Die pharmakologische Inhibition epigenetischer Regulatoren als Alternative zur Standardtherapie für (Cisplatin-resistente) Keimzelltumoren

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Melanie Rita Müller
geboren in München

Düsseldorf, Oktober 2022

aus dem Forschungslabor der Urologischen Klinik,
Arbeitsgruppe Translationale UroOnkologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Diese Arbeit wurde von der **Brigitte und Dr. Konstanze Wegener-Stiftung** zur Förderung der med. Forschung und Therapie auf dem Gebiet der Krebsbehandlung und zur Förderung des Tierschutzes gefördert (Projekt #36 an Daniel Nettersheim).

Gedruckt mit der Genehmigung
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. Daniel Nettersheim

2. Prof. Dr. Thomas Kurz

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Januar 2023

Für meine Familie

Publikationen

Publikation im Rahmen dieser Arbeit:

Müller MR, Burmeister A, Skowron MA, Stephan A, Bremmer F, Wakileh GA, Petzsch P, Köhrer K, Albers P, Nettersheim D. Therapeutical interference with the epigenetic landscape of germ cell tumors: a comparative drug study and new mechanistical insights. Clin Epigenetics. 2022 Jan 7;14(1):5.

Die Datenerhebung der Experimente in Keimzelltumorzelllinien erfolgte durch mich. Die Experimente in, Urothelkarzinom-, Prostatakrebs- und Nierenzellkarzinomzelllinien wurden für Quisinostat von A Stephan für JIB-04 und Chaetocin von mir selbst durchgeführt. Die Epi-Drug Co-Behandlungen (in dieser Arbeit nicht verwendet) wurden von A Burmeister und GA Wakileh durchgeführt. F Bremmer unterstützte im Revisionsprozess, P Petzsch und K Köhrer unterstützen die Durchführung der RNA-Sequenzierung. P Albers und D Nettersheim stellten Ressourcen zur Verfügung. Die Planung der Experimente, Analyse der Daten, sowie die Anfertigung des Manuskriptes erfolgte durch mich selbst unter Mithilfe von MA Skowron und D Nettersheim.

Weitere Publikationen:

Nettersheim D, Oing C, Schönberger S, Skowron M, Vermeulen M, **Müller M**, Watolla M, Bremmer F, Pfister D, Calaminus G, Looijenga L, Lorch A, Albers P. Aktuelle Forschung pädiatrischer und adulter Keimzelltumoren: Ein Bericht vom ersten „Düsseldorfer Testis Cancer Day“ [Current research on pediatric and adult germ cell tumors : A report from the first "Düsseldorfer Testis Cancer Day"]. Urologe A. 2019 Jul;58(7):804-808.

Müller MR, Skowron MA, Albers P, Nettersheim D. Molecular and epigenetic pathogenesis of germ cell tumors. Asian J Urol. 2021 Apr;8(2):144-154.

Skowron MA, Becker TK, Kurz L, Jostes S, Bremmer F, Fronhoffs F, Funke K, Wakileh GA, **Müller MR**, Burmeister A, Lenz T, Stefanski A, Stühler K, Petzsch P, Köhrer K, Altevogt P, Albers P, Kristiansen G, Schorle H, Nettersheim D. The signal transducer CD24 suppresses the germ cell program and promotes an ectodermal rather than mesodermal cell fate in embryonal carcinomas. Mol Oncol. 2022 Feb;16(4):982-1008.

Müller MR, Burmeister A, Skowron MA, Nettersheim D. Epigenetische Inhibitoren als Behandlungsoption für (Cisplatin-resistente) Keimzelltumoren. UroForum. 2022 Apr;4:34-7.

Burmeister A, Stephan A, Alves Avelar LA, **Müller MR**, Seiwert A, Höfmann S, Fischer F, Torres-Gomez H, Hoffmann MJ, Niegisch G, Bremmer F, Petzsch P, Köhrer K, Albers P, Kurz T, Skowron MA, Nettersheim D. Establishment and evaluation of a dual HDAC / BET inhibitor as a therapeutic option for germ cell tumors and other urological malignancies. Mol Cancer Ther. 2022 Aug 23:MCT-22-0207. (im Druck, Online verfügbar)

Vorträge und Posterpräsentationen:

Müller MR, Skowron MA, Albers P, Nettersheim D. Screening epigenetic drugs as novel therapeutic options for (cisplatin resistant) germ cell tumors. DSO Retreat 2019, 2019, Düsseldorf, Deutschland. (Posterpräsentation, **Müller MR**)

Skowron MA, Becker TK, Kurz L, Jostes S, Bremmer F, Fronhoffs F, Funke K, Wakileh GA, **Müller MR**, Burmeister A, Lenz T, Stefanski A, Stühler K, Petzsch P, Köhrer K, Altevogt P, Albers P, Kristiansen G, Schorle H, Nettersheim D. The molecular and (epi)genetic regulation of the signal transducer CD24 and its influence on germ cell tumor fate decisions. 12. AuF-Symposium. 2021, Berlin, Deutschland. V2.4. (Vortrag, Skowron MA)

Müller MR, Petzsch P, Skowron MA, Köhrer K, Nettersheim D. Die pharmakologische Störung epigenetischer Regulatoren als Alternative zur Standardtherapie für (Cisplatin-resistente) Keimzelltumoren. 73. DGU Kongress. 2021, Stuttgart, Deutschland. V12.9. (Vortrag, **Müller MR**)

Skowron MA, Thomas DJ, Becker TK, Kurz L, Jostes S, Bremmer F, Fronhoffs F, Funke K, Wakileh GA, **Müller MR**, Burmeister A, Lenz T, Stefanski A, Stühler K, Petzsch P, Köhrer K Altevogt P, Albers P, Kristiansen G, Schorle H, Nettersheim D. The molecular and epigenetic function of the signaling molecule CD24 in germ cell tumors and its suitability as a therapeutic target using antibodies and NK-CAR cells. 37th Annual EAU Congress. 2022, Amsterdam, Netherlands. A0549. (Videovortrag, Skowron MA)

Skowron MA, Becker T, Kurz L, Jostes S, Bremmer F, Fronhoffs F, Funke K, Wakileh GA, **Müller MR**, Burmeister A, Lenz T, Stefanski A, Stühler K, Petzsch P, Köhrer K Altevogt P, Albers P, Kristiansen G, Schorle H, Nettersheim D. Die molekulare und epigenetische Funktion des Signalmoleküls CD24 in Keimzelltumoren und dessen therapeutischer Angriff über Antikörper und NK-CAR-Zellen. 67. Kongress der Nordrhein-Westfälischen Gesellschaft für Urologie (NRWGU). 2022, Münster, Deutschland. P 2.6. (Posterpräsentation, Skowron MA)

Burmeister A, Stephan A, **Müller MR**, Petzsch P, Köhrer K, Alves-Avelar LA, Albers P, Kurz T, Skowron MA, Nettersheim D. Die Entwicklung neuer HDAC BET-Dualinhibitoren als epigenetische Therapieoption für (Cisplatin-resistente) urogenitale Tumoren. 67. Kongress der Nordrhein-Westfälischen Gesellschaft für Urologie (NRWGU). 2022, Münster, Deutschland. V-D 1.2.1. (Vortrag, Burmeister A)

Skowron MA, Thomas DJ, Söhngen C, Kurz L, Jostes S, Bremmer F, Fronhoffs F, Funke K, Wakileh GA, **Müller MR**, Burmeister A, Lenz T, Stefanski A, Stühler K, Petzsch P, Köhrer K, Altevogt P, Albers P, Kristiansen G, Schorle H, Nettersheim D. The signaling molecule CD24 controls endodermal differentiation of embryonal carcinomas via regulating RNA processing and post-translational modifications. 74. DGU Kongress. 2022, Hamburg, Deutschland. V18K.4. (Vortrag, Skowron MA)

Burmeister A, **Müller MR**, Söhngen C, Skowron MA, Petzsch P, Köhrer K, Alves-Avelar LA, Kurz T, Albers P, Nettersheim D. Die molekulare und (epi)genetische Charakterisierung von DHRS2 als mögliches therapeutisches Ziel in Kombination mit Histondeacetylase-Inhibitoren in urologischen Tumoren. 74. DGU Kongress. 2022, Hamburg, Deutschland. V18K.8. (Vortrag, Burmeister A)

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass diese Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Die Arbeit wurde bisher keiner Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht. Ich habe bisher keinen erfolglosen Promotionsversuch unternommen.

Düsseldorf, den

_____

Melanie Rita Müller

Inhaltsverzeichnis

Publikationen IV

Eidesstattliche Erklärung VI

Inhaltsverzeichnis VII

Zusammenfassung IX

Abstract XI

1. Einleitung 1

1.1. Keimzelltumoren 1

1.1.1. Klassifizierung von Keimzelltumoren 1

1.1.2. Demographische Verteilung der Keimzelltumoren des Mannes 1

1.1.3. Risikofaktoren bei Keimzelltumoren 4

1.1.4. TNM-Stadieneinteilung und prognostische IGCCCG-Einteilung 6

1.1.5. Etablierte Therapiemethoden bei KZT 7

1.1.6. Die Entwicklung der Keimzellen 10

1.1.7. Mögliche Entartungswege von Keimzellen 11

1.2. Die Epigenetik der KZT 12

1.2.1. Einführung in die Epigenetik 12

1.2.2. Epigenetische Inhibitoren 16

1.2.3. Stand der Forschung zur Epigenetik der Keimzelltumoren 22

1.2.4. Epigenetik als Therapieziel in KZT 23

1.3. Zielsetzung 24

2. Material und Methoden 27

2.1. Material 27

2.1.1. Zelllinien und Primärkultur 27

2.1.2. Medien und Zellkulturbedarf 29

2.1.3. Epi-Drugs und Lösemittel 30

2.1.4. Chemikalien 31

2.1.5. Kits und Assays 32

2.1.6. Gebrauchsfertige Puffer 32

2.1.7. Sonstige Verbrauchsmaterialien 33

2.1.8. Geräte ... 34
2.1.9. Software und online Tools ... 35
2.1.10. Oligonucleotide ... 37
2.1.11. Antikörper ... 38
2.2. Methoden ... 39
2.2.1. Zellbiologische Methoden ... 39
2.2.2. Molekularbiologische Methoden ... 43
2.2.3. Biochemische Methoden ... 46
2.2.4. *In silico* Analysen ... 49
3. Ergebnisse ... 52
3.1. Identifizierung potenzieller epigenetischer Ziele in KZT ... 52
3.2. Identifizierung zytotoxisch wirksamer Epi-Drugs in KZT-Zelllinien ... 56
3.3. Epi-Drugs induzieren Apoptose und Zellzyklusarrest ... 60
3.4. Behandlung mit Epi-Drugs verursacht epigenetische Nebeneffekte ... 61
3.5. Epi-Drugs gegen Histoninteraktoren zeigen auch Effekte auf DNA-Methylierung ... 66
3.6. Interferenz mit der epigenetischen Landschaft führt zur Deregulation von Transkriptionsregulatoren ... 67
3.7. Epi-Drug-Behandlung stört die Zellproliferation über cAMP-, JAK-STAT- und WNT-Signalkaskaden ... 75
3.8. HDACi und ihre Effekte auf die *DHRS2*-Expression ... 78
4. Diskussion ... 85
4.1. Das Potential verschiedener Epi-Drugs zur Behandlung von Keimzelltumoren ... 85
4.2. Die Wirkung und Nebenwirkung von Epi-Drugs auf molekularer Ebene ... 90
4.3. Die Auswirkungen der HDAC-Inhibition auf die Expression der *DHRS2*-Isoformen ... 99
Literaturverzeichnis ... 102
Abbildungsverzeichnis ... 131
Tabellenverzeichnis ... 133
Abkürzungsverzeichnis ... 134
Anhang ... 136
Danksagung ... XI

Zusammenfassung

Die Keimzelltumoren (KZT) des Mannes sind vor allem eine Erkrankung junger Männer im Alter zwischen 10 und 40 Jahren. Die Tumoren werden in verschiedene Entitäten unterteilt: Seminome (SE) und Nicht-Seminome (NSE). Letztere werden weiter in Embryonalkarzinome (EC), Dottersacktumoren (YST), Chorionkarzinome (CC) und Teratome (TE) unterschieden, wobei auch gemischte Typen auftreten können. Die Heilungschancen dieser Erkrankung mit der Standardtherapie, bestehend aus Strahlungstherapie oder Cisplatin-basierter Chemotherapie sind sehr gut. Bei Rezidiven und Cisplatin-resistenten Tumoren gibt es jedoch keine alternativen Therapien neben einer Hochdosis-Chemotherapie. Zusätzlich sind die nach Cisplatin-Behandlung häufig beobachteten Langzeittoxizitäten, allen voran Sekundärtumoren, in diesen jungen Patienten mit guter Prognose und geringer Einschränkung der Lebenserwartung ein Problem. Aus diesen Gründen werden dringend alternative Strategien zur Behandlung (Cisplatin-resistenter) KZT benötigt.

KZT weisen nur selten genomische Mutationen auf, weswegen eine gestörte Epigenetik als Ursache für die Entartung der Keimzellen vermutet wird. Die Epigenetik ist die Regulierung der Genexpression, welche durch Transkription-aktivierende und -reprimierende Histon- und DNA-Modifikationen etabliert wird. Der Eingriff in dieses in KZT bereits instabile Netzwerk durch Inhibitoren gegen epigenetische Modifikatoren und Interaktoren kann daher als Therapieziel genutzt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Eignung verschiedener, epigenetisch wirkender Agenzien (Epi-Drugs) als Therapieoption in (Cisplatin-resistenten) KZT-Zellen getestet. Dafür wurden, basierend auf Transkriptomanalysen von KZT-Zelllinien- und -Gewebe, epigenetische Interaktoren verschiedener Enzymklassen als potenzielle Ziele identifiziert und passende Inhibitoren ausgewählt. Der Einfluss dieser Inhibitoren auf die Zellviabilität wurde zunächst in drei verschiedenen KZT-Zelllinien, jeweils eine Zelllinie der Entitäten SE, EC und CC getestet. Hier konnten vier Epi-Drugs mit Reduktion der Zellviabilität im nanomolaren Konzentrationsbereich identifiziert werden: Histondeacetylaseinhibitor (HDACi) Quisinostat, Histondemethylaseinhibitor JIB-04, Histonmethyltransferaseinhibitor Chaetocin und PROTAC MZ-1, welcher gegen Acetylmodifikationen erkennende Proteine gerichtet ist. Weitere drei Epi-Drugs zeigten Wirkspektren im niedrigen mikromolaren Konzentrationsbereich: LP99, ebenfalls ein Inhibitor gegen Acetylmodifikationen erkennende Proteine, und *Polycomb-repressive-Complex*-Inhibitoren PRT4165 und GSK343. Anschließend wurde die zytotoxische Analyse dieser sieben Epi-Drugs auf weitere KZT-Zelllinien ausgedehnt, einschließlich Cisplatin-resistenter Subklone, und die molekulare Wirkung genauer analysiert. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Induktion von Apoptose und Zellzyklusarresten ermittelt. Massenspektrometrisch wurden die durch die Epi-Drugs induzierten Änderungen der Histonmodifikationen analysiert. Hier konnte gezeigt werden, dass zusätzlich zu den durch die

Inhibition der Zielenzyme erwarteten Änderungen auch epigenetische Nebeneffekte auf andere Histonmodifikationen, sowie auf die DNA-Methylierung auftraten. Des Weiteren wurden die Effekte der verschiedenen Epi-Drugs auf das Transkriptom mittels RNA-Sequenzierung untersucht. Dies zeigte, dass der Eingriff in die epigenetische Landschaft von KZT vor allem zur Deregulation von Ionentransportern und DNA-bindenden Faktoren führte. Mit einem Kinase-Array wurde zudem eine Deregulation verschiedener Kinase-Signalwege wie cAMP, JAK-STAT und WNT durch die Epi-Drugs identifiziert.

Zusätzlich wurde die bei HDAC-Inhibition identifizierte stark erhöhte *DHRS2*-Expression genauer untersucht. Die NADPH-abhängige Reduktase DHRS2 kann im Zellkern und in den Mitochondrien vorkommen und hat je nach Lokalisation vermutlich unterschiedliche Funktionen. Um einen ersten Einblick in die Funktion von DHRS2 im Wirkspektrum der HDACi zu erhalten, wurde in dieser Arbeit zunächst die Expression der verschiedenen *DHRS2*-Isoformen untersucht. Durch verschiedene getestete HDACi wurden vor allem die beiden proteinkodierenden *DHRS2*-Isoformen *5* und *7*, welche ein Mitochondrientranslokationssignal im N-Terminus beinhalten, vermehrt exprimiert. Es wurde jedoch auch eine stark erhöhte Expression der nicht-proteinkodierenden Isoformen *8* und *9* nach HDACi-Behandlung beobachtet, über deren Funktion noch nichts bekannt ist.

Zusammenfassend konnten durch umfangreiche zytotoxische und molekulare Analysen sieben verschiedene Epi-Drugs für eine alternative oder zusätzliche Therapieoption zur Standardtherapie zur Behandlung von (Cisplatin-resistenten) KZT identifiziert und deren Wirkspektrum durch molekulare Untersuchungen charakterisiert werden.

Abstract

Germ cell tumors (GCTs) in males are preeminently a disease of young men aged 10 to 40 years. GCTs are divided into the subtypes seminoma (SE) and non-seminoma (NSE), the latter being further divided into embryonal carcinoma (EC), yolk sac tumor (YST), choriocarcinoma (CC) and teratoma (TE). Mixed types, consisting of two or more different subtypes have also been reported. The standard therapy, consisting of radiation or Cisplatin-based chemotherapy provides very good chances of recovery. Although recurring cancer and gaining of Cisplatin-resistance are more problematic, as there are as of now no alternative treatment options for GCTs except salvage chemotherapy. Especially in these young patients with good prognosis and therefore a good life expectancy, the long-term toxicities like secondary tumors, which often succeed Cisplatin-based treatments are problematic. For those reasons, alternative strategies for the treatment of (Cisplatin-resistant) GCTs are urgently needed.

As GCTs have a very low mutation burden compared to other tumor entities, the cause of the maldevelopment of the germ cells is thought to originate in a disturbed epigenetic landscape. The term epigenetics refers to the regulation of gene expression carried out by transcription activating and repressing histone and DNA modifications. Further violation of this already destabilized regulatory network by the inhibition of epigenetic modifiers and interactors can be used as a therapeutical target in GCTs.

The aim of this thesis was to determine the suitability of different epigenetically active drugs (Epi-Drugs) as a therapeutical option for (Cisplatin-resistant) GCTs. The selection of suitable epigenetic targets and corresponding drugs was based on transcriptome data of GCT cell lines and tissues. The effect on the cell viability of these Epi-Drugs was first tested in three different GCT cell lines, one from each entity SE, EC and CC. Four Epi-Drugs induced a reduction of the cell viability in a nanomolar concentration range: histone deacetylase inhibitor (HDACi) Quisinostat, histone demethylase inhibitor JIB-04, histone methyltransferase inhibitor Chaetocin and PROTAC MZ-1 which targets proteins recognizing acetylated histones. Further, LP99, also an inhibitor of proteins recognizing acetylated histones, as well as PRT4165 and GSK343, both inhibitors of polycomb repressive complexes, effectively decreased cell viability using concentrations in the lower micromolar range. The cytotoxic testing of these seven Epi-Drugs was extended to additional GCT cell lines, including Cisplatin-resistant subclones, followed by the characterization of the molecular effects induced by the treatments. The induction of apoptosis and cell cycle arrests was determined using flow cytometry. The changes in histone modifications caused by the inhibition of the epigenetic targets were observed using mass spectrometry. Remarkably, in addition to the expected changes caused by the inhibition, further changes concerning different histone modifications were found. These epigenetic side effects included histone modifications as well as methylation of the DNA. In addition, effects of the Epi-Drugs on the transcriptome were observed using RNA sequencing,

revealing that modulation of the epigenetic landscape results in deregulation of ion transporters and DNA-binding factors in GCT cells. Finally, the activation of kinase signaling pathways was analyzed using a kinase array, providing evidence for the deregulation of the cAMP, JAK-STAT and WNT signaling pathways.

The inhibition of HDACs lead to a strong increase in *DHRS2* expression, which was further analyzed in the scope of this work. DHRS2 is a NADPH-dependent reductase located in the nucleus or the mitochondria. There is not much known about the function of DHRS2, but it seems to differ depending on its localization. In order to gain a first insight into the function of DHRS2 in the mode of action of HDACi, the expression of the different isoforms of *DHRS2* were analyzed. The treatment with different HDACi mainly increased the expression of the protein coding *DHRS2* isoforms *5* and *7*, containing the mitochondrial translocation signal. In addition, the expression of the non-coding isoforms *8* and *9* was also increased. A potential function of these non-coding isoforms is not yet known.

In conclusion this thesis identified seven Epi-Drugs as an alternative treatment option for the therapy of (Cisplatin-resistant) GCTs using extensive cytotoxic and molecular analyses to further characterize their mode of action.

1. Einleitung

1.1. Keimzelltumoren

1.1.1. Klassifizierung von Keimzelltumoren

Keimzelltumoren (KZT) sind solide Tumoren, die sich aus entarteten Keimzellen, den Vorläuferzellen der Gonaden oder Keimdrüsen, entwickeln. Die Primärtumoren sind daher meist in den Hoden oder den Eierstöcken zu finden, können jedoch vor allem bei Kindern auch extragonadal entlang der Körpermitte oder im zentralen Nervensystem auftreten [1]. KZT lassen sich nach Oosterhuis *et al.* in sieben verschiedene Typen unterteilen [2,3]. Der präpubertäre Typ I (unreifes Teratom, unreifer Dottersacktumor) betrifft vor allem Neugeborene und Kinder unter 6 Jahren, wobei Mädchen häufiger erkranken als Jungen. Typ II-Tumorerkrankungen betreffen Jugendliche ab der Pubertät bis ca. 35 Jahre. Die KZT des Mannes werden dabei in Seminome (SE) und Nicht-Seminome (NSE), die der Frau in Dysgerminome und Nicht-Dysgerminome unterschieden. NSE (und Nicht-Dysgerminome) werden unterteilt in stammzellähnliche Embryonalkarzinome (EC, aus dem Englischen „*embryonal carcinoma*“), welche weiter zu Teratomen (TE) und extra-embryonalem Gewebe differenzieren können, wie dem Dottersacktumor (YST, aus dem Englischen „*yolk-sac tumor*“) und dem Chorionkarzinom (CC, aus dem Englischen „*choriocarcinoma*“). Typ III beschreibt die spermatozytischen Tumoren, welche vornehmlich bei älteren Männern vorkommen. Typ IV (dermoide Zyste am Eierstock) und V (Blasenmole in der Plazenta) betreffen ausschließlich Frauen im gebärfähigen Alter. Zusätzlich wurden die seltenen Typen 0 (verursacht durch einen parasitären Zwilling) und VI (Tumoren die Typ I oder II ähneln aber in älteren Patienten, über 60 Jahre auftreten) als weitere Subtypen klassifiziert [3]. Das Klassifizierungssystem der *World Health Organization* (WHO) unterscheidet die Keimzelltumoren lediglich nach ihrer Entstehung aus der nicht-invasiven Vorläuferläsion „*germ cell neoplasia in situ*“ (GCNIS). So entwickelt sich der Typ II aus GCNIS, der präpubertale Typ I und die Spermatozytentumoren (Typ III) jedoch nicht [4]. Bei den Typ II KZT des jungen Mannes, welche im Zuge dieser Arbeit genauer beschrieben und analysiert werden, handelt es sich also vornehmlich um SE und NSE, sowie um gemischte Typen mit SE- und NSE-Anteilen.

1.1.2. Demographische Verteilung der Keimzelltumoren des Mannes

KZT, welche 90 % aller Hodentumoren darstellen, entsprechen ca. 1-2 % aller Krebserkrankungen und gehören damit zu den selteneren Tumorerkrankungen [5,6]. Die Inzidenzen von Hodentumoren sind seit 1980 in vielen Ländern stetig gestiegen (Abbildung 1.1 A). In den letzten Jahren konnte in einigen Ländern mit hohen Inzidenzen jedoch eine Stabilisierung der Raten beobachtet werden, so beispielsweise in Deutschland und Slowenien (Abbildung 1.1 A). Der Grund für diese Entwicklung und ob diese sich weiterhin fortsetzen kann, oder ob eine Art Plateau der Inzidenzen erreicht ist, ist allerdings nicht bekannt [7].

KZT sind vor allem eine Erkrankung junger Männer, mit den höchsten Inzidenzraten zwischen 20 und 40 Jahren (Abbildung 1.1 B). Im Folgenden werden vor allem Jungen und Männer im Alter von 10 bis 39 Jahren diskutiert, da ab ca. 40 bis 45 Jahren die Inzidenzen für die meisten anderen Krebsarten (beispielsweise Brust-, Lungen-, Prostata-, Haut-, Darm- und Magenkrebs mit über 1 Million neue Fälle in 2020) stark zunehmen und die Inzidenzen der Hodentumoren bei weitem übersteigen [6,8]. In dieser Altersgruppe junger Männer (10-39 Jahre) sind Hodentumoren die nach Ländern häufigste Krebserkrankung (meist-diagnostizierte Tumorart in 62 Ländern, Abbildung 1.1 C). Dabei sind Länder mit hohen Entwicklungsstand stärker betroffen als Länder mit niedrigem Entwicklungsstand (Abbildung 1.1 D). Nach Inzidenzzahlen ist Leukämie die weltweit häufigste Tumorart junger Männer (10,3 % aller Tumordiagnosen), dicht gefolgt von den Hodentumoren (9,5 %) (Abbildung 1.2 A). Am stärksten betroffen sind hier vor allem die amerikanischen Subkontinente und Europa, sowie Teile Asiens (Abbildung 1.2B). Männer mit afrikanischem Hintergrund erkranken deutlich seltener [9]. Im europäischen Raum weisen vor allem die nordischen Länder Norwegen und Dänemark hohe Inzidenzraten auf (> 10), der Süden mit Spanien und Italien mit 3-6 Fälle pro 100000 Männer eher niedrige Inzidenzen [10] (Abbildung 1.1 A). Diese geographischen Unterschiede sind zum einen auf genetische Faktoren aber auch auf exogene Einflüsse zurückzuführen, wie beispielsweise der Exposition gegenüber chemischen Substanzen mit östrogenähnlicher Wirkung [9].

Die Heilungschancen sind jedoch bei frühzeitiger Behandlung sehr gut, was eine vergleichsweise niedrige Mortalitätsrate von weniger als 10 % zur Folge hat (Abbildung 1.2 B, C, D). Hier ist auffällig, dass in höher entwickelten Ländern deutlich weniger Patienten sterben als in ärmeren Ländern (Abbildung 1.1 D, Abbildung 1.2 D). In Europa ist ein Ost-West-Gefälle zu beobachten, mit höherer Mortalität in östlichen Ländern (Mortalitätsrate > 1) und niedrigerer Mortalität in westlichen Ländern (Mortalitätsrate < 0,4) [10]. Dies lässt möglicherweise auf eine bessere Aufklärung der Bevölkerung über diese Erkrankung, sowie eine bessere Versorgung der Patienten schließen, was zu einer früheren Erkennung bei gleichzeitig besserer Behandlung führt und dadurch günstigere Voraussetzungen für das Überleben der Patienten schafft.

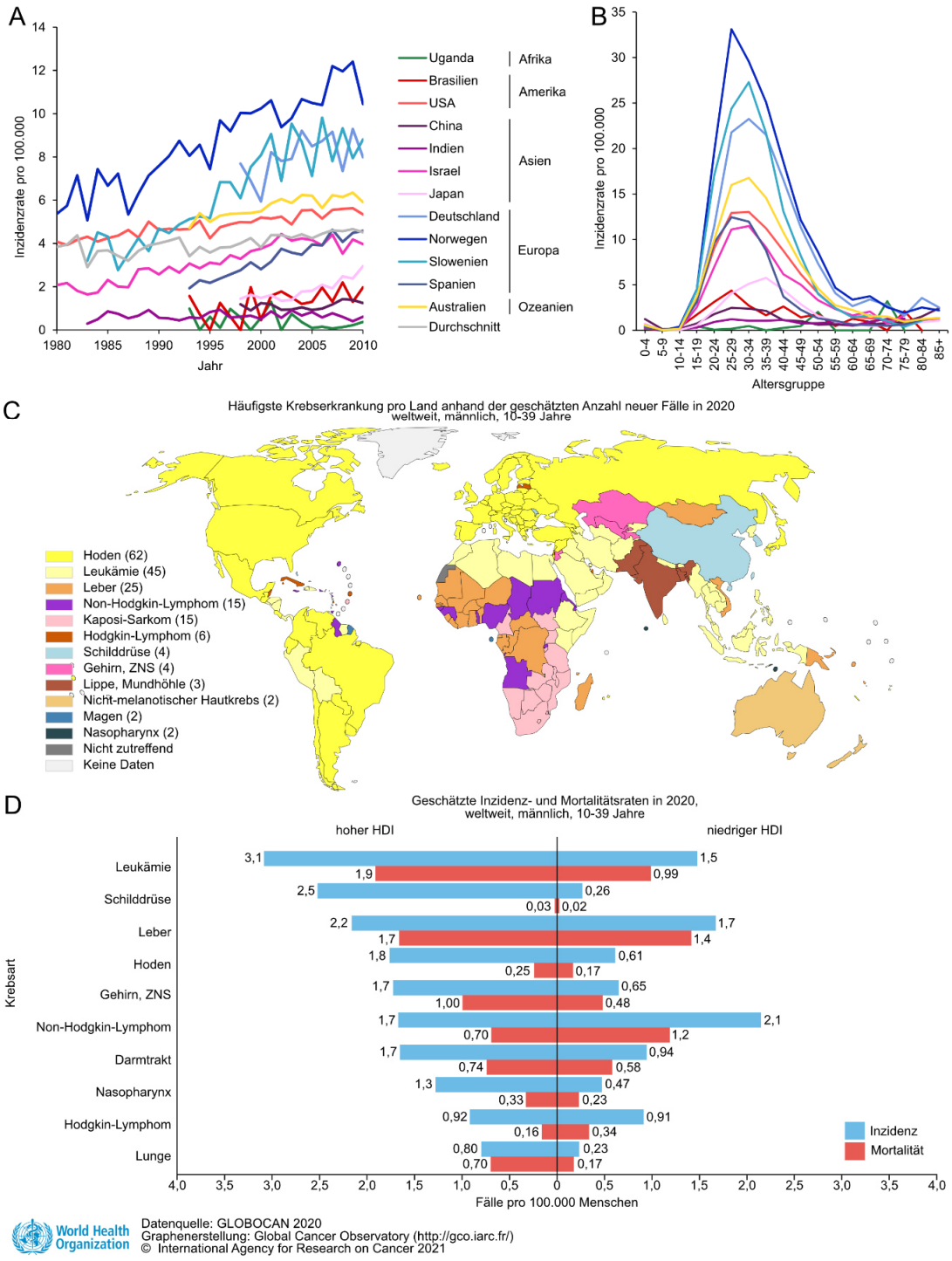


Abbildung 1.1: Die demographische Verteilung von Hodentumoren bei Männern
A) Hodenkrebsinzidenzraten (alle Altersgruppen) verschiedener Länder als Vertreter aller Kontinente über den Zeitraum von 1980 bis 2010. Der Trend (grau) stellt den Durchschnitt aller dargestellten Länder dar. B) Nach Diagnosealter aufgetrennte Hodenkrebsinzidenzraten verschiedener Länder. Die Datenerhebungen stammen aus den Kollaborationsstandorten der IACR (*International Association of Cancer Registries*): Australien, Brasilien (Goiania), China (Harbin, HongKong, Jiashan, Shanghai, Zhongshan), Deutschland (Hamburg, Saarland), Indien (Chennai), Israel, Japan (Fukui, Miyagi, Nagasaki, Osaka), Norwegen, Slowenien, Spanien (Albacete, Basque Country, Canary Islands, Cuenca, Girona, Granada, Murcia, Navarra, Tarragona), Uganda (Kampala), USA (Kalifornien, Los Angeles) Die Daten wurden der CI5*plus*-Datenbank (aus dem Englischen „*Cancer Incidence in 5 Continents*“) entnommen (https://ci5.iarc.fr/CI5plus/Pages/online.aspx). C) Farbkodierte Darstellung der häufigsten Tumorerkrankung je Land anhand der geschätzten Inzidenzen im Jahr 2020 (Alter-Standardisierte Inzidenz). D) Demographische Verteilung (Alter-Standardisiert) der Inzidenz- und Mortalitätsraten der häufigsten Krebserkrankungen zwischen 10 und 39 Jahren mit Bezug auf den HDI (Index der menschlichen Entwicklung, aus dem Englischen „*human development index*“). Die Abbildungen wurden mithilfe des *Cancer Today*-Tools der Globocan (*Global Cancer Observatory)* Website erstellt (https://gco.iarc.fr/today).

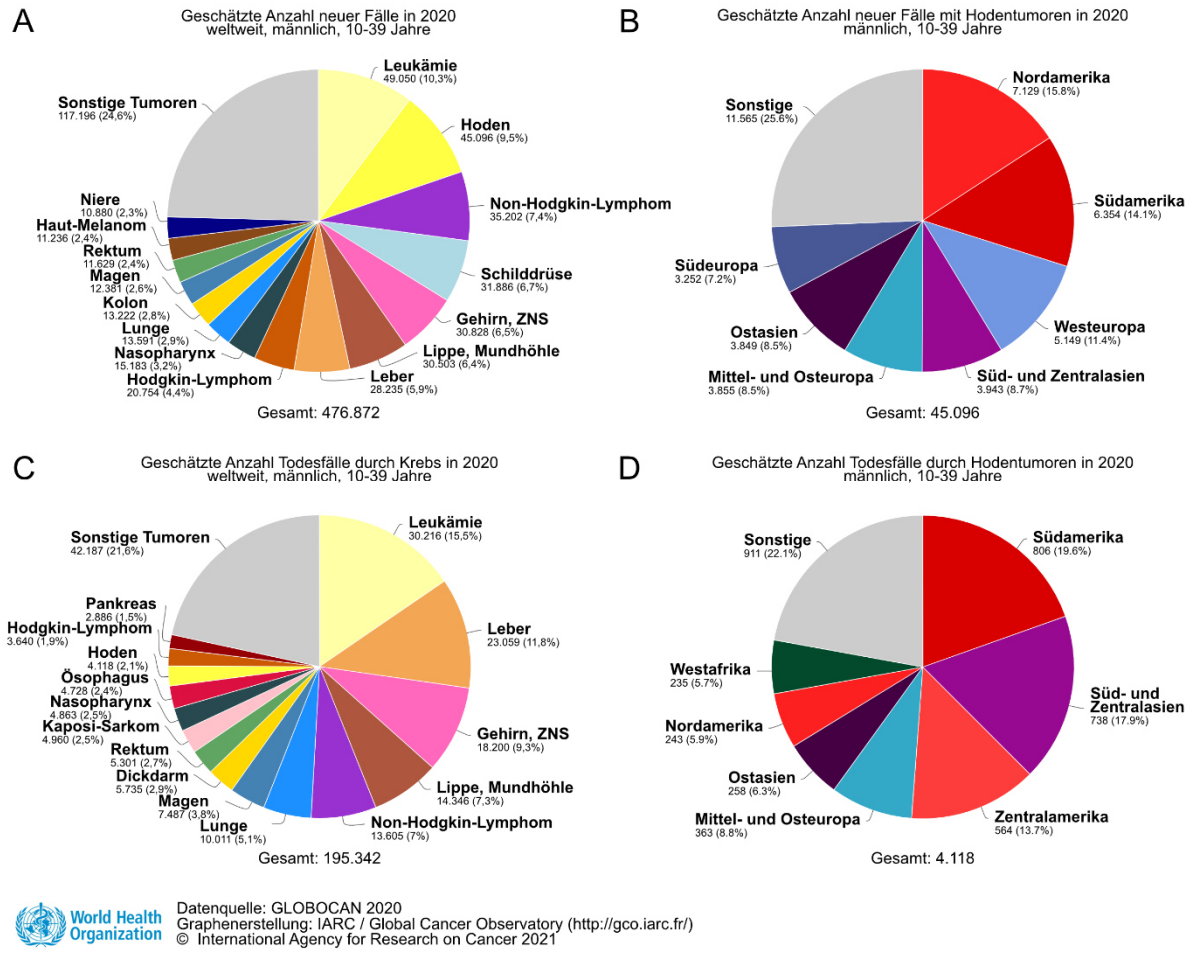


Abbildung 1.2: Hodenkrebs ist eine der häufigsten Krebserkrankungen junger Männer
A) Geschätzte Anzahl neuer Krebserkrankungen weltweit im Jahr 2020 bei Männern zwischen 10 und 39 Jahren. B) Geschätzte Anzahl neuer Hodentumorerkrankungen im Jahr 2020 unterteilt nach Weltregion. C) Geschätzte Anzahl krebsbezogener Todesfälle weltweit im Jahr 2020 bei Männern zwischen 10 und 39 Jahren. D) Geschätzte Anzahl der Todesfälle durch Hodentumorerkrankungen im Jahr 2020 unterteilt nach Weltregion. Die untersuchten Krebsarten in A, und C beinhalten: Blase, Gehirn und ZNS (Zentrales Nervensystem, Lippe und Mundhöhle, Ösophagus, Nasopharynx, Larynx, Kehlkopf, Oropharynx, Hypopharynx, Speicheldrüse, Schilddrüse, Lunge, Magen, Bauchspeicheldrüse, Gallenblase, Leber, Niere, Kolorektale Tumorerkrankungen (Dünndarm, Dickdarm, Rektum), Prostata, Mesotheliom, Penis, Hoden, Hodgkin-Lymphom, Non-Hodgkin-Lymphom, Leukämie, Multiples Myelom, Kaposi-Sarkom, Haut-Melanom und Nicht-melanotischer Hautkrebs. Die Weltregionen in C und E sind untereilt in Nordamerika, Mittelamerika, Karibik, Südamerika, Nordeuropa, Mittel- und Osteuropa, Südeuropa, Westeuropa, Nordafrika, Ostafrika, Zentralafrika, Südafrika, Westafrika, Ostasien, Südostasien, Süd- und Zentralasien, Westasien, Australien und Neuseeland, Melanesien, Polynesien und Mikronesien. Die Abbildungen wurden mithilfe des *Cancer Today*-Tools der Globocan (*Global Cancer Observatory)* Website erstellt (https://gco.iarc.fr/today).

1.1.3. Risikofaktoren bei Keimzelltumoren

Da die Ursachen der KZT-Entstehung noch nicht vollständig geklärt sind, basieren die klinischen Risikofaktoren vornehmlich auf epidemiologischen Studien [11].

Der bekannteste Risikofaktor ist eine Lageanomalie des Hodens, der Hodenhochstand, auch Kryptorchismus oder *Maldeszensus testis* genannt, bei dem das gleichzeitige Auftreten eines KZT mit einem relativem Risiko von 2,9 % angegeben wird [12]. Das relative Risiko beschreibt in der Epidemiologie das Erkrankungsrisiko von exponierten zu nicht-exponierten Individuen und damit die Wahrscheinlichkeit eher mit einem bestimmten Risikofaktor zu erkranken als ohne. Es ist noch nicht endgültig geklärt, ob eine frühzeitige Operation der Lageanomalie vor

Auftreten eines KZT schützt. Es gibt jedoch Studien, die darauf hinweisen, dass eine frühe Korrektur im Kindesalter (mit dem größten Erfolg während des ersten Lebensjahrs) das Risiko mindert [13,14].

Familiäre Häufungen von KZT stellen einen weiteren Risikofaktor dar. Eine norwegische Studie ermittelte ein relatives Risiko für eine KZT-Erkrankung von 2 % bei Erkrankung des Vaters und 4,1 % bei Erkrankung des Bruders (20 % bei Zwillingen) [15]. Es wird eine autosomal rezessive Vererbung vermutet, mit der Veränderung einzelner Basenpaare welche unter anderem in den Genen *KITLG*, *SPRY4*, *BAK1* und *PDE11A* identifiziert werden konnten. Gonosomal spielt die gr/gr Deletion des Y-Chromosoms eine Rolle. Die auch im Zusammenhang mit Infertilität erwähnte gr/gr Deletion ist eine ca. 1,6 Megabasenpaar große Deletion in der Azoospermie Faktor Region c (*AZFc*), welche Gene enthält, die an der Spermienbildung beteiligt sind [16].

Ein weiterer Risikofaktor, der auch oft im Zusammenhang mit Kryptorchismus auftritt, ist Infertilität. Vor allem Männer, deren Infertilität auf den sogenannten „männlichen Faktor“ zurückzuführen ist, sind betroffen [17]. Der „männliche Faktor“ beinhaltet die Fehlbildung von Spermien durch Deformierung oder eingeschränkte Mobilität, sowie generell niedrige Spermienproduktion. Das relative Risiko für eine KZT-Erkrankung beträgt 2,8 % [11].

Kontrovers diskutiert wird die *Mikrolithiasis testis* (MLT) als Risikofaktor für KZT. MLT ist das Auftreten von Kalkeinlagerungen im Hoden, welches aber selbst keinen Krankheitswert besitzt. Auffällig war das simultane Auftreten von MLT bei KZT-Diagnosen (relatives Risiko 8,5 %) [18], allerdings kann dabei das MLT-Erscheinungsbild auch durch die KZT-Erkrankung verursacht werden. In einer großen Studie von Patel wurden neu diagnostizierte MLT-Patienten (n = 442) über einen Zeitraum von ca. 2 Jahren beobachtet, von denen lediglich 2 Patienten (0,5 %) einen KZT entwickelten [19]. Bei diesen Patienten waren jedoch zusätzliche Risikofaktoren vorhanden (KZT-Vorerkrankung bzw. Hodenatrophie).

Als höchster Risikofaktor gilt die bereits auf einer Seite des Hodens aufgetretene KZT-Erkrankung. Das relative Risiko für die Entwicklung eines Zweittumors auf der Gegenseite liegt bei ca. 25 % [11,20,21].

Die Theorie des „testikulären Dysgenesie-Syndroms“ (TDS) ist eine Hypothese, die versucht eine gemeinsame Erklärung für eine Vielzahl von Erkrankungen des männlichen Reproduktionssystems zu finden. TDS umfasst dabei als zugrundeliegende Erkrankung das Auftreten von Fehlentwicklungen wie Kryptorchismus und Hypospadie, Störungen der Spermatogenese (Infertilität), sowie histopathologische Veränderungen von Keimzellen bis zur GCNIS, welche zur Entstehung von KZT führen können [22]. Die Grundlage dieser Theorie ist dabei das Auftreten gemeinsamer Risikofaktoren dieser Erscheinungsbilder bzw. Manifestationen. Diese Theorie wird durch epidemiologische Studien allerdings nur wenig gestützt, da Evidenzen und Kausalität zwischen TDS und KZT fehlen [23].

1.1.4. TNM-Stadieneinteilung und prognostische IGCCCG-Einteilung

KZT werden nach dem TNM-System (Tumor, Nodus (Lymphknoten), Metastasen) in verschiedene Stadien eingeteilt [21]. Die Einteilung erfolgt dabei nach der Ausdehnung des Primärtumors, dem Befall von Lymphknoten und dem Vorhandensein von Metastasen (Tabelle 1.1) [24]. Das TNM-System wurde von der internationalen Vereinigung gegen Krebs (UICC, aus dem Französischen *„union internationale contre le cancer*“) erstellt und soll vor allem Klinikern bei der Behandlungsplanung helfen und Prognosen liefern. Zusätzlich liefert es eine internationale Vereinheitlichung, welche den Informationsaustausch zwischen Behandlungszentren erleichtert. Die Einteilung erfolgt dabei meist nach pathologischem Befund des befallenen Hodens und umliegender Lymphknoten. Zusätzlich werden Blutserum-Marker zu Rate gezogen.

