz gegenüber CDK4/6-Inhibitoren führen könnte. Hinweise darauf, dass dieser Fall auftreten kann, konnten bereits im Zusammenhang mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Hals-Bereich aufgedeckt werden. Dort kam es in Cisplatin-resistenten Tumoren zu einer verringerten Aktivität von Palbociclib, was eine Resistenzentwicklung gegenüber dieser Therapie fördert (Robinson *et al.*, 2019). Es könnte sich demnach als sinnvoll erweisen, bei weiteren Forschungen im Bereich der Resistenzentwicklung gegenüber CDK4/6-Inhibitoren ein Augenmerk darauf zu legen, inwieweit eine zusätzlich bestehende Cisplatin-Resistenz einen Einfluss hat.

Des Weiteren stellte sich heraus, dass bei den meisten KZT-Zelllinien die Behandlung mit Ribociclib zu einer deutlich stärkeren Proteinanreicherung von CDK4 führte (Abb.18). Daher wäre es interessant herauszustellen, ob sich die beiden CDK4/6-Inhibitoren in Hinblick auf

eine Resistenzentwicklung unterscheiden und einer der beiden Inhibitoren daher eventuell einen erfolgreicherer Einsatz in der Therapie verspricht als der andere.

Es lässt sich resümieren, dass es so eine interessante Fragestellung für weitere Forschung darstellt, welche genauen Mechanismen intrinsischer oder erworbener Resistenz nun in Keimzelltumoren durch den dauerhaften Einsatz von CDK4/6-Inhibitoren eingeleitet werden. Dadurch könnte eventuell herausgestellt werden, ob und wie man sich diese adaptiven Effekte für eine selektive Therapie zunutze machen bzw. die Kombitherapie mit Inhibitoren anderer Signalwege nützlich sein könnte, um die Resistenz gegenüber CDK4/6-Inhibitoren zu überwinden.

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit konnten einige Faktoren herausgestellt werden, welche Erklärungsansätze für mögliche Wirkmechanismen der CDK4/6-Inhibitoren Palbociclib und Ribociclib in KZT-Zelllinien bieten.

In zukünftiger Forschung müsste erarbeitet werden, inwieweit diese Erkenntnisse *in vivo* bestätigt werden können, beispielweise zunächst in Maus-Modellen. Ein besonderes Augenmerk müsste dabei auf die Fragestellung gelegt werden, inwieweit die Keimzelltumoren dazu in der Lage sind, eine Resistenz gegenüber den beiden Inhibitoren zu entwickeln und welche Mechanismen zu dieser Resistenzentwicklung führen. Ein tieferes Verständnis dieser Mechanismen könnte dann die Grundlage dazu schaffen, nach möglichen Kombinationstherapien mit anderen Wirkstoffen zu forschen, um eine Resistenzentwicklung zu umgehen.

5. Literaturverzeichnis

Adams, M. N. *et al.* (2017) 'Expression of CDCA3 Is a Prognostic Biomarker and Potential Therapeutic Target in Non – Small Cell Lung Cancer', 12(7), pp. 1071–1084. doi: 10.1016/j.jtho.2017.04.018.

Albers, P. *et al.* (2011) 'EAU guidelines on testicular cancer: 2011 update', *European Urology*, 60(2), pp. 304–319. doi: 10.1016/j.eururo.2011.05.038.

Albers, P. *et al.* (2015) 'Guidelines on Testicular Cancer: 2015 Update', *European Urology. European Association of Urology*, 68(6), pp. 1054–1068. doi: 10.1016/j.eururo.2015.07.044.

Baird, D. C. *et al.* (2018) 'Testicular Cáncer', *American Family Physician*, 97(4).

Bartkova, J. *et al.* (2000) 'Cell cycle regulators in testicular cancer: Loss of p18(INK4C) marks progression from carcinoma in situ to invasive germ cell tumours', *International Journal of Cancer*, 85(3), pp. 370–375. doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(20000201)85:3<370::AID-IJC13>3.0.CO;2-A.

Bartkova, J. *et al.* (2003) 'Deregulation of the RB pathway in human testicular germ cell tumours', *Journal of Pathology*, 200(2), pp. 149–156. doi: 10.1002/path.1353.

Batool, A. *et al.* (2019) 'Testicular germ cell tumor: a comprehensive review', *Cellular and Molecular Life Sciences*. Springer International Publishing, 76(9), pp. 1713–1727. doi: 10.1007/s00018-019-03022-7.

De Boer, L. *et al.* (2008) 'Cyclin A/cdk2 coordinates centrosomal and nuclear mitotic events', *Oncogene*, 27(31), pp. 4261–4268. doi: 10.1038/onc.2008.74.

Calzone, L. *et al.* (2008) 'A comprehensive modular map of molecular interactions in RB/E2F pathway.', *Molecular systems biology*, 4(173), p. 173. doi: 10.1038/msb.2008.7.

Carrassa, L. *et al.* (2004) 'Chk1, but not Chk2, is involved in the cellular response to DNA damaging agents: Differential activity in cells expressing or not p53', *Cell Cycle*, 3(9), pp. 1175–1179. doi: 10.4161/cc.3.9.1080.

Cheng, L. *et al.* (2018) 'Testicular cancer', *Nature Reviews Disease Primers*. Springer US, pp. 1019–1028. doi: 10.1093/oso/9780190238667.003.0054.

Chieffi, P. (2018) 'Aurora B: A new promising therapeutic target in cancer', *Intractable and Rare Diseases Research*, 7(2), pp. 141–144. doi: 10.5582/irdr.2018.01018.

Choi *et al.* (2012) 'The Requirement for Cyclin D Function in Tumor Maintenance', *Cancer Cell*, 22(4), pp. 438–451. doi: 10.1016/j.ccr.2012.09.015.

Condorelli, R. *et al.* (2018) 'Polyclonal RB1 mutations and acquired resistance to CDK 4 / 6 inhibitors in patients with metastatic breast cancer', *APOBEC mutagenesis in HIV and cancer evolution*. Elsevier Masson SAS, 29(3), pp. 640–645. doi: 10.1093/annonc/mdx784.

Conn, C. W. *et al.* (2000) 'Incomplete cytokinesis and induction of apoptosis by overexpression of the mammalian polo-like kinase, Plk31', *Cancer Research*, 60(24), pp. 6826–6831.

Le Cornet, C. *et al.* (2014) 'Testicular cancer incidence to rise by 25% by 2025 in Europe? Model-based predictions in 40 countries using population-based registry data', *European*

Journal of Cancer, 50(4), pp. 831–839. doi: 10.1016/j.ejca.2013.11.035.

Cui, F. *et al.* (2018) 'Knockdown of spindle pole body component 25 homolog inhibits cell proliferation and cycle progression in prostate cancer', pp. 5712–5720. doi: 10.3892/ol.2018.8003.

Darr, H., Mayshar, Y. and Benvenisty, N. (2006) 'Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features', 1201, pp. 1193–1201. doi: 10.1242/dev.02286.

Eckert, D. *et al.* (2008) 'TCam-2 but not JKT-1 cells resemble seminoma in cell culture', *Cell and Tissue Research*, 331(2), pp. 529–538. doi: 10.1007/s00441-007-0527-y.

Ezeh, U. I. *et al.* (2005) 'Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma', *Cancer*, 104(10), pp. 2255–2265. doi: 10.1002/cncr.21432.

Farmanfarma, K. K., Mahdavifar, N. and Salehiniya, H. (2018) 'TESTICULAR CANCER IN THE WORLD: AN EPIDEMIOLOGICAL REVIEW', 5(4), pp. 1–5.

Franco, J. *et al.* (2016) 'Metabolic Reprogramming of Pancreatic Cancer Mediated by CDK4/6 Inhibition Elicits Unique Vulnerabilities', *Cell Reports*. The Authors, 14(5), pp. 979–990. doi: 10.1016/j.celrep.2015.12.094.

Freissmuth, M. (2020) 'Chemotherapie von Tumorerkrankungen', in *Pharmakologie und Toxikologie: Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 837–916. doi: 10.1007/978-3-662-58304-3_61.

Fukawa, T. and Kanayama, H. O. (2018) 'Current knowledge of risk factors for testicular germ cell tumors', *International Journal of Urology*, 25(4), pp. 337–344. doi: 10.1111/iju.13519.

Giacinti, C. and Giordano, A. (2006) 'RB and cell cycle progression', *Oncogene*, (25), pp. 5220–5227. doi: 10.1038/sj.onc.1209615.

Giannandrea, F. and Fagnoli, S. (2017) 'Environmental Factors Affecting Growth and Occurrence of Testicular Cancer in Childhood: An Overview of the Current Epidemiological Evidence', *Children*, 4(1), p. 1. doi: 10.3390/children4010001.