Tabelle 1.1: TNM-Stadieneinteilung bei KZT
Serumtumormarker Grenzwerte für Bereich „erhöht“: LDH (Laktatdehydrogenase) 1.5-10 x N, wobei N die obere Grenze des Normwertes für LDH ist. βhCG **(**humanes β-Choriongonadotropin): 5000-50000 [IU/l], AFP (Alpha-Fetoprotein): 1000-10000 [ng/ml]. Bei „leicht erhöht“ liegen die Werte unter den angegebenen Bereichen, bei „stark erhöht“ darüber. Nach der Leitlinie zur Therapie von KZT [21].

Stadium		Beschreibung
0		GCNIS
I	IA	Tumor begrenzt auf Hoden, ohne Lymphknotenbefall, keine Metastasen, Serumtumormarker nicht erhöht
	IB	Invasion in umliegendes Gewebe, ohne Lymphknotenbefall, keine Metastasen, Serumtumormarker nicht erhöht
	IS	Tumor mit/ohne Invasion in umliegendes Gewebe, ohne Lymphknotenbefall, keine Metastasen, Mindestens ein Serumtumormarker (leicht) erhöht
II	IIA	Tumor mit/ohne Invasion in umliegendes Gewebe, Lymphknotenkonglomerat < 2 cm, keine Metastasen, Serumtumormarker nicht erhöht
	IIB	Tumor mit/ohne Invasion in umliegendes Gewebe, Lymphknotenkonglomerat 2-5 cm, keine Metastasen, Serumtumormarker nicht erhöht
	IIC	Tumor mit/ohne Invasion in umliegendes Gewebe, Lymphknotenkonglomerat > 5 cm, keine Metastasen, Serumtumormarker nicht erhöht
III	IIIA	Tumor mit/ohne Invasion in umliegendes Gewebe, mit/ohne Lymphknotenkonglomerat, Metastasen in entfernten Lymphknoten oder Lunge, Serumtumormarker nicht/leicht erhöht
	IIIB	Tumor mit/ohne Invasion in umliegendes Gewebe, Lymphknotenkonglomerat vorhanden, keine Metastasen, mindestens ein Serumtumormarker erhöht
		Tumor mit/ohne Invasion in umliegendes Gewebe, mit/ohne Lymphknotenkonglomerat, Metastasen in entfernten Lymphknoten oder Lunge, mindestens ein Serumtumormarker erhöht
	IIIC	Tumor mit/ohne Invasion in umliegendes Gewebe, Lymphknotenkonglomerat vorhanden, keine Metastasen, mindestens ein Serumtumormarker stark erhöht
		Tumor mit/ohne Invasion in umliegendes Gewebe, mit/ohne Lymphknotenkonglomerat, Metastasen in entfernten Lymphknoten oder Lunge, mindestens ein Serumtumormarker stark erhöht
		Tumor mit/ohne Invasion in umliegendes Gewebe, mit/ohne Lymphknotenkonglomerat, andere Metastasen, Serumtumormarker nicht/leicht erhöht/erhöht

Die Überlebenschancen bei KZT werden nach dem Klassifizierungssystem einer kooperativen, internationalen KZT-Forschergruppe kurz: IGCCCG (aus dem Englischen „*international germ cell cancer cooperative group“)* bestimmt (Tabelle 1.2) [25]. Rezidive von Stadium I-Tumoren

sind fast immer der guten Prognosegruppe zuzuordnen. Ein Drittel der Patienten mit metastasiertem Tumor entwickelt ein erneutes Rezidiv, die Einteilung erfolgt hier ähnlich zum primär metastasierten Tumor nach IGCCCG.

Tabelle 1.2: IGCCCG-Klassifizierung von KZT
LDH: Laktatdehydrogenase, N: obere Grenze des Normwertes für LDH, βhCG: humanes β-Choriongonadotropin, AFP: Alpha-Fetoprotein. Nach der Leitlinie zur Therapie von KZT [21].

Gute Prognose	NSE (56% der Fälle)	Alle folgenden Kriterien: • Primärtumor Hoden/ retro-peritoneal • Keine extrapulmonalen viszeralen Metastasen • AFP < 1,000 ng/ml • βHCG < 5,000 IU/l • LDH < 1.5 x N
	SE (90% der Fälle)	Alle folgenden Kriterien: • Jede Primärtumorlokalisation • Keine extrapulmonalen viszeralen Metastasen • Normale AFP-Werte • Alle βHCG-Werte • Alle LDH-Werte
Intermediäre Prognose	NSE (28% der Fälle)	Primärtumor Hoden/ retroperitoneal • Keine extrapulmonalen viszeralen Metastasen Eines der folgenden Kriterien: • AFP 1,000 - 10,000 ng/ml • βhCG 5,000 - 50,000 IU/l • LDH 1.5 - 10 x N
	SE (10% der Fälle)	Alle der folgenden Kriterien: • extrapulmonale viszerale Metastasen • Normale AFP-Werte • Alle βhCG -Werte • Alle LDH-Werte
Schlechte Prognose	NSE (16% der Fälle)	(Mindestens) eines der folgenden Kriterien: • primär mediastinal • extrapulmonale viszerale Metastasen • AFP > 10,000 ng/ml • βhCG > 50,000 IU/l • LDH > 10 x N

1.1.5. Etablierte Therapiemethoden bei KZT

Die Behandlungsmöglichkeiten bei KZT sind, zusätzlich zu einer aktiven Überwachung des Tumors, die operative Entfernung des betroffenen Hodens und naher Lymphknoten, eine Strahlentherapie, sowie eine Chemotherapie mit Carboplatin oder einer Kombination aus Bleomycin, Etoposid und Cisplatin (BEP) [21]. Cisplatin ist ein Zytostatikum, welches eine Quervernetzung der DNA verursacht, wodurch die Replikation gehemmt wird [26]. Etoposid, ebenfalls den Zytostatika zugehörig, ist ein Topoisomerase-II-Inhibitor, der somit die Transkription stört [27]. Bleomycin wirkt zytotoxisch, indem es durch die Komplexierung von Eisenionen mithilfe von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, aus dem Englischen „*reactive oxygen species*“) zu DNA-Strangbrüchen führt [28].

Falls eine Kontraindikation für Bleomycin besteht, kann auch nur mit Etoposid und Cisplatin (EP) bei verlängerter Therapiedauer gegeben werden. Alternativ kann statt Bleomycin

Ifosfamid in Kombination mit Cisplatin und Etoposid (PEI) verwendet werden [21]. Ein BEP-Zyklus besteht aus 22 Tagen wobei an den Tagen 1-5 jeweils 20 mg/m² Cisplatin und 75-100 mg/m² Etoposid und an Tag 1, 8 und 15 je 30 mg Bleomycin verabreicht werden. Die Behandlung nach EP-Schema umfasst ebenfalls 22 Tage mit 100 mg/m² Etoposid und 20 mg/m² Cisplatin an den Tagen 1-5. Bei der PEI-Therapie werden zusätzlich an denselben Tagen 1200 mg/m² Ifosfamid gegeben [21].

Bei KZT-Patienten liegt ein hohes Risiko für eine adjuvante Übertherapie vor, weswegen im Vorfeld der Behandlung eine Risikoadaption auf Basis prognostischer Faktoren erfolgt, welche die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs vorhersagen [21]. Dies ist nötig, da mehr als die Hälfte der Patienten auch ohne adjuvante Therapie Rezidiv-frei bleibt und eine Überdosierung aufgrund des jungen Alters der Patienten vermehrt zu therapiebedingten Folgeerkrankungen führen kann. Die Behandlungsstrategie wird immer individuell an den Patienten und dessen Krankheitsmerkmale angepasst. Hier dargestellt sind die Behandlungsempfehlungen nach der deutschen Leitlinie [21].

Die KZT des Mannes können auch außerhalb des Hodens auftreten, zur Vereinfachung wird im Folgenden jedoch hauptsächlich die Behandlung bei Auftreten im Hoden beschrieben. Bei vorliegender GCNIS (Stadium 0) kann zunächst auf eine Behandlung verzichtet werden und nur eine aktive Überwachung der GCNIS erfolgen, was vor allem bei Männern mit noch nicht abgeschlossener Familienplanung durchgeführt wird [29,30]. Als Behandlung werden des Weiteren eine Entfernung des betreffenden Hoden (*Ablatio testis*) und eine lokale Strahlentherapie empfohlen [31]. Eine Chemotherapie wird bei GCNIS aufgrund der geringeren Teilungsrate der Vorläuferläsion nicht empfohlen, da die Zellen dadurch weniger auf die Therapie ansprechen und sich bei unvollständiger Eradikation trotzdem zu einem Tumor entwickeln können [31].

Bei SE im klinischen Stadium I (70-80 % aller Seminome) empfiehlt sich die *Ablatio testis*, was in den meisten Fällen für eine Heilung ausreichend ist [21]. Da in einigen Fällen jedoch eine unerkannte Metastasierung zum Diagnosezeitpunkt vorliegt, erfolgt im Anschluss an die Operation eine Überwachung mit kurativer Therapie bei Auftreten eines Rezidivs. Die Wahrscheinlichkeit für eine Metastasierung korreliert dabei positiv mit der Größe des SE. Bei einer Größe von weniger als 4 cm ist das Vorhandensein einer Metastasierung minimal und die Überwachungsstrategie wird bevorzugt [32,33]. Bei größeren SE können auch ein- oder zwei Zyklen Chemotherapie (Carboplatin), sowie eine Strahlentherapie des Retroperitoneums erfolgen [34]. NSE im Stadium I werden nach der *Ablatio testis* in eine Niedrig- und eine Hoch-Risikogruppe unterteilt, welche anhand verschiedener Faktoren wie der Zellteilungsrate und EC-Anteil entschieden werden [21]. Bei niedrigem Risiko wird zunächst eine Überwachung bevorzugt, bei hohem Risiko kann in Absprache mit dem Patienten auch zunächst eine Überwachung erfolgen oder eine Therapie mit einem Zyklus BEP [35,36]. Alternativ kann hier

in spezialisierten Zentren eine nervenschonende primäre retroperitoneale Lymphadenektomie (RLA) erfolgen [37].

SE im Stadium IIA und IIB werden mit Strahlentherapie (IIA 30 Gy, IIB 36 Gy) oder drei Zyklen BEP behandelt [21,38]. Stadium IIA/IIB NSE werden anhand ihrer IGCCCG Prognosegruppe mit drei (gute Prognose) bis vier (intermediäre Prognose) Zyklen BEP behandelt. Bei Auftreten eines Residualtumors soll dieser operativ entfernt werden [39,40]. Bei Abwesenheit von Serumtumormarkern wird bei Stadium IIA NSE eine RLA mit nachfolgender Überwachung bevorzugt [39,40].

KZT im Stadium IIC oder III werden fast immer mit einer BEP-Chemotherapie behandelt. Bei guter Prognose erfolgt die Behandlung sowohl bei SE als auch NSE mit drei, bei intermediärer Prognose mit vier Zyklen BEP [21,41–43]. Bei schlechter Prognose wird ebenfalls eine Therapie mit vier Zyklen BEP empfohlen, welche gegebenenfalls intensiviert werden kann [21]. Obwohl die Behandlungen meist gute Prognosen schaffen, liegt das Risiko eines Rezidivs nach initialem Stadium I bei 9-15 % bei SE und 19 % bei NSE [21]. Diese Rezidive treten in der Regel innerhalb der ersten drei Jahre nach initialer Therapie auf und sind meist auf nicht entdeckten Lymphknotenbefall zurückzuführen. Da im klinischen Stadium I selten bereits chemotherapeutisch behandelt wurde, stehen die Heilungschancen sehr gut [21].

Bei initial bereits metastasiertem Tumor tritt bei ca. einem Drittel der Patienten ein Rezidiv auf [21]. Diese Patienten erhalten eine sogenannte Salvage-Therapie mit einer hochdosierten Chemotherapie. Als Salvage-Therapie, oder „Rettungstherapie“ werden diejenigen Therapieformen bezeichnet, die verabreicht werden, nachdem die gängigen Behandlungsformen ausgeschöpft sind und nicht angeschlagen haben. Diese Therapien sind häufig hoch dosiert und weisen mehr Nebeneffekte auf. Das 3-Jahres Gesamtüberleben nach einer Salvage-Therapie mit Cisplatin, Ifosfamid und Paclitaxel liegt dabei je nach Studie zwischen 52 % und 66 %, wobei das 1-Jahres progressionsfreie Überleben nur ca. 38 % beträgt [44,45]. Bei fortbestehender Tumorbelastung stehen die Chancen auf ein Ansprechen einer zweiten oder nachfolgenden Salvage-Therapie meist schlecht, da hier häufig eine Resistenz gegen die Cisplatin-basierte Chemotherapie auftritt [21,46]. Die Datenlage über den Erfolg nachfolgender Salvage-Therapien ist sehr gering, da aufgrund der Seltenheit der Erkrankung randomisierte Studien fehlen.

Die KZT-Therapie führt jedoch auch zu akuten Toxizitäten in anderen Organen und kann zu Problemen führen. Dazu gehören kardiovaskuläre Toxizitäten wie Bluthochdruck, Hypercholesterinämie, Infarkte und thromboembolische Ereignisse, die als akute Symptome direkt auf die Behandlung zurückzuführen sind [47,48].

Zu den Langzeit- oder Spättoxizitäten, welche über mehr als 12 Monate bestehen oder erst Jahre später auftreten, zählen Infertilität oder eingeschränkte Fertilität (30 % der Patienten). In diesem Zusammenhang kann es auch zu Ejakulationsstörungen, Erektions- und

Libidostörungen und Hypogonadismus kommen, welche durch eine unzureichende Testosteronproduktion aufgrund eines fehlenden Hodens verursacht werden. Dadurch kann es zusätzlich zu einer Abnahme der Muskel- bei gleichzeitiger Zunahme der Fettmasse kommen. Auch Insulinresistenz, Fettstoffwechselstörungen, Osteopenie, Anämie und Stimmungsveränderungen sind möglich, was sich vor allem auf das psychische und physische Wohlbefinden der Patienten auswirken kann [49].
Da es sich meist um junge Patienten handelt, spielen auch Sekundärmalignome eine Rolle, die in der Regel nach ca. zehn Jahren in der Nähe des Therapiefeldes (Darm, Magen, Pankreas, Blase und Harnwege) auftreten [50]. Das relative Risiko für einen soliden Sekundärtumor liegt bei etwa 40 % [51]. Auch das Risiko für die Entwicklung einer Leukämie, hauptsächlich akute myeloische Leukämie mit schlechter Prognose, ist nach einer Behandlung mit Cisplatin und Etoposid erhöht (relatives Risiko 1,6 %) [52]. Das relative Risiko an Infektionen oder pulmonalen Komplikationen zu sterben ist ebenfalls höher und liegt bei 2,48 % bzw. 2,53 % [47].
Sowohl akut- als auch langzeittoxisch können Neuro- Oto- und Nephrotoxizitäten sowie Fatigue auftreten [53,54].

1.1.6. Die Entwicklung der Keimzellen

Keimzellen bilden die Grundlage der geschlechtlichen Fortpflanzung, da sich aus ihnen die Gameten entwickeln: die Eizellen und Spermatozoen. Die Spezifikation der ursprünglichen Keimzellen (PGC, aus dem Englischen *„primordial germ cell“*) erfolgt bereits früh in der embryonalen Entwicklung. Die PGCs entstehen zunächst in der posterioren Region des Epiblasten und migrieren zu den sich entwickelnden Gonaden in den Genitalleisten. Dort differenzieren sie entweder zu Spermatogonien den Vorläufern der Spermien (männlich) oder Oogonien, den Vorläufern der Eizellen (weiblich).
Im Menschen beginnt die Entwicklung der PGC ungefähr in der zweiten bis dritten Woche nach der Befruchtung (Oogamie) [55–57]. Zu diesem Zeitpunkt hat sich aus der Zygote bereits die bilaminare embryonische Scheibe entwickelt. Durch Signalwege des extraembryonalen Gewebes wird in einigen Epiblasten in der Mitte der posterioren Region die Keimzellentwicklung induziert. Als Teil der Signalwege, welche die PGC-Spezifizierung einleiten, wurden BMP, NODAL und WNT-Signalwege identifiziert [58,59]. Weitere wichtige Faktoren der Spezifizierung und Marker der Keimzellen sind PRMD1, TNAP, NANOG, OCT4, KIT, DAZL, DDX4, TFAP2 und SOX17 [58,60–68]. Sie sorgen für den Pluripotenzcharakter der PGC und eine Unterdrückung der somatischen Linie [69,70]. Während der Migration zur Genitalleiste, geleitet durch Chemokingradienten (CXCL12, KITLG) und Nervenfasern [55], durchlaufen die PGC einen Prozess der sich Reprogrammierung nennt. Dabei werden sämtliche epigenetische Marker, wie z.B. die DNA-Methylierung aus dem Genom entfernt, um

einen totipotenten Status herzustellen [71]. Ist dieser Status des genetischen *Reset* erreicht folgt die rapide remethylierung der DNA und Etablierung der parentalen *Imprints*, den epigenetisch vererbbaren Eigenschaften, und dadurch die Entstehung der Gonozyten [55]. Diese bilden schließlich die Vorläufer der Spermatogonien und Oogonien.

1.1.7. Mögliche Entartungswege von Keimzellen

Die Entstehung von KZT ist noch nicht endgültig geklärt. Man vermutet jedoch eine Entartung der Keimzellen bereits während der embryonalen Entwicklung [72]. Aufgrund des Fehlens eines Tiermodells, sowie aufgrund der Seltenheit der Erkrankung gestaltet sich die Forschung nach der Ursache der Entstehung von Keimzelltumoren als schwierig und kann lediglich auf epidemiologischen Studien und Zellkultur-basierter Forschung aufbauen [11]. Das Fehlen eines Tiermodells wird vor allem durch den *Knockout* einzelner Gene in Mäusen kompensiert, indem die Folgen des funktionellen Verlusts einzelner Gene studiert werden. So konnte in *Prdm1 Knockout*-Studien (Cre/loxP-System) gezeigt werden, dass bei Verlust von *Prdm1* keine Repression der somatischen Gene mehr stattfindet und PGC-spezifische Gene nicht korrekt exprimiert werden [60,73]. Bei einem *Knockout* von *Prdm14* wird der Pluripotenzmarker *Sox2* nicht exprimiert, die Repression somatischer Gene bleibt aber intakt [74]. *Prdm1* ist daher hauptsächlich für die Unterdrückung der somatischen Linie zuständig, während *Prdm14* eine wichtige Rolle als sequenzspezifischer Regulator der Transkription von Pluripotenzfaktoren spielt [63,75].

Ein Problem bei Mausversuchen, welche die embryonale Entwicklung betrachten, sind die vorhandenen Unterschiede zur menschlichen Embryogenese. So beruht die murine Keimzellentwicklung auf SOX2 als Pluripotenztranskriptionsfaktor, wohingegen im humanen Embryo SOX17 diese Rolle einnimmt. Die Zielgene zwischen beiden Transkriptionsfaktoren sind teilweise überlappend, da sich die DNA-Bindemotive sehr ähneln [76]. Jostes *et al.* konnten die verschiedenen Rollen von SOX2 und SOX17 im Transkriptionsfaktorkomplex mit OCT4 definieren. Chromatin-Immunpräzipitation-Sequenzierungen (ChIP-Seq) zeigten, dass die überlappenden Zielgene von SOX2 und SOX17, relevante Pluripotenzgene während der Keimzellentwicklung darstellen, darunter *NANOG, OTX2, PIM1/2, PRDM14, DPPA4, TDGF1, LIN28A,* und *TRIM71* [77]. Allerdings gibt es eine Reihe von Pluripotenzfaktoren, welche ausschließlich von SOX2, nicht aber SOX17 reguliert werden: *GDF3, LEFTY2, SALL4, TP53* sowie *SOX2* und *OCT4* selbst [77]. Diese Gene sind wichtige Faktoren in embryonalen Stammzellen. Obwohl humane PGC keine *SOX2* Expression aufweisen, sind sie latent pluripotent ohne jedoch spontan differenzieren zu können [78,79]. Latente Pluripotenz beschreibt eine unterdrückte Form der Pluripotenz, die in PGC vermutet wird, da die Pluripotenzfaktoren OCT4, NANOG und LIN28 vorhanden sind, die Zellen jedoch nicht die Fähigkeit besitzen sich wie naive pluripotente Zellen in alle drei Keimblätter zu differenzieren

[80]. Ein Beispiel für diese latente Pluripotenz ist in den KZT-Subtypen zu finden. SE, welche den PGC sehr ähnlich sind, exprimieren *SOX17,* wohingegen EC, welche stark den embryonalen Stammzellen ähneln, *SOX2* exprimieren [81]. Letztere besitzen die Fähigkeit zu differenzieren, wodurch TE, CC und YST entstehen können. Interessanterweise entwickelten sich TCam-2-Zellen (SE), welche in der murinen Flanke xenotransplantiert wurden durch Reprogrammierung zu EC. Dabei wurde durch das die Zellen umgebende Mikromilieu der BMP-Signalweg gehemmt und somit die Expression von *SOX2* hochreguliert, bei zeitgleicher Herabregulierung von *SOX17* [82]. Ein CRISPR/Cas9-vermittelter *Knockout* von *SOX17* in der SE-Zelllinie TCam-2 führte zur Herabregulation von Keimzell- und Pluripotenzfaktoren unter Zellkulturbedingungen, welcher nicht durch *SOX2* revidiert werden konnte [79], was auf den nötigen Einfluss des Mikromilieus schließen lässt. Die Xenotransplantation von CRISPR/Cas9-vermittelten *SOX2-Knockout*-TCam-2-Zellen führte nicht zu einer Reprogrammierung in ein EC, sondern zu Zellen, welche stark den *in vitro* kultivierten TCam-2-Zellen ähnelten [83]. Dies bedeutet, dass die Unterdrückung der *SOX2*-Expression und das Umfeld der PGC eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von KZT spielen.

Auch die bereits erwähnte TDS-Theorie von Skakkebeak *et al.* sieht den Ursprung der Urogenitaltrakt-Erkrankungen und entarteten Keimzellen in einem veränderten Mikromilieu während der frühen embryonalen Entwicklung [22,84]. Das Mikromilieu im Hoden wird vor allem durch Sertoli- und Leydigzellen etabliert [57]. Die Aufgabe des Mikromilieus ist es Chemokine (z.B. CXCL12) zu produzieren um über den zugehörigen Rezeptor CXCR4 die PGC-Migration und deren Wachstum zu unterstützen [85,86]. In ca. 25 % der KZT-Patienten sind histologische Veränderungen in ebendiesen Mikromilieu-Zellen (Sertoli- und Leydig-) zu finden [87]. Nach einer Theorie von Sonne *et al.* sind die veränderten Mikromilieuzellen jedoch nicht für die fehlgeleitete Spezifizierung der PGC verantwortlich, also der eigentlichen Entstehung von GCNIS. Nach seiner Theorie fehlen in dem aberranten Mikromilieu Signale, welche bei bestehenden GCNIS Apoptose induzieren könnten [88,89].

1.2. Die Epigenetik der KZT

1.2.1. Einführung in die Epigenetik

Der Begriff Epigenetik, zusammengesetzt aus „*epi* (ἐπί)“, altgriechisch für dazu/außerdem und Genetik (Ableitung der altgriechischen Wörter „*geneá* (γενεά)*“* für Abstammung und „*génesis* (γένεσις)*“* dem Ursprung) wurde 1942 von Conrad Waddington zunächst als Bezeichnung für das Studium der Zusammenhänge zwischen Genotyp und Phänotyp eingeführt [90,91]. 1987 definierte Robin Holliday den Begriff Genetik als Übertragung von Eigenschaften von Generation zu Generation, wohingegen die Epigenetik die Veränderungen der Genaktivität während der Entwicklung eines Organismus beschreibt [92]. Später prägte Holliday den heutigen Begriff der Epigenetik, indem er die Theorie aufstellte, dass die Veränderung von

Genexpression nicht nur während der Entwicklung eines Organismus auftritt, sondern auch in der adulten Phase [93].

Unter Epigenetik versteht man demnach die Veränderung von Genaktivität oder Funktion, welche, unabhängig von der DNA-Sequenz, sowohl mitotisch als auch meiotisch vererbt werden kann [94,95]. Epigenetische Mechanismen beinhalten unter anderem kovalente Modifikationen von DNA und Histonen, Histonvarianten, Nukleosom-Positionierung entlang der DNA und Interaktionen mit nicht-kodierenden RNAs (microRNA).

Der Fokus dieser Arbeit liegt dabei auf den kovalenten Modifikationen. Als Modifikationen der DNA wird vor allem die Methylierung der fünften Position von Cytosinen (5mC) in CpG Dinukleotiden beschrieben (Abbildung 1.3). Etabliert werden die DNA-Methylierungen durch die DNA-Methyltransferasen (DNMT) DNMT1, DNMT3A und DNMT3B. Der Großteil der CpG Dinukleotide im Genom ist methyliert. Diese Methylierungen kommen jedoch selten in sogenannten CpG-Inseln vor, also Bereichen mit besonders hohem CpG Anteil. Diese nicht-methylierten CpG-Inseln liegen vor allem in Promotorregionen [96–98]. 5mC DNA-Methylierung ist mit der Repression der Transkription assoziiert. Ein bekanntes Beispiel ist die Inaktivierung eines X-Chromosoms zur Dosiskompensation in weiblichen Säugetieren [99]. Neben 5mC gibt es auch die hydroxymethylierte Form 5hmC, welche die Vorstufe der aktiven DNA-Demethylierung bildet [100,101] (Abbildung 1.3). Der weitere aktive Abbau erfolgt nach zwei unterschiedlichen Wegen: entweder über den oxidativen Weg durch die TET-Enzyme mit den Zwischenprodukten 5-Formylcytosin (5fC) und 5-Carboxylcytosin (5caC) oder durch Deaminierung von 5hmC zu 5-Hydroxyuracil (5hmU) über die Deaminasen AID und Vertreter der APOBEC-Familie (vornehmlich APOBEC3C). 5hmU wird dann über die Basenexzisions-Reparatur (BER) ausgetauscht [102]. Die Endstufe der oxidativen Demethylierung 5caC wird ebenfalls durch den BER-Mechanismus ausgetauscht, zusätzlich wurde hier jedoch die Aktivität einer noch unbekannten Decarboxylase identifiziert, die BER-unabhängig 5caC zu Cytosin decarboxyliert [103]. Die passive DNA-Demethylierung erfolgt durch eine Ausdünnung der Methylmodifikationen über mehrere Replikationszyklen (Abbildung 1.3).

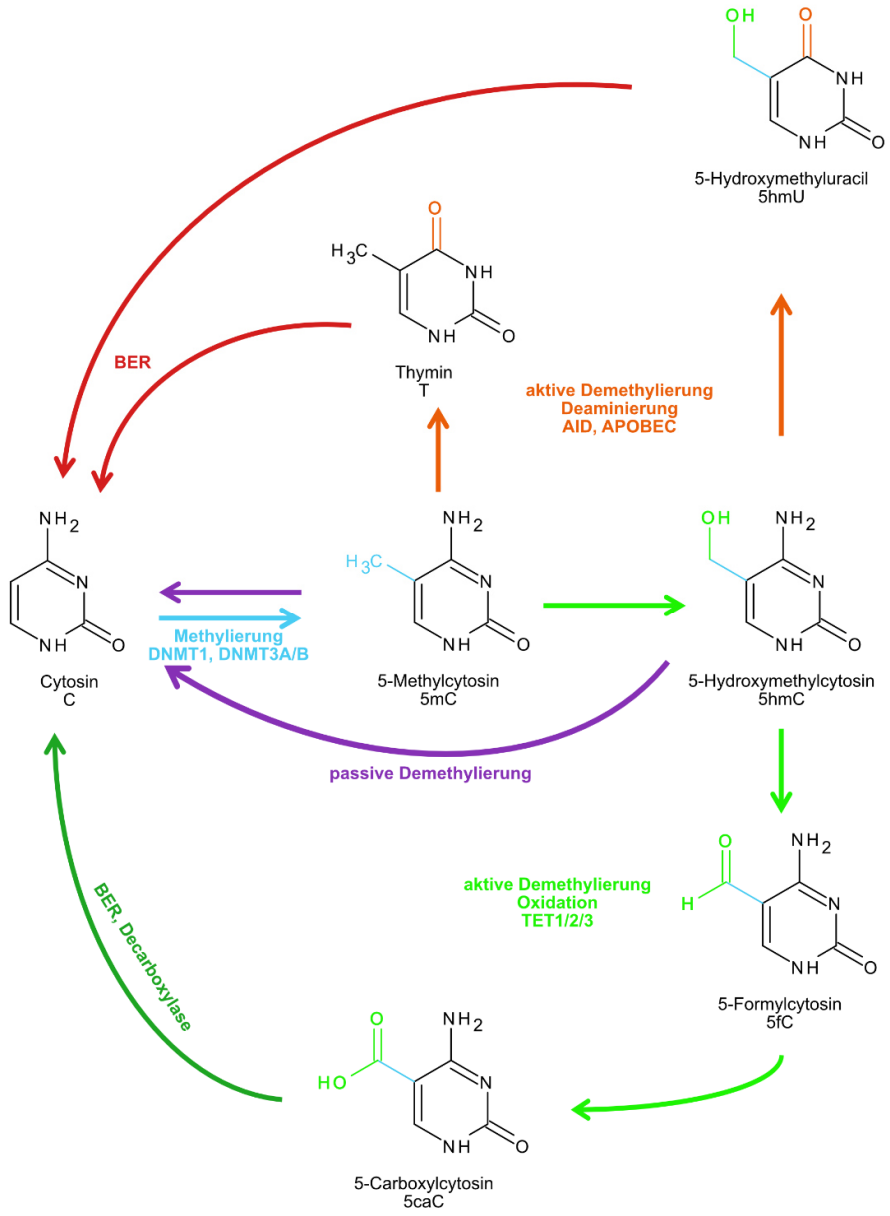


Abbildung 1.3: Methylierung und Demethylierung der DNA (Cytosin)
DNA-Methylierung (blau) durch DNMT, passive DNA-Demethylierung durch Replikation (lila), aktive DNA-Demethylierung durch Oxidation (grün) über TET-Enzyme, Austausch der Endstufe 5caC durch BER oder Umwandlung in Cytosin durch eine (noch unbekannte) Decarboxylase (dunkelgrün). DNA-Demethylierung durch Deaminierung über AID und APOBEC-Enzyme (orange), Austausch von T und 5hmU durch BER (rot). Abbildung modifiziert nach [102].

Posttranslationale Modifikationen (PTM) von Histonen sind kleine Veränderungen an Aminosäuren und befinden sich meist im exponierten N-terminalen Ende der Histone, sind jedoch auch an anderen exponierten Bereichen der Proteinsequenz zu finden. Die im Zuge dieser Arbeit näher beschriebenen Lysinreste können sowohl methyliert (Mono-, Di-, Trimethyllysin), acetyliert als auch ubiquitiniert werden (Abbildung 1.4). Es gibt jedoch auch Methylierungen an Argininresten als Monomethylierung und symmetrische oder asymmetrische Dimethylierung, sowie Phosphorylierung an Tyrosin- und Threoninresten,

welche vor allem im Zusammenhang mit DNA-Schäden und damit einhergehenden Reparaturmechanismen bekannt sind [104].

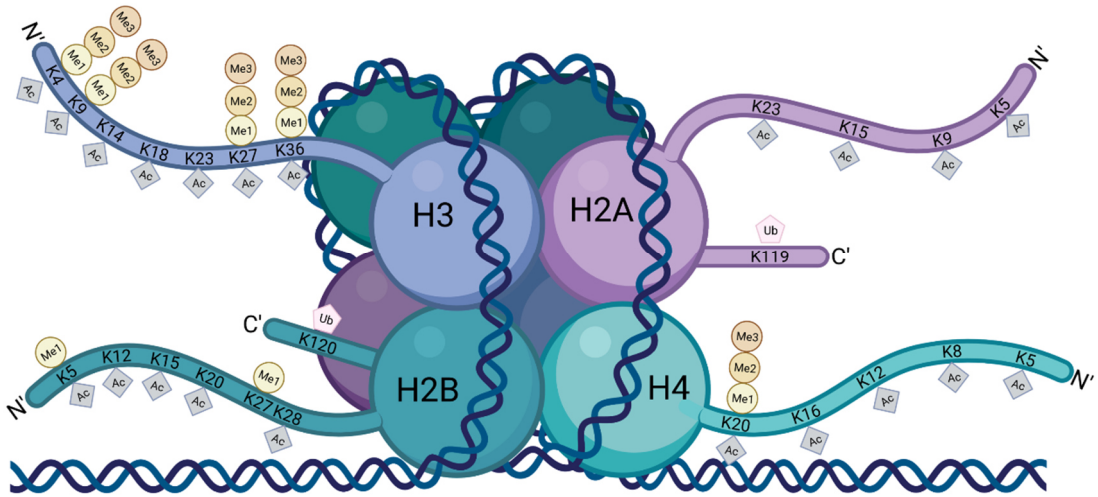


Abbildung 1.4: Das Nukleosom mit posttranslationalen Histonmodifikationen
Dargestellt sind die vier verschiedenen Nukleosomkomponenten H2A, H2B, H3 und H4. Die regulierenden Modifikationen befinden sich überwiegend an den Lysinen hier dargestellten exponierten N-Termini der Histone, sowie dem C-Terminus von H2A. Dargestellt sind Methylierungen, die als Mono-, Di- und Trimethylierungen vorkommen können, sowie Acetylierung und Ubiquitinierung. Nicht dargestellt sind weiter innen liegende Modifikationen, sowie Methylierungen von Arginin und Phosphorylierungen von Threonin und Tyrosin. Abbildung modifiziert nach [105–107].

Histonmodifikationen haben je nach Art und Lage verschiedene Funktionen. So wird eine Häufung von Histonacetylierung generell mit einer Aktivierung der Transkription assoziiert, da die Acetylierung die positive Ladung der Lysinreste verringert und dadurch die Bindung zur negativ geladenen DNA schwächt [108]. Am besten beschrieben ist hier die H3K27ac (Histon 3 mit Lysin 27 Acetylierung) als Marker für aktive Promotoren und *Enhancer* (Transkriptionsverstärker) [109,110]. Histonmethylierung hingegen kann je nach Aminosäurerest und Grad der Methylierung (me1/me2/me3, mono-, di-, trimethyliert) sowohl aktiv als auch repressiv auf die Transkription wirken. So gilt beispielsweise H3K9me2/me3 als Marker für Heterochromatin und Transkriptionsrepression [110,111]. H3K9me1 hingegen wurde in der Nähe von Transkriptionsstartpunkten (TSS, aus dem Englischen „*transcription start sites*“) aktiver Gene gefunden [110,112]. H3K4me1 liegt vorwiegend in *Enhancer*-Regionen vor und markiert in Kombination mit H3K27ac aktive *Enhancer* (Transkriptionsverstärker), und mit H3K27me3 inaktive *Enhancer* [110]. Das Vorhandensein einer bestimmten Modifikation reicht also meist nicht aus um eine Aktivierung oder Repression der Transkription auszulösen, sondern ist ein Zusammenspiel vieler verschiedener Modifikationen, sowohl auf Histon- als auch auf DNA-Ebene [113].

Vermittelt werden diese epigenetischen Veränderungen durch Modifikationsenzyme, den sogenannten *Writer*- und *Eraser*-Enzymen [114]. *Writer* (Schreiber) sind Enzyme, die epigenetische Modifikationen anbringen wie DNMT und Histonmethyl- (HMT) und Histonacetyltransferasen (HAT). Die Gegenstücke dazu sind die *Eraser* (Löscher), welche die

Modifikationen wieder entfernen wie DNA-Demethylasen (ADD, aktive DNA-Demethylase), Histondemethylasen (HDM) und Histondeacetylasen (HDAC). Des Weiteren gibt es *Reader* (Leser), welche die epigenetischen Modifikationen ablesen und weitere Enzyme oder Transkriptionsfaktoren rekrutieren [114]. Es gibt *Reader* der DNA-Methylierung (PMDN, Proteine, die an methylierte DNA binden), Histonmethylierung (PMH, Proteine, die an methylierte Histone binden) und Histonacetylierung (PAH, Proteine, die an acetylierte Histone binden). Zusätzlich gibt es Chromatin-remodellierende Proteine oder auch ganze Komplexe, welche meist aus mehreren Proteinen bestehen und in enger Zusammenarbeit mit bereits bestehenden epigenetischen Modifikationen interagieren, sie selbst erweitern oder auch andere epigenetische Modulatoren wie *Writer, Eraser* und *Reader* rekrutieren. Die Aufgaben dieser *Chromatin-Remodeler* sind sehr weitreichend und beinhalten die transkriptionelle Regulierung, sowie die Nukleosom-Platzierung und -Zusammensetzung durch den Austausch von Histon-Varianten [115]. Unterteilt werden diese *Remodeler* in ATP-abhängige Proteinfamilien wie SWI/SNF (*switch/sucrose-non-fermenting*), ISWI (*imitation switch*), CHD (*chromodomain-helicase-DNA binding*) und INO80 (*inositol requiring 80*), sowie ATP-unabhängige Komplexe wie PRC1 und PRC2 (*polycomb-repressive complex 1* und *2*) [98,115]. Beide Komplexe dienen zur Unterdrückung der Transkription von Genen, PRC1 fungiert dabei als Ubiquitinligase und PRC2 als HMT [98].
Die epigenetische Regulierung der Genexpression ist ein essenzieller Bestandteil der Entwicklung eines Organismus, sowie der Fähigkeit auf Umwelteinflüsse zu reagieren [116]. Folglich kann eine fehlerhafte epigenetische Regulierung zur Entstehung von (tumorösen) Erkrankungen beitragen [117,118].

1.2.2. Epigenetische Inhibitoren

Ein Merkmal von Tumoren ist häufig die übermäßige Expression von Onkogenen. Die Nutzung der „epigenetischen Stilllegung“ dieser Gene als therapeutisches Ziel ermöglichte das relativ neue Feld der „epigenetischen Therapie“ [117]. Die ersten epigenetisch wirkenden Agenzien (Epi-Drugs), die für diesen Zweck zum Einsatz kamen, waren sogenannte Nukleotid-Analoga wie 5-Azacytidin oder Decitabin (Abbildung 1.5). Allerdings stand, wie häufig bei der Entdeckung neuer medizinisch nutzbarer Stoffe, bei der Entdeckung dieser Agenzien zunächst die zytotoxische Wirkung in Vordergrund. Eine geringe Modifikation der Pyrimidinbase Cytosin, genauer das Ersetzen des C_5 im Pyrimidin Ring durch Stickstoff, führt dazu, dass diese Analoga von den DNA-Polymerasen weiterhin erkannt und während der Replikation in die DNA eingebaut werden können. 5-Azacytidin wurde bereits 1967 aufgrund seiner zytotoxischen Eigenschaften in klinischen Studien zu Behandlung von akuter myeloischer Leukämie (AML) getestet [119]. Die Aufklärung der (epigenetischen) Wirkweise von 5-Azacytidin als DNMTi (i für Inhibitor) folgte jedoch erst 1980 durch Jones *et al.* [120,121]. Hier wurde gezeigt, dass

der nach Behandlung mit 5-Azacytidin neu synthetisierte DNA-Strang (welcher 5-Azacytidin eingebaut hat) nicht methyliert wird. Dieser DNA-Demethylierungseffekt trat bereits bei geringer Dosierung von 5-Azacytidin auf. Die Inhibition von DNMT1, DNMT3a und 3b erfolgt durch die kovalente Bindung eines Cystein-Rests im aktiven Zentrum der DNMT an die Nukleotidanaloga [122,123]. Die Analoga werden zwar methyliert, können jedoch nicht als Produkt abgegeben werden. Diese Inaktivierung kann nur durch den proteasomalen Abbau der DNMT-Inhibitor-DNA-Komplexe wieder aufgelöst werden [124].

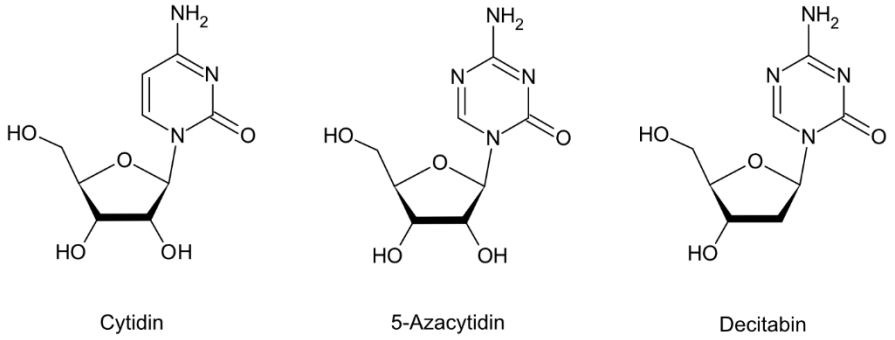


Abbildung 1.5: Strukturformeln der ersten Epigenetischen Inhibitoren: DNMTi
Strukturformeln von Cytidin und dessen als DNMTi genutzten Analoga 5-Azacytidin und Decitabin. In beiden Analoga wurde das C_5 des Pyrimidinrings durch ein Stickstoffatom ersetzt. Durch die Ribose kann 5-Azacytidin sowohl in DNA als auch in RNA eingebaut werden, Decitabin mit einer Desoxyribose-Zuckereinheit wird dagegen nur in DNA-Stränge inkludiert.

Auch die Entdeckung und Entwicklung der Inhibitoren von Histonmodifikatoren basierte zunächst nur auf phänotypischen Beobachtungen, ohne die (epigenetischen) Wirkmechanismen zu kennen. Als erste Histonmodifikationen-betreffende Epi-Drug wurde Vorinostat entwickelt: Basierend auf einer, durch die Behandlung mit Dimethylsulfoxid (DMSO) ausgelösten Differenzierung in murinen Erythroleukämiezellen [125], entstand die Hypothese, dass DMSO entweder durch Metallkomplexierung oder Wasserstoffbrückenbindungen an sein noch unbekanntes Zielprotein bindet (Abbildung 1.6 A). Aufgrund dessen wurden verschiedene Moleküle entwickelt, die ähnliche molekulare Interaktionen eingehen konnten. Dies führte zunächst zur Synthese von Hexamethylamin-Bisacetamid (HMBA, Abbildung 1.6 B), was bereits in klinischen Studien zur Behandlung von AML eingesetzt, jedoch aufgrund zu geringer Effizienz (Induktion von Differenzierung und Wachstumstopp) verworfen wurde [126,127]. HMBA wurde von Richon *et al.* 1996 zu der 100-fach potenteren Suberoylanilide-Hydroxamsäure (SAHA), auch als Vorinostat bekannt, weiterentwickelt (Abbildung 1.6 C) [128]. Die Beschreibung der HDAC-Inhibition durch Vorinostat folgte 1998, als die strukturelle Ähnlichkeit zu dem aus *Streptomyces platensis* isolierten Trichostatin A entdeckt wurde, welches als ein *small molecule inhibitor* (aus dem Englischen: Inhibitor von geringer molekularer Größe) von ab dieser Zeit verfügbaren, isolierten HDAC-Enzymen identifiziert wurde (Abbildung 1.6 C, D) [129,130]. Die HDAC-Inhibition durch Vorinostat und Trichostatin A beruht auf der reversiblen Komplexierung des Zinkkations im aktiven Zentrum der HDAC

durch die Hydroxamsäure-Gruppe [129]. Ziel der Inhibition sind damit alle metallbindenden HDAC (panHDAC): Klasse I HDAC (HDAC1, 2, 3, und 8), Klasse IIa (HDAC4, 5, 7 und 9) und IIb (HDAC6 und 10), sowie Klasse IV (HDAC11), nicht inhibiert werden hingegen die Klasse III HDAC (Sirtuine), da diese NAD^+- und nicht Metall-abhängig agieren [131]. HDACi Romidepsin inhibiert dagegen spezifisch Klasse I HDAC. Romidepsin wurde aus *Chromobacterium violaceum* isoliert und ist strukturell deutlich von anderen HDACi wie Vorinostat und Trichostat A zu unterscheiden (Abbildung 1.6 E) [132]. Romidepsin ist eine sogenannte Pro-Drug. Der Inhibitor wird bei der Aufnahme in die Zellen zunächst an der Disulfidbrücke durch Glutathion reduziert (Abbildung 1.6 E) und dadurch erst aktiviert. Die entstandene Sulfhydryl-Gruppe (Abbildung 1.6 F) bindet über eine Disulfidbrücke an den Cysteinrest im aktiven Zentrum der HDAC und inhibiert diese dadurch [133,134].