Gillesen, S. *et al.* (2019) 'Redefining the IGCCCG classification in advanced non-seminoma', *Abstract Book of the 44th ESMO Congress (ESMO 2019) 27 September – 1 October 2019, Barcelona, Spain*. Elsevier Masson SAS, 30(October), pp. v357–v358. doi: 10.1093/annonc/mdz249.002.

Goel, S. *et al.* (2018) 'CDK4/6 Inhibition in Cancer: Beyond Cell Cycle Arrest', *Trends in Cell Biology*. Elsevier Ltd, 28(11), pp. 911–925. doi: 10.1016/j.tcb.2018.07.002.

Gong, X. *et al.* (2017) 'Genomic Aberrations that Activate D-type Cyclins Are Associated with Enhanced Sensitivity to the CDK4 and CDK6 Inhibitor Abemaciclib', *Cancer Cell*, 32(6), pp. 761–776.e6. doi: 10.1016/j.ccell.2017.11.006.

Graves, P. R. *et al.* (2000) 'The Chk1 protein kinase and the Cdc25C regulatory pathways are targets of the anticancer agent UCN-01', *Journal of Biological Chemistry*, 275(8), pp. 5600–5605. doi: 10.1074/jbc.275.8.5600.

Halahleh, K. *et al.* (2015) 'Isochromosome X in Myelodysplastic Syndrome', *Acta Haematologica*, 135, pp. 37–38.

- Helmke, C. et al. (2016) 'The role of Plk3 in oncogenesis', *Oncogene*. Nature Publishing Group, 35(2), pp. 135–147. doi: 10.1038/onc.2015.105.
- Hentrich, M. et al. (2021) 'Improved outcomes in metastatic germ cell cancer : results from a large cohort study', *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. Springer Berlin Heidelberg, 147(2), pp. 533–538. doi: 10.1007/s00432-020-03343-2.
- Herrera-Abreu, M. T. et al. (2016) 'Early Adaptation and Acquired Resistance to CDK4 / 6 Inhibition in Estrogen Receptor – Positive Breast Cancer', *Cancer Research*. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0728.
- Hofmann, F. et al. (1996) 'Differential effects of cdk2 and cdk3 on the control of pRb and E2F function during G1 exit', 130, pp. 851–861.
- Iyengar, M. et al. (2018) 'CDK4/6 inhibition as maintenance and combination therapy for high grade serous ovarian cancer.', *Oncotarget*, 9(21), pp. 15658–15672. doi: 10.18632/oncotarget.24585.
- Jiao, X. et al. (2012) 'DAVID-WS: A stateful web service to facilitate gene/protein list analysis', *Bioinformatics*. Oxford University Press, 28(13), pp. 1805–1806. doi: 10.1093/bioinformatics/bts251.
- Jingwen, B., Yaochen, L. and Guojun, Z. (2017) 'Cell cycle regulation and anticancer drug discovery', *Cancer Biology & Medicine*, 14(4), p. 348. doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2017.0033.
- Knudsen, E. S. and Witkiewicz, A. K. (2018) 'The Strange Case of CDK4/6 Inhibitors: Mechanisms, Resistance, and Combination Strategies TARGETING CYCLIN DEPENDENT KINASES FOR CANCER TREATMENT', 3(1), pp. 39–55. doi: 10.1016/j.trecan.2016.11.006.
- Lawo, S. et al. (2009) 'HAUS, the 8-Subunit Human Augmin Complex, Regulates Centrosome and Spindle Integrity', *Current Biology*, 19(10), pp. 816–826. doi: 10.1016/j.cub.2009.04.033.
- Levine, A. J. and Brivanlou, A. H. (2005) 'GDF3 , a BMP inhibitor , regulates cell fate in stem cells and early embryos', pp. 209–216. doi: 10.1242/dev.02192.
- Lobo, J., Jerónimo, C. and Henrique, R. (2020) 'Cisplatin resistance in testicular germ cell tumors: Current challenges from various perspectives', *Cancers*, 12(6), pp. 1–26. doi: 10.3390/cancers12061601.
- Looijenga, L. H. J. et al. (2003) 'Role of gain of 12p in germ cell tumour development', *Apmis*, 111(1), pp. 161–170. doi: 10.1034/j.1600-0463.2003.11101201.x.
- Luo, Y. et al. (2001) 'Blocking CHK1 expression induces apoptosis and abrogates the G2 checkpoint mechanism', *Neoplasia*, 3(5), pp. 411–419. doi: 10.1038/sj.neo.7900175.
- Myer, D. L. et al. (2005) 'The Plk3-Cdc25 circuit', *Oncogene*, 24(2), pp. 299–305. doi: 10.1038/sj.onc.1208278.
- Nettersheim, D. et al. (2015) 'BMP Inhibition in Seminomas Initiates Acquisition of Pluripotency via NODAL Signaling Resulting in Reprogramming to an Embryonal Carcinoma', *PLoS Genetics*, 11(7), pp. 1–26. doi: 10.1371/journal.pgen.1005415.
- O'Leary, B., Finn, R. S. and Turner, N. C. (2016) 'Treating cancer with selective CDK4/6