Die vier Inhibitoren Azacytidin, Decitabin, Vorinostat und Romidepsin waren die ersten Epi-Drugs die von der FDA (aus dem Englischen: „*Food and Drug Administration*“, Standort USA) zugelassen wurden. Die DNMTi sind bei Knochenmarkserkrankungen wie dem myelodysplastischen Syndrom, chronische myelomonozytäre Leukämie und AML im Einsatz wohingegen die HDACi bisher nur bei kutanen, sowie peripheren T-Zell-Lymphomen als letzte Therapieoption zugelassen sind [124]. Ein Problem dieser frühen Epi-Drugs ist die nicht vorhandene Spezifität für eine bestimmte Isoform (z.B. nur Inhibition von DNMT1 und nicht DNMT3) und damit die Möglichkeit unerwünschter Nebeneffekte zu vermeiden. Zudem weisen diese Epi-Drugs erster Generation nur kurze Halbwertszeiten und geringe Bioverfügbarkeit auf. Es wurde daher die Weiterentwicklung dieser Substanzen hin zu spezifischen Inhibitoren mit verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften vorangetrieben.

Die sogenannte zweite Welle der Epi-Drugs weisen unter den DNMTi zwar verbesserte pharmakokinetischen Profile auf, sind jedoch bisher nur in klinischen Studien getestet worden, so beispielsweise CP-4200 mit verbesserter Bioverfügbarkeit [135] oder SGI-110 (Guadecitabin, als GcP-Analog), welches nicht als Substrat der Cytidindeaminase abgebaut werden kann, was zu einer längeren Halbwertszeit führt [136]. Auch Inhibitoren, die keine Nukleotidanaloga sondern *S*-Adenosylmethionin- (SAM)-Analoga sind, wurden entwickelt. SAM ist der Co-Faktor, welcher als universeller Methyldonor für Methyltransferasen dient. Die Analoga blockieren ebenfalls das aktive Zentrum der DNMT durch eine Interaktion mit Lysin- und Argininresten [137].

Auf Seiten der HDACi wurden bei Vorinostat-Analoga ebenfalls die pharmakokinetischen Eigenschaften Bioverfügbarkeit und zu schnelle Verstoffwechslung optimiert und resultierte unter anderem in Belinostat und Panobinostat, beide ebenfalls von der FDA zur Behandlung von peripheren T-Zell-Lymphomen bzw. multiplen Myeloma zugelassen. Panobinostat wurde als einziger HDACi auch in der EU ebenfalls zur Behandlung von multiplen Myeloma zugelassen [124,138].

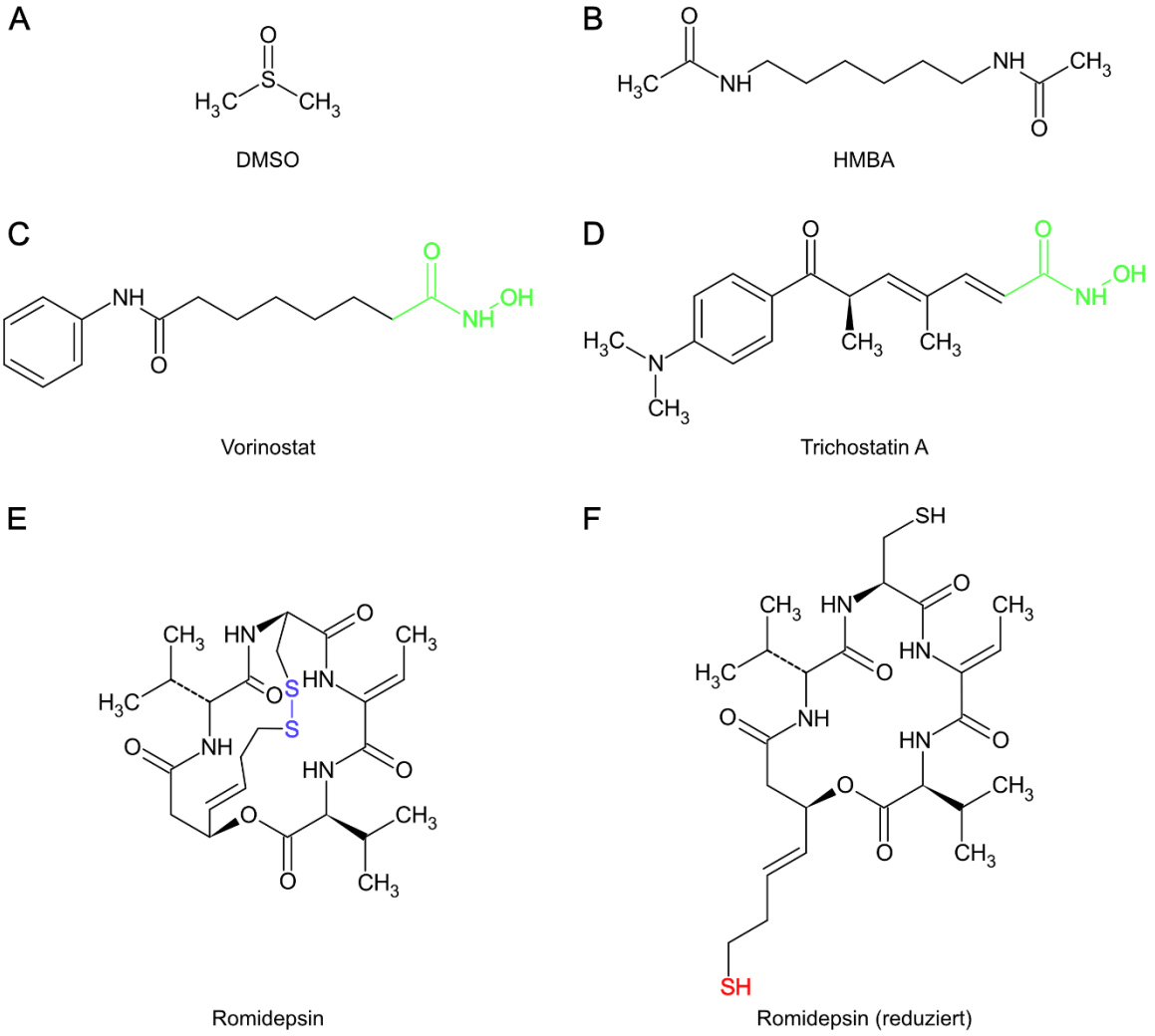


Abbildung 1.6: Strukturformeln der ersten HDAC-Inhibitoren
A) DMSO (Dimethylsulfoxid), B) HMBA (Hexamethylamin-Bisacetamid), C) Vorinostat (SAHA), D) Trichostat A, In Grün dargestellt ist die Hydroxamsäuregruppe, welche das Zinkkation im aktiven Zentrum der HDAC reversibel bindet und dadurch die Aktivität inhibiert. E) Romidepsin. In Blau ist die Disulfidbrücke dargestellt, welche bei der Aufnahme in die Zelle reduziert wird. F) Die dabei entstehende Sulfhydryl-Gruppe (Rot) interagiert mit dem Cysteinrest im aktiven Zentrum der HDAC.

Im letzten Jahrzehnt wurden in der dritten Welle der Epi-Drugs die therapeutischen Ansätze auch auf andere epigenetische Ziele neben HDAC und DNMT ausgeweitet. Ähnlich zu den DNMT nutzen auch HMT den Methyl-Donor SAM als Substrat zur Methylierung von Histonen (Abbildung 1.7 A). SAM-Analoga und SAM-imitierende Moleküle kommen also auch bei dieser Enzymklasse als Inhibitoren in Frage. Die Spezifität für bestimmte Enzyme wird über kleine Unterschiede in der Bindestelle des Co-Faktors SAM erreicht [124,139]. Der DOT1L-Inhibitor Pinometostat kam als erster HMTi in klinischen Studien zur Behandlung von Leukämie zum Einsatz (Abbildung 1.7 B) [140]. Ein weiterer SAM-imitierender Inhibitor, Tazemetostat (EZH2 Inhibitor), wurde von der FDA als erster HMTi zugelassen (Abbildung 1.7 C) [141]. Tazemetostat darf zur Behandlung von inoperablen epitheloiden Sarkomen eingesetzt werden

und wird zudem in klinischen Studien der Phase II zur Therapie von B-Zell-Lymphomen untersucht [141,142].

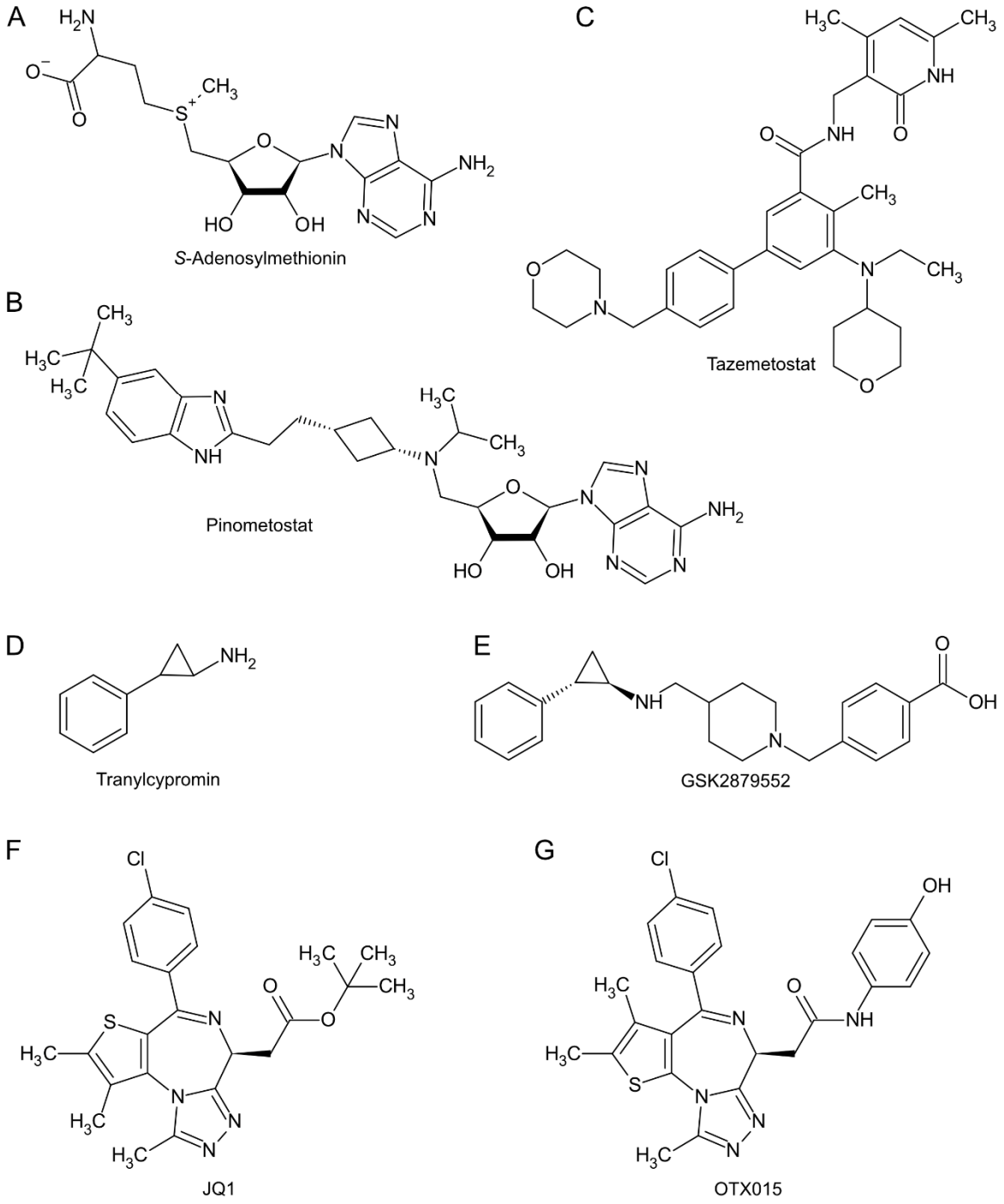


Abbildung 1.7: Epi-Drugs der dritten Generation
A) Co-Faktor von Methyltransferasen: S-Adenosylmethionin (SAM), SAM-imitierende HMTi: B) Pinometostat und C) Tazemetostat, HDMi: D) Tranylcypromin und E) GSK2879552, PAHi: F) JQ1 und G) OTX015.

Bei den HDM sind vor allem Inhibitoren gegen KDM1A (LSD1) und KDM1B (LSD2) erforscht. Tranylcypromin (Abbildung 1.7 D) und darauf basierende Inhibitoren wie GSK2879552 (Abbildung 1.7 E) werden derzeit in klinischen Studien zur Behandlung von AML, dem myelodysplastischen Syndrom und kleinzelligen Lungenkarzinomen untersucht

(ClinicalTrials.gov, Identifizierungsnummer NCT02717884, NCT02261779, NCT02034123, NCT02929498, NCT02177812) [143]. Tranylcypromin ist sehr unspezifisch und wurde ursprünglich als irreversibler Inhibitor von Monoaminooxidasen (MAO), welche dieselbe Aminooxidasedomäne wie HDM besitzen, als Antidepressiva eingesetzt. Die Funktion des Inhibitors beruht auf der Interaktion mit dem MAO- und HDM-Co-Faktor FAD (Flavin-Adenin-Dinukleotid), welcher für die Katalyse der Oxidationsreaktion nötig ist. Während der Oxidationsreaktion werden Elektronen und Protonen auf FAD übertragen und dabei die Methylgruppe am Lysinrest des Substrats abgespalten. Bei dem Einsatz von Tranylcypromin und Analoga wird dieses, anstelle des Substrats, kovalent über den Cyclopropanring an FAD gebunden und inhibiert dadurch den FAD-HDM-Komplex irreversibel im aktiven Zentrum [144,145]. Als erste epigenetische *Reader* wurden Bromodomänen (BRD) enthaltende Proteine (PAH) pharmakologisch inhibiert. Im Fokus stehen hier vor allem die BET-Enzyme (aus dem Englischen: „*bromo and extra terminal*“) BRD2, BRD3, BRD4 und BRDT, da sie an der Regulation verschiedener Gene beteiligt sind, die in der Karzinogenese eine Rolle spielen. Vor allem BRD4 ist in vielen Tumoren dereguliert, unter anderem Myeloma und Brustkrebs [146,147]. Die Suche nach kleinen Molekülen, welche in der hydrophoben Bindetasche der BET-Proteine angreifen, resultierte in Inhibitoren wie JQ1 oder OTX015. JQ1 (Abbildung 1.7 F) wird in vielen präklinischen Studien und der Grundlagenforschung eingesetzt, ist jedoch für die klinischen Anwendung aufgrund der kurzen Halbwertszeit nicht geeignet [148]. OTX015 (Abbildung 1.7 G) wird langsamer verstoffwechselt und wurde in klinischen Phase I Studien zur Behandlung von multiplen Myelomen und verschiedenen Leukämien eingesetzt [149].

Neben den hier erwähnten Inhibitoren wird an einer Vielzahl von Epi-Drugs gegen nahezu sämtliche Vertreter der epigenetischen *Eraser, Writer* und *Reader* geforscht und deren potential in der klinischen Anwendung getestet. Auch bereits bestehende Epi-Drugs werden weiterhin verbessert, um entweder spezifischere Inhibitoren zu erhalten oder das pharmakinetische Profil zu verbessern, wie die Halbwertszeit, Resorption, Bioverfügbarkeit oder den Metabolismus der Epi-Drugs. Zusätzlich werden Kombinationen verschiedener (epigenetischer) Inhibitoren untersucht, beispielsweise die Kombination von HDACi und DNMTi, HDACi und PAHi aber auch in Kombination mit Immuntherapie oder mit bestehenden Chemo- oder Bestrahlungstherapien [150–153]. Dabei sind eine Co-Behandlung mit den beiden Therapeutika, aber auch Fusionsmoleküle denkbar [154,155]. Im Fall der Kombination mit etablierten Therapien ist vor allem die häufig beobachtete Resensitivierung nach Resistenzentwicklung, zum Beispiel Cisplatin-Resistenz, bei der Behandlung von Tumoren von Interesse [153].

1.2.3. Stand der Forschung zur Epigenetik der Keimzelltumoren

KZT weisen eine relativ niedrige Mutationslast im Vergleich zu anderen urologischen Tumorentitäten auf (Abbildung 1.8) [156,157]. Auch im Durchschnitt über 32 verschiedene Tumorentitäten aus den TGCA-Studien (aus dem Englischen „*the genome cancer atlas*“ [158]) sind KZT weniger stark von Mutationen betroffen. Genmutationen als Treiber der KZT-Pathogenese sind daher unwahrscheinlich, wodurch es einer alternativen Erklärung für die Entartung der PCG bedarf. Eine veränderte Epigenetik der PGC ist eine mögliche alternative Erklärung [3,159]. Durch Veränderungen in der epigenetischen Landschaft können eine Vielzahl von Genen dereguliert werden, wodurch es zur vermehrten oder verringerten Transkription dieser Gene kommt. Dadurch kann es auch ohne eine Genmutation zu vermehrter Aktivität von Onkogenen und unzureichender Aktivität von Tumorsuppressoren kommen, wodurch die Entstehung von Tumoren ermöglicht oder begünstigt wird. Die epigenetische Veränderung der Genexpression kann somit als erster „Hit“ der sogenannten „*Two-Hit-Hypothesis*“, der Zwei-Treffer-Hypothese, gelten. Nach dieser Theorie benötigt es zwei kritische Gendefekte, durch Mutationen oder epigenetische Stilllegung/Aktivierung in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen, um eine phänotypische Veränderungen nach sich zu ziehen, welche die Karzinogenese fördern [160–162].

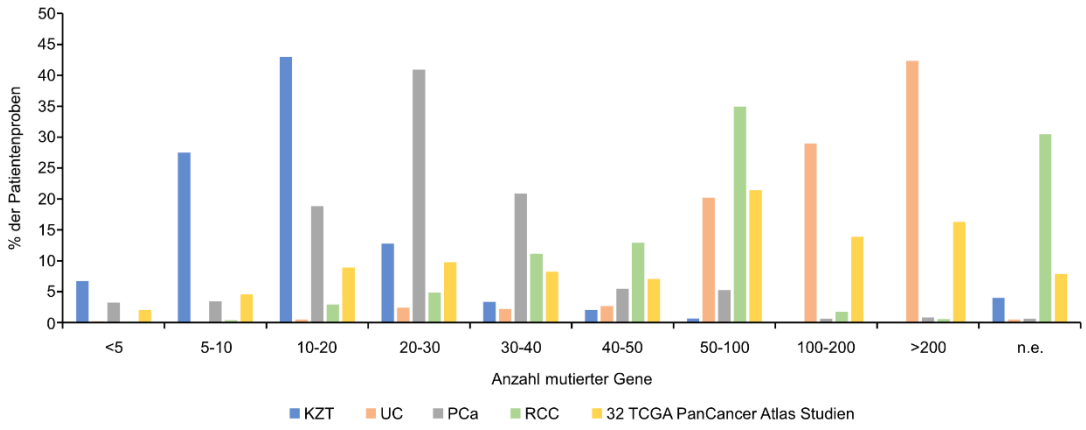


Abbildung 1.8: Anzahl mutierter Gene in KZT im Vergleich zu anderen malignen (urologischen) Entitäten
Die gezeigten Daten stammen aus der TCGA-Studie (The Cancer Genome Atlas, [158]) und wurden über das Online-Tool cBioPortal [163,164] analysiert. Die Anzahl mutierter Gene bezieht sich dabei nur auf annotierte Gene. Die 32 TCGA-Studien umfassen akute myelotische Leukämie, Blasenkarzinom (UC, aus dem Englischen „*urothelial carcinoma*“), chromophobes Nierenzellkarzinom, diffuse B-Zell Leukämie, Endometriumkarzinom, Gallengangskarzinom, Glioblastoma multiforme, Gliome niedrigen Malignitätsgrades, Haut-Melanom, invasives Mammakarzinom, Karzinosarkom des Uterus, klares Nierenzellkarzinom (RCC, aus dem Englischen „*renal clear cell carcinoma*“), Kolorektalkarzinom, KZT, Leberkarzinom, Lungenadenokarzinom, Magenkarzinom, Mesotheliom, Nebennierenrindenkarzinom, Ovarialkarzinom, Pankreaskarzinom, papilläres Nierenzellkarzinom, Phäochromozytom und Paragangliom, Prostatakarzinom (PCa, aus dem Englischen „*prostate cancer*“), Sarkom. Schilddrüsenkrebs, Speiseröhrenkrebs, squamöses Kopf-Hals-Karzinom, squamöses Lungenzellkarzinom, squamöses Zervixkarzinom, Thymom, uveales Melanom. n.e.: nicht ermittelt

Bei der Untersuchung der Epigenetik von KZT fallen zunächst klare Unterschiede bei der DNA-Methylierung zwischen den verschiedenen KZT-Subtypen auf. So ist in SE häufig nur ein geringer Anteil der DNA methyliert (Hypomethylierung), wohingegen die NSE stark methyliert

vorliegen (Hypermethylierung) [157,165]. Es gibt jedoch auch SE welche stärker methylierte DNA aufweisen. Die einzige SE Zelllinie TCam-2 scheint ein Vertreter dieser hypermethylierten SE zu sein, da das Genom einen ähnlichen hohen Anteil methylierter DNA hat wie NSE-Zelllinien [165].

Im Hinblick auf die Histonmodifikationen sind ebenfalls Unterschiede zwischen SE und NSE zu finden. So weisen SE höhere Mengen an H3K9me2, H3K4me1 H2AR3me2 und H4R3me2 auf, EC dagegen mehr H3K4me2/3 [166,167]. Auch bivalente Histonmodifikationen, also Modifikationen die sowohl aktivierend als auch repressiv auf die Transkription wirken, treten in KZT häufig auf [168]. Dabei treten in derselben Chromatinregion, meist Promotoren, aktivierende H3K4me3 und repressive H3K27me3 Modifikationen auf. Embryonale Stammzellen haben vergleichsweise viele dieser bivalenten Promotoren, wo diese vor allem Zelltyp-spezifische, regulatorische Gene markieren und dadurch eine Rolle bei der Regulation von Pluripotenz und der Zelltyp-spezifischen Differenzierung spielen [169–171].

Ein Großteil des Genoms wird epigenetisch reguliert, so auch die epigenetischen Regulatoren selbst [172]. In KZT sind viele epigenetische Regulatoren stärker exprimiert als in gesundem Gewebe, in einigen Fällen auch umgekehrt (Abbildung 1.9).

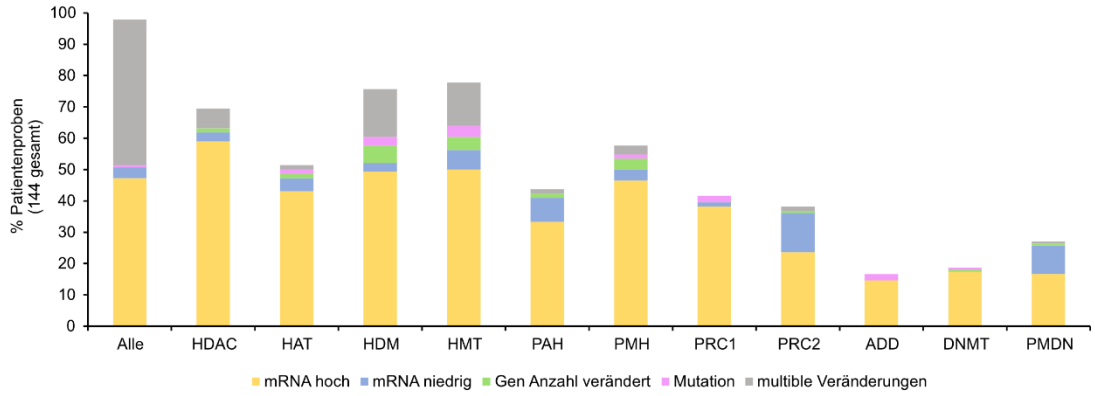


Abbildung 1.9: Veränderungen der Expressionsprofile epigenetischer Interaktoren in KZT
Die Aufstellung der einzelnen Gene ist in Anhang 1 zu finden. Die gezeigten Daten stammen aus der TCGA-Studie (aus dem Englischen „*The Cancer Genome Atlas*“, [158]) und wurden über das Online-Tool cBioPortal [163,164] analysiert.

1.2.4. Epigenetik als Therapieziel in KZT

Die erhöhte Expression der epigenetischen Modifikatoren und *Reader* in KZT kann als Ansatzpunkt für pharmakologische Therapieansätze genutzt werden. Durch Eingreifen in das instabile epigenetische Regulationsnetz der KZT und damit weiterer Störung der Transkriptionsmaschinerie können KZT-Zellen in die Apoptose, zum Zellzyklusarrest oder zur Differenzierung getrieben werden [162,173].

Die ersten Studien mit Epi-Drugs in KZT untersuchten deren Potential Cisplatin-resistente Zellen zu resensitivieren, beispielsweise durch DNMT-Inhibitoren (DNMTi, i für Inhibitor) wie

5-Azacytidin und 5-Aza-desoxycytidin (Decitabin) oder durch HDACi Romidepsin, Panobinostat und Belinostat [174–176]. Aber auch die alleinige Behandlung mit HDACi Romidepsin oder BRDi, wie der *Bromodomain and extraterminal domain-containing* (BET)-Inhibitor JQ1, führte zu verringerter Zellviabilität *in vitro*, sowie reduziertem Tumorwachstum in xenotransplantierten EC-Zellen (NCCIT, NT2/D1, 2102EP) *in vivo* [177,178]. Eine Kombination von Romidepsin und JQ1 führte zu erhöhten Apoptoseraten *in vitro*, sowie ähnlicher Reduktion des Tumorwachstums im Vergleich zur Einzelapplikation beider Inhibitoren, allerdings bei geringerer Dosierung und Häufigkeit der Behandlung [178].

1.3. Zielsetzung

Die aktuelle Therapie von KZT durch Bestrahlung oder Cisplatin-basierter Chemotherapie führt bei den meisten Patienten zu einer günstigen Prognose mit einer Lebenserwartung, die gegenüber der Allgemeinbevölkerung kaum verringert ist. Ungefähr 120000 Männer leben derzeit in Deutschland, bei denen jemals ein Hodentumor diagnostiziert wurde [5]. Da die Patienten sehr jung und die Mortalität sehr niedrig sind, spielen Langzeittoxizitäten wie Sekundärtumoren oder kardiovaskuläre Erkrankungen, welche durch die Chemotherapie verursacht werden, durchaus eine große Rolle und können die Lebensqualität der Patienten erheblich einschränken. Neue Therapien, die geringere Nebenwirkungen aufweisen oder durch Kombination zu verringerter Behandlungsdosis führen sind für die Behandlung von KZT daher von Interesse. Zusätzlich gibt es für Patienten mit einer schlechten Prognose oder resistenten KZT kaum Alternativen zu höheren Dosen der Standardtherapie. Auch hier werden dringend alternative Behandlungsstrategien benötigt.

Die Epigenetik als Therapieansatz in KZT hat sich in ersten Studien als sehr vielversprechend erwiesen. Die Forschung an epigenetischen Vorgängen in der Onkologie, aber auch anderen Krankheiten, sowie Stammzellforschung und Entwicklungsbiologie ist in den letzten Jahren stark vorangeschritten, wodurch eine Vielzahl an Epi-Drugs gegen Vertreter nahezu aller epigenetischen Zielproteinklassen entwickelt wurden.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Eignung verschiedener epigenetischer Inhibitoren zur Behandlung von (Cisplatin-resistenten) KZT festzustellen. Dazu wurden folgende Fragestellungen und experimentelle Ziele festgelegt:

1. <u>Welche epigenetischen Ziele kommen theoretisch für eine Behandlung in KZT in Frage?</u>

Zur Identifikation geeigneter epigenetischer, therapeutisch nutzbarer Zielstrukturen in KZT sollte zunächst, anhand vorhandener Expressionsprofile aus Microarray-Sequenzierungsdaten, eine geeignete Auswahl an epigenetischen Interaktoren und passenden Inhibitor-Kandidaten getroffen werden.

2. Führen die ausgewählten Epi-Drugs zu einer Viabilitätsreduktion in KZT-Zellen?

Im nächsten Schritt sollte der Einfluss dieser Vorauswahl auf die Zellviabilität *in vitro* in Zelllinien der verschiedenen KZT-Entitäten untersucht werden. Die Abnahme der Zellviabilität wurde durch den XTT-Zellviabilitätsassay bestimmt. Hier sollte festgestellt werden, welche epigenetischen Interaktoren und Modifikatoren tatsächlich als Therapieziel in KZT in Frage kommen.

3. Wird die Zellviabilitätsreduktion durch die Induktion von Apoptose oder einem Zellzyklus-Arrest verursacht?

Diejenigen Epi-Drugs, welche die Zellviabilität der KZT-Zellen bei möglichst geringen Dosen verringern, sollten im weiteren Verlauf dieser Arbeit genauer untersucht werden. Dazu folgte zunächst die Bestimmung der Apoptoserate und Analyse des Zellzyklus. Die Bestimmung der Apoptoserate wurde mittels durchflusszytometrischer Bestimmung der Annexin V/Propidium-Iodid (PI) Co-Färbung untersucht werden, um lebende (Annexin und PI negativ), früh-(Annexin positiv, PI negativ) und spät-apoptotische (Annexin und PI positiv), sowie nekrotische Zellen (Annexin negativ, PI positiv) zu unterscheiden. Potenzielle Zellzyklusarreste nach Behandlung mit Epi-Drugs wurden ebenfalls durchflusszytometrisch durch PI-Färbung bestimmt.

4. Wie wirken die Epi-Drugs molekularbiologisch in KZT-Zelllinien?
    a. Welche Veränderungen werden durch die Epi-Drug-Behandlung auf epigenetischer Ebene induziert?

Die Wirkung der Epi-Drug-Behandlung auf die epigenetische Landschaft erfolgte zum einen anhand der Analyse der DNA-Methylierung mittels Slot-Blot-Methode. Dabei wurde die DNA behandelter Zellen auf eine Membran geblottet und die DNA-Methylierung mit Antikörpern gefärbt und mit unbehandelten Zellen verglichen. Zum anderen wurden Veränderungen der Histonmodifikationen mittels Massenspektrometrie untersucht. Hierbei wurden simultan sämtliche Methylierungen und Acetylierungen exponierter Lysinreste analysiert. Diese Untersuchungen sollten die Wirkung der Epi-Drugs bestätigen und Aufschluss über epigenetische Nebeneffekte der Inhibition der Epi-Drug Ziele geben.

    b. Welche Folgen hat Epi-Drug-Behandlung auf transkriptioneller Ebene?

Auf transkriptioneller Ebene sollte untersucht werden, welche Gene durch den Eingriff in die epigenetische Landschaft beeinflusst werden. Dazu sollten RNA-Sequenzierungen durchgeführt und das Transkriptom nach Epi-Drug-Behandlung analysiert und mit unbehandelten Zellen verglichen werden.

c. Hat die Behandlung mit Epi-Drugs Auswirkungen auf Zell-Signalwege auf Proteinebene?

Auch auf Proteinebene sollte untersucht werden, ob durch die Behandlung mit Epi-Drugs Veränderungen in Kinasesignalkaskaden induziert werden. Dies sollte mithilfe eines kommerziellen Kinase-Arrays analysiert werden, welcher die Phosphorylierung bekannter Kinaseziele quantifiziert. Da Kinasesignalwege vor allem eine Rolle bei der Proliferation und dem Zellüberleben spielen, lassen sich so Rückschlüsse auf die Signalwege ziehen, welche durch die Behandlung mit Epi-Drugs aktiviert werden und zu reduziertem Zellwachstum und Apoptose führen.

5. Wie werden die verschiedenen DHRS2-Isoformen durch eine HDACi-Behandlung dereguliert?

Im Zuge dieser Arbeit wurde bei Inhibition mit dem HDACi Quisinostat ein starker Anstieg der *DHRS2* Expression festgestellt, welcher bereits in früheren HDACi Studien, unter anderem mit Romidepsin und Vorinostat (SAHA) bestätigt wurde [177,179]. Um die Rolle von *DHRS2* in der HDACi-Wirkung in urologischen Entitäten (KZT, UC, PCa und RCC) besser zu verstehen, wurden Zelllinien dieser Entitäten mit verschiedenen HDACi (Quisinostat, Romidepsin, Vorinostat, Entinostat, LAK31, KSK64 und MPK409) behandelt. Die Expression von *DHRS2* und seiner Isoformen wurde anhand quantitativer *real time* PCR (qRT-PCR) und RNA-Sequenzierung analysiert.

Zusammenfassend sollte anhand dieser umfangreichen zytotoxischen und molekularen Untersuchungen identifiziert werden, welche Epi-Drugs für eine alternative oder zusätzliche Therapieoption zur Standardtherapie zur Behandlung von (resistenten) KZT in Frage kommen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zelllinien und Primärkultur

2.1.1.1. Keimzelltumor-Zelllinien

Tabelle 2.1: Keimzelltumor-Zelllinien
‚Zur Verfügung gestellt von': [1]Prof. Dr. Matthew Murray (Department of Pathology, University of Cambridge, Cambridge, England), [2]Dr. Christoph Oing (Zentrum für Onkologie, Hämatologie, Knochenmarktransplantation mit Abteilung für Pneumologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Deutschland), [3]Dr. Thomas Müller (Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Deutschland), [4]Dr. Michal Mego (National Cancer Institute Comenius University, Bratislava, Slovakei), [5]Dr. Janet Shipley (Institute of Cancer Research, Sutton, England)

Zelllinie	Entität	Ursprung	Geschlecht Alter [Jahre]	RRID	Zur Verfügung gestellt/ vertrieben von
1411H	YST	EC, Abdomenmetastase, Differenziert vorwiegend zum YST *in vivo* [180]	M, 17	CVCL_2268	1
2102EP	EC	Hoden	M, 23	CVCL_C522	2
2102EP-R	EC	Cisplatin-resistenter Subklon zu 2102EP			2
BeWo	CC	Gestationsbedingtes CC, Gehirnmetastase	M, Fötus	CVCL_0044	ATCC (#CCL-98), Wesel, Deutschland
GCT72	YST	Testikuläres Teratom Differenziert vorwiegend zum YST *in vivo* [181]	M, k.A.	CVCL_A349	3
JAR	CC	Gestationsbedingter Trophoblasttumor aus der Plazenta, Zelllinie stammt jedoch vom Fötus	M, Fötus	CVCL_0360	ATCC (#HTB-144), Wesel, Deutschland
JEG-3	CC	Gestationsbedingtes CC, Gehirnmetastase des Fötus	M, Fötus	CVCL_0363	ATCC (#HTB-36), Wesel, Deutschland
JEG-3-R	CC	Cisplatin-resistenter Subklon zu JEG-3			4
NCCIT	EC	Hoden	M, 24	CVCL_1451	2
NCCIT-R	EC	Cisplatin-resistenter Subklon zu NCCIT			2
NT2/D1	EC	Lungenmetastase	M, 22	CVCL_3407	2
NT2/D1-R	EC	Cisplatin-resistenter Subklon zu NT2/D1			2
TCam-2	SE	Hoden	M, 35	CVCL_T012	5
TCam-2-R	SE	Cisplatin-resistenter Subklon zu TCam-2			4

Chorionkarzinome rein männlichen Ursprungs konnten bislang nicht erfolgreich kultiviert werden, weswegen Zelllinien aus Chorionkarzinomen mit gestationsbedingtem, weiblichen Ursprung genutzt werden

2.1.1.2. Urothelkarzinom-Zelllinien

Tabelle 2.2: Urothelkarzinom-Zelllinien
‚Zur Verfügung gestellt von': [1]PD Dr. Michèle Hoffmann (Klinik für Urologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, Düsseldorf, Deutschland)

Zelllinie	Ursprung	Geschlecht, Alter [Jahre]	RRID	Zur Verfügung gestellt/ vertrieben von
RT-112	Urothelkarzinom	F, n.A.	CVCL_1670	[1]
SCaBER	Plattenepithelkarzinom	M, 58	CVCL_3599	[1]
VM-CUB-1	Urothelkarzinom	M, n.A.	CVCL_1786	DSMZ (#ACC 400), Braunschweig, Deutschland, [1]

2.1.1.3. Prostatakarzinom-Zelllinien

Tabelle 2.3: Prostatakarzinom-Zelllinien
‚Zur Verfügung gestellt von': [1]PD Dr. Michèle Hoffmann (Klinik für Urologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, Düsseldorf, Deutschland)

Zelllinie	Ursprung	Geschlecht, Alter [Jahre]	RRID	Zur Verfügung gestellt/ vertrieben von
DU145	Prostatakarzinom, Gehirnmetastase	M, 69	CVCL_0105	DSMZ (#ACC 261), Braunschweig, Deutschland. [1]
LNCap	Lymphknotenmetastase (supraklavikulär, links)	M, 50	CVCL_0395	DSMZ (#ACC 256), Braunschweig, Deutschland, [1]
PC-3	Prostatakarzinom, Knochenmetastase	M, 62	CVCL_0035	DSMZ (#ACC 465), Braunschweig, Deutschland, [1]

2.1.1.4. Nierenzellkarzinom-Zelllinien

Tabelle 2.4: Nierenzellkarzinom-Zelllinien
‚Zur Verfügung gestellt von': [1]PD Dr. med Isabella Syring-Schmandke, Urology & Paedriatic Urology, University Hospital Bonn, Bonn, Deutschland, [2]PD Dr. Michèle Hoffmann (Klinik für Urologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, Düsseldorf, Deutschland)

Zelllinie	Ursprung	Geschlecht, Alter [Jahre]	RRID	Zur Verfügung gestellt/ vertrieben von
786-O	Nierenzellkarzinom	M, 58	CVCL_1051	[1, 2]
ACHN	Papilläres Nierenzellkarzinom, Metastase Pleuraerguss	M, 22	CVCL_1067	[1, 2]
Caki-1	Klarzelliges Nierenzellkarzinom, Hautmetastase	M, 49	CVCL_0234	DSMZ (#ACC 731), Braunschweig, Deutschland, [2]

2.1.1.5. Kontrollzellen

Tabelle 2.5: Kontrollzellen
‚Zur Verfügung gestellt von': [1]Dermatologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, Deutschland, PD Dr. Michèle Hoffmann (Klinik für Urologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, Düsseldorf, Deustchland, [2]Dr. Michael Peitz (Life & Brain, Bonn, Germany), [3]Dr. Valerie Schumacher (Harvard Medical School, Boston, MA, USA)

Zelllinie	Ursprung			Zur Verfügung gestellt/ vertrieben von
HVHF2	Fibroblasten			[1]
MPAF	Fibroblasten			[2]
FS1	Sertoli-Zellen			[3]

2.1.2. Medien und Zellkulturbedarf

Tabelle 2.6: Materialien zur Kultivierung humaner Zelllinien

Material	Hersteller	Sitz
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich/MERCK	Taufkirchen, Deutschland
Cell Counting Slides for TC20	Bio-Rad Laboratories	Feldkirchen, Deutschland
CryoTube™ Vials 1,0 ml	Thermo Fischer Scientific	Schwerte, Deutschland
DMEM (1X) + GlutaMAX™-I, [+] 4.5 g/l D-Glucose, [+] Pyruvat	Gibco/Thermo Fischer Scientific	Schwerte, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich/MERCK	Taufkirchen, Deutschland
Fetales Kälberserum (FBS)	Bichrom/MERCK	Darmstadt, Deutschland
Filter-Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Greiner Bio One	Frickenhausen, Deutschland
Ham's F-12 Nutrient Mix, GlutaMAX™ Supplement	Gibco/Thermo Fischer Scientific	Schwerte, Deutschland
L-Glutamin (100x)	Gibco/Thermo Fischer Scientific	Schwerte, Deutschland
MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X)	Gibco/Thermo Fischer Scientific	Schwerte, Deutschland
Minisart Syringe Filter 0,2 µM	Sartorius	Göttingen, Deutschland
Natron-Kalk-Glas-Pasteurpipetten	Brand	Wertheim, Deutschland
Omnifix Luer Lock Solo Spritzen 10 ml	B. Braun	Melsungen, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Gibco/Thermo Fischer Scientific	Schwerte, Deutschland
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Nerbe	Winsen/Luhe, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Röhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner Bio One	Frickenhausen, Deutschland
RPMI 1640 (1x), [-] L-Glutamin	Gibco/Thermo Fischer Scientific	Schwerte, Deutschland
Stripette 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Corning	Kaiserslautern, Deutschland

T25 -, T75 - Flasche	CELLSTAR/Greiner Bio One	Frickenhausen, Deutschland
Trypanblau 0,4 %	Sigma-Aldrich/MERCK	Taufkirchen, Deutschland
Trypsin-EDTA 0,05 %, 0,25 %	Gibco/Thermo Fischer Scientific	Schwerte, Deutschland
Zellkulturplatten (6 -, 96 -Well)	Greiner Bio One	Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturschale 145 mm²	Greiner Bio One	Frickenhausen, Deutschland

2.1.3. Epi-Drugs und Lösemittel

Tabelle 2.7: Epigenetische Agenzien und ihre Lösungsmittel (LM)

Substanz	LM	Hersteller	Sitz
Aurintricarboxylic Acid	Ethanol	Sigma-Aldrich/MERCK	Taufkirchen, Deutschland
BI-9564	DMSO	opnMe, Boehringer Ingelheim	Ingelheim am Rhein, Deutschland
Bizine	DMSO	Cayman Chemical, Biomol GmbH	Hamburg, Deutschland
Chaetocin	DMSO	Selleckchem	Berlin, Deutschland
Daminozide	DMSO	Selleckchem	Berlin, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)		Sigma-Aldrich/MERCK	Taufkirchen, Deutschland
DMF		Sigma-Aldrich/MERCK	Taufkirchen, Deutschland
Ethanol		VWR Chemicals	Darmstadt, Deutschland
GSK2879552	DMSO	Selleckchem	Berlin, Deutschland
GSK343	DMF	Selleckchem	Berlin, Deutschland
H_2O		Sigma-Aldrich/MERCK	Taufkirchen, Deutschland
JIB-04	DMSO	Selleckchem	Berlin, Deutschland
LP99	DMSO	Cayman Chemical, Biomol GmbH	Hamburg, Deutschland
MZ-1	DMSO	opnMe, Boehringer Ingelheim	Ingelheim am Rhein, Deutschland
Nicotinamide	H_2O	Selleckchem	Berlin, Deutschland
PBIT	DMSO	Cayman Chemical, Biomol GmbH	Hamburg, Deutschland
PRT4165	DMSO	Selleckchem	Berlin, Deutschland
Quisinostat	DMSO	Selleckchem	Berlin, Deutschland
Selisistat	DMSO	Selleckchem	Berlin, Deutschland
VZ185	DMSO	opnMe, Boehringer Ingelheim	Ingelheim am Rhein, Deutschland