- inhibitors', *Nature Reviews Clinical Oncology*. Nature Publishing Group, 13(7), pp. 417–430. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.26.
- Oliveros, J. C. (2007) 'Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams'. Available at: <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.
- Patil, M., Pabla, N. and Dong, Z. (2013) 'Checkpoint kinase 1 in DNA damage response and cell cycle regulation', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(21), pp. 4009–4021. doi: 10.1007/s00018-013-1307-3.
- Pierce, J. L., Frazier, A. L. and Amatruda, J. F. (2018) 'Pediatric Germ Cell Tumors: A Developmental Perspective', *Advances in Urology*, 2018. doi: 10.1155/2018/9059382.
- Pietro, A. *et al.* (2005) 'Testicular germ cell tumours : The paradigm of chemo-sensitive solid tumours', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(12), pp. 2437–2456. doi: 10.1016/j.biocel.2005.06.014.
- Qian, W. *et al.* (2018) 'CDCA3 mediates p21-dependent proliferation by regulating E2F1 expression in colorectal cancer', *International Journal of Oncology*, 53(5), pp. 2021–2033. doi: 10.3892/ijo.2018.4538.
- Robinson, A. M. *et al.* (2019) 'Cisplatin exposure causes c-Myc-dependent resistance to CDK4/6 inhibition in HPV-negative head and neck squamous cell carcinoma', *Cell Death and Disease*. Springer US, 10(11). doi: 10.1038/s41419-019-2098-8.
- Schettini, F. *et al.* (2018) 'CDK 4/6 inhibitors as single agent in advanced solid tumors', *Frontiers in Oncology*, 8(December), pp. 1–12. doi: 10.3389/fonc.2018.00608.
- Schmidt, B. A. *et al.* (2001) 'Up-regulation of cyclin-dependent kinase 4/cyclin D2 expression but down-regulation of cyclin-dependent kinase 2/cyclin E in testicular germ cell tumors', *Cancer Research*, 61(10), pp. 4214–4221.
- Shaughnessy, M. J. O. *et al.* (2015) 'Late Relapse of Testicular Germ Cell Tumors Detection of Late Relapse', *Urologic Clinics of NA*. Elsevier Inc, 42(3), pp. 359–368. doi: 10.1016/j.ucl.2015.04.010.
- Sheikine, Yuri; Genega, Elizabeth; Melamed, Honathan; Lee, Peng; Reuter, Victor E.; Ye, H. (2012) 'Genetics of testicular germ cell tumors', *American Journal of Cancer Research*, 2(2), pp. 153–167.
- Shen, T. *et al.* (2019) 'KIF20A Affects the Prognosis of Bladder Cancer by Promoting the Proliferation and Metastasis of Bladder Cancer Cells'. Hindawi, 2019. doi: 10.1155/2019/4863182.
- Shin, Y. S. and Kim, H. J. (2013) 'Current management of testicular cancer', *Korean Journal of Urology*, 54(1), pp. 2–9. doi: 10.4111/kju.2013.54.1.2.
- Singh, R. *et al.* (2019) 'Mechanisms of cisplatin sensitivity and resistance in testicular germ cell tumors', *Cancer Drug Resistance*, 2(3), pp. 580–594. doi: 10.20517/cdr.2019.19.
- Skowron, M. A. *et al.* (2020) 'CDK4/6 inhibition presents as a therapeutic option for paediatric and adult germ cell tumours and induces cell cycle arrest and apoptosis via canonical and non-canonical mechanisms', *British Journal of Cancer*. Springer US, 123(3), pp. 378–391. doi: 10.1038/s41416-020-0891-x.
- Strohmeyer, T. *et al.* (1991) 'Correlation between retinoblastoma gene expression and differentiation in human testicular tumors (testicular neoplasms/tumor suppressor