2.1.4. Chemikalien

Tabelle 2.8: Allgemeine Chemikalien

Substanz	Hersteller	Sitz
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich/MERCK	Taufkirchen, Deutschland
2-Propanol	VWR Chemicals	Darmstadt, Deutschland
Acrylamid 30 % (37,5:1) Rotiphorese Gel 30	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Sigma-Aldrich/MERCK	Taufkirchen, Deutschland
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Sigma-Aldrich/MERCK	Taufkirchen, Deutschland
cOmplete ULTRA Tablets, Mini, *EASY*pack	Roche	Mannheim, Deutschland
Coomassie Brilliant Blau R 250	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
EDTA Solution pH 8,0 (0,5 M)	PanReac AppliChem/ITW Reagents	Darmstadt, Deutschland
Essigsäure (Eisessig 100 %)	MERCK	Darmstadt, Deutschland
Ethanol 96 %, 70 %	VWR Chemicals	Darmstadt, Deutschland
Ethanol absolut	VWR Chemicals	Darmstadt, Deutschland
Methanol	VWR Chemicals	Darmstadt, Deutschland
Methylenblau Certistain	MERCK	Darmstadt, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat ($C_2H_3NaO_2$)	MERCK	Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	MERCK	Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	MERCK	Darmstadt, Deutschland
N-Methylphenazinium-Methylsulfat (PMS)	Sigma-Aldrich/MERCK	Taufkirchen, Deutschland
PCI (RotiPhenol)	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Plasmocure	InvivoGen	Toulouse, Frankreich
Ponceau S	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Propidium Iodid (PI)	Sigma-Aldrich/MERCK	Taufkirchen, Deutschland
Proteinase K	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
QIAzol Lysis Reagent	QUIAGEN GmbH	Hilden, Deutschland
RNase A	QUIAGEN GmbH	Hilden, Deutschland
RNase *AWAY*	Molecular Bioproducts/Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
RNase-freies Wasser	Sigma-Aldrich/MERCK	Taufkirchen, Deutschland
Salzsäure 1,5 %, 0,5 M	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
SDS	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
SYBR-Safe, DNA Gel-stain	Invitrogen/Thermo Fischer Scientific	Schwerte, Deutschland
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich/MERCK	Taufkirchen, Deutschland
TRIS ($C_4H_{11}NO_3$)	VWR Chemicals	Darmstadt, Deutschland
Tween-20 Surfact-Amps	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
XTT Natriumsalz	Neofroxx	Einhausen, Deutschland

2.1.5. Kits und Assays

Tabelle 2.9: Kits und Assays sowie Assay-Einzelprodukte

Kit/Assay	Hersteller	Sitz
10x PCR Puffer (mit 15 mM $MgCl_2$)	QUIAGEN GmbH	Hilden, Deutschland
Annexin V-FITC	Miltenyi Biotech	Bergisch Gladbach, Deutschland
BCA Protein Assay Reagent Kit	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
dNTP Mix	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Gene ruler	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Histone Extraction Kit	Abcam	Cambridge, Vereinigtes Königreich
Hot Start Taq Polymerase	QUIAGEN GmbH	Hilden, Deutschland
Luna Universal qPCR Master Mix	New England Biolabs	Frankfurt am Main, Deutschland
Maxima H Minus Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Oligo$(dT)_{18}$-Primer	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Page Ruler prestained protein ladder	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Pierce Rinderserumalbumin Standards	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kit	R&D Systems	Abingdon, Vereinigtes Königreich
QIAamp DNA Mini Kit	QUIAGEN GmbH	Hilden, Deutschland
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
RNeasy Mini Kit	QUIAGEN GmbH	Hilden, Deutschland
RT Puffer 5x	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
SuperSignal HRP- Substrate	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland

2.1.6. Gebrauchsfertige Puffer

Tabelle 2.10: Gebrauchsfertige Puffer

Puffer	Hersteller	Sitz
Annexin V Binding Puffer (20x Stock Solution)	Miltenyi Biotech	Bergisch Gladbach, Deutschland
MACSQuant Running Buffer	Miltenyi Biotech	Bergisch Gladbach, Deutschland
MACSQuant/MACSima Storage Solution	Miltenyi Biotech	Bergisch Gladbach, Deutschland
PBS (10x)	Sigma-Aldrich/MERCK	Taufkirchen, Deutschland
Purple DNA loading dye 6x	New England Biolabs	Frankfurt am Main, Deutschland
RIPA Buffer (10x)	Cell Signaling Technology	Frankfurt am Main, Deutschland
Roti-Load 1 4x	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese 50x TAE Puffer	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland

TE (1x) pH 8.8 low EDTA buffer	PanReac Applichem	Darmstadt, Deutschland
Tris/Glycin Puffer 10x (blotting buffer)	Miltenyi Biotech	Bergisch Gladbach, Deutschland
Tris/Glycin/SDS Puffer 10x (running buffer)	Miltenyi Biotech	Bergisch Gladbach, Deutschland

2.1.7. Sonstige Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.11: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller	Sitz
96-Well-Platten	Greiner Bio One	Frickenhausen, Deutschland
Combitips advanced, 2 ml, 5 ml, 10 ml	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Corning Costar Reagenzreservoir 50 ml	Corning	Kaiserslautern, Deutschland
Filter-Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Greiner Bio One	Frickenhausen, Deutschland
Framestar 384 Well Skirted PCR Plate	4titude von Brooks Life Sciences	Griesheim, Deutschland
Immobilon-P Membran	MERCK	Darmstadt, Deutschland
Natron-Kalk-Glas-Pasteurpipetten	Brand	Wertheim, Deutschland
PCR Reaktionsgefäße 8er Kette (Multiply µStrip Pro)	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Nerbe	Winsen/Luhe, Deutschland
Polystrene-Röhrchen	Greiner Bio One	Frickenhausen, Deutschland
Positiv geladene Nylon Membran	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Röhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner Bio One	Frickenhausen, Deutschland
Spritzen Injekt F	B. Braun	Melsungen, Deutschland
Stripette 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Corning	Kaiserslautern, Deutschland
Whatman Gel Blot Paper	GE Healthcare	Solingen, Deutschland

2.1.8. Geräte

Tabelle 2.12: Geräte

Gerät	Hersteller	Sitz
Agarose-Gel-Elektrophoresekammern EASY-CAST Model#B1A	Owl Scientific/Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Autoklav 3870 ELV	Tuttnauer	Breda, Niederlande
Automatischer Zellzähler TC20	Bio-Rad Laboratories	Feldkirchen, Deutschland
BSB 4/4A Sterilbank	GELAIRE	Sydney, Australia
CFX384 Touch Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories	Feldkirchen, Deutschland
Chemidoc Imaging System	Bio-Rad Laboratories	Feldkirchen, Deutschland
CO2-Inkubator HeraCell 150i	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
ECLIPSE TE2000-S Inverted Microspcope	Nikon Instruments	Düsseldorf, Deutschland
ECLIPSE Ts2 Inverted Routine Microscope	Nikon Instruments	Düsseldorf, Deutschland
Gel-Dokumentationsanlage	INTAS	Göttingen, Deutschland
Gyratory rocker SSL3	Stuart™/BioCote, Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
HulaMixer	Invitrogen/Thermo Fischer Scientific	Schwerte, Deutschland
iMark Microplate Absorbance Reader	Bio-Rad Laboratories	Feldkirchen, Deutschland
Kipp-/Rollenmischer RM5	CAT	Ballrechten-Dottingen, Deutschland
Kipp-/Rollenmischer RS-TR 05	Phoenix Instrument/Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Kühlzentrifuge Allegra	Beckman Coulter Life	Krefeld, Deutschland
MACSQuant Analyser 10	Miltenyi Biotech	Bergisch Gladbach, Deutschland
Microprocessor pH Meter	WTW	Weilheim, Deutschland
Microwelle	Küppersbusch	Gelsenkirchen, Deutschland
Mini-Protean Tetra Cell (Kammer, Deckel, Elektrodenzubehör, Laufmodul)	Bio-Rad Laboratories	Feldkirchen, Deutschland
Multikanalpipette	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Multikanalpipette Xplorer plus	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Multipette E3 Bundle	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Multipipette E3	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
MyFuge™ Mini PCR tube Centrifuge	Benchmark Scientific	Biozym, Hessisch Oldendorf
NanoDrop 2000/2000c Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte	Eberstadt, Deutschland
Power Supply	Biometra	Göttingen, Deutschland

PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories	Feldkirchen, Deutschland
Roller 6 BASIC	IKA-Werke	Staufen, Deutschland
S1000 Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories	Feldkirchen, Deutschland
Slot-Blotter	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge Mini Spin	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge Z 216 M	HERMLE	Wehingen, Deutschland
Trans-Blot Turbo Transfer System	Bio-Rad Laboratories	Feldkirchen, Deutschland
UV-Tisch FLX – 20 M	Vilber Lourmat	Eberhardzell, Deutschland
VaKuumpumpe N811	Laboport, Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries/Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Vortex-Mixer VF2	IKA Labortechnik	Staufen, Deutschland
Wasserbad	Köttermann GmbH	Uetze, Deutschland
Zentrifuge 5810	Eppendorf	Hamburg, Deutschland

2.1.9. Software und online Tools

Tabelle 2.13: Benutzte Software und online Tools

Software/Tool	Hersteller/Website	Sitz/Quelle
CFX Maestro Software	Bio-Rad Laboratories	Feldkirchen, Deutschland
Microplate Manager 6	Bio-Rad Laboratories	Feldkirchen, Deutschland
GraphPad Prism V8	GraphPad Software, Inc	San Diego, Kalifornien, Vereinigte Staaten
STRING database	https://string-db.org	[182,183]
cBioportal	https://www.cbioportal.org/	[163,164]
interactivenn	http://www.interactivenn.net/	[184]
circos online tool	http://mkweb.bcgsc.ca/tableviewer/	[185]
word cloud tool	https://www.wordclouds.com/	Zygomatic Vianen, Niederlande
BioRender	https://biorender.com/	Toronto, Ontario, Kanada
Microsoft Word (Version 2019)	Microsoft 365, Microsoft Corporation	Redmond, WA, USA
Microsoft Excel (Version 2019)	Microsoft 365, Microsoft Corporation	Redmond, WA, USA
INTAS GDS 2010 Windows	INTAS	Göttingen, Deutschland
UCSC Xena Browser	https://xenabrowser.net/transcripts/	Santa Cruz, CA, USA
Primer3Plus	https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi	[186]
PrimerBank	https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/	[187,188]
Affinity Designer 1.10.1.1142	Serif (Europe) Ltd.	Nottingham, Vereinigtes Königreich
Fiji ImageJ 1.53c	https://imagej.nih.gov/ij/	[189]
PINAv3.0	https://omics.bjcancer.org/pina/	[190]
Inkscape 1.0.2-2	https://inkscape.org/	GNU General Public License

NanoDrop 2000 V 1.6	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Qlucore Omics Explorer 3.7	Qlucore AB	Lund, Schweden
DAVID Bioinformatics Resources 6.8	https://david.ncifcrf.gov/	[191,192]
GIMP 2.10.22	https://www.gimp.org/	GNU General Public License
MACSQuantify V 2.11	Miltenyi Biotech	Bergisch Gladbach, Deutschland

2.1.10. Oligonucleotide

Tabelle 2.14: Primer für qRT-PCR
5'Primer F (*forward primer*) und 3'Primer R (*reverse primer*). Die Tm (Schmelztemperatur) wurde mit Primer3Plus nach Breslauer *et al.* kalkuliert [193]. Die Produktgröße wurde mit den In-Silico PCR Tool des UCSC Genome Browsers erstellt (https://genome.ucsc.edu/).

Gen		Sequenz	Tm [°C]	Produktgröße [bp]
GAPDH	F	TGCCAAATATGATGACATCAAGAA	61,5	121
	R	GGAGTGGGTGTCGCTGTTG	62,8	
β-Actin	F	CCATCATGAAGTGTGACGTGG	62,4	293
	R	GTCCGCCTAGAAGCATTTGCG	66,3	
DHRS2	F	GTAGGGAGCACTCTGGGGAC	61,1	105
	R	CTCCATGTAGGGCAGCAACT	60,3	
DHRS2 Exon 1	F	ATCTGCAGTGCCTGAAATCC	60,2	110
	R	CTGTGCACCTGTCTGTCTGG	60,5	
DHRS2 Exon 2	F	ATACTCACCGCAAGGGTCTG	60,1	171
	R	ACCGCTTGGTGATGGTCTC	61,1	
DHRS2 Exon 2/3c	F	ATACTCACCGCAAGGGTCTG	60,1	334
	R	AGGACGCCCTTCCTGTCTAT	60,1	
DHRS2 Exon 3a	F	AGTGCTCAATGTTTGCTATGCA	60,8	141
	R	GAACCTCAGGTCAGGAAAGCA	61,7	
DHRS2 Exon 5b/d	F	ACCTTGGCCTCCTAAAGTGC	60,6	134
	R	CTGTGAGCAGAGCCCTGAAA	61,7	
DHRS2 Exon 5n/m	F	GTCCTTCCTGTGCTCTCCAG	60,0	169
	R	AGACTCTGCCTCCAGATCCA	59,9	
DOK5	F	AATGTGAAGAACGTAGCTCGATT	59,3	157
	R	TCCGTGTTCCTACACACTCCA	61,6	
DDIT4	F	GGACCAAGTGTGTTTGTTGTTTG	61,6	120
	R	CACCCACCCCTTCCTACTCTT	61,6	
CST1	F	ACTTGGACACCTGTGCCTTC	60,2	119
	R	TTGACACCTGGATTTCACCA	59,9	
SERPINB3	F	GCTGAAGATCGCCAACAAG	59,5	260
	R	CCCACTGCCCTTTGAAATAG	59,6	
CD36	F	CTTTGGCTTAATGAGACTGGGAC	61,3	134
	R	GCAACAAACATCACCACACCA	62,8	
SULT1A3	F	CACGGCTCATCAAGTCACAC	60,3	134
	R	TTCCATACGGTGGAAATGGT	60,1	
EIF3CL	F	ATGAGGAGGAGGAGGAGGA	58,7	102
	R	CAGTTCCCTTGGCAAACATT	60,0	
NPIPA2/3	F	AGGCAGAGGAAAACGGGAAA	63,2	125
	R	TGCAGAAGGGGTGATTTTGC	63,4	
SAMD3	F	TGGTCAGTTGAGCAGGTCTG	60,0	90
	R	GGCCCCACTTACTTCTTCCTC	61,3	
SPANXB1	F	AATGAGGCCAACAAGACGATG	62,3	198
	R	CTCCTCCATTTGGTCGGGG	65,0	
ACE2	F	CGAAGCCGAAGACCTGTTCTA	61,8	140
	R	GGGCAAGTGTGGACTGTTCC	62,9	

CD80	F	GGGCACATACGAGTGTGTTGT	60,9	90
	R	TCAGCTTTGACTGATAACGTCAC	59,4	
FOS	F	GAGAGCTGGTAGTTAGTAGCATGTTGA	61,4	112
	R	AATTCCAATAATGAACCCAATAGATTAGTTA	61,5	

Tabelle 2.15: Primer für genomische PCR zur Mykoplasmen Kontrolle
Primersequenzen nach Uphoff und Drexler [194].

	Sequenz	Tm [°C]
5‘	CGCCTGAGTAGTACGTTCGC	61,0
	CGCCTGAGTAGTACGTACGC	58,6
	TGCCTGGGTAGTACATTCGC	61,1
	TGCCTGAGTAGTACATTCGC	64,4
	CGCCTGAGTAGTATGCTCGC	61,1
	CACCTGAGTAGTATGCTCGC	56,1
	CGCCTGGGTAGTACATTCGC	62,8
3‘	GCGGTGTGTACAAGACCCGA	64,4
	GCGGTGTGTACAAAACCCGA	64,1
	GCGGTGTGTACAAACCCCGA	62,9

2.1.11. Antikörper

Tabelle 2.16: Liste genutzter Antikörper
Alle Antikörper wurden in 5 % Milch-PBS-Lösung geblockt.

Antikörper	Hersteller	Katalognr.	Verdünnung	Anwendung
beta-ACTIN	Sigma Aldrich	a5441	1:30000	WB
BRD4	Abcam	ab128874	1:1000	WB
VHL	BD Pharmingen	65031A	1:400	WB
EZH2	Abcam	ab3748	1:2000	WB
H2AK119ub	Cell Signaling	8240	1:2000	Histon WB
H3K23ac	Active Motif	39131	1:2000	Histon WB
H3K79me3	Abcam	ab208189	1:400	Histon WB
H3K4me3	Active Motif	39915	1:1000	Histon WB
H3K64ac	Abcam	ab214808	1:400	Histon WB
H4K16ac	Active Motif	39167	1:1000	Histon WB
H3K36me2	Active Motif	39891	1:1000	Histon WB
H3K9me3	Abcam	ab8898	1:3000	Histon WB
H3	Active Motif	39763	1:3000	Histon WB
H4	Active Motif	61199	1:3000	Histon WB
5mC	Abcam	ab10805	1:5000	DNA Slot Blot
5hmC	Active Motif	39769	1:2000	DNA Slot Blot
anti-mouse HRP	Dako	P0260	1:1000	alle Blots
anti-rabbit HRP	Dako	P0448	1:2000	alle Blots

2.2. Methoden

2.2.1. Zellbiologische Methoden

2.2.1.1. Kultivierung von Zelllinien

Zur Authentifizierung der Zelllinien wurden regelmäßig *short tandem repeats*-Profile (STR, aus dem Englischen: sich wiederholende Mikrosatelliten der nicht-kodierenden DNA) durch das Institut für Rechtsmedizin, Universitätsklinikum Düsseldorf, erstellt. Die aktuellen Profile sind auf Nachfrage verfügbar. Die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf äußerte keine Bedenken gegen die Nutzung der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien für *in vitro* Experimente (Ethik-Votum 2018-178 und 2019-412 an D. Nettersheim).

2.2.1.1.1. Kultivierung der KZT-Zelllinien

Die adhärent wachsenden KZT-Zelllinien TCam-2(-R), 2102EP(-R), NCCIT(-R), NT2/D1(-R), 1411H, GCT72, JAR, JEG-3(-R) und BeWo wurden in T75-Zellkulturflaschen in ihrem entsprechenden Medium (Tabelle 2.17) bei 37 °C und 7,5 % CO_2 unter sterilen Bedingungen kultiviert. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich bei Erreichen von ca. 80-90 % Konfluenz passagiert. Dazu wurden zunächst das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS (aus dem Englischen „*phosphate buffered saline*“) (5 ml) gewaschen und mittels 0,05 % Trypsin-EDTA (1 ml) bei 37 °C dissoziiert. Das Voranschreiten der Zelldissoziation wurde unter dem Mikroskop beobachtet. Sobald alle Zellen in Suspension vorlagen, wurde die Trypsinierung durch Zugabe von FBS-haltigem (fetales Kälberserum, aus dem Englischen „*fetal bovine serum*“) Medium (3-4-fache des Trypsin/EDTA-Volumens) gestoppt und auf neue T75-Flaschen mit vorgelegtem Medium verteilt (Gesamtvolumen 15 ml). Das Passagierverhältnis richtet sich dabei nach Zelldichte und Wachstumsrate der Zellen und liegt ca. zwischen 1:3 und 1:20. Bei GCT72, welche als Mischkultur mit murinen Fibroblasten vorliegt wurden einmal wöchentlich die Fibroblasten ausgedünnt. Dazu wurden zunächst für ca. 30 s (Sekunden) hauptsächlich die Fibroblasten mittels Trypsin abgelöst und abgenommen. Im Anschluss erfolgte eine erneute Zugabe von Trypsin/EDTA zur Dissoziation der GCT72 Zellen mit weiterer Passage wie oben beschrieben.

Für Versuche wurde nach Abstoppen der Dissoziation die Zellzahl bestimmt. Dazu wurde eine 1:1 Verdünnung der Zellsuspension mit Trypanblau erstellt und der lebend-Zellanteil mittels automatischem Zellzähler ermittelt.

Tabelle 2.17: Zusammensetzung der Medien zur Kultivierung der KZT

Zelllinie	Medium	Zusätze
1411H, 2102EP(-R), JAR, JEG-3(-R), NT2/D1(-R)	DMEM (1x) + GlutaMAX-I	10 % FBS, 1 % P/S (10,000 U), 1 % L-Glutamin (200 mM)
GCT72, NCCIT(-R), TCam-2(-R)	RPMI Medium 1640 (1x)	10 % FBS, 1 % P/S (10,000 U), 1 % L-Glutamin (200 mM)
BeWo	Ham's F-12 Nutrient Mix	10 % FBS, 1 % P/S (10,000 U), 1 % L-Glutamin (200 mM)

2.2.1.1.2. Kultivierung der Zelllinien des Blasen-, Prostata- und Nierenzellkarzinoms

Die Kultivierung der Urothelkarzinom (UC)-Zellinien VM-CUB-1, RT-112 und SCaBER, Prostatakrebs (PCa)-Zelllinien DU145, PC-3 und LNCap, sowie Nierenzellkarzinom (RCC)-Zelllinien Caki-1, 786-O und ACHN erfolgte ebenfalls in T75 Flaschen bei 37 °C und 5 % CO_2. Die Zusammensatzung der Kulturmedien sind in Tabelle 2.18 zu finden. Die Passage der Zellen erfolgte wie unter 2.2.1.1.1 beschrieben, jedoch mit 0,25 % Trypsin/EDTA.

Tabelle 2.18: Zusammensetzung der Medien zur Kultivierung von UC-, PCa- und RCC-Zelllinien
Die Hitze-inaktivierung von FBS erfolgte bei 56 °C für 30 min.

Zelllinie	Medium	Zusätze
VM-CUB-1, RT-112, SCaBER, Caki-1	DMEM (1x) + GlutaMAX-I	10 % FBS hitze-inaktiviert, 1 % P/S (10,000 U), 1 % L-Glutamin (200 mM)
DU145, PC-3, LNCap, 786-O	RPMI Medium 1640 (1x)	10 % FBS, 1 % P/S (10,000 U), 1 % L-Glutamin (200 mM)
ACHN	DMEM (1x) + GlutaMAX-I	10 % FBS, 1 % P/S (10,000 U), 1 % L-Glutamin (200 mM)

2.2.1.1.3. Kultivierung der Kontrollzellen

Die Kultivierung der Kontrollzellen erfolgte wie unter 2.2.1.1.1 beschrieben in den entsprechenden Medien (Tabelle 2.19).

Tabelle 2.19: Zusammensetzung der Medien zur Kultivierung der Kontrollzellen

Zellen	Medium	Zusätze
MPAF HVHF2	DMEM (1x) + GlutaMAX-I	10 % FBS, 1 % P/S (10,000 U), 1 % L-Glutamin (200 mM), 1 % Nicht-essenzielle Aminosäuren (100x), 100 nM β-Mercaptoethanol

2.2.1.1.4. Herstellung von Kryokulturen

Zur langfristigen Lagerung der Zelllinien wurden Kryokulturen angelegt. Hierfür wurden die Zellen nach Abstoppen der Trypsin-Reaktion in ein 15 ml Röhrchen überführt und bei 99 x g bzw. 700 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Mediumüberstand wurde verworfen und die Zellen in geeigneter Menge Cryomedium (FBS mit 10 % DMSO) resuspendiert (meist 3 ml pro T75-

Flasche) und auf Kryoröhrchen zu je 1 ml aufgeteilt. Diese wurden zunächst bei -70 °C und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.
Zum Auftauen wurden die Zellen möglichst schnell in neues Kulturmedium in eine T75-Flasche überführt und am nächsten Tag das Medium gewechselt. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Zellen wie unter 2.2.1.1.1 beschrieben regelmäßig passagiert.

2.2.1.1.5. Mykoplasmen-Nachweis

Im Abstand von zwei Monaten als Routinekontrolle, sowie nach dem Auftauen von Kulturen wurden Untersuchungen zur Mykoplasmen Kontamination der Zellen durchgeführt. Das hier beschriebene Protokoll basiert dabei auf einer Publikation von Uphoff und Drexler [194]. Es wurde je 1 ml Zellkulturüberstand von ca. 75 % konfluenten Zellen gesammelt und 5 min bei 95 °C gekocht, kurz abzentrifugiert und auf Eis gelagert. Die PCR (Polymerase-Kettenreaktion) setzt sich wie in Tabelle 2.20 beschrieben zusammen und läuft nach dem angegebenen PCR-Programm (Tabelle 2.20). Der Reaktionsansatz wurde anschließend per Agarose-Gelelektrophorese (1,3 % Agarose in 1xTAE-Puffer) untersucht. Als Positivkontrolle diente eine bekannte positive Kulturprobe. Die Erwartete Bandengrößen lagen bei 510 bp bei positivem Befall und 1000 bp der internen Kontrolle. Falls Zellen mit Mykoplasmen befallen waren, wurden sie mit für zwei Wochen alle vier Tage mit 30 µg/ml Plasmocure nach Herstellerprotokoll behandelt.

Tabelle 2.20: Zusammensetzung und Programm der Mykoplasmen-PCR

PCR-Reaktionsansatz			PCR-Programm		
Reagenz	**Volumen**		**Temperatur**	**Zeit**	**Zyklen**
dNTP Mix	0,5 µl		95 °C	15 min	
5‘ Primer Mix (5 µM je Primer)	1 µl		94 °C	30 s	34 x
3‘ Primer Mix (5 µM je Primer)	1 µl		65 °C	45 s	
H2O ad 25 µl	39,3 µl		72 °C	1 min	
10x PCR Puffer	5 µl		72 °C	10 min	
Zellkulturüberstand	2 µl		4 °C	∞	
Hot Start Taq Polymerase	0,2 µl				
Interne Kontrolle [1x10000 verdünnt]	1 µl				

2.2.1.2. XTT-Assay zur Analyse der Zellviabilität

Zur Bestimmung der Zellviabilität wurden XTT-Assays durchgeführt. Durch Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen wird das gelbe XTT Tetrazolium-Salz (2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilid) zum orange-farbenen Formazan-Salz reduziert. Dieser Farbumschlag kann dann photometrisch bestimmt werden [195].

Zellen wurden in 96-Well Platten zu je 5000 Zellen in 50 µl pro Well ausplattiert (KZT und Kontrollzellen, 3000 bei UC, PCa und RCC wegen höherer Wachstumsrate). Am nächsten Tag wurden die Zellen mit verschiedenen Inhibitorkonzentrationen in Quadruplikaten behandelt. Dabei wurde jeweils die doppelte Konzentration in 50 µl Medium ins Well zugegeben, um mit den bereits vorhandenen 50 µl Medium die final gewünschte Konzentration (siehe Rohadaten Anhang 4) einzustellen. Nach 24, 48, 72 und 96 h wurde dann die Zellviabilität gemessen. Dazu wurde 4 h vor Messzeitpunkt 50 µl XTT-Lösung zugegeben (1 mg/ml XTT in RPMI-Medium mit 1:100 PMS (1,25 mM)) und die 96-Well Platte gut geschüttelt. Die Absorption wurde mittels *iMark Microplate Reader* und zugehöriger Software gemessen (Messwellenlänge: 450 nm, Referenzwellenlänge: 655 nm). Zur Auswertung wurde zunächst der Messwert der Referenzwellenlänge subtrahiert, und anschließend der Blankwert (nur Medium mit XTT-Lösung ohne Zellen) abgezogen. Eine Lösungsmittelkontrolle (Zellen behandelt mit dem jeweiligen Lösungsmittel der Epi-drug) wurde zur Normalisierung benutzt. Die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) wurde mit GraphPad Prism v8 berechnet.

2.2.1.3. Durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptose-Rate und des Zellzyklus

Die durchflusszytometrische Analyse der Apoptose-Rate und der Zellzyklusverteilung wurde mittels Annexin V/PI- bzw. PI-Färbung mit dem *MACSQuant Analyzer 10* durchgeführt. Annexin V ist ein Phospholipid-bindendes Protein mit hoher Affinität für anionische, phospholipide Phosphatidylserine. Diese kommen in normalen, gesunden Zellen nur auf der dem Zytoplasma zugewandten Seite der Zellmembran vor, werden während der Apoptose jedoch nach außen gekehrt [196]. Dort können sie mit fluoreszierenden Annexin V-Konjugaten detektiert werden und dienen so als Nachweis apoptotischer Zellen. PI färbt spezifisch DNA. Bei beginnender Nekrose und damit zunehmender Porosität der Zellmembran, gelangt PI in den Zellkern und interkaliert dort in die DNA. Durch die Kombination von Annexin V und PI können somit verschiedene Stadien der Zelle nachgewiesen werden: lebendig (Annexin V^-/PI^-), frühapoptotisch (Annexin V^+/PI^-), spätapoptotisch (Annexin V^+/PI^+) und nekrotisch (Annexin V^-/PI^+). Der Zellzyklusnachweis mittels PI erfolgt durch Permeabilisierung der Zellen und Interkalation von PI in die DNA. Die Menge an PI in der Zelle ist dabei relativ zur Menge an vorhandener DNA und dementsprechend doppelt so hoch nach Replikation der DNA während der S-Phase [197]. Zellen in der G2- oder M-Phase enthalten also doppelt so viel DNA/PI wie Zellen in der G1-Phase.

Zellen wurden in 6-Well Platten ausgesät (KZT, Kontrollzellen: 150000 Zellen; UC, PCa, RCC: 80000 Zellen), am nächsten Tag via Mediumwechsel mit den EC_{50} Konzentrationen der Epi-drugs behandelt und nach weiteren 16 h geerntet (die Zellen wurden trypsiniert wie unter 2.2.1.1.1 und 2.2.1.1.3 beschrieben). Alle Schritte wurden, falls nicht anders angegeben auf

Eis durchgeführt. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 99 x g bzw. 700 rpm für 5min bei Raumtemperatur (RT).

Zur Analyse der Apoptose-Rate wurden sowohl die adhärenten Zellen als auch die apoptotischen Zellen im Medium gemessen. Dazu wurde das Medium vor der Ernte der Zellen nicht verworfen, sondern gesammelt, die trypsinierten Zellen hinzugefügt, alle Zellen abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden mit 1 ml 1x *Annexin V binding buffer* (von 10x mit Millipore Wasser verdünnt) gewaschen (i.e. Puffer hinzufügen, zentrifugieren, Überstand verwerfen). Die Zellen wurden in 70 µl 1x *Annexin V binding buffer* resuspendiert und kurz mittels Vortex-Mixer gemischt. Es erfolgte die Zugabe von 2,5 µl Annexin V FITC-Konjugat und 15 µg PI (Stock 2 mg/ml). Nach einer kurzen Durchmischung wurden die Zellen für 15 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend wurden 500 µl 1x *Annexin V binding buffer* zugegeben und nach erneuter kurzer Mischung gemessen.

Für die Analyse des Zellzyklus wurden nur die adhärenten Zellen verwendet. Nach der Zellernte wurden das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die Fixierung und Permeabilisierung mit Ethanol, dazu wurden die Zellen in 300 µl PBS resuspendiert und unter leichtem Schütteln des Vortex-Mixers tropfenweise 700 µl eiskaltes, absolutes Ethanol hinzugegeben. Die Zellen wurden zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Es folgte die Resuspendierung in 500 µl FACS-Zellzyklus-Puffer (2 µg/ml PI und 200 µg/ml RNase A in PBS) mit anschließender Messung.

Es wurden mindestens je $5x10^4$ Zellen gemessen und mittels *MACSQuant Software* v 2.13.0 analysiert.

2.2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1. DNA-Isolation

Die Isolation von DNA aus humanen Zellen erfolgte mittels Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCI) Extraktion. Zellen wurden zu je 150000 Zellen pro Well in 6-Well Platten ausgesät, am nächsten Tag via Mediumwechsel mit den EC_{50} Konzentrationen der Epi-Drugs sowie einer ähnlichen Menge des Lösungsmittels behandelt und nach weiteren 24 h geerntet (i.e. trypsiniert wie unter 2.2.1.1.1 beschrieben). Pro Bedingung wurden je zwei Wells verwendet. Die Zellen wurden bei 99 x g bzw. 700 rpm zentrifugiert und das Zellpellet mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 300 µl DNA-Extraktionspuffer (Tabelle 2.21) mit frisch hinzugefügtem SDS (40 µl) und Proteinase K (12,5 µl) resuspendiert und lysiert. Nach der Zugabe von 360 µl PCI wurde das Lysat für 10 min gemischt (*HulaMixer*) und anschließend 10 min bei 10000 rpm (9000xg) und 4 °C zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß übertragen und mit einem Zehntel des Volumens 3 M Natriumacetat sowie dem dreifachen Volumen 100 Ethanol versetzt und das Gemisch invertiert. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert (5 min, 12000 rpm (13000xg)) und zweimal mit je 1 ml 70 % Ethanol

gewaschen. Das DNA-Pellet wurde getrocknet (wenige Sekunden bei 37 °C), in 100 µl TE-Puffer resuspendiert und für 1 h bei 55 °C gelöst. Die Konzentration der DNA wurde mittels *NanoDrop* gemessen und anhand der 260/280 sowie 260/230 Verhältnisse die Reinheit bestimmt. Da hier meist das 260/280 Verhältnis bei 2 lag, was für eine Verunreinigung mit RNA spricht (reine DNA: 1,8) wurden die Proben zudem mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Da für Folgeanalysen eine möglichst genaue Bestimmung der DNA-Konzentration nötig war wurde, bei Vorhandensein von RNA-Banden, die DNA erneut mit dem *QIAamp DNA Mini Kit* aufgereinigt. Hierbei wurde das Extraktionsprotokoll Appendix B Protokoll für kultivierte Zellen (Verweis auf Protokoll für Blut und Körperflüssigkeiten), wie von Hersteller empfohlen, befolgt. Die DNA wurde bei 4 °C gelagert.

Tabelle 2.21: DNA-Extraktionspuffer

Stocklösung	Endkonzentration	Volumen	frisch hinzufügen	Stocklösung
NaCl (5 M)	0,1 M	2 ml		Proteinase K (10 mg/ml)
Tris-HCl (1 M, pH 8)	0,01 M	1 ml		SDS (10 %)
EDTA (0,5 M, pH 8)	0,025 M	5 ml		
SDS (10 % (w/v))	0,5 % (v/v)	5 ml		
H_2O (Sigma)	Ad 100 ml	87 ml		

2.2.2.2. DNA-*Slot-Blot*

Isolierte DNA behandelter Zellen wurde mittels *Slot-Blot* Technik auf ihren DNA-Methylierungsstatus untersucht. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe in Wasser erstellt zu je 1, 0,5 und 0,25 ng/µl. Pro Slot wurden je 200 µl Probe aufgetragen, dementsprechend 200, 100 und 50 ng DNA und mittels Vakuum auf eine positiv geladene Nylon-Membran übertragen. Der *Slot-Blotter* wurde dabei nach dem Herstellerprotokoll zusammengesetzt (Whatman Papier unter der Membran). Die Membranen wurden für 15-20 min luftgetrocknet und die DNA anschließend durch UV-Bestrahlung mit der Membran quervernetzt (20 sek, 1200 mJ/cm^2). Es wurden jeweils drei gleiche Membranen vorbereitet. Die erste Membran wurde 5 min mit Methylenblau-Lösung (0,02 % Methylenblau in 0,3 M Natriumacetat pH 5,2) gefärbt, um gleichmäßige Ladung und Verdünnung der verschiedenen DNA-Proben zu überprüfen. Die Entfärbung erfolgte mit Millipore Wasser. Die anderen beiden Membranen wurden zunächst in Blocking-Puffer (5 % (w/v) Milchpulver in PBST (PBS mit 0,1 % (v/v) Tween)) auf einem Rollenschüttler bei RT für 1 h blockiert und anschließend über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper gegen 5mC (5-Methylcytosin) bzw. 5hmC (5-Hydroxymethylcytosin) in Blocking-Puffer inkubiert. Nach drei Waschschritten mit PBST (je 5 min) wurden die Membranen mit den entsprechenden Sekundär-Antikörpern (in Blocking-Puffer) für 2 h bei RT rollend inkubiert. Antikörper und Verdünnungen sind in Tabelle 2.16 (Abschnitt 2.1.11) zu finden. Nach erneutem Waschen (3x 5 min in PBST) wurden die Membranen mit HRP (*horse raddish*

peroxidase)-Substrat 5 min im Dunkeln inkubiert und die Blot Signale mit dem *ChemiDoc Imaging System* detektiert.

2.2.2.3. RNA-Isolation

Je nach benötigter RNA-Menge wurde pro Bedingung je 1 Well einer 6-Well-Platte (150000 Zellen) oder eine T75-Flasche ($1{,}1x10^6$ Zellen) ausplattiert und am nächsten Tag entsprechend mit Epi-drugs oder Lösungsmittelkontrolle behandelt. Nach 16 h wurden die Zellen durch Trypsinieren (siehe 2.2.1.1.1) geerntet. RNA aus wurde mittels *RNeasy Mini Kit* aus Zelllinien nach dem Herstellerprotokoll isoliert. Die RNA-Konzentration und Reinheit (260/280; 260/230) wurde mittels *NanoDrop* bestimmt und bei -20 °C gelagert.

2.2.2.4. RNA-Sequenzierung (RNA-Seq)

Die Schritte der RNA-Sequenzierung wurden im Labor für *Genomics & Transcriptomics* der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Dazu wurden die RNA-Proben zunächst Quantifiziert (*Qubit RNA HS Assay*, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) und die Qualität mittels Elektrophorese überprüft (*Fragment Analyzer* und *Total RNA Standard Sensitivity Assay* (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). Aus 300 ng RNA wurde eine „Fragmentbibliothek“ nach Herstellerprotokoll erstellt und amplifiziert (*VAHTS Stranded mRNA-Seq Library Prep Kit*) und über *beads* aufgereinigt. Diese „Fragmentbibliotheken“ wurden normalisiert und mit dem *HiSeq 3000/4000 System* (Illumina, Inc., Berlin, Deutschland) sequenziert (*read setup* 1 x 150 bp). *Adapter trimming* und *demultiplexing*, sowie Dateikonvertierung zu fastq-Dateien wurden mittels des *bcl2fastq tool* durchgeführt. Die Datenanalyse der fastq-Dateien erfolgte mittels *clc genomics workbench* (Version 12.0.2; Qiagen, Hilden, Deutschland). Die *Reads* wurden gegen die genomische Sequenz *Homo sapiens (hg38)* (May 25, 2017) kartiert. Die statistische Analyse wurde mit dem *Differential Expression in two groups' tool* (Version 1.02, Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Zusätzlich zu den so erhaltenen unkorrigierten *p*-Werten wurden über *„false discovery rate“* (FDR) und Bonferroni die korrigierten *p*-Werte ermittelt.

2.2.2.5. Reverse Transkription

Zur Erstellung von cDNA wurden 1000 ng RNA revers transkribiert. Pufferbedingungen sowie *Thermal Cycler* Konditionen sind Tabelle 2.22 zu entnehmen. Aus dem 20 µl Ansatz wurden 19 µl entnommen und mit 304 µl H_2O (Sigma) verdünnt. Die verdünnte cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2.22: Zusammensetzung und Reaktionsbedingungen der reversen Transkription

Reaktionsansatz			*Thermal Cycler* Programm	
Reagenz	**Volumen**		**Temperatur**	**Zeit**
1000 ng RNA (verdünnt mit RNase freiem H_2O)	12,5 µl		50 °C	30 min
dNTP Mix (10 mM)	1 µl		85 °C	5 min
Oligo(dT)$_{18}$ Primer (0,5 µg/µl)	1 µl		4 °C	∞
Reverse Transkriptase Puffer (5x)	4 µl			
RiboLock RNase Inhibitor (40 U/µl)	0,5 µl			
Maxima H Minus Reverse Transkriptase (200 U/µl)	1 µl			

2.2.2.6. Quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR)

Zur Analyse und Validierung der Genexpression der RNA-Seq-Daten wurde eine qRT-PCR durchgeführt. Dazu wurde die unter 2.2.2.5 beschriebene cDNA verwendet. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2.14 (Abschnitt 2.1.10) gelistet. Die qRT-PCR setzte sich wie in Tabelle 2.23 gezeigt zusammen. Pro Well der 384-Well-Platte wurden 5 µl des Reaktionsansatzes in Triplikaten pipettiert und mit dem *CFX384 Touch Thermal Cycler* analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels *CFX Maestro Software* und Microsoft Excel. Dazu wurde der Cq-Wert einzelner Gene gegen die beiden *Housekeeper GAPDH* und *ACTB* normalisiert (ΔCq), anschließend die Epi-Drug-Behandlung gegen die Kontrolle normalisiert (ΔΔCq) und somit der *Fold Change* (x-fache Veränderung) berechnet.

Tabelle 2.23: Reaktionsansatz und -bedingungen der qRT-PCR

Reaktionsansatz pro Triplikat		PCR-Programm		
Reagenz	**Volumen**	**Temperatur**	**Zeit**	**Zylen**
Verdünnte cDNA	8,5 µl	95 °C	2 min	
Primer F (10 µM)	0,5 µl	95 °C	10 s	39x
Primer R (10 µM)	0,5 µl	60 °C	30 s	
Luna Universal qPCR Master Mix	7,5 µl		Detektion	
		95 °C	30 s	
		95-65 °C in 0,5°C Schritten	Schritt je 5 s	Schmelz-kurve
			Detektion	

2.2.3. Biochemische Methoden

2.2.3.1. Histon-Isolation

Pro Epi-Drug wurden je 3 Wells einer 6-Well-Platte (150000 Zellen) ausplattiert und am nächsten Tag entsprechend behandelt. Nach 16 h wurden die Zellen durch Trypsinieren (siehe 2.2.1.1.1) geerntet. Die Isolation von Histonextrakten erfolgte mit dem *Histone Extraction Kit* nach dem Hersteller Protokoll. Die Zellen wurden dabei in 200 µl *Pre-Lysis Buffer* aufgenommen, nach Protokoll zentrifugiert (3000 rpm, 5 min, 4 °C) und das resultierende Pellet in 30 µl *Lysis Buffer* aufgenommen. Nach 30-minütiger Lyse auf Eis wurde der

Überstand mit 10 µl *Balance-DTT Buffer* neutralisiert. Histonextrakte wurden bei -80 °C gelagert.

2.2.3.2. Protein-Isolation

Zelllysate wurden mit 1x RIPA-Puffer mit Proteasehemmer-Cocktail (1 cOmplete ULTRA Tablette in 10 ml Puffer) generiert. Zellpellets wurden in 40 µl Puffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden bei 12000 x g, 4 °C pelletiert und das Lysat in ein neues Reaktionsgefäß übertragen. Proteinlysate wurden bei -20 °C gelagert.

2.2.3.3. Bestimmung der Konzentration von Protein- und Histonlysaten

Die Konzentration von Lysaten wurde mittels *BCA Protein Assay Kit* und mithilfe einer Eichgerade verschiedener Albuminkonzentrationen bestimmt. Dazu wurde von Proteinlysaten eine 1:10 Verdünnung (1:3 bei Histonextrakten) des Lysats mit Wasser hergestellt. Es wurden jeweils 10 µl der Proben und Standardreihe auf eine 96-Well Platte aufgetragen und 200 µl frisch hergestellter BCA Lösung (Reagenz A : Reagenz B, 1:50) 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Absorption wurde bei 570 nm detektiert (*iMark Microplate Reader*) und die Konzentration der Proben anhand der Eichgerade bestimmt. Die Standardreihe und Proben wurden dabei in Duplikaten gemessen.

2.2.3.4. Western Blot-Verfahren

Zur Identifikation und Quantifizierung von Proteinen wurden die Proteine zunächst mittels SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) der Größe nach aufgetrennt. Dazu wurden 20 µg Proteinlysat (3 µg Histon Extrakt) mit 4 µl 4x *Roti-Load* vermischt und mit H_2O (Sigma) auf ein Gesamtvolumen auf 16,5 µl eingestellt. Das Gemisch wurde anschließend bei 95 °C 5 min denaturiert und das Kondenswasser kurz abzentrifugiert. Die Proben wurden, zusammen mit einem Protein-Größenstandard in einem 12 %-igen Tris-Polyacrylamid-Gel (Tabelle 2.24) in einer diskontinuierlichen Elektrophorese in 1x Tris/Glycin/SDS Puffer aufgetrennt. Dies erfolgte zunächst bei einer Spannung von 70 V bis zum gänzlichen Einlaufen der Proben in das Sammelgel und anschließend bei 99 V für ca. 2 h. Die aufgetrennten Proteine wurden im *Semi-Dry-Blotting*-Verfahren mittels *Trans-Blot Turbo Transfer System* auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Immobilon-P) übertragen. Dazu wurde die Membran zunächst in Methanol aktiviert und mit Millipore H_2O gewaschen. Der Transfer erfolgte in 1x Tris/Glycin Puffer mit 10 % Methanol bei 25 V für 20 min. Zur Überprüfung des korrekten Transfers wurde die Membran für 5 min mit Ponceau S-Lösung (0,5 % (w/v) Ponceau S in 5 % (v/v) Essigsäure) gefärbt. Die Entfärbung erfolgte mit Millipore H_2O und anschließendem Waschen in PBST. Membranen auf die Histonextrakte

transferiert wurden, wurden für 5 min mit Coomassie-Lösung gefärbt (225 ml H_2O (Millipore), 225 ml Methanol, 50 ml Eisessig, 1,25 g Coomassie), da diese Färbung sensitiver ist. Die Entfärbung erfolgte in Coomassie-Lösung ohne Coomassie.