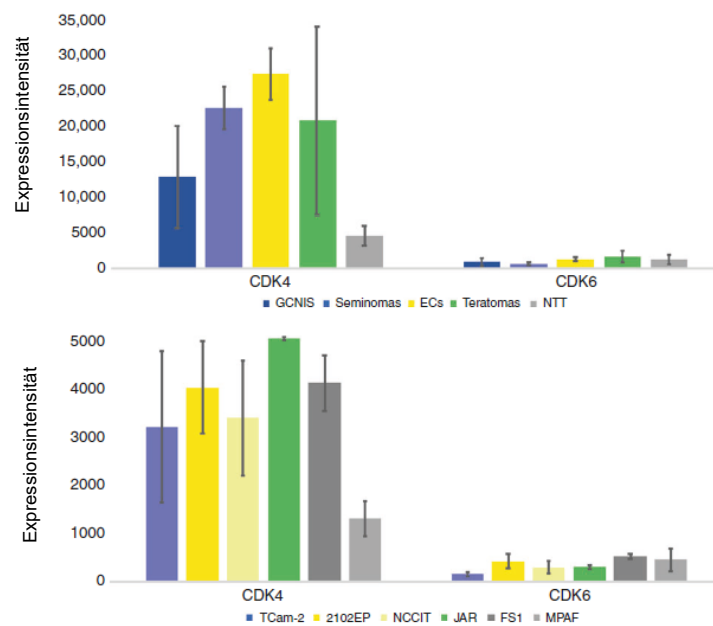
- genes/tumor cell differentiation/oncogenes)', *Medical Sciences*, 88(August 1991), pp. 6662–6666.
- Szklarczyk, D. *et al.* (2019) 'STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets', *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 47(D1), pp. D607–D613. doi: 10.1093/nar/gky1131.
- Tripathy, D., Bardia, A. and Sellers, W. R. (2017) 'Ribociclib (LEE011): Mechanism of Action and Clinical Impact of This Selective Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibitor in Various Solid Tumors', *Clinical Cancer Research*, 23(13), pp. 3251–3262. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-3157.
- Uehara, R. *et al.* (2009) 'The augmin complex plays a critical role in spindle microtubule generation for mitotic progression and cytokinesis in human cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(17), pp. 6998–7003. doi: 10.1073/pnas.0901587106.
- Unoki, M. *et al.* (2009) 'UHRF1 is a novel molecular marker for diagnosis and the prognosis of bladder cancer'. Nature Publishing Group, pp. 98–105. doi: 10.1038/sj.bjc.6605123.
- de Vries, G. *et al.* (2020) 'Testicular cancer: Determinants of cisplatin sensitivity and novel therapeutic opportunities', *Cancer Treatment Reviews*. Elsevier, 88(April), p. 102054. doi: 10.1016/j.ctrv.2020.102054.
- Wagner, V. and Gil, J. (2020) 'Senescence as a therapeutically relevant response to CDK4/6 inhibitors', *Oncogene*. Springer US, 39(29), pp. 5165–5176. doi: 10.1038/s41388-020-1354-9.
- Wang, M. *et al.* (2017) 'Downregulation of KIF20A induces cell cycle arrest and apoptosis by suppressing PI3K/AKT in human glioblastoma', *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 10(12), pp. 16133–16143.
- Wang, Q. *et al.* (2002) 'Cell Cycle Arrest and Apoptosis Induced by Human Polo-Like Kinase 3 Is Mediated through Perturbation of Microtubule Integrity', *Molecular and Cellular Biology*, 22(10), pp. 3450–3459. doi: 10.1128/mcb.22.10.3450-3459.2002.
- Xu, X. qing *et al.* (2020) 'Intrinsic and acquired resistance to CDK4/6 inhibitors and potential overcoming strategies', *Acta Pharmacologica Sinica*. Springer US, (September 2019), pp. 1–8. doi: 10.1038/s41401-020-0416-4.
- Yan, G. *et al.* (2012) 'Genistein-induced mitotic arrest of gastric cancer cells by downregulating KIF20A , a proteomics study', pp. 2391–2399. doi: 10.1002/pmic.201100652.
- Yuan, J. *et al.* (2004) 'Cyclin B1 depletion inhibits proliferation and induces apoptosis in human tumor cells', *Oncogene*, 23(34), pp. 5843–5852. doi: 10.1038/sj.onc.1207757.
- Zhang, G. *et al.* (2019) 'Palbociclib triggers apoptosis in bladder cancer cells by Cdk2-induced Rad9-mediated reorganization of the Bak.Bcl-xl complex', *Biochemical Pharmacology*. Elsevier, 163(October 2018), pp. 133–141. doi: 10.1016/j.bcp.2019.02.017.
- Zhao, B. and Burgess, K. (2019) 'PROTACs suppression of CDK4/6, crucial kinases for cell cycle regulation in cancer', *Chemical Communications*. Royal Society of Chemistry, 55(18), pp. 2704–2707. doi: 10.1039/c9cc00163h.