Danach wurden die Membranen zunächst wie in Abschnitt 2.2.2.2 beschrieben 1 h bei RT in Blocking-Puffer und anschließend über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper inkubiert. Nach drei Waschschritten mit PBST folgte die Inkubation mit entsprechenden Sekundär-Antikörpern für 2 h bei RT. Antikörper und Verdünnungen sind in Tabelle 2.16 (Abschnitt 2.1.11) zu finden. Nach erneutem Waschen wurden die Membranen mit HRP-Substrat inkubiert und die Blot-Signale mit dem *ChemiDoc Imaging System* detektiert.

Sollten mehrere Proteine ähnlicher Größe auf einer Membran detektiert werden, wurden die gebundenen Antikörper mit der sogenannten „*Stripping*"-Methode abgelöst. Dadurch konnte die Membran erneut mit einem primären Antikörper inkubiert werden, ohne dass es bei der Detektion zu Kreuzreaktionen der Sekundärantikörpern kommt. Dazu wurden die Membranen 30 min bei 60 °C in *Stripping*-Lösung (pro Membran: 5 ml 20 % SDS (w/v), 3,125 ml 1,5 M Tris pH 8,8, 390 µl β-Mercaptoethanol, ad 50 ml H_2O (Millipore)) in einem Wasserbad geschüttelt. Danach wurde die Membran zunächst mit Millipore H_2O und anschließend dreimal mit PBST gewaschen. Die Membran wurde dann erneut mit Blocking-Puffer blockiert, gefolgt von Inkubation mit primärem und sekundärem Antikörper.

Pixelintensitäten von Proteinsignalen wurden mit der *Image Lab Software* von Bio-Rad bestimmt und normalisiert.

Tabelle 2.24: Zusammensetzung Tris-Polyacrylamidgel
Angaben für 2 Gele.

Substanz	Trenngel 12 %	Sammelgel 4 %
H_2O (Millipore)	3,3 ml	3,4 ml
Acrylamid 30 %	4 ml	0,83 ml
1,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml	-
1 M Tris pH 6,8	-	0,63
SDS 10 % (w/v)	0,1 ml	0,05 ml
APS 10 % (w/v)	0,1 ml	0,05 ml
TEMED	0,005 ml	0,005 ml

2.2.3.5. Massenspektrometrische Analyse von Histonmodifikationen

Zur Analyse der Histonmodifikationen wurden je 1,1 x 10^6 Zellen in T75-Flaschen ausplattiert und am nächsten Tag durch Austausch des Mediums mit den Epi-Drugs oder dem Lösungsmittel behandelt. Die Zellen wurden nach 16 h dissoziiert, mit PBS gewaschen und 3,5 x 10^6 Zellen bei -80 °C eingefroren. Die quantitative, massenspektrometrische (MS) Analyse der Histonmodifikationen aus generierten Zellpellets erfolgte bei Active Motif (Carlsbad, CA, USA) über den *Mod Spec* Service. Histone wurden über Säure-Extraktion aus Zellpellets isoliert, propionyliert und mit Trypsin verdaut wie durch Zheng *et al.* beschrieben

[198]. Die Proben wurden mit einem *UltiMate 3000 Dionex nano-liquid chromatography system* gekoppeltem Triple-Quadrupol (QqQ) MS (TSQ Quantiva, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) gemessen. Der gesamte Prozess wurde dreimal je Probe wiederholt (Triplikat). Die erhaltenen Rohdaten wurden in *Skyline* mit Savitzky-Golay Glättungsfilter analysiert [199]. Für jede Modifikation wurden mehrere Peptidübergänge quantifiziert, so wurden für jede Aminosäure die Anzahl modifizierter und modifizierter Formen bestimmt. Anhand der Summe aller (un-)modifizierter Formen wurde für jede Modifikation der prozentuale Anteil der Gesamtsumme des Aminosäurerestes berechnet („% of peptide pool"). Zudem wurde von Active Motif eine hierarchische Clusteranalyse (generiert mit der R Funktion *pheatmap*) bereitgestellt. Weitere Darstellungen der Daten wurden mit dem *Circos* Online-Tool erstellt (http://mkweb.bcgsc.ca/tableviewer/) [185].

2.2.3.6. Kinase-Signalweg-Analyse

Zur Untersuchung der Aktivität von Signalwegen unter Epi-Drug-Behandlung wurde das *Proteome Profiler Human Phospho Kinase Array Kit* verwendet. Dafür wurden je $1{,}1 \times 10^6$ Zellen in T-75 Flaschen ausplattiert und am nächsten Tag mit den Epi-Drugs oder dem Lösungsmittel behandelt. Nach 16 h wurden die Zellen durch Trypsinieren (siehe 2.2.1.1.1) geerntet, das Zellpellt mit PBS gewaschen und die Zellen gezählt. Die Zellen wurden dann nach Herstellerprotokoll in 150 µl Lysepuffer aufgenommen und die Proteine extrahiert (anstatt einzelner Proteasehemmer wurde 1 cOmplete ULTRA Tablette in 10 ml Puffer verwendet). Im Anschluss wurde die Konzentration bestimmt (siehe 2.2.3.3), jeweils 400 µg Protein wurden in 2 ml H_2O (Sigma) aufgenommen und mit den Membranen inkubiert. Die weiteren Inkubationsschritte der Membranen wurden nach Herstellerprotokoll ausgeführt. Die Detektion der Signale erfolgte am *ChemiDoc Imaging System*. Die Pixelintensitäten der Signale wurde mit Fiji ImageJ 1.53c ausgewertet [189], die weitere Datennormalisierung erfolgte mit Microsoft Excel.

2.2.4. *In silico* Analysen

2.2.4.1. Oligonukleotid-Design

Oligonukleotid-(Primer-)Paare für qRT-PCR (Tabelle 2.14, Abschnitt 2.1.10) wurden zunächst in der *PrimerBank*-Datenbank https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/index.html [187] gesucht. Konnten hier keine geeigneten Primersequenzen gefunden werden, wurden zunächst geeignete Gensequenzen über die Ensembl (https://www.ensembl.org/index.html) [200] und die CCDS (aus dem Englischen „*consensus coding sequence")* -Datenbank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/CcdsBrowse.cgi) [201] identifiziert und Primerpaare mit dem Online Tool Primer3Plus (https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi) [202] erstellt. Die Auswahl erfolgte unter Standardeinstellungen (Optimum: Größe 20 bp,

Schmelztemperatur 60 °C, GC-Gehalt 50 %) mit einer Produktgröße von 50-250 bp. Nach Möglichkeit wurden Exon-überspannende Primerpaare ausgewählt. Die Spezifität der Primerpaare wurde mittels *in silico*-PCR überprüft (https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr) [203]. Die erstellten Primer wurden bei Sigma-Aldrich/MERCK (Taufkirchen, Deutschland) synthetisiert und vor ihrer Verwendung im Versuch per qRT-PCR an Test-RNA auf Funktionalität (Amplifikation eines Zielgens) und Spezifität (Schmelzkurve des Amplikons mit einem Peak) getestet.

2.2.4.2. Funktionelle Annotation von Genen mit DAVID

Zur funktionellen Einordung der in der RNA-Seq identifizierten deregulierten Gene wurde das Online Tool DAVID Bioinformatics Resources 6.8 (https://david.ncifcrf.gov/) genutzt [191,192]. Listen mit hoch- oder runterregulierten Genen wurden mit den Datenbanken ‚*UniProt Keywords*', ‚*Gene Ontology term biological process direct*' und ‚*molecular function*' sowie ‚*KEGG Pathway*' über die Auswahl ‚*Functional Annotation Chart*' analysiert und somit entsprechenden zellulären Prozessen und Funktionen zugeordnet. Die zehn Funktionszuordnungen mit höchster Signifikanz wurden graphisch mit Wortwolken dargestellt, wobei die Größe der Schrift mit der Signifikanz pro Genliste in Relation steht (https://www.wordclouds.com/ von Zygomatic (Vianen, Niederlande).

2.2.4.3. Protein-Netzwerk-Analysen

Die Interaktionen der in der RNA-Seq identifizierten deregulierten Gene wurden mithilfe der STRING-Datenbank (https://string-db.org) analysiert und graphisch dargestellt, sowie einzelne Gene funktionell farblich hervorgehoben [182,183]. Des Weiteren wurde PINAv3.0 (https://omics.bjcancer.org/pina/) genutzt um innerhalb von hochregulierten Netzwerken potentielle Zielgene und passende Inhibitoren für eine Kombinationstherapie von Epi-Drugs mit kommerziellen Inhibitoren zu finden [190].

2.2.4.4. Re-Analyse von Microarray-Daten

Im Kontext dieser Arbeit wurden bereits publizierte Daten zu Genexpression in KZT-Geweben und Zelllinien erneut analysiert. Die Erhebung der Daten, sowie Folgeanalysen erfolgten in den folgenden Publikationen: [82,83,165,177,178,204–207]. KZT- und normales Hodengewebe wurden mit dem *Affymetrix Expression Array* untersucht (normales Hodengewebe: n = 4, GCNIS: n = 3, SE: n = 4, EC: n = 3, TE: n = 3 und gemischtes Nicht-Seminom n = 4). Die Klassifizierung der genutzten Tumoren erfolgte nach WHO-Richtlinien basierend auf Histologie und GCNIS-Anteil. Die KZT-Zelllinien Analyse der Genexpression wurde mit dem *Illumina HT-12v4 expression microarray* durchgeführt (TCam-2: n = 5, 2102EP: n = 5, NCCIT: n = 4 und JAR: n = 2). Die Expressionsdaten der KZT-Zelllinien sind über die

GEO (aus dem Englischen *„gene expression omnibus“*)-Datenbank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) frei verfügbar: GSE71239, GSE71269, GSE79065, GSE87477 and GSE60698. Basierend auf den Intensitäten von *SOX2* und *SOX17* in SE (*SOX2*$^{-}$ und *SOX17*$^{+}$) und EC (*SOX2*$^{+}$, *SOX17*$^{-}$) wurden Expressionsintensitäten < 10 (Affymetrix) und < 8 (Illumina) als “nicht exprimiert” angesehen. Die resultierenden Darstellungen dieser Analyse wurden mit Excel und dem Venn-Diagramm Online Tool *interactivenn* (http://www.interactivenn.net/) erstellt [184].

2.2.4.5. Analyse öffentlicher Datensätze

Zur Analyse der Daten aus der TCGA-Datenbank [158,208] wurde das Internetportal cBioportal (https://www.cbioportal.org/) genutzt [163,164]. Folgende Testkohorten/Studien wurde dabei analysiert: *Testicular Germ Cell Tumors* (149 Proben, TCGA, *PanCancer Atlas*, basierend auf [157]), *urothelial carcinoma* (413 Proben, TCGA, *Firehose Legacy*), *prostate adenocarcinoma* (501 Proben, TCGA, *Firehose Legacy*), *kidney renal clear cell carcinoma* (538 Proben, TCGA, *Firehose Legacy*) and *kidney renal papillary cell carcinoma* (293 Proben, TCGA, *Firehose Legacy*).

3. Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifikation neuer, epigenetischer Inhibitoren als Therapieoption (Cisplatin-resistenter) KZT.

3.1. Identifizierung potenzieller epigenetischer Ziele in KZT

Dafür wurde zunächst die Expression epigenetischer *Writer*, *Eraser* und *Reader* anhand bestehender Microarray-Daten der KZT-Entitäten GCNIS, SE, EC und TE analysiert (Abbildung 3.1 A) [165,204]. 127 potenzielle Zielgene wurden überprüft von denen 80 in allen Entitäten exprimiert waren, d.h. die Expressionsintensität > $\log_2$10 war (Abbildung 3.1 B). Dieser Schwellenwert wurde anhand der Expression von *SOX2* und *SOX17* in SE und EC gewählt. SE sind *SOX2*$^-$, das heißt *SOX2* ist in SE nicht exprimiert [81,82]. In den Microarray-Daten wurde für SE die Expressionsintensität von *SOX2* mit $\log_2$9,7 und *SOX17* in EC (*SOX17*$^-$) mit $\log_2$9,7 ermittelt. Eine höhere Intensität von > $\log_2$10 soll somit eine Genexpression mit biologischer Relevanz sicherstellen.

In einem weiteren Schritt wurde die Expression dieser 80 Gene auch in KZT-Zelllinien verschiedener Entitäten analysiert (SE: TCam-2; EC: 2102EP, NCCIT; CC: JAR), um *in vitro* Untersuchungen mit potenziellen Inhibitoren zu gewährleisten. Dazu wurden erneut publizierte Microarray-Daten (Illumina Microarray) von KZT-Zelllinien konsultiert (Abbildung 3.2 A) [82,83,177,178,205]. 33 epigenetische Modulatoren waren in allen untersuchten Zelllinien exprimiert (Abbildung 3.2 B). Der Schwellenwert (> $\log_2$8) wurde auch hier über die *SOX2-bzw. SOX17*-Expressionen in SE (TCam-2, $\log_2$7,2 bzw. $\log_2$10,7) und EC (2102EP, $\log_2$9,9 bzw. $\log_2$6,7) definiert. Basierend auf einer hohen Spezifität für die Zielstruktur konnten 14 Inhibitoren gegen diese 33 Zielgene gefunden werden. Dazu zählen HDACi, HDMi, HMTi, PAHi, PRCi und DNMTi (Abbildung 3.2 C). Zusätzlich wurden zwei neuartige PROTACs (aus dem Englischen „*proteolysis targeting chimera*“) VZ185 gegen BRD7/BRD9 und MZ-1 gegen BRD4 in die Studie einbezogen [209,210]. PROTACs sind keine herkömmlichen Inhibitoren, sondern besitzen zwei durch einen Linker verbundene Liganden: einen für das Zielmolekül und einen weiteren für die Von Hippel-Lindau (VHL)-E3 Ubiquitinligase. Das Funktionsprinzip besteht darin, dass die E3-Ligase das Zielmolekül durch die räumliche Nähe polyubiquitiniert und somit für die Proteolyse markiert [211]. Die Zusammensetzung der PROTACs sowie die Strukturformeln aller untersuchten Inhibitoren sind in Anhang 2 und Anhang 3 beigefügt.

Den Microarray-Daten zufolge liegen nur niedrige mRNA-Level von *BRD4* und *EZH2* in KZT-Zelllinien vor. Jedoch konnten frühere Studien erfolgreich BET Proteine in KZT inhibieren und somit therapieren, da das BRD4-Protein trotzdem vorhanden ist [178]. Im Zuge dieser Arbeit konnte das Vorhandensein von BRD4 auf Proteinebene ebenfalls bestätigt, sowie das Vorliegen von EZH2 in den KZT-Zelllinien TCam-2, 2102EP, JAR und GCT72 nachgewiesen werden (Abbildung 3.2 D). Des Weiteren konnte das für die Funktion der PROTACs nötige

Vorhandensein der VHL-E3-Ubiquitinligase mittels Western Blot validiert werden (Abbildung 3.2 D). Somit stellen BRD4 und EZH2 in KZT therapierbare Ziele dar und die Voraussetzungen für den Einsatz von PROTACs sind gewährleistet. Insgesamt konnten also 16 Epi-Drugs gegen verschiedene Enzymklassen identifiziert werden (Tabelle 3.1).

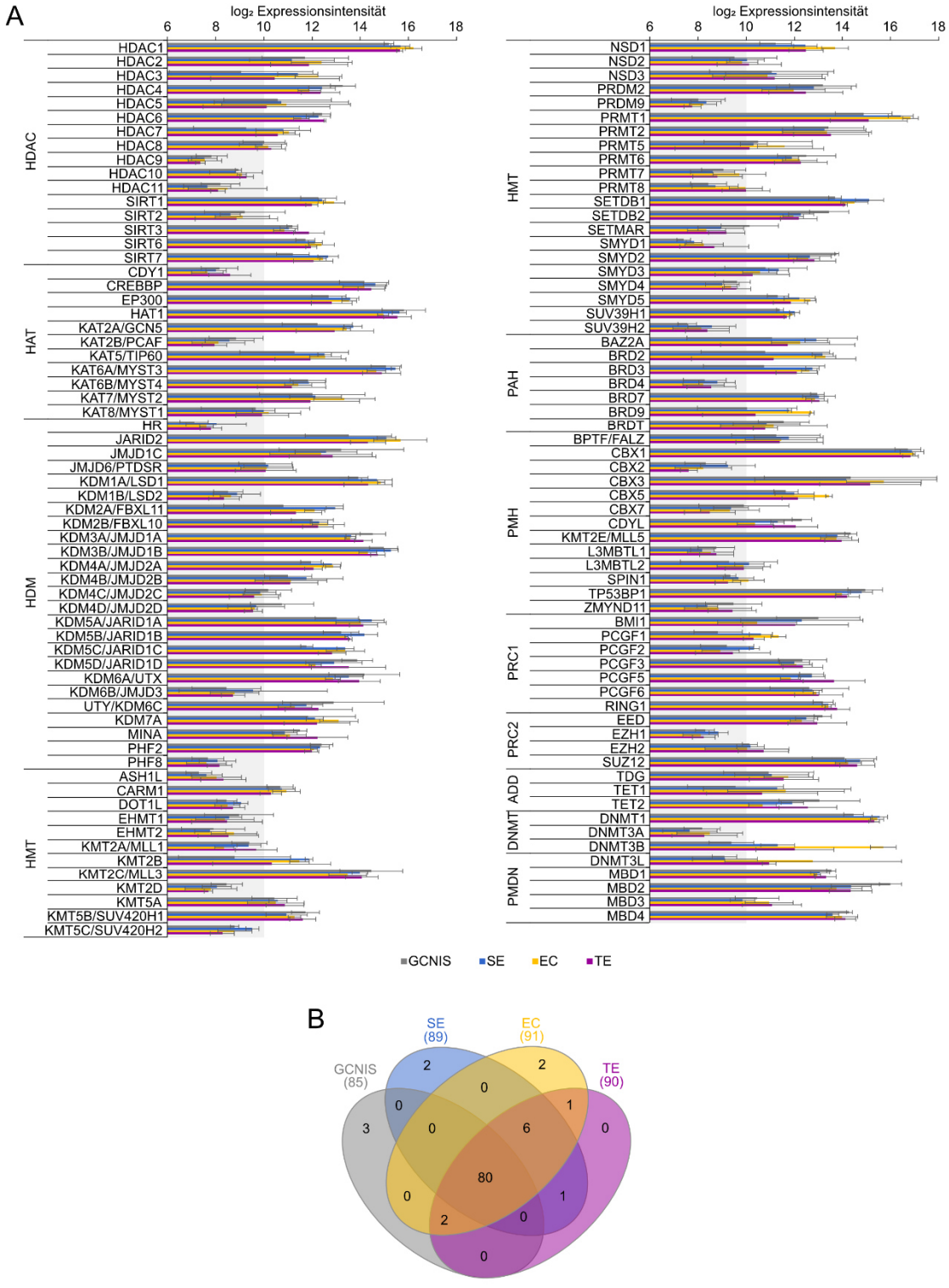
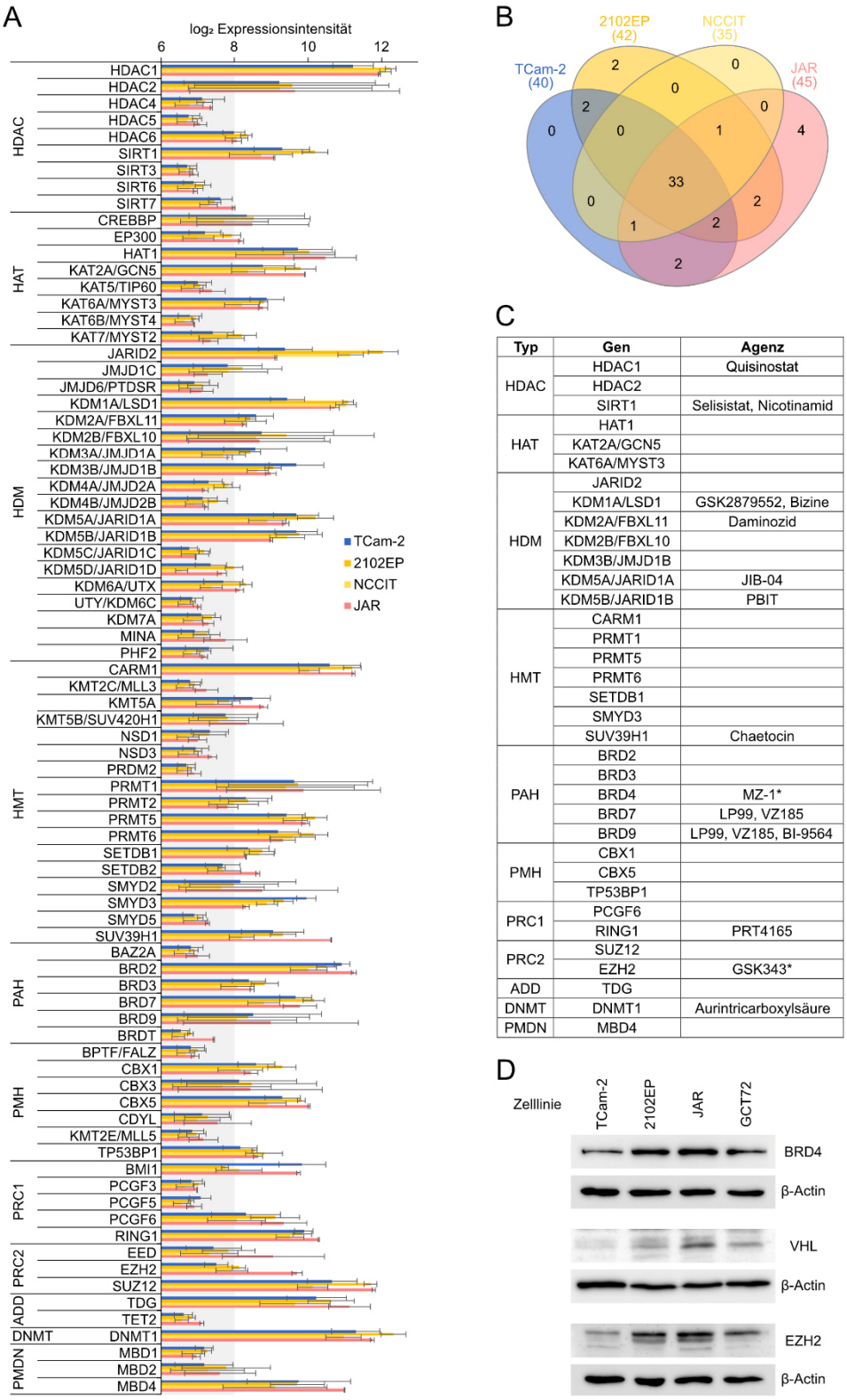


Abbildung 3.1: Identifizierung 80 potenzieller epigenetischer Zielgene in KZT-Geweben
A) Analyse der Expressionsintensität epigenetischer Modifikatoren in bereits publizierten Microarray-Daten (Affymetrix-Microarray) von KZT-Gewebeproben. B) Venn-Diagramm mit Identifizierung 80 gemeinsam exprimierter Gene in KZT-Geweben. Modifiziert nach Müller *et al.* [212].



Typ	Gen	Agenz
HDAC	HDAC1	Quisinostat
	HDAC2	
	SIRT1	Selisistat, Nicotinamid
HAT	HAT1	
	KAT2A/GCN5	
	KAT6A/MYST3	
HDM	JARID2	
	KDM1A/LSD1	GSK2879552, Bizine
	KDM2A/FBXL11	Daminozid
	KDM2B/FBXL10	
	KDM3B/JMJD1B	
	KDM5A/JARID1A	JIB-04
	KDM5B/JARID1B	PBIT
HMT	CARM1	
	PRMT1	
	PRMT5	
	PRMT6	
	SETDB1	
	SMYD3	
	SUV39H1	Chaetocin
PAH	BRD2	
	BRD3	
	BRD4	MZ-1*
	BRD7	LP99, VZ185
	BRD9	LP99, VZ185, BI-9564
PMH	CBX1	
	CBX5	
	TP53BP1	
PRC1	PCGF6	
	RING1	PRT4165
PRC2	SUZ12	
	EZH2	GSK343*
ADD	TDG	
DNMT	DNMT1	Aurintricarboxylsäure
PMDN	MBD4	

Abbildung 3.2: Identifizierung 35 potenzieller epigenetischer Zielgene in KZT-Zelllinien
A) Analyse der Expressionsintensität der in KZT-Gewebe identifizierten 80 Zielgene epigenetischer Modifikatoren in bereits publizierten Microarray-Daten (Illumina-Microarray) von KZT-Zelllinien. B) Venn-Diagramm mit Identifizierung 30 gemeinsam exprimierter Gene in KZT-Zelllinien. C) Finale Liste mit 35 epigenetischen Zielgenen einschließlich BRD4 und EZH2, sowie geeigneter Inhibitoren bzw. PROTACs. D) Verifizierung der Proteinexpression von BRD4, VHL and EZH2 in KZT-Zelllinien mittels Western Blot. β-Actin diente als Ladekontrolle. Modifiziert nach Müller *et al.* [212].

Tabelle 3.1: Finale Liste der 16 in dieser Arbeit untersuchten Epi-Drugs

Typ	Ziel	Epi-Drug	Referenz
HDACi	HDAC1	Quisinostat	[213]
	SIRT1	Selisistat, Nicotinamid	[214,215]
HDMi	KDM1A/LSD1/AOF2	GSK2879552, Bizine	[216,217]
	KDM2A/FBXL11	Daminozid	[218]
	KDM5A/JARID1A	JIB-04	[219]
	KDM5B/JARID1B	PBIT	[220]
HMTi	SUV39H1	Chaetocin	[221]
PAHi	BRD4	MZ-1	[209]
	BRD7	LP99, VZ185	[210,222]
	BRD9	LP99, VZ185, BI-9564	[210,222,223]
PRC1i	RING1/RNF2	PRT4165	[224]
PRC2i	EZH2	GSK343	[225]
DNMTi	DNMT1	Aurintricarboxylsäure	[226]

3.2. Identifizierung zytotoxisch wirksamer Epi-Drugs in KZT-Zelllinien

Um zunächst einen Überblick über die Wirksamkeit der 16 ausgewählten Epi-Drugs in KZT zu erhalten, wurden die zytotoxischen Effekte in KZT-Zelllinien ermittelt. Dazu wurde die Reduktion der Zellviabilität durch die Epi-Drugs in TCam-2 (SE), 2102EP (EC) und JAR (CC) als Repräsentanten verschiedener KZT-Entitäten, sowie in nicht-malignen Kontrollen (Fibroblasten) mittels XTT-Assay analysiert (Anhang 4). Anhand der aus den Rohdaten berechneten EC_{50}-Werte (nach 48 h) konnten die Epi-Drugs basierend auf ihrer Wirksamkeit klassifiziert werden (Abbildung 3.3 A). Drei der Inhibitoren (Quisinostat, Chaetocin und JIB-04) erwiesen sich als sehr effektiv in der Reduzierung der Zellviabilität in TCam-2 und 2102EP mit Konzentrationen im nanomolaren Bereich. GSK343, PBIT, PRT4165 und LP99 zeigten Wirkung im niedrigen mikromolaren Bereich bis 50 µM. Selisistat, Nicotinamid, GSK2879552, Bizine, Daminozif, BI-9564 und Aurintricarboxylsäure zeigten wenig (EC_{50} > 50 µM), oder keinen Effekt auf die Zellviabilität und wurden daher in weiteren Versuchen nicht berücksichtigt. Die beiden PROTACs MZ-1 und VZ185 erwiesen sich ebenfalls als potenzielle Therapieoptionen mit nanomolaren bzw. niedrig mikromolaren Konzentrationsbereichen. Generell reagierte die Zelllinie JAR (CC) weniger sensitiv auf die Behandlungen, ebenso wie die Fibroblasten.

A

nach 48 h	SE TCam-2	EC 2102EP	CC JAR
Quisinostat	++	++	++
Chaetocin	++	++	+
JIB-04	++	++	+
MZ-1	++	++	+
GSK343	+	+	+
VZ185	+	+	+
PBIT	+	+	O
LP99	+	+	O
PRT4165	+	+	O
Bizine	O	O	O
Selisistat	O	O	O
Aurintricarboxylic Acid	-	-	-
BI-9564	-	-	-
Daminozide	-	-	-
GSK2879552	-	-	-
Nicotinamide	-	-	-

EC_{50} < 1 µM ++ EC_{50} > 50 µM O
EC_{50} < 50 µM + wenig/kein Effekt -

B

		SE	SE-R	EC	EC-R	YST	CC	CC-R	Fibroblast	SC
EC_{50} [nM]	Quisinostat	9.48	13.22	11.55	7.35	6.88	6.94	10.67	>50	6.25
	Chaetocin	122.10	217.50	127.65	160.79	98.73	>1000	232.90	137.93	69.33
	JIB-04	344.60	0.01	1024.12	394.67	67.78	6700.01	1165.00	806.65	82.60
	MZ-1	487.00	63.54	949.17	64.72	4.54	>10000	59.11	>10000	1001.00
EC_{50} [µM]	GSK343	12.06	10.07	10.55	9.41	6.18	10.40	9.06	9.79	10.61
	PBIT	24.77	19.99	39.95	38.43	28.23	71.98	57.16	43.15	24.56
	LP99	34.66	48.97	33.96	44.69	47.16	42.53	67.25	68.22	47.66
	PRT4165	43.36	38.02	57.86	46.05	45.74	56.08	60.05	71.36	53.45

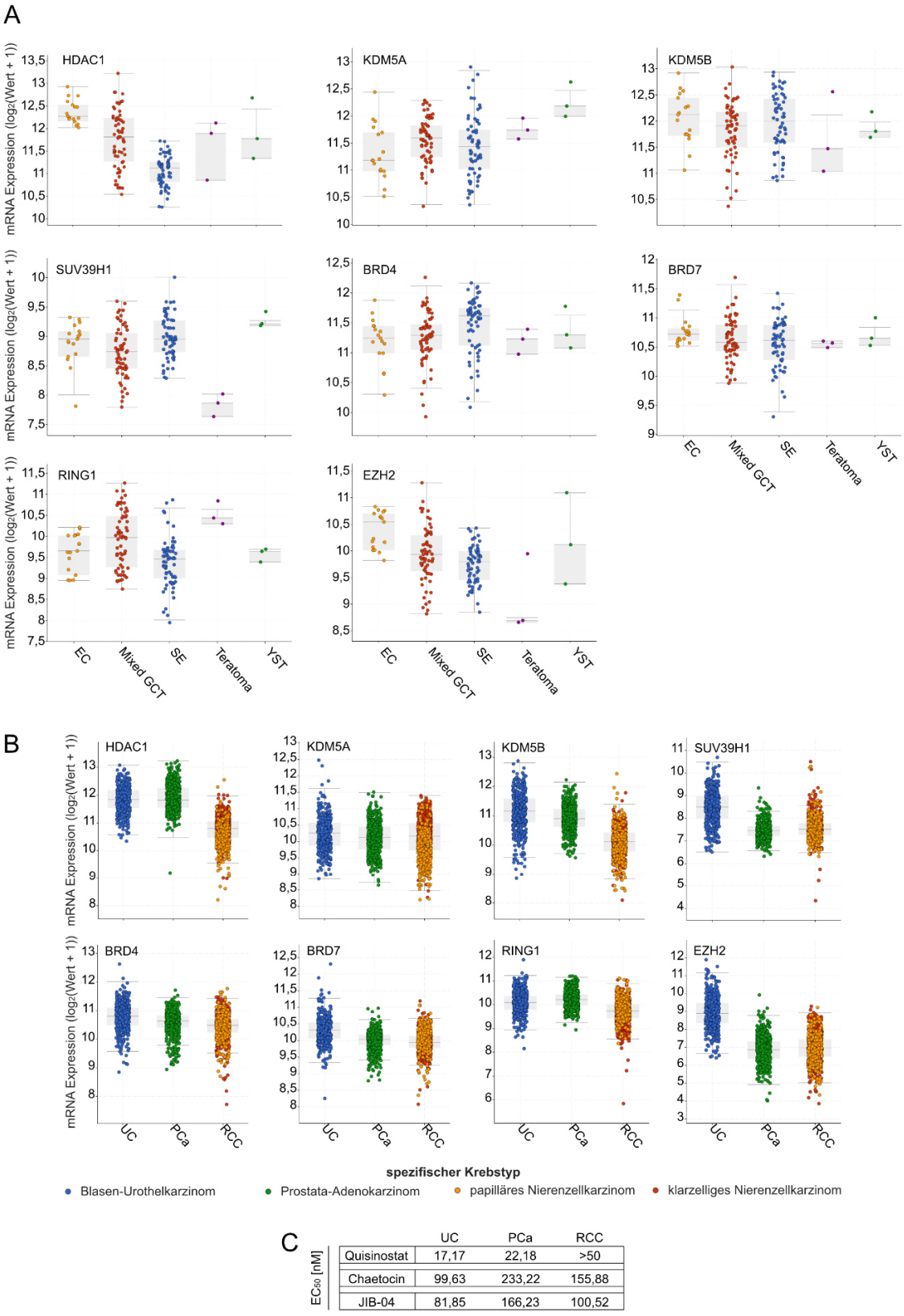
Abbildung 3.3: Übersicht der zytotoxischen Effektivität der Epi-Drugs in KZT-Zelllinien
A) Übersicht der Ergebnisse der ersten Wirkanalyse der 16 Epi-Drugs in drei KZT-Zelllinien. Die Farb-/Zeichenkodierung basiert auf den berechneten EC_{50}-Werten der XTT-Zellviabilitätsassays nach 48 h Behandlung. Die zugehörigen XTT-Zellviabilitätsassay Rohdaten sind in Anhang 4 zu finden. B) Auflistung der gemittelten EC_{50} der verschiedenen KZT-Entitäten und Kontrollzellen nach 48 h. Rohdaten sind in Anhang 5 zu finden, die einzelnen EC_{50}-Werte in Anhang 6 A. Modifiziert nach Müller *et al.* [212].

Die Effekte auf die Zellviabilität der sieben wirksamsten Inhibitoren, sowie MZ-1 als Vertreter der PROTACs, wurden in weiteren Zelllinien getestet, um zellspezifische zytotoxische Effekte auszuschließen und einen besseren Überblick über die Effektivität auf die verschiedenen KZT-Entitäten zu erhalten. Als Vertreter der EC wurden NCCIT und NT2/D1 hinzugezogen, JEG-3 und BeWo als CC und GCT72 und 1411H als YST. Zusätzlich wurden Cisplatin-resistente Subklone (-R) analysiert, sowie weitere Kontrollzellen (HVHF2 und FS1) inkludiert. Die einzelnen Zelllinien wurden dazu anhand ihrer KZT-Subtypen gruppiert und der Mittelwert der EC_{50}-Werte der Behandlungen in Abbildung 3.3 B aufgeführt. Die Werte der einzelnen Zelllinien sind in Anhang 5 und Anhang 6 A zu finden. SE-, EC- und YST-Zelllinien reagierten sensitiv auf die Behandlung mit den getesteten Epi-Drugs, da die Reduktion der Zellviabilität bereits bei niedrigeren Konzentrationen als in Fibroblasten (MPAF, HVHF2) erfolgte (außer in SE mit GSK343 Behandlung) (Abbildung 3.3 B). Dies lässt ein therapeutisches Fenster zur Behandlung dieser KZT mit nur wenig Effekt auf gesundes Gewebe. Die Sertoli-Zelllinie FS1 als Vertreter des Hodenmikromilieus reagierte meist sehr sensitiv auf die Behandlung mit Epi-

Drugs, jedoch auch hier gibt es Agenzien, die in KZT-Zelllinien effektiver sind (MZ-1, GSK343, LP99, PRT4165). CC-Zelllinien reagierten heterogen auf die Epi-Drug-Behandlung, da BeWo ähnlich sensitiv wie SE und EC auf die Behandlung ansprachen, JAR und JEG-3 jedoch deutlich resistenter waren (Abbildung 3.3 B).

Als weitere Validierung der Zielgene der acht wirksamsten Epi-Drugs (Quisinostat, JIB-04, PBIT, Chaetocin, MZ-1, LP99, PRT4165, GSK343) wurden die Expressions- und Mutationsprofile der testikuläre KZT-Kohorte in der „*The Cancer Genome Atlas*“ (TCGA) Datenbank analysiert [157,158,208]. Die Auswertung erfolgte dabei über die online Plattform cBioPortal [163,164] (Abbildung 3.4 A, Anhang 6 B). Generell war die Mutationslast in den Zielgenen sehr gering mit der höchsten Rate bei 6 % in *KDM5A* (JIB-04 Zielgen) in 144 Patienten (Anhang 6 B). Häufiger waren dagegen Unterschiede in der mRNA-Expression gegenüber gesundem Gewebe, beispielsweise hohe mRNA-Expression von *EZH2* (GSK343 Zielgen) und *HDAC1* (Quisinostat Zielgen) in 17 % bzw. 13 % der Patientenproben. Zusätzlich wurde die generelle mRNA Expression der Zielgene auch in der TCGA-KZT-Kohorte überprüft. Alle Zielgene waren auch in diesen Proben exprimiert mit dem niedrigsten mRNA-Level für *SUV39H1* in YST. Dies bestätigte zusätzlich die potenzielle Nutzung der ausgewählten Epi-Drugs in KZT (Abbildung 3.4 A).

Zusätzlich wurde der mögliche Einsatz der Epi-Drugs Quisinostat, JIB-04, PBIT, Chaetocin, MZ-1, LP99, PRT4165 and GSK343 auch in anderen malignen, urologischen Tumoren überprüft: dem Urothelkarzinom (UC), dem Prostatakrebs (PCa) und dem klaren Nierenzellkarzinom (RCC) (Abbildung 3.4 B). Auch in diesen Tumoren waren alle Zielgene exprimiert, mit Ausnahme von *EZH2* (GSK343) welches nur niedrige Level in PCa und RCC aufwies. Die drei wirksamsten Epi-Drugs Quisinostat, JIB-04 und Chaetocin wurden daraufhin in je drei Zelllinien dieser urologischen Tumoren getestet (UC: VM-CUB-1, RT-112, SCaBER; PCa: DU145, PC-3, LNCap; RCC: Caki-1, 786-O, ACHN) (Abbildung 3.4 C, Anhang 6 C-F). Der HDACi Quisinostat war weniger potent als in den KZT-Zelllinien, wirkte aber dennoch in niedrigen nanomolaren Konzentrationen in UC- und PCa-Zelllinien (< 50 nM). JIB-04 und Chaetocin dagegen waren auch in diesen urologischen Entitäten sehr toxisch.



C

EC_{50} [nM]	UC	PCa	RCC
Quisinostat	17,17	22,18	>50
Chaetocin	99,63	233,22	155,88
JIB-04	81,85	166,23	100,52

Abbildung 3.4: Expressionsprofile der acht wirksamsten Epi-Drug-Ziele in KZT- und weiteren urologischen Entitäten
A) TCGA-Expressionsprofile der Zielgene in KZT-Patientenproben, aufgeteilt nach KZT-Entität. B) TCGA-Expressionsprofile der Zielgene in weiteren urologischen Tumorarten UC, PCa und RCC. C) Auflistung der gemittelten EC_{50} der UC-, PCa- und RCC-Zelllinien nach 48 h. Die Rohdaten der XTT-Zellviabilitätsassays, sowie die EC_{50} Werte pro Zelllinie sind in Anhang 6 C-F zu finden. Die XTT-Analysen zu Quisinostat in den allen UC-, PCa- und RCC-Zelllinien wurden von Alexa Stephan durchgeführt. Die XTT-Analysen zu JIB-04 und Chaetocin wurden von mir selbst durchgeführt. Modifiziert nach Müller *et al.* [212].

3.3. Epi-Drugs induzieren Apoptose und Zellzyklusarrest

Zur weiteren Analyse der zytotoxischen Effekte wurden Untersuchungen zur Apoptose- oder Zellzyklusinduktion durchgeführt, um zu bestimmen, ob die reduzierte Zellviabilität auf diese Effekte zurückzuführen ist. Dazu wurden TCam-2, 2102EP(-R), JAR, GCT72 und MPAF als Vertreter der verschiedenen KZT-Entitäten und Fibroblasten mit den entsprechenden EC_{50}-Konzentrationen der acht besten Epi-Drugs (Quisinostat, JIB-04, Chaetocin, MZ-1, LP99, PRT4165 und GSK343) für 16 h behandelt und durchflusszytometrisch analysiert. Der Zeitpunkt wurde mit 16 h relativ früh gewählt, um einen Großteil der Zellen in der beginnenden Apoptose zu detektieren, da die Zellviabilität bereits nach 24 h rapide abnimmt (Anhang 5). Die Ermittlung der Apoptose-induktion erfolgte durch gleichzeitige Färbung der Zellen mit Annexin V und PI, die Zellzyklusanalyse durch Fixierung und Permeabilisierung der Zellen mit anschließender PI-Färbung (Abbildung 3.5, Anhang 7).

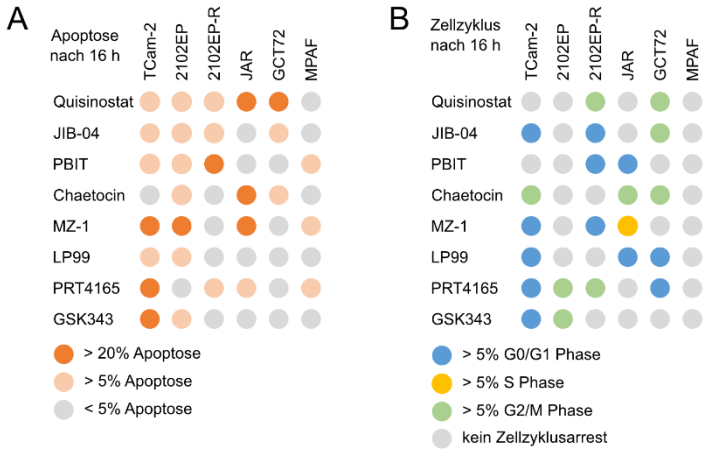


Abbildung 3.5: Epi-Drugs induzieren Apoptose und Zellzyklusarrest in KZT
Durchflusszytometrische Analyse der Induktion von Apoptose (A) und Zellzyklusarrest (B). Die angegebenen Zelllinien wurden für 16 h mit verschiedenen Epi-Drugs behandelt. Nur Änderungen im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle von über 5 % wurden berücksichtigt. Die Rohdaten sind in Anhang 7 zu finden. Modifiziert nach Müller *et al.* [212].

Die getesteten Epi-Drugs führten in der Mehrheit der getesteten KZT-Zelllinien zur Induktion von Apoptose oder einem Zellzyklusarrest. In TCam-2 und 2102EP führten alle Inhibitoren entweder zur Induktion von Apoptose oder zum Zellzyklusarrest (in TCam-2: JIB-04, MZ-1, LP99, PRT4165, GSK343 und 2102EP: PRT4165 und GSK343 auch beides). In JAR und GCT72 führte die Behandlung mit PBIT, LP99 und GSK343 nicht zur Induktion von Apoptose (Abbildung 3.5 A). In den Fibroblastenzellen MPAF folgte nur durch die Behandlung mit PBIT, MZ-1 und PRT4165 die Induktion von Apoptose, es wurde jedoch kein Zellzyklusarrest detektiert. Der Cisplatin-resistente Subklon 2102EP-R reagierte anders als die parentale Linie nicht mit Induktion von Apoptose auf die Behandlung mit Chaetocin, MZ-1, LP99 oder GSK343. Stattdessen führte MZ-1-Behandlung in 2102EP-R zu einem G1-Zellzyklusarrest. Generell war die Deregulation des Zellzyklus zelllinienabhängig, jedoch führte die Behandlung

mit Quisinostat oder Chaetocin eher zu einem G2/M-Arrest, während PBIT, LP99 und teilweise MZ-1 eher zu einem G1-Arrest führten (Abbildung 3.5 B).
Zusammenfassend wurden durch die getesteten Epi-Drugs zelllinienspezifisch sowohl Apoptose als auch Zellzyklusarrest in KZT-Zelllinien induziert. In Fibroblasten waren diese Effekte generell weniger stark ausgeprägt.
Aufgrund großer Ähnlichkeiten der Zielmoleküle der Inhibitoren JIB-04 und PBIT (Jumonji-Histondemethylasen KDM5A und KDM5B) wurde PBIT aus weiteren molekularen Analysen aufgrund der höheren EC_{50}-Konzentrationen im Vergleich zu JIB-04 ausgeschlossen.

3.4. Behandlung mit Epi-Drugs verursacht epigenetische Nebeneffekte

Um die postulierten Effekte der verschiedenen Epi-Drugs auf die epigenetische Landschaft zu bestätigen und mögliche, bisher unbeschriebene Veränderungen zu untersuchen, wurde eine massenspektrometrische (MS) Analyse der Histonmodifikationen durchgeführt (Rohdaten in Anhang 8). Dazu wurde die Zelllinie 2102EP (EC) jeweils für 16 h mit den verschiedenen Epi-Drugs Quisinostat, JIB-04, MZ-1, LP99, PRT4165 oder GSK343 sowie dem Lösungsmittel (DMSO) als Vergleich behandelt. Dieser Versuchsansatz erlaubte die simultane Detektion von *on* und *off target*-Effekten. Die *on target*-Effekte (primäre Effekte) sind dabei die durch die Inhibition von epigenetischen Regulationen erwarteten Veränderungen (z.B. Histonacetylierung unter HDAC-Inhibition). Die potenziellen Nebeneffekte (*off target*-Effekte, sekundäre Effekte) auf die epigenetische Landschaft sind dagegen nicht direkt auf die Inhibition des Zielmoleküls zurückzuführen. Die Ergebnisse der MS Untersuchung wurden zunächst als hierarchische *Cluster*-Analyse in einer *Heatmap* dargestellt, um einen generellen Überblick über die globalen Änderungen zu erhalten (Abbildung 3.6). In einem weiteren Schritt wurden die Histonmodifikationen nach Peptidhäufigkeit gruppiert (> 10 %, > 1 %, < 1 %). Dadurch wurde ein besserer Vergleich einzelner Histonmodifikationen untereinander ermöglicht, bei dem gleichzeitig die natürliche Häufigkeit der verschiedenen Modifikationen berücksichtigt wird (Abbildung 3.7). Unter diesem Aspekt nahmen vor allem Modifikationen mit niedriger Häufigkeit (< 10 %) unter Behandlung mit Epi-Drugs zu.

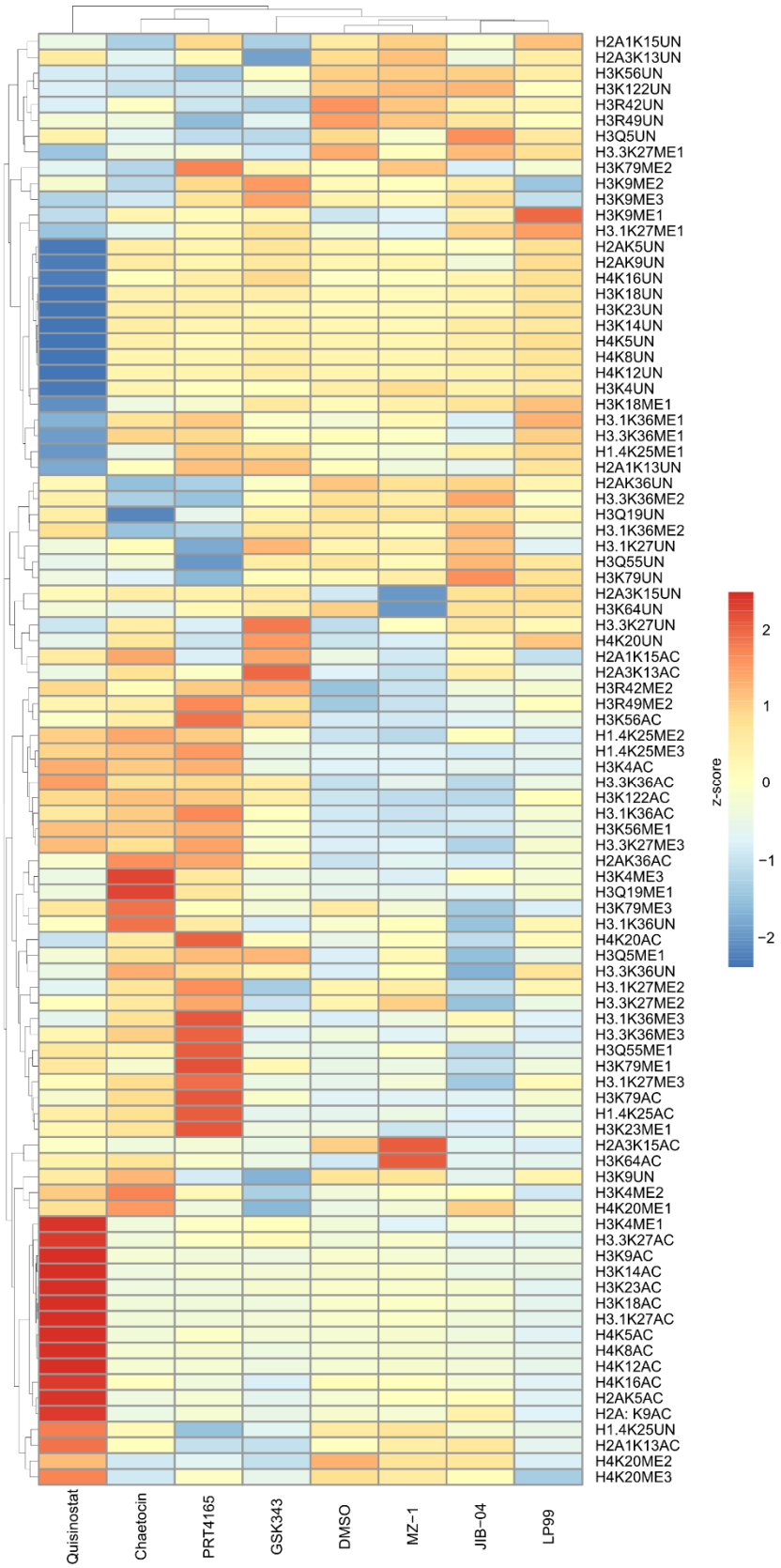


Abbildung 3.6: Hierarchische *Cluster-Heatmap* der MS-Daten zur Analyse der Histonmodifikationen
Globale Analyse der Veränderungen in der epigenetischen Landschaft auf Histonebene durch Epi-Drug-Behandlung in der Zelllinie 2102EP, dargestellt in einer „*unsupervised clustering heatmap*“ (bereitgestellt durch den MODSpec-Service von Active Motif). Die Zellen wurden für 16 h mit den entsprechenden Epi-Drugs oder der Lösungsmittelkontrolle behandelt. Die Rohdaten sind in Anhang 8 zu finden. Modifiziert nach Müller *et al.* [212].

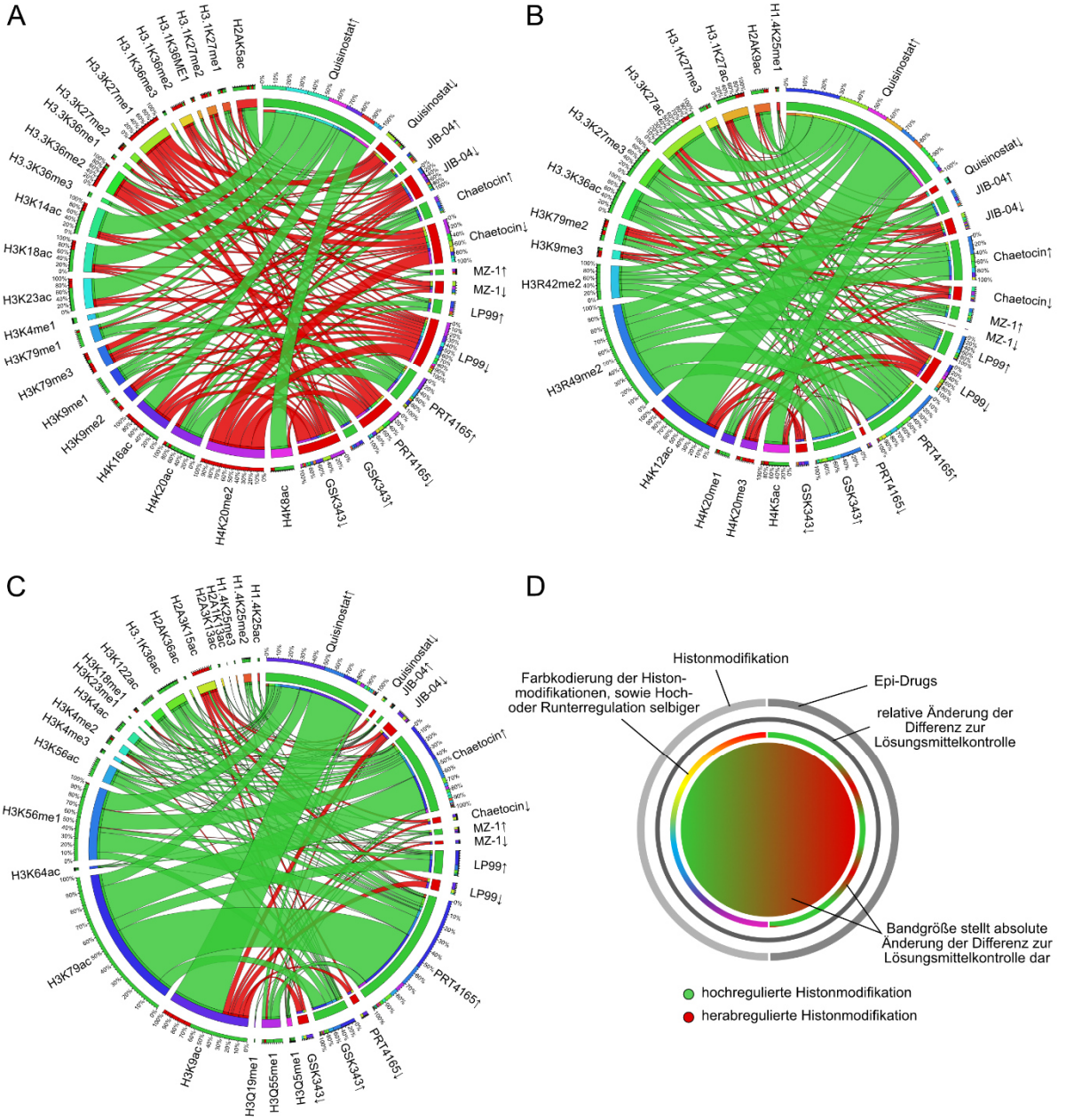


Abbildung 3.7: MS-Analyse der Histonmodifikationen getrennt nach Peptidhäufigkeit
Cirkos Diagramme stellen die Differenz der Häufigkeiten einzelner Histonmodifikationen von mit Epi-Drugs behandelten 2102EP im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle dar. Die Histonmodifikationen wurden nach Peptidhäufigkeiten aufgeteilt: häufige Peptide mit einer Frequenz von 10-100 % (A), niedrige Frequenz 1-10 % (B) und seltene Peptide 0-1 % (C). Nur Änderungen in der Frequenz > 1 (A, 10-100 %), > 0,1 (B, 1-10 %) und > 0,01 (0,1-1 %) wurden berücksichtigt. D) Schematische Darstellung eines Circos-Diagramms und wie diese zu lesen sind. ↑: hochreguliert (grün), ↓: herabreguliert (rot). Die Rohdaten sind in Anhang 8 zu finden. Modifiziert nach Müller *et al.* [212].

Erwartungsgemäß konnte durch HDACi Quisinostat ein starker Anstieg der Histonacetylierung an H3 und H4 beobachtet werden, mit Ausnahme von H4K20ac und H2A3K15ac, die weniger häufig acetyliert vorlagen (Abbildung 3.6, Abbildung 3.7 A-C, Abbildung 3.8 A). Zusätzlich wurden weitere Effekte auf die Histonmodifikationen identifiziert, wie einen Anstieg der Histonmethylierungen (H3K4me1, H3.3K27me3, H3K56me1, H4K20me1/3). Es ist bekannt, dass JIB-04 KDM5A/JARID1A inhibiert, eine Histondemethylase die speziell Methylgruppen

von di- und trimethylierten H3K4 entfernt [227]. Einen durch JIB-04 verursachten Anstieg von H3K4me2/me3 konnte auch massenspektrometrisch nachgewiesen werden (Abbildung 3.7 C, Abbildung 3.8 B). Die Behandlung mit HMTi Chaetocin und GSK343 führte zu einer reduzierten Methylierung der entsprechenden Ziele. Bei Inhibition der H3K9-di/tri-Methyltransferase SUV39H1 [228,229] (Chaetocin) konnte ein Abfall von H3K9me2/me3 mit gleichzeitigem Anstieg von H3K9me1 beobachtet werden (Abbildung 3.6, Abbildung 3.7 A, B, Abbildung 3.8 C). Ähnlich führte die Inhibition der Methytransferase EZH2/PRC2 generell zu einer reduzierten Methylierung an H3K27 [230,231], mit Ausnahme von H3.1K27me1, H3.3K27me3 (leichter Anstieg) und H3.1K27me3 (unverändert) (Abbildung 3.6, Abbildung 3.7 A, B, Abbildung 3.8 D). Als Nebeneffekte der HDMi und HMTi konnten Änderungen in der Histonacetylierung beobachtet werden. So waren H4K16 und H4K20 unter JIB-04 Behandlung weniger acetyliert, wohingegen beide HMTi Chaetocin und GSK343 zu einem Anstieg von H4K20ac führten (Abbildung 3.7 A). Des Weiteren traten auch veränderte Histonmethylierungen *off target* auf, beispielsweise nach JIB-04 Behandlung: weniger H3K27me2 und H3K79me3; Chaetocin Behandlung: weniger H4K20me2/me3, mehr H4K20me1 und H3K4me2/me3; GSK343 Behandlung: weniger H3K4me2 und H4K20me2 (Abbildung 3.6, Abbildung 3.7).

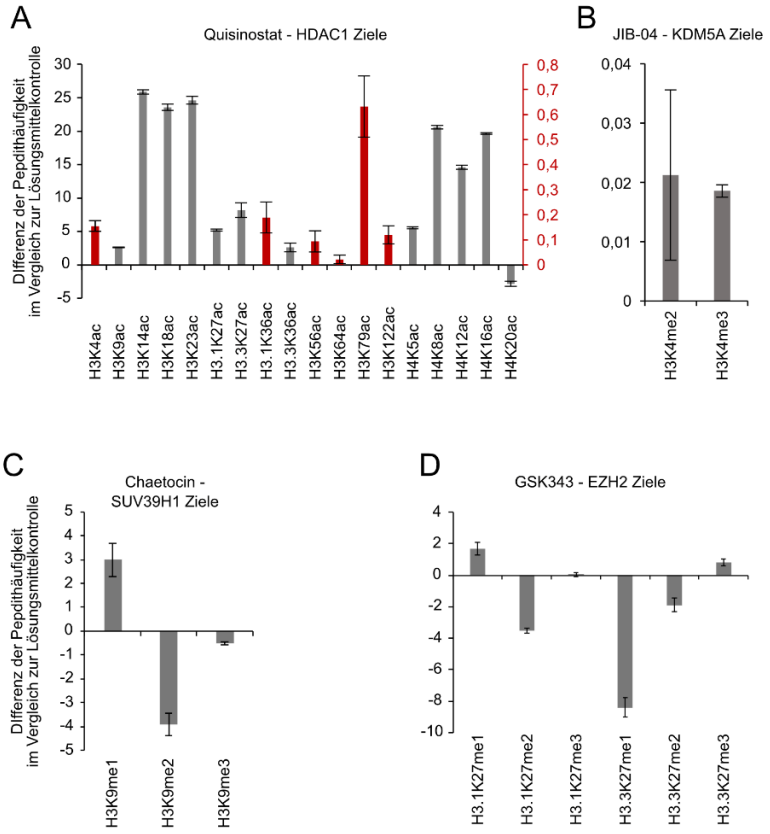


Abbildung 3.8: Erwartete Effekte der Epi-Drugs auf Histonmodifikationen
Balkendiagramme mit Änderungen postulierter Histonmodifikationsänderungen durch Inhibition des Zielenzyms A) HDAC1 (Quisinostat), B) KDM5A (JIB-04), C) SUV39H1 (Chaetocin) und D) EZH2 (GSK343). In A) sind Histonmodifikationen sehr unterschiedlicher Häufigkeit dargestellt und daher den Farben entsprechend der Skalierung zuzuordnen. Die Rohdaten sind in Anhang 8 zu finden. Modifiziert nach Müller *et al.* [212].

Die Behandlung mit PRT4165, einem PRC1 Inhibitor, welche zu einer Reduktion der H2AK19 Ubiquitinierung (ub) führt [224], konnte nicht anhand der MS-Analyse ermittelt werden, da diese nicht detektiert wurde. Allerdings konnten auch hier Nebeneffekte auf andere Histonmodifikationen gefunden werden, beispielsweise ein Anstieg von H3K36me3, H4K20ac und H3K79me1/ac (Abbildung 3.6, Abbildung 3.7 A, C). Unerwartet waren Veränderungen der epigenetischen Modifikationen, welche unter Verwendung von Agenzien gegen *Reader* der Histonacetylierung (MZ-1, LP99) gefunden wurden. BRD7/9-Inhibitor LP99 führte dabei zu einem generellen Verlust der Histonacetylierungen und einigen Lysinresten mit vermehrter Methylierung (H3K9me1, H3K27me1, H3K26me1) (Abbildung 3.6, Abbildung 3.7 A). Die Behandlung mit dem PROTAC MZ-1 mit BRD4 als Ziel zeigte die größte Ähnlichkeit zur Lösungsmittelkontrolle auf, wobei nur zwei Modifikationen signifikant verändert waren (Anstieg in H3K64ac und H2A3K15ac) (Abbildung 3.6, Abbildung 3.7 C). Unter allen Behandlungen mit den getesteten Epi-Drugs konnte ein Anstieg in H3R42me2 und H3R49me2 beobachtet werden (Abbildung 3.7 B).

Da in der MS-Analyse die Ubiquitinierung nicht untersucht wurde, erfolgte eine Analyse mittels Western Blot. Hier konnte eine Verringerung von H2AK119ub nach Behandlung mit PRT4165 nachgewiesen werden, jedoch erst nach 48 h Behandlung (Abbildung 3.9 A). Zur Validierung der MS-Analysen in weiteren KZT-Entitäten wurden ausgewählte primäre, sowie sekundäre Veränderungen der Histonmodifikationen in 2102EP, sowie TCam-2 (SE), JAR (CC) und GCT72 (YST) mittels Western Blot-Analyse nachgewiesen und quantifiziert (Abbildung 3.9 B-E). *On target* Effekte der MS aus 2102EP konnten auch in anderen Entitäten/Zelllinien nachgewiesen werden, wie der Anstieg von H3K23ac nach Quisinostat-Behandlung. Die Nebeneffekte hingegen sind nicht in allen Zelllinien gleich verändert. Hier konnte der gleiche Effekt immer nur in einer bis zwei Zelllinien nachgewiesen werden, jedoch nicht in allen vier untersuchten Zelllinien. Die höchste Gemeinsamkeit war zwischen 2102EP (EC) und GCT72 (YST), welche sich nur bei Behandlung mit LP99 unterschieden.

Zusammenfassend konnten die, durch die Inhibition der Zielmoleküle erwarteten Änderungen der Histonmodifikationen nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden weitere Effekte auf die epigenetische Landschaft, welche nicht direkt auf das Zielprotein zurückzuführen sind, identifiziert.

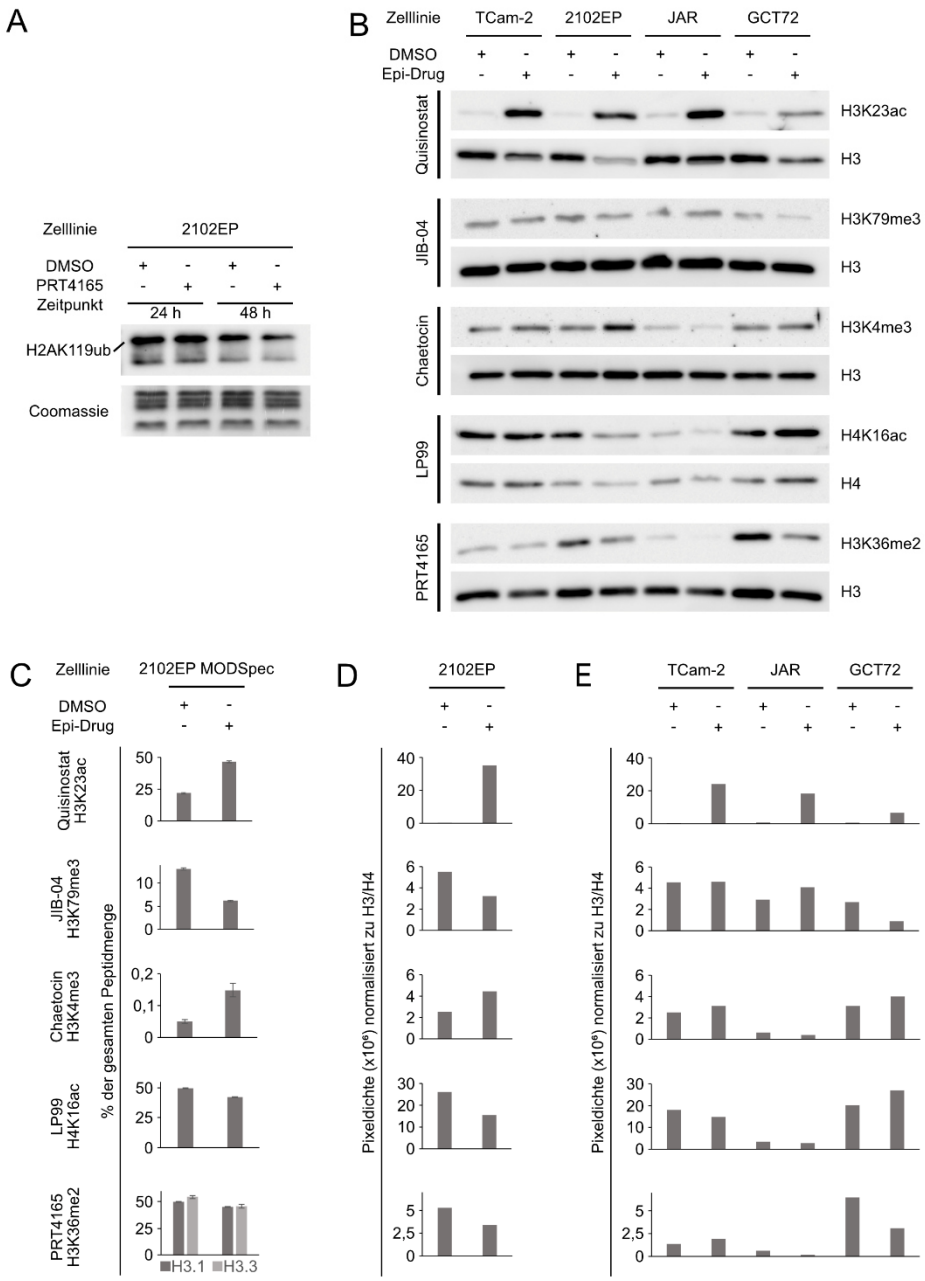


Abbildung 3.9: Western Blot-Nachweis von Veränderungen auf Histonmodifikationen durch Epi-Drugs
A) Western Blot von Histonextrakten behandelt mit PRT4165 oder DMSO (Lösungsmittelkontrolle) für 24 h und 48 h. Coomassie-Färbung dient als Ladekontrolle. B) Western Blot ausgewählter Histonmodifikationen zum Nachweis von Epi-Drug induzierten Modifikationsänderungen in weiteren KZT-Zelllinien. Zellen wurden für 16 h mit den jeweiligen Epi-Drugs behandelt und anschließend die Histone extrahiert. Totales H3/H4 dient als Ladekontrolle. C) Veränderungen der Peptidhäufigkeit aus der MS-Analyse von 2102EP der Modifikationen aus B). D) Quantifizierung des Western Blots aus B) für 2102EP und weitere KZT-Zelllinien E) TCam-2, JAR und GCT72. Modifiziert nach Müller *et al.* [212].

3.5. Epi-Drugs gegen Histoninteraktoren zeigen auch Effekte auf DNA-Methylierung

Um zu untersuchen, ob die Interferenz mit Histoninteraktoren auch Auswirkungen auf DNA-Ebene, genauer die epigenetische Modifikation der DNA hat, wurden Slot-Blot-Analysen zum Methylierungsstatus der DNA durchgeführt. Dazu wurden 2102EP Zellen für 24 h mit den Epi-Drugs behandelt und anschließend die 5-Methylcytosin (5mC) und 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC) Level densitometrisch bestimmt (Abbildung 3.10). Mit Ausnahme von Quisinostat

verringerten die getesteten Epi-Drugs die Menge an 5mC gegenüber der Lösungsmittelkontrolle. Mit GSK343 behandelte Zellen wiesen dabei die geringste Menge an 5mC auf (52 % im Vergleich zur Kontrolle). JIB-04 führte zu einer signifikanten Reduktion von 5mC auf 73 %, Chaetocin, MZ-1, PRT4165 und LP99 jeweils auf 85 %, 70 %, 84 % und 58 % im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. 5hmC ist der erste Schritt der aktiven DNA-Demethylierungskaskade. Die Behandlung mit Epi-Drugs führte zu einem leichten Anstieg an 5hmC, um 19 % unter MZ-1, 25 % unter PRT4165 und um 30 % unter GSK343 Behandlung, was auf Prozesse der aktiven DNA-Methylierung hindeutet. Dementsprechend resultierte die Behandlung mit Epi-Drugs gegen Histoninteraktoren neben Effekten auf die Histonebene auch zu Veränderungen der DNA-Methylierung.

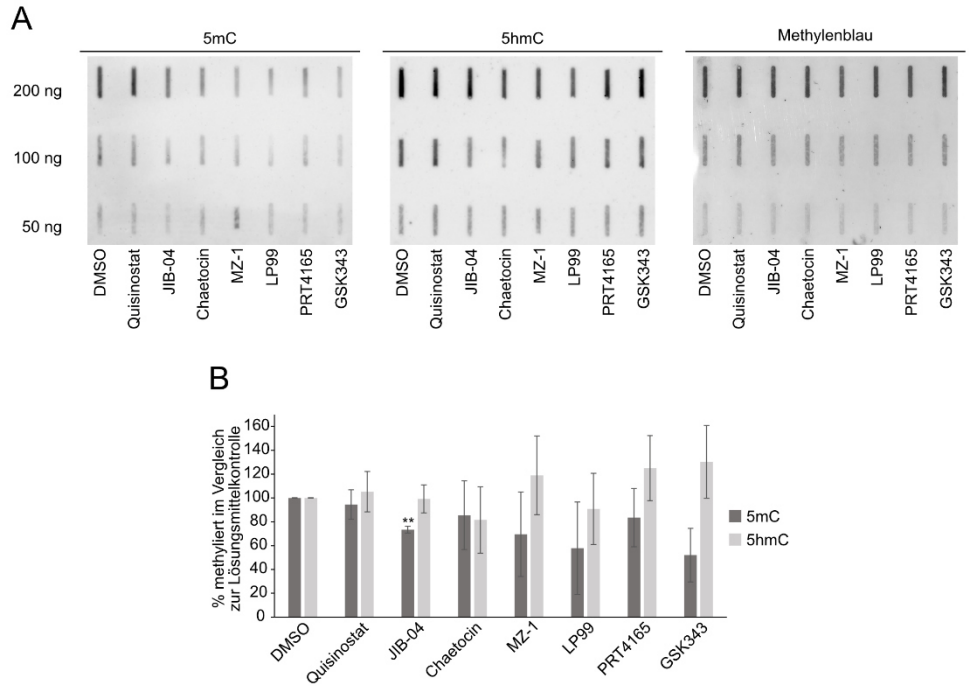


Abbildung 3.10: Slot-Blot Analyse zur Bestimmung des DNA-Methylierungsstatus
A) Nachweis der 5mC und 5hmC DNA-Methylierung mittels Slot-Blot Analyse. 2102EP Zellen wurden für 24 h mit den verschiedenen Epi-Drugs sowie dem Lösungsmittel behandelt. Für jede Färbung wurde eine separate Membran verwendet, die Verdünnungsreihe wurde einmalig für alle drei Membranen angesetzt. Methylenblau dient als Ladekontrolle. B) Densitometrische Analyse der Slot-Blots aus (A) gemittelt aus 200 ng, 100 ng und 50 ng. Die Pixeldichte der 5mC und 5hmC Blots wurde gegen die Methylenblau-Färbung normalisiert. Änderungen der DNA-Methylierung sind als prozentualer Anteil der Lösungsmittelkontrolle (100 %) angegeben. Die statistische Analyse erfolgte mittels gepaartem T-Test (*p < 0,05; **p < 0,005). Modifiziert nach Müller *et al.* [212].

3.6. Interferenz mit der epigenetischen Landschaft führt zur Deregulation von Transkriptionsregulatoren

Um herauszufinden, ob die Veränderung der Histonmodifikationen zu einer Deregulation auf transkriptioneller Ebene führt, wurde eine Sequenzierung des Transkriptoms (RNA-Seq) durchgeführt. Dies erfolgte ebenfalls in der Zelllinie 2102EP nach 16 h Behandlung mit den Epi-Drugs Quisinostat, JIB-04, Chaetocin, MZ-1, LP99, PRT4165 und GSK343. Die „*unsupervised clustering heatmap*“, sowie die PCA (Hauptkomponentenanalyse aus dem

Englischen „*principal component analysis*“) aller RNA-Seq-Daten zeigten, dass Behandlungen mit JIB-04 und MZ-1 die höchste Ähnlichkeit zur Lösungsmittelkontrolle aufwiesen (Abbildung 3.11 A, B). Die Quisinostat-Behandlung verursachte dagegen die meisten Veränderungen des Transkriptoms. Unter Berücksichtigung von transkriptionellen Änderungen mit einem FDR korrigiertem *p*-Wert ≤ 0,05, waren 474 Gene unter Quisinostat-Behandlung dereguliert (Abbildung 3.11 C). Generell führte die Behandlung mit Epi-Drugs eher zu einer erhöhten transkriptionellen Aktivität, da mehr Gene hoch-, als herunterreguliert wurden. Nur wenige Gene wurden unter MZ-1- und JIB-04-Behandlung dereguliert.

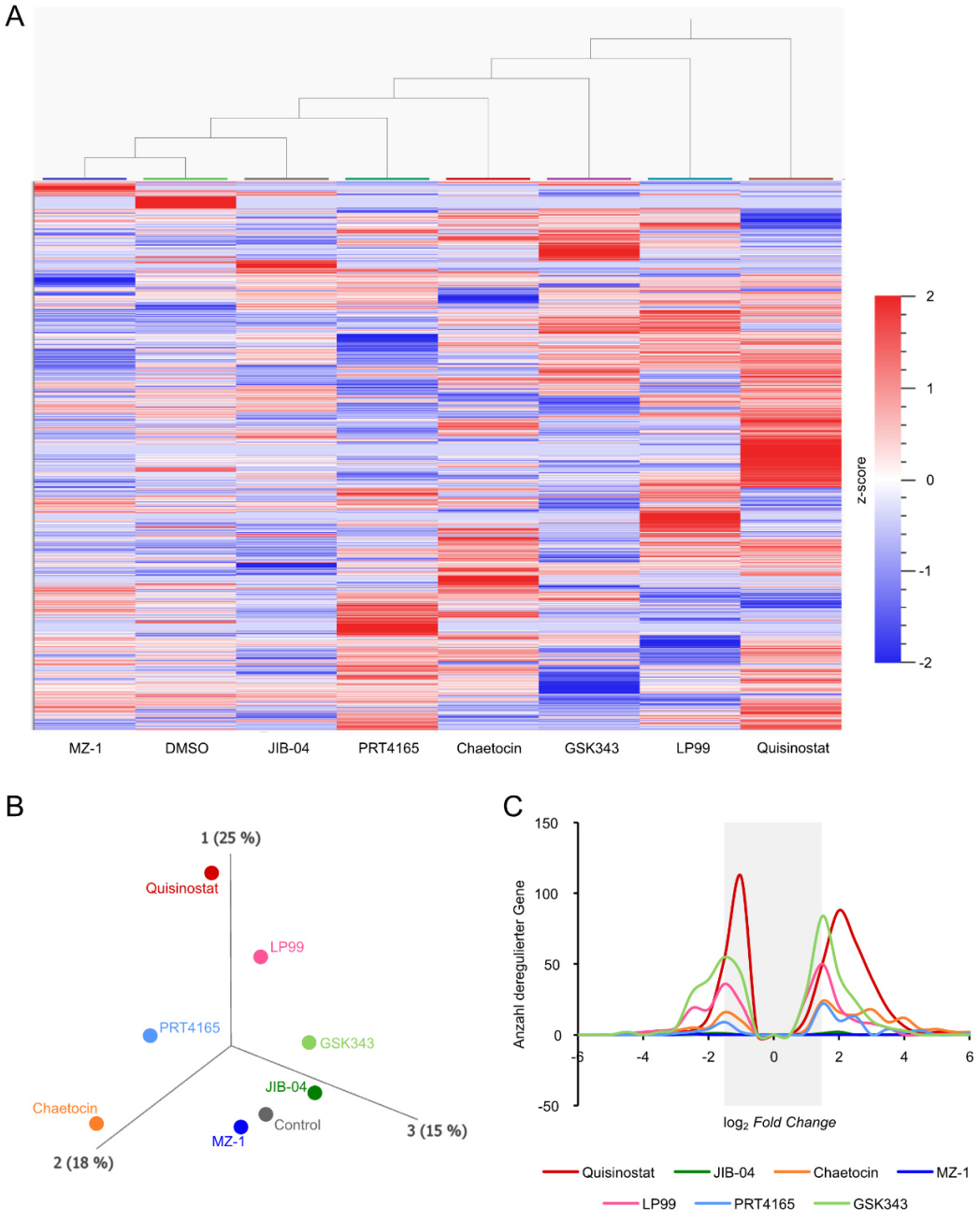


Abbildung 3.11: Epi-Drugs führen zur Deregulation des Transkriptoms
A) „*Unsupervised clustering heatmap*“ der RNA-Seq-Daten (DMSO-Kontrolle n = 3, Epi-Drugs n = 1). 2102EP Zellen wurden mit den Epi-Drugs jeweils für 16 h behandelt. B) PCA der RNA-Seq Analyse. C) Histogramm mit der Verteilung der x-fachen Veränderungen der Expression im Transkriptom durch Epi-Drug-Behandlung. Nur Deregulationen mit einem FDR korrigiertem *p*-Wert ≤ 0,05 wurden berücksichtigt. Die graue Schattierung beinhaltet Gene mit einem *Fold Change* unter $\log_2$ 1,5. Modifiziert nach Müller *et al.* [212].

Für nachfolgende funktionelle Analysen wurden nur Gene mit einem $\log_2$ *Fold Change* von mindestens ± 1,5 und einem FDR korrigiertem *p*-Wert von ≤ 0,05 als signifikant verändert betrachtet (Anhang 9). Mit diesen Beschränkungen waren 243 Gene unter Quisinostat Behandlung signifikant dereguliert (223 hoch-, 20 herunterreguliert, Anhang 9). Die top zehn funktionellen Zuordnungen zeigten vor allem eine Hochregulation von Genen im Zusammenhang mit ‚Ionentransport' und ‚Bestandteilen der Zellmembran', wohingegen Gene die für die ‚Aktivierung der Adenylatcyclase-Aktivität' relevant sind, herunterreguliert wurden (Abbildung 3.12).

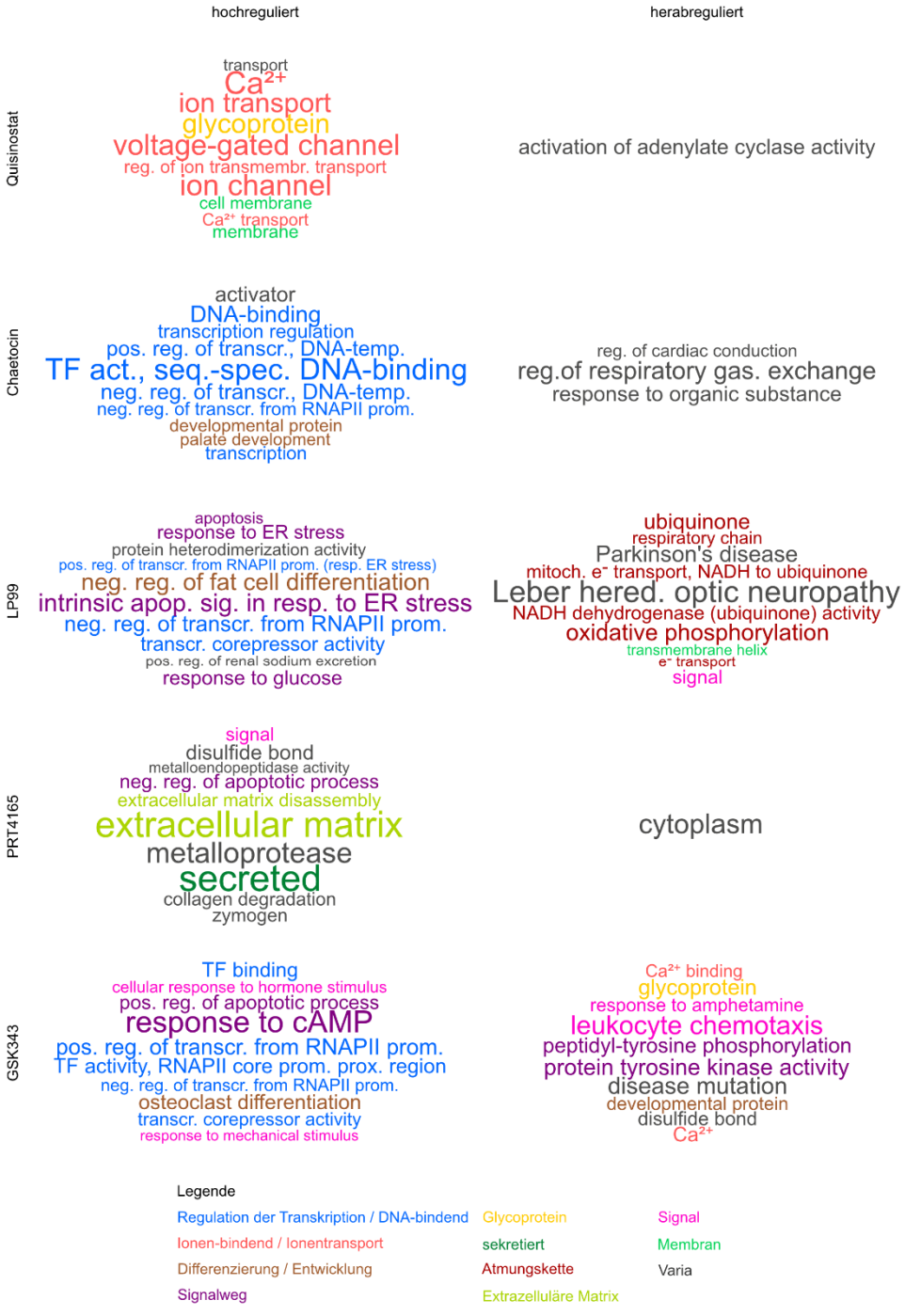


Abbildung 3.12: Funktionelle Analyse der signifikant deregulierten Gene nach Epi-Drug-Behandlung
Wortwolken repräsentieren die zehn funktionellen Zuordnungen höchster Signifikanz der hoch- und runterregulierten Gen-Ontologien (gefiltert nach unkorrigiertem *p*-Wert ≤ 0,05). Die Schriftgröße korreliert mit -$\log_{10}$(*p*-Wert) und die Farbkodierung erfolgt nach Oberbegriffen. Die komplette Auflistung der funktionellen Zuordnungen sind in Anhang 10 zu finden. Modifiziert nach Müller *et al.* [212].

Eine STRING-Netzwerk-Analyse (aus dem Englischen „*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*“), welche Interaktionen zwischen Proteinen darstellt, identifizierte ebenfalls die Hochregulation von ‚Ionentransportern‘, sowie in die ‚Entwicklung des Nervensystems‘ involvierte Gene (Abbildung 3.13 A). Für die 20 herabregulierten Gene konnte kein Netzwerk gefunden werden. Unter Behandlung mit JIB-04 wurden nur drei Gene in 2102EP signifikant dereguliert: Hochregulation von *SLC16A3* (*monocarboxylate transporter 4*)

und *DDIT4* (*DNA damage-inducible transcript 4*), sowie Herabregulation von *EIF3CL* (*eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C-like*) (Anhang 9). Die Funktions- und Netzwerkanalysen ergaben keine Treffer.