5.Literaturverzeichnis

Zheng, D. et al. (2008) 'Cdk3-Mediated ATF1 Phosphorylation Enhances Cell Transformation', *Bone*, 23(1), pp. 1–7. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1137.Cdk3-Mediated.

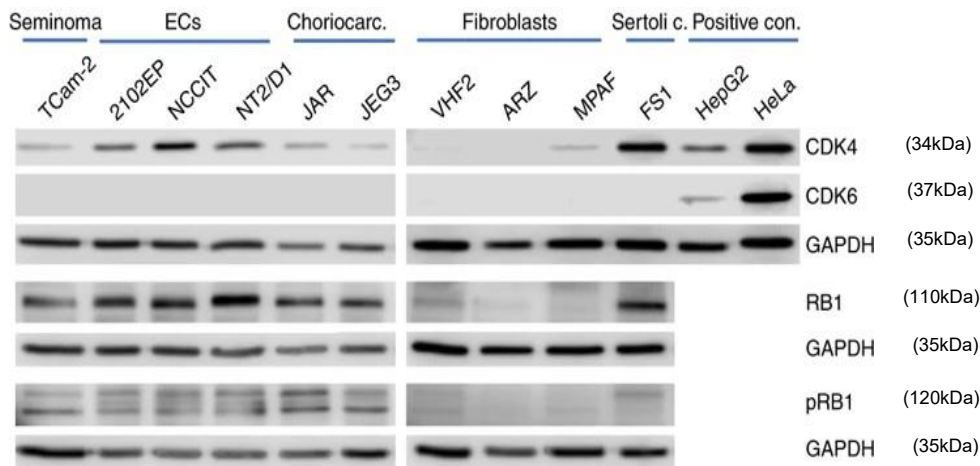
Znaor, A. et al. (2020) 'Testicular cancer incidence predictions in Europe 2010–2035: A rising burden despite population ageing', *International Journal of Cancer*, 147(3), pp. 820–828. doi: 10.1002/ijc.32810.

6. Anhang

**Anhang 1: RNA-Expression von CDK4 und CDK6 in Keimzelltumor-Zelllinien und -Gewebe**

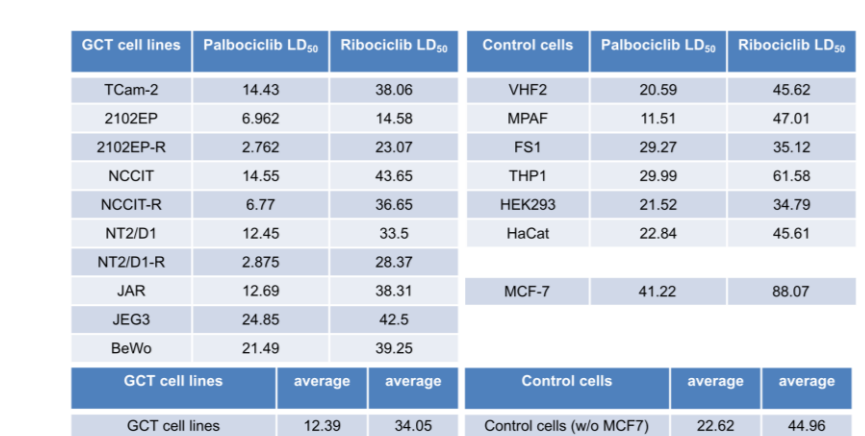
Dargestellt ist die RNA- Expressionsintensität von *CDK4* und *CDK6* in KZT-Gewebe (oben) und KZT-Zelllinien (unten). Dazu wurde ein Affymetrix- Microarray (KZT-Gewebe) bzw. Illumina- Microarray (KZT-Zelllinien) verwendet. Das normale Hodengewebe und die Zelllinie MPAF (Fibroblasten) wurden dabei als Kontrollen inkludiert. Die jeweiligen Standardabweichungen sind über den Diagrammbalken abgebildet.