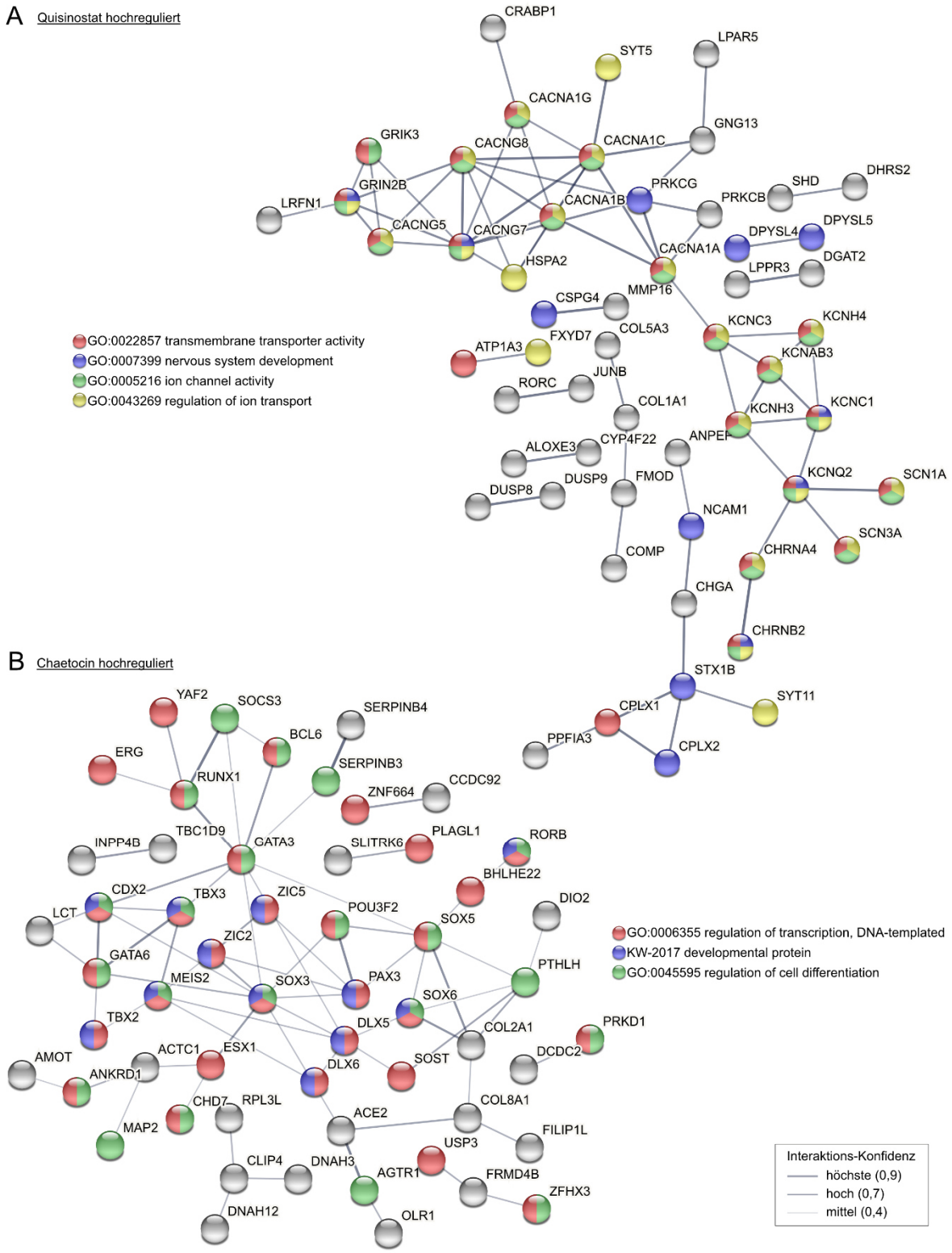


Abbildung 3.13: STRING-Analyse der Quisinostat- und Chaetocin-Behandlung in 2102EP
STRING-Analyse der hochregulierten Gene in A) mit Quisinostat (Interaktions-Konfidenz ≥ 0,7) und B) mit Chaetocin (Interaktions-Konfidenz ≥ 0,4) behandelten 2102EP Zellen (16 h). Modifiziert nach Müller *et al.* [212].

Die Chaetocin-Behandlung in 2102EP (82 hoch-, 14 runterregulierte Gene, Anhang 9) führte zur Hochregulation von ‚DNA-bindenden Faktoren' (z.B. *DLX5*, *DLX6*, *SOX5*, *GATA3*, *GATA6*, *POU3F2*), sowie ‚Regulatoren der Zelldifferenzierung', während Gene im Zusammenhang der ‚Regulation von Atemgasen' und ‚Antwort auf organische Substanzen' herabreguliert wurden (Abbildung 3.12, Abbildung 3.13 B). Nach Behandlung der 2102EP Zellen mit dem BET-PROTAC MZ-1 konnte nur *EIF3CL* als signifikant herabreguliertes Gen identifiziert werden (Anhang 9). Die Behandlung mit LP99 (43 hoch-, 48 runterregulierte Gene, Anhang 9) führte zur Hochregulierung von Faktoren des ‚intrinsischen Apoptosesignalwegs als Antwort auf Stress des endoplasmatischen Retikulums' (*CEBPB*, *DDIT3*, *TRIB3*), sowie ‚negativen Regulatoren der Transkription' (z.B. *DDIT3*, *JDP2*, *VEGFA*) (Abbildung 3.12). STRING-Netzwerk-Analysen konnten die Hochregulation von Apoptosefaktoren ebenfalls bestätigen (Abbildung 3.14 A). Zu den herabregulierten Genen zählten vor allem Gene im Zusammenhang mit ‚Elektronentransport' und mitochondriellen Genen, welche an der ‚oxidativen Phosphorylierung' beteiligt sind (*MT-ATP6/8*, *MT-ND2/3/4/4L*) (Abbildung 3.12, Abbildung 3.14 B). Die Behandlung mit dem PRC1i PRT4165 führte zur Hochregulation von 35 Genen (Anhang 9), unter anderem ‚sekretierte Faktoren' (*CP4A*, *ANXA1*, *MMP1/3/10*) und Genen der ‚extrazellulären Matrix'. Signifikant herabreguliert wurden sieben Gene (Anhang 9), welche im Zusammenhang mit dem ‚Zytoplasma' stehen, die jedoch kein STRING-Netzwerk ergaben (Abbildung 3.12, Abbildung 3.14 C, D). Die GSK343-Behandlung in 2102EP-Zellen (84 hoch-, 78 runterregulierte Gene, Anhang 9) führte zur Hochregulation von ‚Transkriptionsfaktoren bindenden Faktoren', sowie ‚positiven Regulatoren der Apoptose' (z.B. *FOSL1/2*, *DUSP1*, *GADD45A/B*, *RHOB*) (Abbildung 3.12, Abbildung 3.15 A). Zu den herabregulierten Genen zählten ‚in der Entwicklung beteiligte Proteine', sowie ‚Proteine mit Tyrosinkinaseaktivität' (Abbildung 3.12, Abbildung 3.15 B).

Zur Validierung einzelner deregulierter Gene in weiteren KZT-Entitäten wurden TCam-2, JAR und GCT72 ebenfalls für 16 h mit den Epi-Drugs behandelt und anschließend mittels qRT-PCR analysiert (Abbildung 3.15 C). Die getesteten Gene (Hochregulation: Quisinostat: *DHRS2*; JIB-04: *DDIT4*; Chaetocin: *CD36*; PRT4165: *ACE2*; GSK343: *FOS*; Herabregulation: MZ-1: *EIF3CL*; LP99: *SAMD3*) waren in allen Entitäten ähnlich dereguliert, d.h. hoch- oder herunterreguliert, wobei das Ausmaß der Änderung zelllinienspezifisch und meist in JAR und GCT72 weniger stark ausgeprägt war.

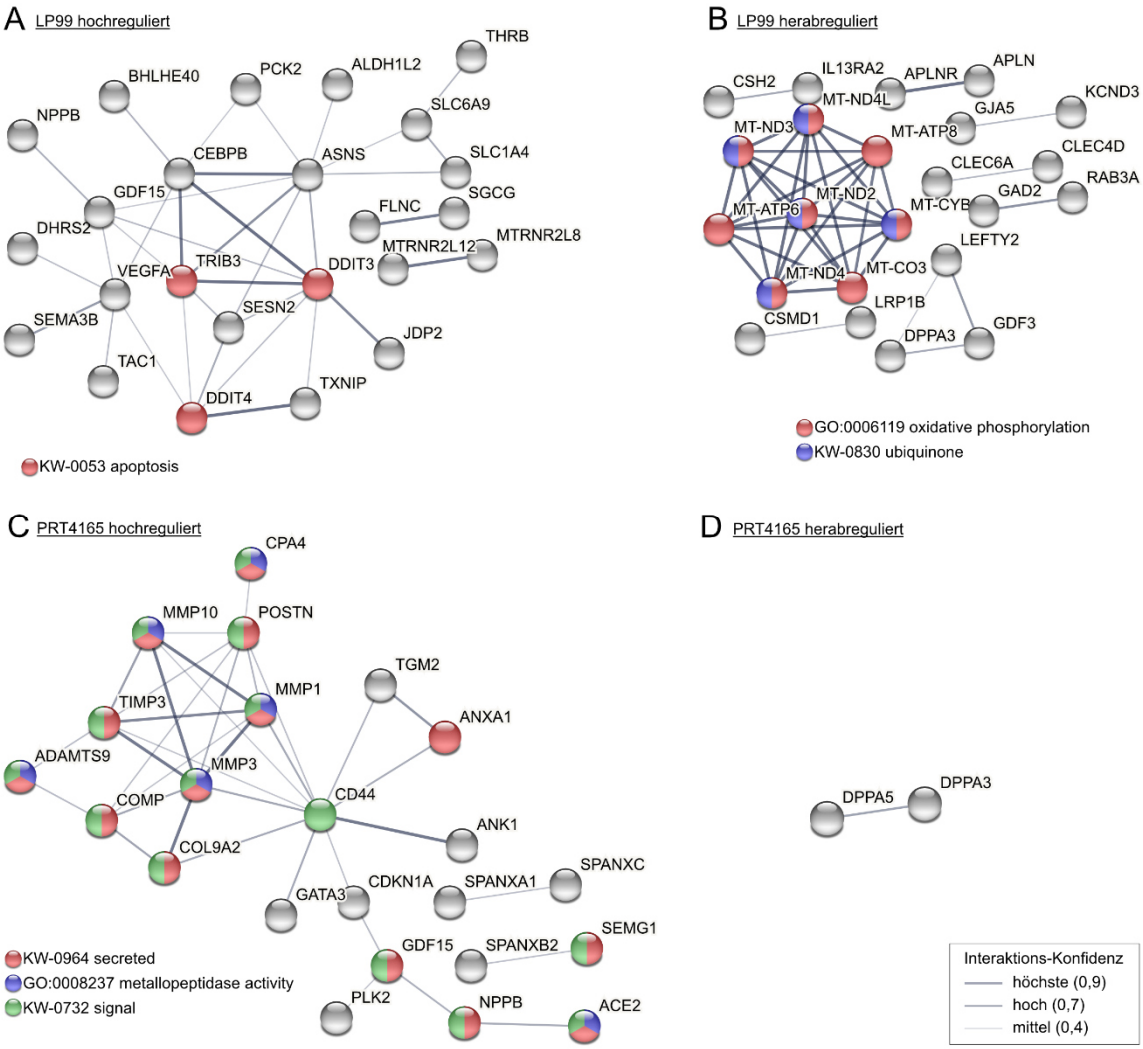


Abbildung 3.14: STRING-Analyse der LP99- und PRT4165-Behandlung in 2102EP
STRING-Analyse der deregulierten Gene nach 16 h Behandlung mit Epi-Drugs in 2102EP (Interaktions-Konfidenz ≥ 0,4). A) hochregulierte Gene LP99, B) herabregulierte Gene LP99, C) hochregulierte Gene PRT4165 und D) herabregulierte Gene PRT4165. Modifiziert nach Müller *et al.* [212].

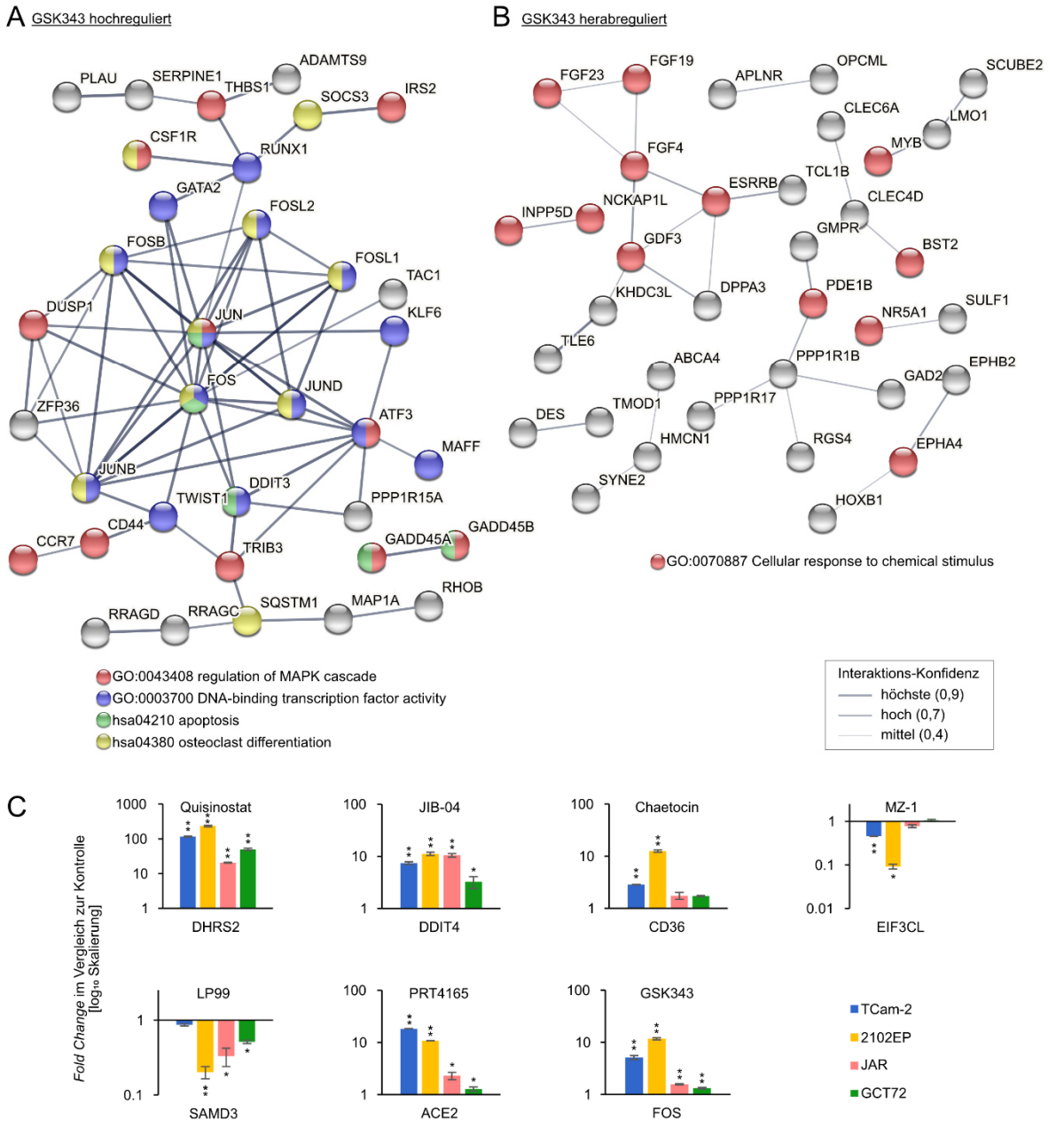
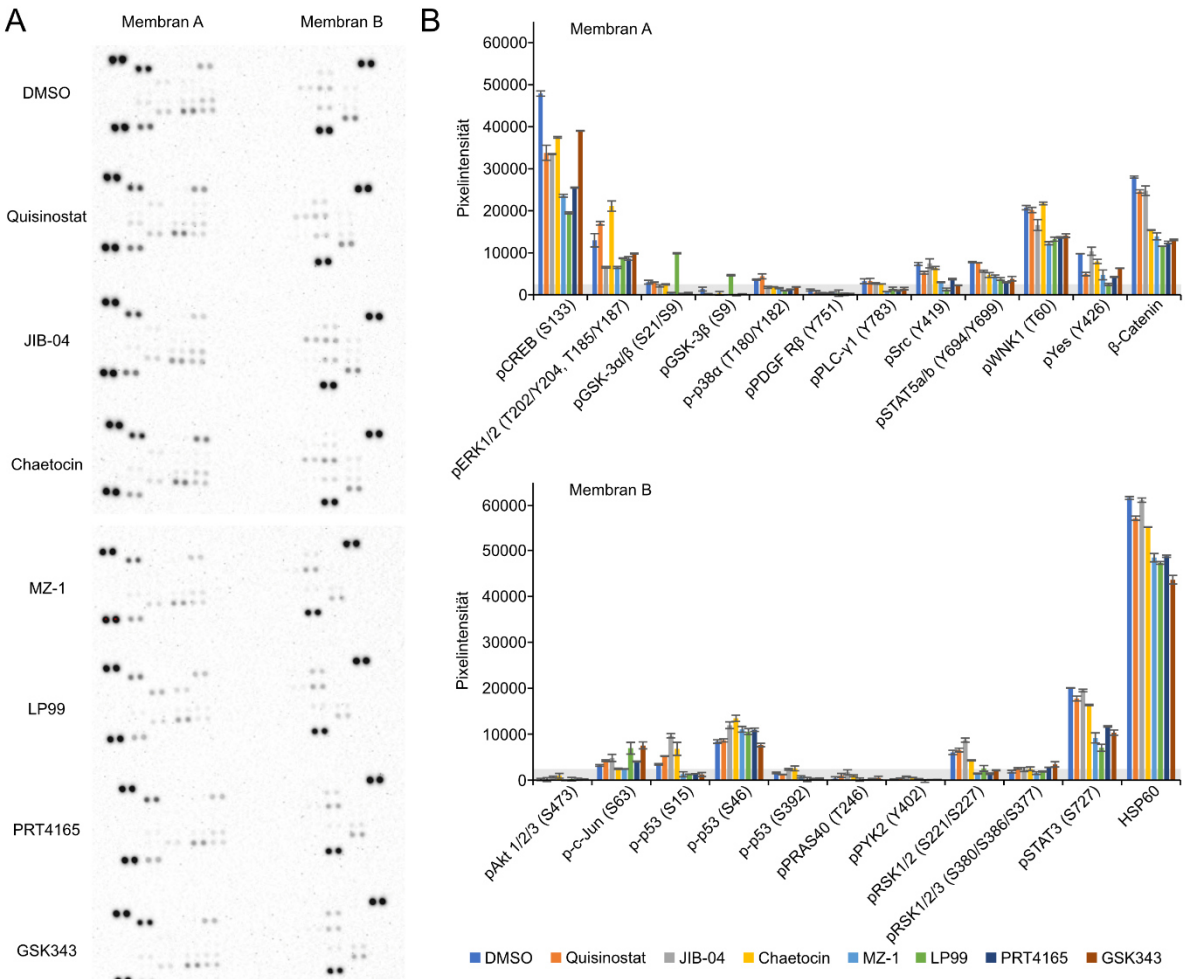


Abbildung 3.15: STRING-Analyse der GSK343-Behandlung in 2102EP und qRT-PCR-Validierung
STRING-Analyse der deregulierten Gene nach 16 h Behandlung mit Epi-Drugs in 2102EP. A) hochregulierte Gene GSK343 (Interaktions-Konfidenz ≥ 0,7), B) herabregulierte Gene GSK343 (Interaktions-Konfidenz ≥ 0,4). C) qRT-PCR Validierung ausgewählter Gene in vier KZT-Zelllinien (n = 3). Asteriske geben signifikante Änderungen zwischen Epi-Drug-Behandlung und Lösungsmittelkontrolle an (*p < 0,05, **p < 0,005). Modifiziert nach Müller *et al.* [212].

3.7. Epi-Drug-Behandlung stört die Zellproliferation über cAMP-, JAK-STAT- und WNT-Signalkaskaden

Ein *„Human Phospho-Kinase* Array“ wurde genutzt, um die Phosphorylierung bekannter Kinaseziele zu untersuchen (Abbildung 3.16, Abbildung 3.17). CREB- (Camp-Kaskade), STAT3- und STAT5-Phosphorylierung (JAK-STAT-Signalweg), sowie die totale Proteinmenge von β-Catenin (WNT-Signalweg) und HSP60 wurden nach 16 h Behandlungen mit Quisinostat, JIB-04, Chaetocin, MZ-1, LP99, PRT4165 und GSK343 in 2102EP-Zellen verringert. Zusätzlich wurde unter der JIB-04-, MZ-1-, PRT4165- und GSK343-Behandlung die ERK1/2-Phosphorylierung vermindert. Die p53-Phosphorylierung an Serin 64 war dagegen unter den meisten Behandlungen (außer Quisinostat und GSK343) erhöht (Abbildung 3.17). Die Phosphorylierung von p53 S15 war unter JIB-04- und Chaetocin-Behandlung ebenfalls erhöht (unter Quisinostat mit tendenziellem Anstieg (Abbildung 3.16 B)), bei den anderen Epi-Drugs jedoch verringert (Abbildung 3.17). Unter Behandlung mit Agenzien gegen BRD-Proteine (MZ-1, LP99), sowie unter PRC1/2-Inhibition (PRT4165, GSK343) kam es zu einer Vielzahl an Herunterregulationen im Phosphorylierungsprofil, wie Scr, WNK1, Yes und RSK1/2 (Abbildung 3.17). Die Epi-Drug-Behandlung beeinflusst also verschiedene Signalwege, welche schließlich zu veränderten Kinase-Phosphorylierungen der Zielmoleküle führen.



D

Membran A			Membran B		
Koordinate	Ziel/Kontrolle	Phosphory-lierung	Koordinate	Ziel/Kontrolle	Phosphory-lierung
A1, A2	Referenz	---	A11, A12	pAkt1/2/3	T308
B3, B4	pCREB	S133	A13, A14	pAkt1/2/3	S473
B5, B6	pEGF R	Y1086	A17, A18	Referenz	---
B7, B8	p-eNOS	S1117	B11, B12	pChk-2	T68
B9, B10	pERK1/2	T202/Y204, T185/Y187	B13, B14	p-c-Jun	S63
C3, C4	pFgr	Y412	C11, C12	p-p53	S15
C5, C6	pGSK-3α/β	S21/S9	C13, C14	p-p53	S46
C7, C8	pGSK-3β	S9	C15, C16	p-p53	S392
C9, C10	pHSP27	S78/S82	D11, D12	p-p70 S6 Kinase	T389
E3, E4	p-p38α	T180/Y182	D13, D14	p-p70 S6 Kinase	T421/S424
E5, E6	pPDGF Rβ	Y751	D15, D16	pPRAS40	T246
E7, E8	pPLC-γ1	Y783	E11, E12	pPYK2	Y402
E9, E10	pSrc	Y419	E13, E14	pRSK1/2	S221/S227
F3, F4	pSTAT2	Y689	E15, E16	pRSK1/2/3	S380/S386/ S377
F5, F6	pSTAT5a/b	Y694/Y699	F11, F12	pSTAT1	Y701
F7, F8	pWNK1	T60	F13, F14	pSTAT3	Y705
F9, F10	pYes	Y426	F15, F16	pSTAT3	S727
G1, G2	Referenz	---	G11, G12	pSTAT6	Y641
G3, G4	β-Catenin	---	G13, G14	HSP60	---
G9, G10	PBS (negativ Kontrolle)	---	G17, G18	PBS (negativ Kontrolle	---

Abbildung 3.16: Epi-Drugs beeinflussen Kinase-Signalwege
A) Lumineszenzsignale des „Human Phospho-Kinase Array". 2102EP Zellen wurden mit den verschiedenen Epi-Drugs für 16 h behandelt. B) Die ermittelten Pixelintensitäten verschiedener Kinase-Ziele aus A. Wert mit einer Pixelintensität ≤ 2500 wurden als nicht signifikant erachtet (Hintergundintensität, grau hinterlegt). C) Membran Layout des „Human Phospho-Kinase Array". Rot markierte Punkte zeigten Signale und wurden zur Auswertung genutzt. D) Übersicht der gespotteten Kinase-Ziele und Kontrollen (n = 2). p: phosphoryliertes Protein. In rot markiert sind die detektierbaren und ausgewerteten Phosphorylierungen. Modifiziert nach Müller *et al.* [212].

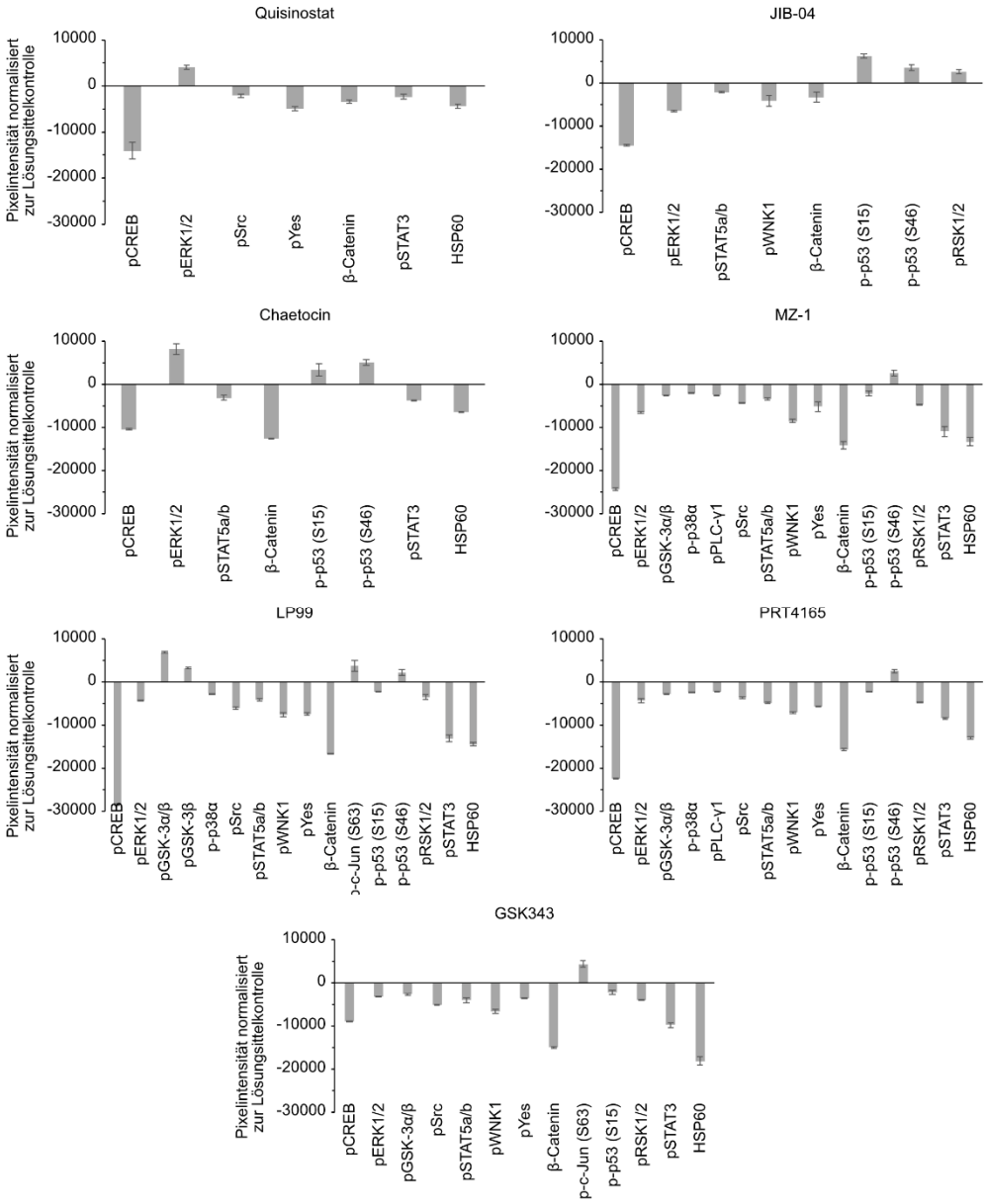


Abbildung 3.17: Die Behandlung mit Epi-Drugs beeinflusst vor allem cAMP (CREB)-, JAK-STAT (STAT3/5)- und WNT (β-Catenin)-Signalkaskaden
Darstellung der Differenz der Pixelintensität (n = 2) einzelner Kinaseziele im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (DMSO). Nur Differenzen von > 2000 zur Lösungsmittelkontrolle wurden berücksichtigt. Die Rohdaten sind in Abbildung 3.16 A dargestellt. p: phosphoryliertes Protein. Modifiziert nach Müller *et al.* [212].

3.8. HDACi und ihre Effekte auf die *DHRS2*-Expression

In dieser Arbeit führte die Inhibition mit Quisinostat zu einem starken Anstieg der *DHRS2*-Expression (siehe 3.6). Ähnlich führte auch die Behandlung mit anderen HDACi wie Romidepsin, TSA (Trichostatin A), Vorinostat (SAHA) und Apicidin in KZT- und Ovarialkarzinom-Zelllinien zu einer erhöhten *DHRS2*-Expression [177,179]. Um die Rolle von *DHRS2* in der HDACi-Wirkung in urologischen Entitäten besser zu verstehen, wurden weitere Expressionsanalysen durchgeführt. Es wurde zunächst eine Reihe verschiedener kommerzieller (Quisinostat, Romidepsin, Vorinostat, Entinostat) und neu-synthetisierter HDACi (LAK31, KSK64, MPK409) in Zelllinien der verschiedenen Entitäten auf *DHRS2*-Hochregulierung getestet (Abbildung 3.18 A). Dabei war in fast allen Fällen eine starke Hochregulierung von *DHRS2* zu beobachten, außer in der Zelllinie DU145 unter Quisinostat- und LAK31-Behandlung, sowie in RT112 unter Vorinostat und Entinostat. Bei der UC-Zelllinie RT112 sei jedoch vermerkt, dass hier bereits die Grundexpression im Vergleich zu den anderen Zelllinien deutlich höher war. Mittels Western Blot konnte nachgewiesen werden, dass die HDAC-Inhibition nicht nur zu einer erhöhten Transkriptionsrate von *DHRS2*, sondern dies auch zu erhöhten Proteinmengen führt (Abbildung 3.18 B).

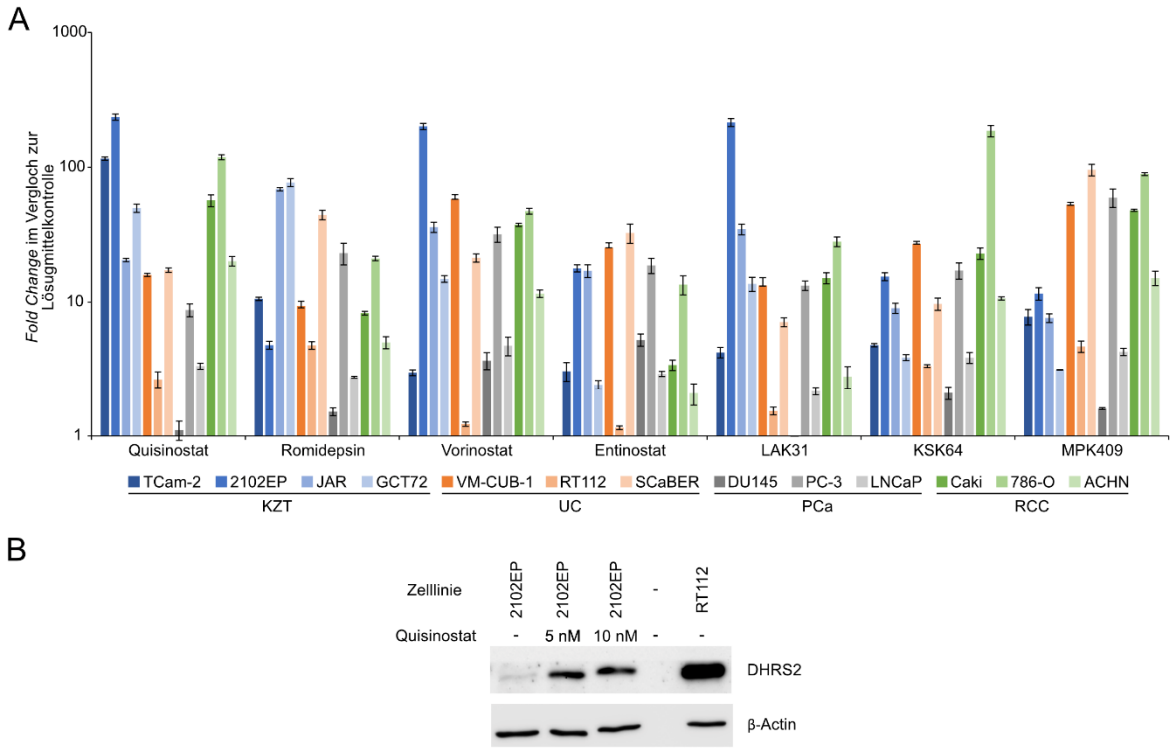
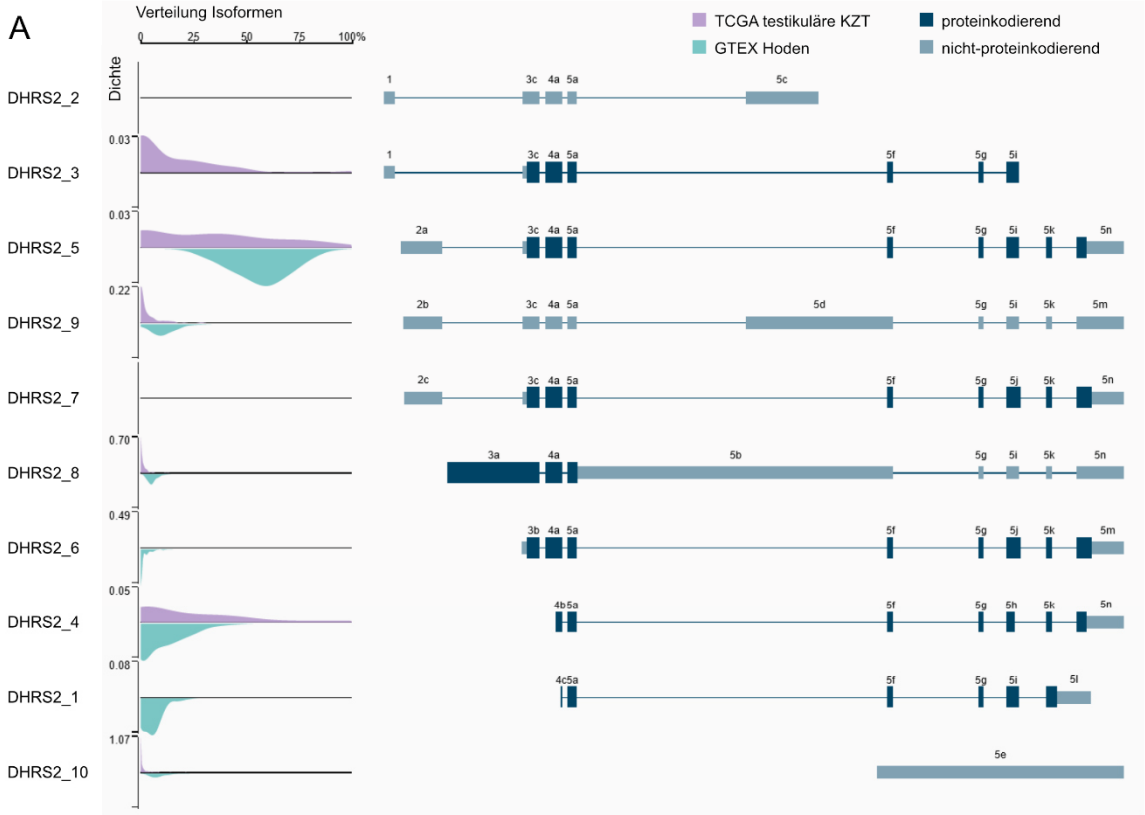


Abbildung 3.18: Die *DHRS2*-Expression wird durch Behandlung mit verschiedenen HDACi in einer Vielzahl an urologischen Tumorzelllinien stark erhöht
A) qRT-PCR-Analyse der DHRS2-Expression nach verschiedenen HDACi-Behandlungen (16 h, EC_{50}, [154]) in KZT- (blau), UC- (orange), PCa- (grau) und RCC-Zelllinien (grün). B) Erhöhte DHRS2-Proteinlevel unter Quisinostat-Behandlung in 2102EP. RT112 mit generell hohem DHRS2-Level dient als Positivkontrolle für den DHRS2-Antikörper. β-Actin dient als Ladekontrolle des Western Blot.

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, welche Isoform von *DHRS2* in den Zellen vorliegt und vor allem welche der zehn bekannten Isoformen durch die HDACi-Behandlung möglicherweise induziert werden. Dazu wurde zunächst mit dem USCS (*University of California, Santa Cruz*) Xena Browser überprüft welche Isoformen in KZT, sowie gesunden Hodengewebe vorlagen (Abbildung 3.19 A). So ist in beiden Geweben die kanonische Isoform *DHRS2_5* vorherrschend. Zusätzlich sind jeweils die kürzeren Isoformen *DHRS2_3* in KZT und *DHRS2_1* in normalen Hodengewebe, sowie *DHRS2_4* in beiden exprimiert. Die beiden längeren proteinkodierenden Isoformen *6* und *7* sind dagegen nicht oder in normalem Gewebe nur sehr gering exprimiert. Die nicht-proteinkodierenden Isoformen *DHRS2_2, 8*, *9* und *10* sind nur sehr gering bis gar nicht exprimiert.

A



B

Name	Transkript ID	Länge	Protein	Biotyp
DHRS2_1	ENST00000553600.1	844 bp	161 AS	proteinkodierend
DHRS2_2	ENST00000553896.5	1352 bp	kein Protein	prozessiertes Transkript, kein ORF
DHRS2_3	ENST00000432832.6	834 bp	225 AS	proteinkodierend
DHRS2_4	ENST00000557535.5	927 bp	180 AS	proteinkodierend
DHRS2_5	ENST00000250383.11	1676 bp	280 AS	proteinkodierend
DHRS2_6	ENST00000611765.4	1287 bp	300 AS	proteinkodierend
DHRS2_7	ENST00000344777.11	1678 bp	300 AS	proteinkodierend
DHRS2_8	ENST00000556729.1	5318 bp	kein Protein	enthält Intron
DHRS2_9	ENST00000556701.5	3157 bp	kein Protein	enthält Intron
DHRS2_10	ENST00000556550.1	2595 bp	kein Protein	enthält Intron

Abbildung 3.19: *DHRS2*-Isoformen und ihre Expression in KZT und Hodengewebe
A) Darstellung der UCSC Xena Browser-Daten zu DHRS2 in KZT der Hoden gegenüber normalem Hodengewebe.
B) Übersicht der *DHRS2*-Isoformen. Hellblau hinterlegt sind proteinkodierende Isoformen.

In den anderen urologischen Entitäten UC, PCa und RCC ist ebenfalls die kanonische Isoform *DHRS2_5* sowohl in den Tumoren als auch im entsprechenden gesunden Gewebe vorherrschend (Abbildung 3.20). Die Isoform *DHRS2_3*, welche in KZT, jedoch nicht im Hodengewebe exprimiert ist, ist in allen anderen urologischen Geweben Harnblase, Prostata und Niere vertreten. Ebenso sind die Isoformen *1* und *6*, welche nur in Hodengewebe, aber nicht in KZT auftreten auch in Tumoren der Harnblase und Prostata zu finden. Es konnte keine Isoform identifiziert werden, welche ausschließlich in malignem Gewebe auftritt. Neben der kanonischen Isoform *5* sind vor allem Isoform *3* und *4* exprimiert.

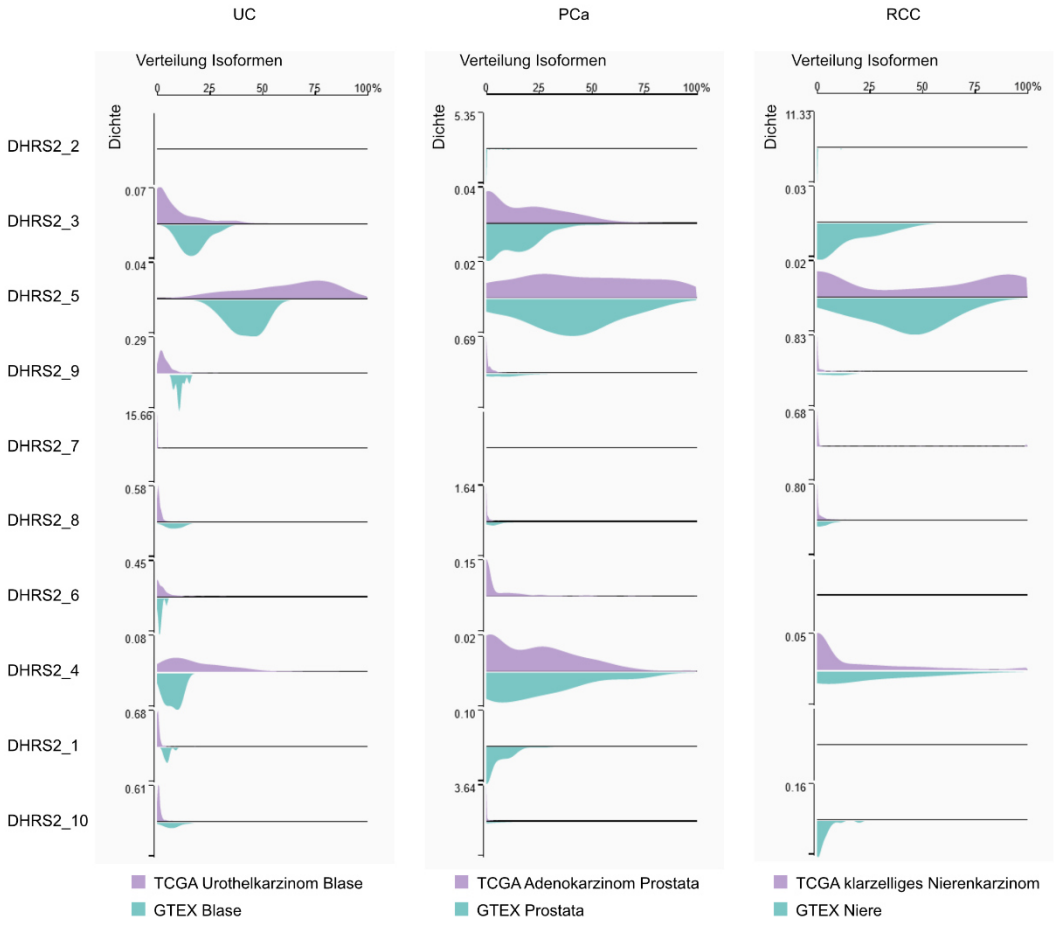


Abbildung 3.20: Expression der *DHRS2*-Isoformen in UC, PCa und RCC, sowie ihren entsprechenden gesunden Geweben Blase, Prostata und Niere
Diese Abbildung wurde mithilfe des UCSC Xena Browsers (https://xenabrowser.net/transcripts/) erstellt.

Um zu identifizieren, ob alle oder nur bestimmte Isoformen durch HDACi-Behandlung hochreguliert werden, wurden die RNA-Seq-Daten in Bezug auf die *DHRS2*-Isoformen genauer analysiert. Zusätzlich wurden Transkriptomanalysen zu HDACi LAK31 analysiert, welche neben 2102EP auch in den Zelllinien VM-CUB-1 (UC), Caki-1 (PCa) und DU145 (RCC) erfolgten [154], um so ein breites Spektrum an Entitäten zu inkludieren (Abbildung 3.22). In den Lösungsmittel-behandelten Kontrollen (DMSO) der EC-Zelllinie 2102EP zeigte sich die höchste basale Expression von *DHRS2*, hierbei vor allem in Isoform *5* (Abbildung 3.22).

Entgegen der Gewebe-Analyse mit *DHRS2_5* als vorherrschender Isoform, war in den Zelllinien VM-CUB-1 und Caki-1 vor allem *DHRS2_7* exprimiert. In DU145 war nahezu keine Expression von *DHRS2* detektierbar. Die Behandlung mit HDACi Quisinostat und LAK31 führte zu einem Anstieg der Isoformen *1*, *4*, *5*, *7*, *8* und *9*. Der größte Anstieg der Expression war auch hier in der kanonischen Isoform *DHRS2_5* (Abbildung 3.22). Interessanterweise kam es zu einem starken Anstieg der beiden nicht-proteinkodierenden Isoformen *8* und *9*, welche besonders lange Transkripte mit enthaltenem Intron darstellen. Die Isoformen *DHRS2_2* und *DHRS2_3* sind hingegen nicht von der durch HDACi hervorgerufenen Expressionserhöhung beeinflusst und sind sowohl vor als auch nach Behandlung, nicht exprimiert (außer in VM-CUB-1 DMSO). In einem nächsten Schritt wurden Primer designt, welche spezifisch bestimmte Exons amplifizieren, um so verschiedene Gruppen von Isoformen mittels qRT-PCR unterscheiden zu können. Mit dieser Methode lässt sich nur *DHRS2_8* eindeutig quantifizieren. Eine eindeutige Unterscheidung der anderen Isoformen wäre nur durch Transkripte mit voller Länge möglich, da viele Exons in mehreren Isoformen vorkommen (siehe Abbildung 3.21). Als Exons wurden Exon 1, Exon 2(a/b/c), Exon 3a, Exon 5b/d, Exon 5n/m (eher als Maß der generellen *DHRS2*-Expression) sowie der Übergang von Exon 2 nach 3c ausgewählt. Das Primerpaar, welches in den vorangegangenen Versuchen genutzt wurde, bindet in Exon 5a und 5f (sowie b und d), kann also die Isoformen *1*, *3*, *4*, *5*, *6* und *7* detektieren. Die Isoformen *8* und *9* sind theoretisch möglich, sind aber aufgrund der zu kurzen Amplifikationszeit der qRT-PCR und der Länge des entstehenden Amplikon auszuschließen.