Diese Daten wurden von Marieke Vermeulen im Rahmen ihrer medizinischen Dissertation erhoben und mit ihrem Einverständnis hier gezeigt. Zusätzlich wurden die Daten in Skowron *et. al*, 2020 publiziert.

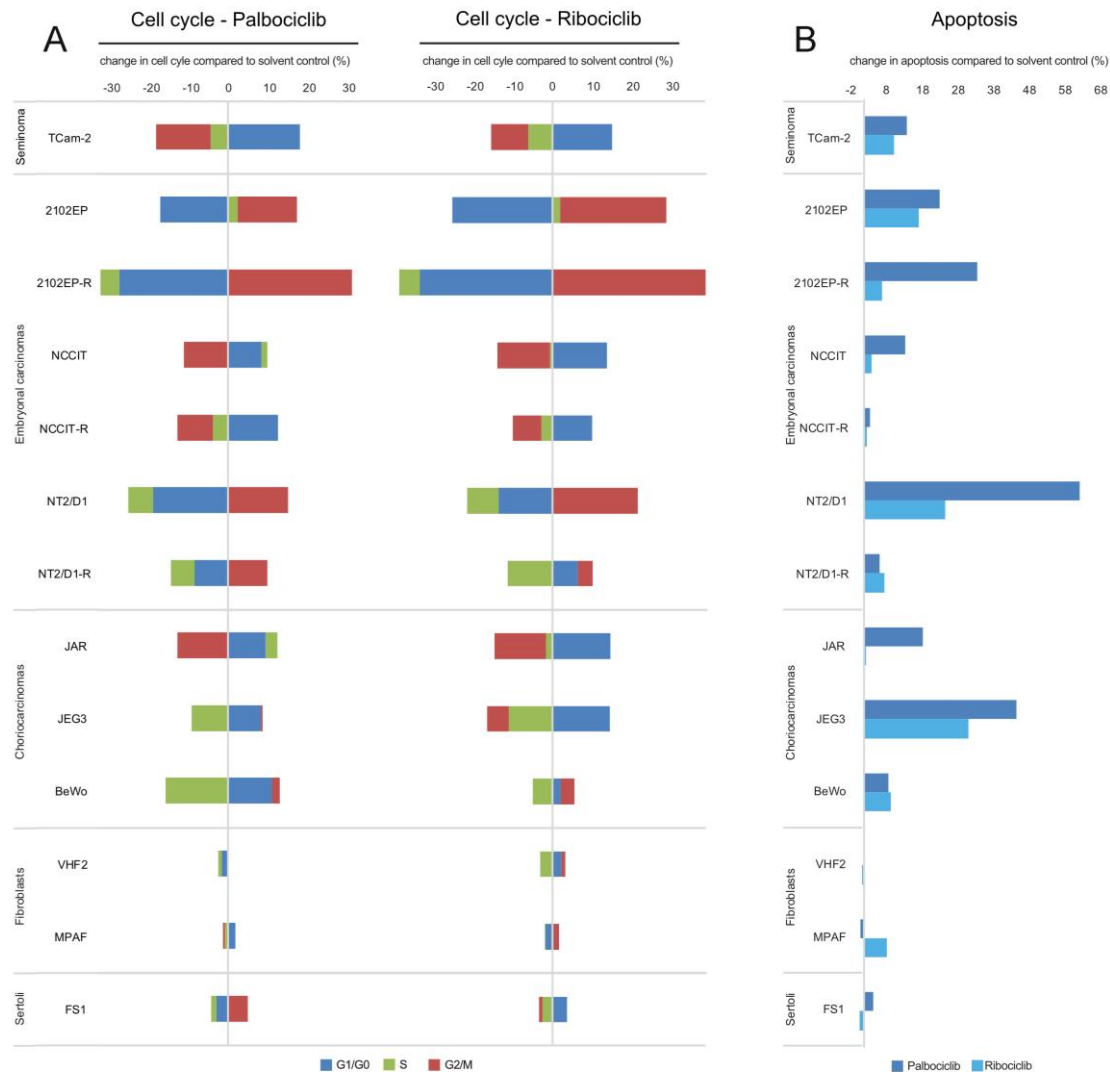
**Anhang 2: Proteinlevel von CDK4, CDK6 und (phospho-) RB1 in Keimzelltumor-Zelllinien**

Hier dargestellt sind die detektierten Proteine (Banden) einer Western-Blot-Analyse der KZT-Zelllinien sowie der Kontroll-Zelllinien. Es wurden die zwei Zelllinien HepG2 (Hepatozelluäres Karzinom) und HeLa (Zervixkarzinom) als Positivkontrollen inkludiert. GAPDH diene als Ladekontrolle. Rechts angegeben sind die primären Antikörper mit der jeweiligen Molekülmasse in Kilodalton (kDa). Die Abbildung zeigt den Zusammenschchnitt von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Western-Blots.

Diese Daten wurden von Marieke Vermeulen im Rahmen ihrer medizinischen Dissertation erhoben und mit ihrem Einverständnis hier gezeigt. Zusätzlich wurden die Daten in Skowron *et. al*, 2020 publiziert



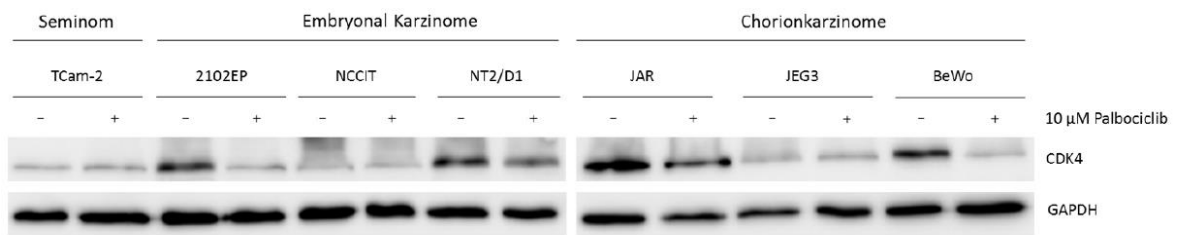
Diese Daten wurden von Marieke Vermeulen im Rahmen ihrer medizinischen Dissertation erhoben und mit ihrem Einverständnis hier gezeigt. Zusätzlich wurden die Daten in Skowron *et. al.*, 2020 publiziert.



Anhang 4: Durchflusszytometrie-basierte Analyse der Zellzyklus-Verteilung (A) und Apoptoseraten (B) in KZT-Zelllinien und Kontrollen 16 Stunden nach Behandlung mit Palbociclib und Ribociclib (10µM/ 25µM).

Diese Daten wurden von Marieke Vermeulen im Rahmen ihrer medizinischen Dissertation erhoben und mit ihrem Einverständnis hier gezeigt. Zusätzlich wurden die Daten in Skowron *et. al*, 2020 publiziert.

6. Anhang



Anhang 5: CDK4-Proteinlevel unter Behandlung mit Palbociclib

Western Blot-Analyse mit einem primären CDK4-Antikörper, als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. Behandelt wurden die KZT-Zelllinien jeweils mit 10 μ M Palbociclib für 16 Stunden und mit der jeweiligen unbehandelten Zelllinie verglichen. Diese Daten wurden von Marieke Vermeulen im Rahmen ihrer medizinischen Dissertation erhoben und mit ihrem Einverständnis hier gezeigt.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen meinen Dank aussprechen, die mich während der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt und begleitet haben.

Meinen aufrichtigsten Dank schulde ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Daniel Nettersheim für die hervorragende und lehrreiche Betreuung, für die anregenden Gespräche und die konstruktive Kritik während meiner Zeit im Labor und bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Des Weiteren danke ich Frau PhD Margaretha Skowron für die großartige Einarbeitung im Labor und für das offene Ohr bei Fragen oder Zweifeln.

Ferner danke ich Herrn Prof. Dr. Hans Neubauer für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein Dank gilt zudem den Firmen Pfizer Inc. und Novartis AG für die Bereitstellung der Inhibitorsubstanzen Palbociclib und Ribociclib, ohne die diese Arbeit nicht hätte umgesetzt werden können.

Ein besonderer Dank gilt dem gesamten Laborteam für den Zusammenhalt und die familiäre Atmosphäre, die meine Zeit im Labor zu einem Abschnitt in meinem Studium gemacht hat, der mir immer positiv im Gedächtnis bleiben wird.

Meinem Freund Fabian danke ich für sein Verständnis, seine Geduld und die technische Unterstützung, wenn Word mal wieder nicht so wollte wie ich.

Ich danke zudem meinem Bruder Maximilian für den Austausch und das gegenseitige Verständnis für unsere Arbeit. Es gab mir viel Kraft, jemanden im selben Boot zu wissen.

Abschließend möchte ich meinen Eltern für den steten Rückhalt während meiner gesamten Studien- und Promotionszeit meinen innigsten Dank aussprechen. Ohne Eure Unterstützung wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.