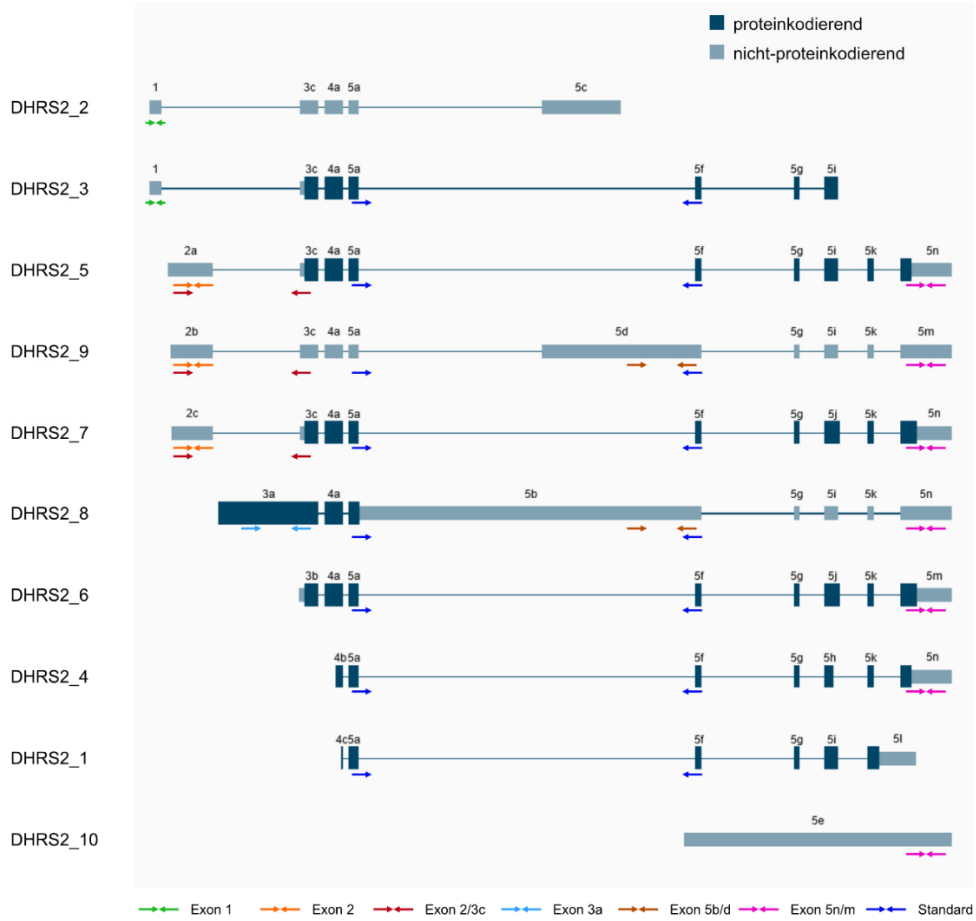


Abbildung 3.21: qRT-PCR Strategie zur Expressionsananalyse der verschiedenen *DHRS2*-Isoformen
Die Lage der Primer in den Exons, sowie deren Transkriptionsrichtung sind durch Pfeile dargestellt. Diese Darstellung gibt nur eine ungefähre Lokalisation der Primer wieder und ist nicht maßstabsgetreu.

Zum Test dieser Primerkonstellationen wurden 2102EP Zellen mit Quisinostat und LAK31 behandelt, um diese Daten mit den RNA-Sequenzierungen vergleichen zu können. Zusätzlich wurde Romidepsin untersucht. Es kam unter allen HDACi-Behandlungen zu einem Anstieg der jeweiligen Exonfragmente (Abbildung 3.23). Die Expressionsintensität war für Exon 1 und Exon 2/3c sehr gering. Dies kann bei Exon 1 durchaus auf die geringe Expression der Isoformen *2* und *3* zurückzuführen sein, bei Exon 2/3c, welches dieselben Isoformen wie das Primerpaar für Exon 2 amplifiziert, ist die niedrige Expressionsintensität vermutlich eher auf eine schlechte Primereffizienz zurückzuführen. Durch eine Normierung gegen die DMSO-Kontrolle und dem damit berechneten *Fold Change*, sind die verschiedenen Amplikons jedoch wieder miteinander vergleichbar. Der größte Anstieg der Expression nach HDACi-Behandlung in 2102EP ist bei Exon 2/3c zu beobachten, was den Isoformen *DHRS2_5*, *7* und *9* entspricht. Dies waren, neben der Isoform *DHRS2_8*, welche ebenfalls stark hochreguliert war (Exon 3a), auch die am stärksten hochregulierten Isoformen in der RNA-Seq Analyse. Die Isoformen *DHRS2_2* und *3* konnten, anders als in der RNA-Seq, mittels qRT-PCR in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden und zeigten ebenfalls eine erhöhte Expression nach HDACi-Behandlung.

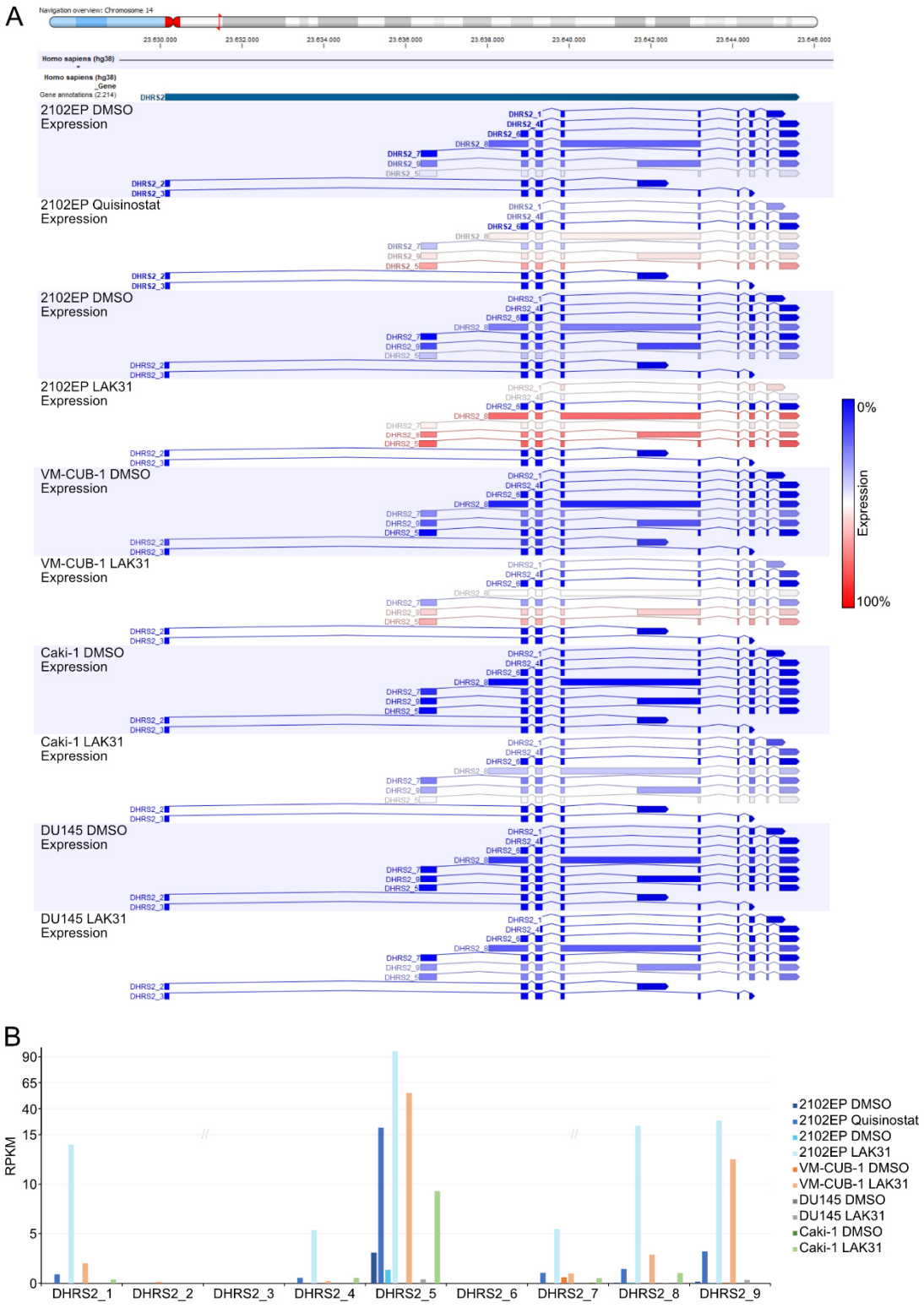


Abbildung 3.22: Detaillierte Analyse der Transkriptomdaten zur Identifizierung deregulierter *DHRS2*-Isoformen

A) Darstellung der Expression der *DHRS2*-Isoformen. Diese Abbildung wurde mit der CLC Genomics Workbench von Patrick Petzsch (Genomics & Transcriptomics Labor (GTL) Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Core Facility für RNA-Seq) erstellt. Die Transkriptomdaten für LAK31 wurden von Aaron Burmeister generiert [154] Die RNA-Isolation erfolgte bei Quisinostat nach 16 h, bei LAK31 nach 24 h. Eine Darstellung er einzelnen gemessenen *Reads* ist in Anhang 11 zu finden. B) Balkendiagramm der RPKM-Werte der einzelnen *DHRS2*-Isoformen aus A.

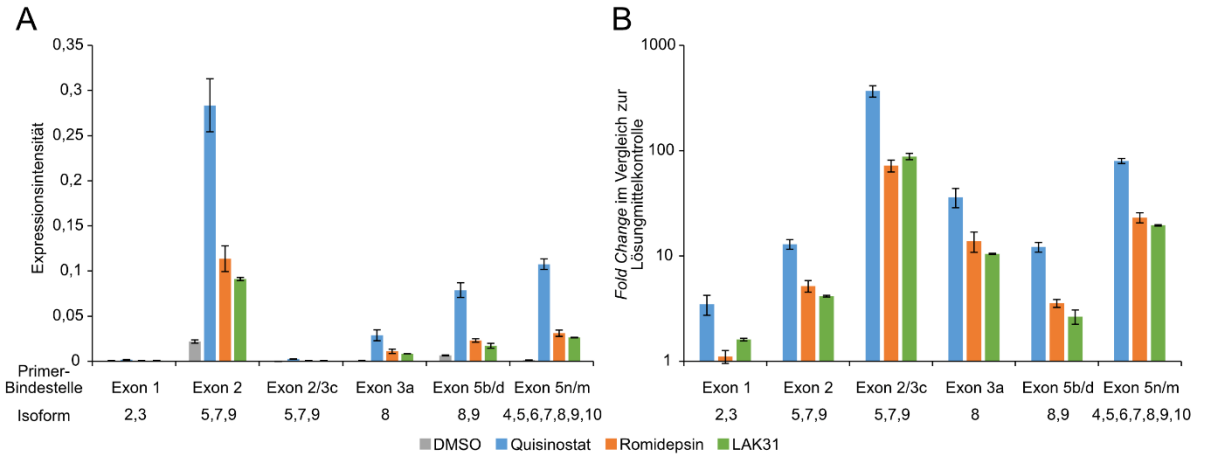


Abbildung 3.23: Nachweis der erhöhten Expression verschiedener DHRS2-Exone nach HDACi-Behandlung
Mittels qRT-PCR bestimmte Expressionsintensität A) und *Fold Change* B) verschiedener *DHRS2*-Exons nach Behandlung mit HDACi Quisinostat, Romidepsin und LAK31 für 16 h in 2102EP-Zellen.

4. Diskussion

In dieser Arbeit konnten sieben epigenetische Inhibitoren als Therapieoption für (Cisplatin-resistenter) KZT identifiziert werden. Zusätzlich wurde die Wirkung dieser Epi-Drugs, sowie deren (Neben-)Effekte auf die epigenetische Landschaft genauer analysiert.

4.1. Das Potential verschiedener Epi-Drugs zur Behandlung von Keimzelltumoren

Im Zuge dieser Arbeit wurden 16 verschiedene Epi-Drugs als mögliche Therapieoption für (Cisplatin-resistente) KZT getestet. Vier dieser Epi-Drugs reduzierten die Zellviabilität verschiedener KZT-Zelllinien unterschiedlicher klinischer Entitäten bereits im nanomolaren Konzentrationsbereich (Quisinostat, JIB-04, Chaetocin, MZ-1), weitere vier Inhibitoren wirkten in niedrigen mikromolaren Konzentrationen bis 50 µM (PBIT, LP99, PRT4165, GSK343) (Abbildung 4.1). Aufgrund der erhobenen Toxizitätsdaten kommen die getesteten Epi-Drugs als potentielle Therapieoption für SE, EC und YST KZT-Entitäten, sowie deren Cisplatin-resistente Subtypen in Frage, da diese im Vergleich sensitiver auf die Behandlung reagieren als normale, nicht-maligne Fibroblasten. CC sind eher weniger für die Behandlung mit Epi-Drugs geeignet, da sie generell weniger sensitiv auf die Behandlung reagieren. Um diesen Umstand weiter zu erläutern, muss zunächst die Herkunft der CC-Zelllinien diskutiert werden. Neben KZT-Hodentumoren können CC auch als Tumoren bei Schwangerschaften auftreten und gelten aufgrund der Fähigkeit das vaskuläre System zu befallen, als aggressivste Form der gestationsbedingten trophoblastischen Neoplasie [232]. In Abhängigkeit ihres Ursprungs werden beide CC unterschiedlich chemotherapeutisch behandelt: gestationsbedingte CC werden bei niedrigen Risiko (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO)-Score < 7) mit Methotextrat oder Actinomycin D, bei hohem Risiko (FIGO-Score ≥ 7) nach dem EMA-CO-Schema (Etoposid, Methotrexat, Actinomycin, Cyclophosphamid und Vincristin (Oncovin®)) behandelt [233]. Im Gegensatz zu den Keimzell-basierten CC reagieren gestationsbedingte CC meist sensitiver auf Chemotherapien mit guten Heilungschancen [234]. Die Keimzell-basierten CC werden je nach Stadium nur beobachtet (nicht-metastasiert, FIGO Stadium Ia, TNM-Stadium I mit niedrigem Risiko) oder mit der Resektion des Tumors gefolgt von einer Chemotherapie bestehend aus Bleomycin, Etoposid und Cisplatin (FIGO Stadium > Ia, TNM-Stadium II) [21,235]. Trotz unterschiedlichem Ursprungs sind alle CC sowohl im Krankheitsbild, als auch histologisch identisch und bestehen aus Zytotrophoblast- und Synzytiotrophoblast-Zellen [236,237]. Bei den in dieser Arbeit benutzten CC-Zelllinien handelt es sich um Zellen mit gestationsbedingtem Ursprung, sind also eher Trophoblasten-Zellmodelle, da es keine etablierten CC-Zelllinien aus KZT gibt. Trotz des gestationsbedingten Ursprungs sind die CC-Zelllinien JAR und JEG-3 sehr resistent gegen die Epi-Drug-Behandlung, sowie anderen Chemotherapeutika wie z.B. CDK4/6-, ARID1A- und ATR- (ATM-Rad3-related) Inhibitoren [154,177,238,239]. Eine mögliche Erklärung ist die Anwesenheit

einer Stammzell-ähnlichen Population in CC [240–242]. Die Existenz dieser Stammzell-ähnlichen Zellpopulation, welche sich später zu Trophoblastenzellen entwickeln kann, wurde vor allem in der CC-Zelllinie JEG-3 untersucht [241,242]. Peng *et al.* stellten die Hypothese auf, dass die Stammzell-Ähnlichkeit durch miR-497-5p und dessen Zielgen *SALL4* beeinflusst wird [243]. Bei der Isolierung der Stammzell-ähnlichen Subpopulation kommt es zu DNA-Hypermethylierung der miR-497-5p kodierenden Sequenz und dem damit einhergehendem *Silencing* (Gen-Stilllegung), was zu einer erhöhten Expression von *SALL4* führt. *SALL4* gilt als Stammzell-assoziiertes Gen und wird als Tumor-Marker in verschiedenen Krebsarten, wie z.B. dem Leberkarzinom oder dem kolorektalen Karzinom diskutiert [243–247]. So kam es in der *SALL4* überexprimierenden Stammzell-Subpopulation zu einer verringerten Sensitivität gegen die Chemotherapie-Medikamente Methotextrat, 5-Fluoruracil, Dactinomycin und Etoposide im Vergleich zur parentalen JEG-3 Zelllinie [243]. Um festzustellen ob primär eine stammzellartige Subpopulation nach Behandlung mit Epi-Drugs überlebt und welche anderen Faktoren eine Rolle spielen, sind jedoch weitere Untersuchungen nötig. Die unterschiedliche Sensitivität innerhalb der CC-Zelllinien mit JAR und JEG-3 als relativ resistente Zellen gegen die Epi-Drug-Behandlungen und BeWo als sensitivere CC-Zelllinie ist auf kleine Unterschiede im Transkriptom zurückzuführen. Auch andere Studien zeigten Unterschiede zwischen den Zelllinien JAR, JEG-3 und BeWo durch abweichende Tauglichkeit als Modell zur Untersuchung von Wachstumsfaktorabhängigkeiten, Hypoxie oder als Plazentamodell [248–251].

Frühere Studien in KZTs zeigten ebenfalls großes Potential für die Behandlung mit HDACi. Im Vergleich zeigte Quisinostat höhere Effektivität in EC-Zelllinien als Belinostat oder Vorinostat und zeigte ein ähnliches Zytotoxizitätsprofil zu HDACi Panobinostat [176,177]. Im Vergleich mit dem HDAC1/2 Inhibitor Romidepsin lagen die EC_{50}-Konzentrationen von Quisinostat in KZT zwar höher, Quisinostat weist jedoch ein verbessertes pharmakokinetisches Profil auf [177,252]. So ist die mittlere Plasmahalbwertszeit von Quisinostat mit 8,8 h (bei einer Dosis von 12 mg/m²) deutlich höher als bei Romidepsin mit einer Halbwertszeit von 2,95 h (bei einer Dosis von 14 bzw. 18 mg/m² in T-Zell-Lymphom-Patienten) bzw. 6,51 h (bei einer Dosis von 13,3 mg/m² in Patienten mit soliden Tumoren unter anderem Kolorektalkarzinom und Brustkrebs) [252–254]. Auch die Patientenverträglichkeit zeigt sich nach ersten Studien verbessert mit weniger Inhibitor-induzierten Elektrokardiogramm-Veränderungen (EKG) wie der T-Kurven Abflachung einem typischen HDACi Effekt (Romidepsin 88 %, Quisinostat 16 % der Patienten) [252,255]. Auch eine durch HDACi-Behandlung verursachte Übelkeit wurde seltener beobachtet (Romidepsin 78 %, Quisinostat 31,5 % der Patienten) [252,255].

Quisinostat, JIB-04 und Chaetocin wurden zusätzlich in Zelllinien weiterer urologischer Malignitäten wie UC, PCa und RCC getestet, welche sich ebenfalls sensitiv gegenüber der Epi-Drug-Behandlung erwiesen. Weitere Test, sowohl in weiteren Zelllinien als auch

molekularbiologische Analysen mit den Epi-Drugs sind nötig, um die besten Inhibitoren für diese Entitäten zu finden und die Wirkmechanismen und Funktionswege besser zu verstehen. UC weisen besonders häufig epigenetische Veränderungen wie aberrante DNA-Methylierung oder veränderte Chromatinremodellierung auf [256]. Es gibt in UC bereits vielversprechende Studien mit anderen Epi-Drugs wie BET, HDAC und DNMT Inhibitoren [257–260]. PCa und RCC weisen im Bereich der Epigenetik vor allem veränderte DNA-Methylierungsmuster auf, aber auch Mutationen oder veränderte Expressionsprofile von Histonmodifikatoren können auftreten [261,262]. In PCa werden Epi-Drugs als mögliche Lösung zur Resensitivierung für die Bestrahlungstherapie diskutiert [262] und in RCC könnten epigenetische Veränderungen als prognostische Biomarker eingesetzt werden, aber auch hier gibt es Überlegungen zu epigenetischen Therapieansätzen [261]. Von den in dieser Arbeit getesteten Epi-Drugs wurde bereits Chaetocin in einer Reihe von Tumorzellen verschiedener Entitäten getestet. Mit guten Erfolgen sprachen Zellen solider Tumoren wie NSCLC (Lungenkarzinom, aus dem Englischen „*non-small-cell lung cancer*“), Melanom oder Brustkrebs auf die Behandlung an, wohingegen Leukämie-Zelllinien weniger sensitiv waren [263]. In der Studie von Isham *et al.* wurden auch die Nieren- und Prostatakarzinom-Zelllinien Caki-1, 786-O, ACHN, DU145 und PC-3 getestet. Hier wurde ein reduziertes Zellwachstum unter Behandlung mit Chaetocinkonzentrationen im Bereich zwischen 100 nM und 1 µM festgestellt [263]. Dieser Bereich ist dabei ähnlich zu den in dieser Arbeit ermittelten Chaetocinkonzentrationen in diesen urologischen Entitäten (RCC und PCa).

Durch die meisten Behandlungen mit den getesteten Epi-Drugs konnte entweder Apoptose oder ein Zellzyklusarrest induziert werden, wobei dieser Effekt jedoch Zelllinien-abhängig war. Im Vergleich dazu, zeigten Fibroblasten keine Zellzyklusveränderungen und nur eine geringe Induktion von Apoptose. Auch die ersten Versuche in humanen Gewebeproben zeigten einen Anstieg der Apoptosemarker *APAF1* und *FAS* und bieten damit eine gute Voraussetzung für weitere *in vivo* Analysen.

Quisinostat wurde als Einziger der hier getesteten Epi-Drugs bereits in klinischen Studien eingesetzt. In Phase 2 Studien wurden unter anderem die Behandlung mit Quisinostat von T-Zell-Lymphomen getestet oder die Behandlung als Zweitlinientherapie bei Ovarialkrebs in Kombination mit Paclitaxel und Carboplatin geprüft (ClinicalTrials.gov, Identifizierungsnummer NCT01486277 und NCT02948075). Auch JIB-04 und Chaetocin wurden bereits im Mausmodell getestet, JIB-04 verringerte erfolgreich das Wachstum von Lungentumoren in Maus-Xenotransplantationen, während Chaetocin bei der Behandlung von Hepatomen und Ovarialkrebs Xenotransplantationen das Tumorwachstum reduzierte [219,263,264].

Generell werden von den Epi-Drugs bisher nur Vertreter der DNMTi und HDACi durch die FDA und der europäischen Arzneimittelagentur (EMA, *European Medicines Agency*) zur Behandlung seltener Krankheiten zugelassen (sogenannte *Orphan Drugs*). Dazu zählen als

DNMTi beispielsweise 5-Azacytidin und Decitabin, sowie die HDACi Belinostat, Panobinostat, Romidepsin und Vorinostat (https://www.fda.gov). Tazemetostat (Tazverik, gegen EZH2) wurde 2020 als erster Inhibitor gegen Histonmethylierungs-Modifikatoren von der FDA als *Orphan Drug,* sowie zur Behandlung von inoperablen epitheloiden Sarkomen zugelassen, ebenfalls eine Erkrankung junger Erwachsener (Zulassung ab 16 Jahre und älter) [141]. Die Epi-Drugs sind also eine relativ neue Therapieoption, welche in der Behandlung verschiedener, vor allem onkologischer Erkrankungen getestet werden.

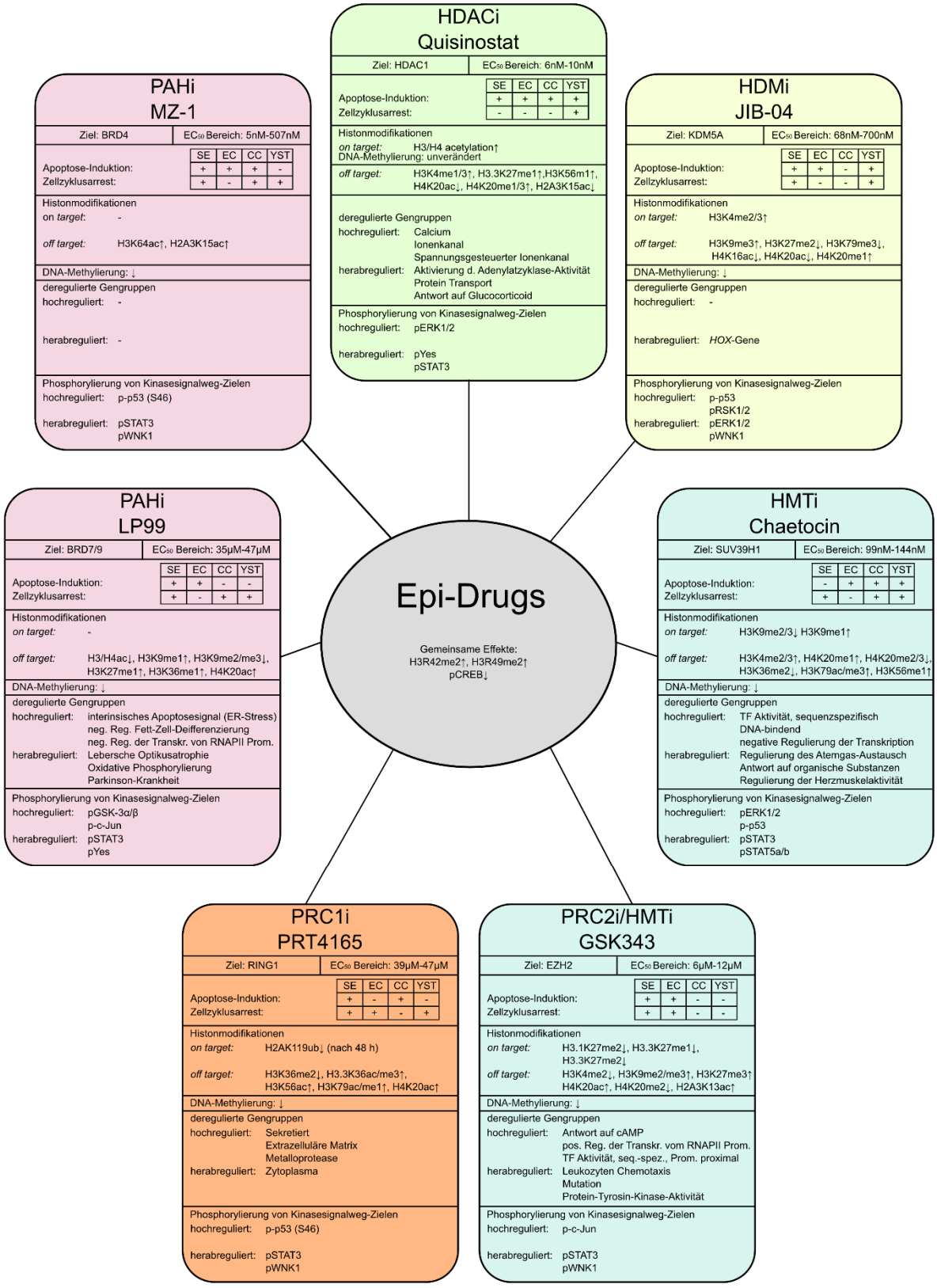


Abbildung 4.1: Zusammenfassung der Effekte der sieben besten Epi-Drugs in KZT-Zellen.
Modifiziert nach Müller *et al.* [212].

4.2. Die Wirkung und Nebenwirkung von Epi-Drugs auf molekularer Ebene

Neben den zytotoxischen Effekten wurden auch die molekularen und epigenetischen Effekte der Epi-Drugs untersucht. Die meisten Studien zu neuen Wirkstoffen überprüfen oft nur die zytotoxische Wirkung oder die zu erwarteten Effekte des Agenz. Allerdings ist die Kenntnis über potentielle *off-target*-Effekte für eine Risikoabschätzung bei neuen Wirkstoffen sehr wichtig, um mögliche durch das Molekül verursachte Prozesse in eine Behandlung mit einzubeziehen. Leider sind diese Nebenwirkungen auf molekularer Ebene oft abhängig von der Art und dem Differenzierungsstand der Zelle. Ein globaler Ansatz, der möglichst viele molekulare Veränderungen abdeckt, ist daher wünschenswert. Die massenspektrometrischen Histonanalysen der epigenetischen Landschaft in dieser Arbeit zeigten neben den erwarteten Veränderungen der Histonmodifikationen auch *off-target*-Effekte (Abbildung 4.1). Die Behandlung mit HDACi Quisinostat führte zu einem Anstieg der globalen Histonacetylierung mit Ausnahme von H4K20ac und H2A3K15ac (Abbildung 4.1). Quisinostat hat die stärkste Affinität zu HDAC1 (Anhang 12), welche auch H4K20 als Ziel acetyliert [265]. H4K20ac wurde als repressive Modifikation im Zusammenhang der Gentranskription beschrieben, wohingegen Histonacetylierung generell eher in positiver Korrelation zur Transkriptionsaktivität steht. H4K20ac co-lokalisiert mit dem repressiven NRDF/REST (*neuron-restrictive silencer factor/repressor element 1-silencing transcription*) Komplex und verhindert somit die Bindung von Transkriptionsfaktoren [266]. Es besteht also die Möglichkeit, dass die H4K20ac anders als andere Histonacetylierungen reguliert wird, da es im Gegensatz zu H3-Acetylierungen vor allem in nicht-zugänglichen Heterochromatinbereichen vorhanden ist. Das vermehrte Auftreten von H4K20me3 als sekundärer Effekt der Quisinostat Behandlung wurde ebenfalls von Arts *et al.* in Ovarialkarzinomzelllinien gezeigt (Abbildung 4.1) [213]. Ein niedriges Level an H4K20me3 gilt als Kennzeichen humaner Tumoren und wurde unter anderem auch in der EC-Zelllinie NT2/D1 nachgewiesen [267]. Warum ein Verlust des Heterochromatinmarkers H4K20me3 vermehrt in entarteten Zellen auftritt, ist noch nicht endgültig geklärt, da auch die Verteilung im Genom eher zell- als tumorspezifisch ist [268]. Es scheint jedoch einen Zusammenhang zwischen Mutationslast und H4K20me3 Status in Tumorzellen zu geben, da wie Gopi *et al.* zeigen konnten, in Genombereichen ohne H4K20me3 auch eine höhere Mutationslast vorlag [268]. Ein Anstieg von H4K20me3 durch die Quisinostat-Behandlung könnte somit einen anti-tumoralen Effekt haben [213,267], und durch damit einhergehende Etablierung von Heterochromatin und damit verbundener Repression von Genen zu einer Verringerung der Proliferation führen.

Die Behandlung mit JIB-04, welcher primär KDM5A/JARID1A inhibiert, führte zu dem erwarteten Anstieg der H3K4me2/me3-Modifikationen, noch deutlicher war jedoch ein Anstieg von H3K9me2/me3 zu beobachten (Abbildung 4.1). Ähnlich dazu zeigten Wang *et al.* eine verringerte Aktivität der H3K9-Demethylierung in JIB-04 behandelten NSCLC Zellen und

Tumoren, i.e. keine Abnahme des H3K9me3 Substrats im JMJD2-Demethylase-Aktivitäts-Kit (Epigentek) nach Zugabe von JIB-04 behandeltem Zelllysat [219]. Eine mögliche Erklärung für den Anstieg wäre die Inhibition anderer Jumonji HDM durch JIB-04 wie KDM4D, welches primär in Hoden exprimiert wird und spezifisch H4K9me2/me3 demethyliert [269,270]. Allerdings sind die mRNA-Level von KDM4D und anderen potentiellen JIB-04-Zielen in KZT-Zelllinien sehr niedrig und damit biologisch in diesem Kontext weniger relevant (Anhang 12). Eine andere Erklärung für die Akkumulation von H3K9me2/me3 wäre hingegen ein Anstieg in der Aktivität von H3K9me2/me3-HMT.

Die Inhibition der HMT SUV39H1 durch Chaetocin führte zu der erwarteten Reduktion der H3K9 Di- und Trimethylierung [221,228]. In *Drosphila melanogaster* SL-2 Zellen führte die Behandlung mit Chaetocin zu einem Anstieg von unmodifiziertem und einfach methyliertem H3K9, bei gleichzeitiger Abnahme von H3K9me2/me3 [221]. Als *off-target* Modifikationen blieben dabei H3K27/K36/K79-Methylierungen größtenteils unbeeinflusst, mit der Abnahme von H3K27/K36me2 als einziger Ausnahme. In dieser Arbeit führte die Behandlung mit Chaetocin ebenfalls zu einer Abnahme von H3K27/K36me2 in 2102EP-Zellen, zusätzlich jedoch auch zu einer Abnahme von H3.3K27me1 und einer Zunahme von H3K79me3 (Abbildung 4.1). Letztere Modifikation wurde in der Studie von Greiner *et al.* jedoch nicht untersucht [221]. Zhang *et al.* wollten mit Chaetocin die H3K9-Methylierung in Schaf-Fibroblasten modulieren, um das Klonieren von Embryos aus somatischen Zellen (SCNT, aus dem Englischen „*somatic cell nuclear transfer*“) zu verbessern. Die Behandlung mit Chaetocin in den Fibroblasten zu führte zu der Reduktion von H3K9me2 und H3K9me3. Zusätzlich wurde, anders als in dieser Arbeit, ein leichter Anstieg an 5mC und nahezu gleichbleibende Level an 5hmC in der DNA-Methylierung im Vergleich zur Kontrolle beobachtet [228]. Die in dieser Studie genutzten Konzentrationen lagen zudem um ein Vielfaches niedriger (EC_{50} 20 nM nach 48 h) als in der vorliegenden Arbeit (Durchschnitt EC_{50} 138 nM nach 48 h in Fibroblasten). Die Schafzellen reagierten daher deutlich empfindlicher auf die Behandlung mit Chaetocin.

Für den BET-Inhibitor MZ-1, einem PAHi, sind als Inhibitor eines *Readers* keine primären Änderungen der epigenetischen Landschaft durch das Enzym selbst zu erwarten. Dennoch kam es bei der Behandlung mit MZ-1 zu einer Anhäufung von H3K64ac und H2A3K15ac (Abbildung 4.1), beides Modifikationen über deren Funktion nur wenig bekannt ist. H3K64ac wurde mit aktiver Transkription assoziiert und ist an der Regulation von Nukleosomdynamiken beteiligt [271], wohingegen H2AK15ac bei DNA-Schäden vorkommt und im HDR-Mechanismus (*homologous directed repair*) eine Rolle spielt [272].

Im Vergleich zu Quisinostat führte die Behandlung mit LP99 zu gegensätzlichen Modifikationsänderungen, also einer Abnahme der Histonacetylierung, erneut mit der Ausnahme von H4K20ac, welche zunahm (Abbildung 4.1). Dies ist ein weiterer Hinweis auf eine differenzielle Regulierung der H4K20-Acetylierung, wie oben bei Quisinostat diskutiert.

Drost *et al.* haben gezeigt, dass ein shRNA-*Knockdown* von *BRD7* zu einer Abnahme von H3K9ac führt [273]. Dies und die Tatsache, dass sowohl BRD7/9 als auch HDAC- und HAT-Enzyme Teil des SWI/SNF-Chromatin-Remodellierungskomplexes sein können lässt darauf schließen, dass BRD7/9, HDAC und HAT mit ähnlichen Zielregionen assoziiert sind [274–277]. Dies könnte bedeuten, dass BRD7/BRD9 bestimmte HAT wie NuA4, SAGA oder EP300 über den SWI/SNF-Komplex rekrutieren kann und somit für die Acetylierung von Histonen sorgt. Generell sind BRD7 und BRD9 Gegenstand der aktuellen Forschung da bisher noch wenig über ihre Funktion bekannt ist. Durch Beteiligung an Zellzyklus und Zellproliferation, sowie bestätigte Interaktionen mit p53 wird auch eine Rolle als Tumorsuppressor von BRD7 diskutiert [273,278].

Unter Behandlung von PRT4165 kam es ebenfalls zu vielen unerwarteten Änderungen der epigenetischen Landschaft. Als Inhibitor einer Ubiquitinligase kam zu mehreren Änderungen von Histonmethylierungen und -acetylierungen (z.B. H3K36ac/me2/me3, H3K79ac/me1); dies zu einem Zeitpunkt (16 h) bei dem noch keine Änderungen der Histonubiquitinierung zu beobachten waren (Abbildung 4.1). Ismail *et al.* konnten eine Verringerung der H2AK119ub bereits nach 60 min in U2OS Zellen (Osteosarkom) beobachten, allerdings erfolgte in 2102EP-Zellen in der vorliegenden Arbeit eine Reduktion der Ubiquitinierung erst nach 48 h [224]. Bakhoum *et al.* konnten zeigen, dass die Abnahme von H2AK119ub von der Expression der PRC1-Komponenten abhängig ist. So erfolgte eine starke Reduktion von H2AK119ub durch die PRT4165 Behandlung in uvealen Melanomzellen 92.1, einer Zelllinie, in der hohe Level der PRC1-Komponenten BAP1, RING1 und RNF2 vorliegen, bereits nach 2 h. In der Zelllinie MP38, mit deutlich niedrigeren PRC1-Komponentenmengen und dadurch niedrigerer Aktivität von PRC1, war die Abnahme deutlich schwächer [279]. Ähnlich zeigten Desai *et al.* eine signifikante Abnahme der Ubiquitinierung nach 36 h (gegenüber 24 h) nach PRT4165 Behandlung in undifferenzierten KIND1-Zellen (embryonale Stammzellen, ES), welche hohe Proteinlevel an RNF2, jedoch wenig BMI1 aufwiesen. Die Expression der PRC1 Komponenten in KZT-Zellen weist ebenfalls höhere Genexpression von *RING1* auf, jedoch niedrige Expression von *BMI1* und *RNF2* (Anhang 12), was jedoch auf Proteinebene noch bestätigt werden muss. Eine Studie von Wang *et al.* deutete darauf hin, dass die katalytische Ubiquitinligase-Aktivität von PRC1 hauptsächlich auf RNF2 beruhte [280], jedoch zeigt RING1 *in vitro* E2-Ligase-Aktivität und kann *in vivo* die Funktion von RNF2 in Fällen wie der X-Chromosom-Ubiquitinierung ersetzen [224,281]. Die verzögerte Reduktion an H2AK119ub könnte demnach auf eine reduzierte Menge an funktionellem PRC1-Komplex zurückzuführen sein, wobei zusätzlich einige PRT4165-Moleküle durch freies RING1 abgefangen werden könnten.

Auch die Inhibition mit GSK343 führte zu der erwarteten Reduktion von H3K27me1/me2, jedoch nicht zu der in Verma *et al.* gezeigten H3K27me3 Reduktion [225] (Abbildung 4.1).

Zusätzlich zu Drug-spezifischen *off-target*-Effekten kam es unter allen getesteten Epi-Drug-Behandlungen zu einer Erhöhung von H3R49me2 in 2102EP. Leider ist über die Funktion dieser Modifikation noch nicht viel bekannt. Mehrere Studien deuten auf eine direkte Interaktion mit der DNA hin und postulieren die Regulation der Genexpression im Zusammenspiel mit H3K56ac (Transkription aktivierend) [282–284]. Auch H3R42me2, welches ebenfalls mit transkriptioneller Aktivierung in Verbindung gebracht wurde, lag in allen Behandlungen erhöht vor, wenn auch weniger stark ausgeprägt [285].

Zusätzlich zu den Änderungen der Histonmodifikationen beeinflussten die Epi-Drugs, welche auf Histonmodifikatoren abzielen, auch den DNA-Methylierungsstatus der Zellen (Abbildung 4.1). So kam es unter der Behandlung mit den Epi-Drugs (außer HDACi Quisinostat) zu einer Reduzierung der DNA-Methylierung 5mC. Es gibt zwei Arten der DNA-Demethylierung: die aktive und die passive Demethylierung. Letztere verläuft über eine größere Dauer von mehreren Replikationszyklen. Es ist daher wahrscheinlicher, dass es nach der Behandlung mit Epi-Drugs zur aktiven DNA-Demethylierung (ADD) kommt, da die Abnahme an 5mC bereits nach 24 h erfolgte. Neben der tendenziellen Abnahme von 5mC erfolgte die gleichzeitige Zunahme von 5hmC. Die Bildung von 5hmC ist der erste Zwischenschritt im Prozess der ADD und erfolgt durch TET-Enzyme (TET1-3) [100]. Somit ist die Zunahme von 5hmC ein weiterer Indikator für den ADD-Prozess. Der hier gewählte Zeitpunkt zur Überprüfung des DNA-Methylierungsstatus ist mit 24 h sehr früh gewählt, allerdings sind bei späteren Messungen bereits hohe Apoptoseraten zu erwarten wodurch eine verlässliche Messung durch den simultanen Abbau der DNA erschwert werden würde [286]. Um weiter zu verfolgen ob die ADD über die oxidative Desaminierung oder den in KZT bevorzugten oxidativen DNA-Demethylierungsweg verläuft [165], sind weitere Untersuchungen nötig. In KZT wurden bereits DNMTi als Therapieoption untersucht. So kam es unter Verwendung der Nukleosidanaloga 5-Azacytidin und Decitabin, sowie einem neueren synthetischen Flavonoid-Wirkstoff MLo1302 zur Induktion von Apoptose, sowie Zellzyklusstörungen in EC-Zelllinien und deren Cisplatin-resistenten Sublinien [174,175,287,288]. Eine Co-Behandlung mit DNMTi und Histonmodifikation-basierten Inhibitoren wäre daher denkbar und könnte zu synergistischen Effekten in der Verringerung des Tumorwachstums führen, wie schon erfolgreich mit der Kombination von Panobinostat oder Belinostat (HDACi) mit Decitabin (DNMTi) in B-Zell-Lymphom- und Ovarialkarzinom-Xenograftmodellen gezeigt [289,290].

Welche allgemeinen Erklärungen gibt es für die Nebeneffekte der Epi-Drugs auf die epigenetische Landschaft? Die Expression alternativer Zielmoleküle der Epi-Drugs derselben Enzymklasse sind in KZT-Geweben und Zelllinien eher niedrig bis nicht exprimiert (Anhang 12). Damit sind alternative Zielmoleküle mit unterschiedlicher enzymatischer Aktivität als Verursacher der Nebeneffekte eher unwahrscheinlich, jedoch nicht vollständig auszuschließen.

Des Weiteren konnten nach Behandlung mit Epi-Drugs keine signifikanten Deregulationen der Expression von epigenetischen Modifikatoren identifiziert werden. Somit sind die beobachteten *off-target* Modifikationsänderungen nicht direkt auf eine veränderte Expression von Modifikatoren zurückzuführen. Eine Ausnahme hiervon ist die Hochregulation von *HDAC9* unter GSK343 Behandlung (Anhang 9), womit sich die verringerte Acetylierung von H3K9ac und H3K16ac erklären lässt. Da HDACs selbst jedoch keine Spezifität für bestimmte Histon-Lysinreste haben, bleibt zu klären, warum sie die verstärkte Deacetylierung nur auf H3K9ac und H3K16ac beschränkt.

Eine mögliche Erklärung für den Modus Operandi der Epi-Drugs ist der Einfluss auf die Genexpression in mehreren Schritten. So verursacht jede Epi-Drug Veränderungen in der epigenetischen Landschaft, wodurch die Expression von Transkriptionsregulatoren und Signalmolekülen beeinflusst wird (Regulator erster Ebene) (Abbildung 4.2). Diese erste Ebene beeinflusster Moleküle bzw. Enzyme kann wiederum entweder selbst die Aktivität epigenetischer Modifikatoren regulieren oder aber die Expression weiterer epigenetischer Modifikatoren beeinflussen (Regulator zweiter Ebene) (Abbildung 4.2).

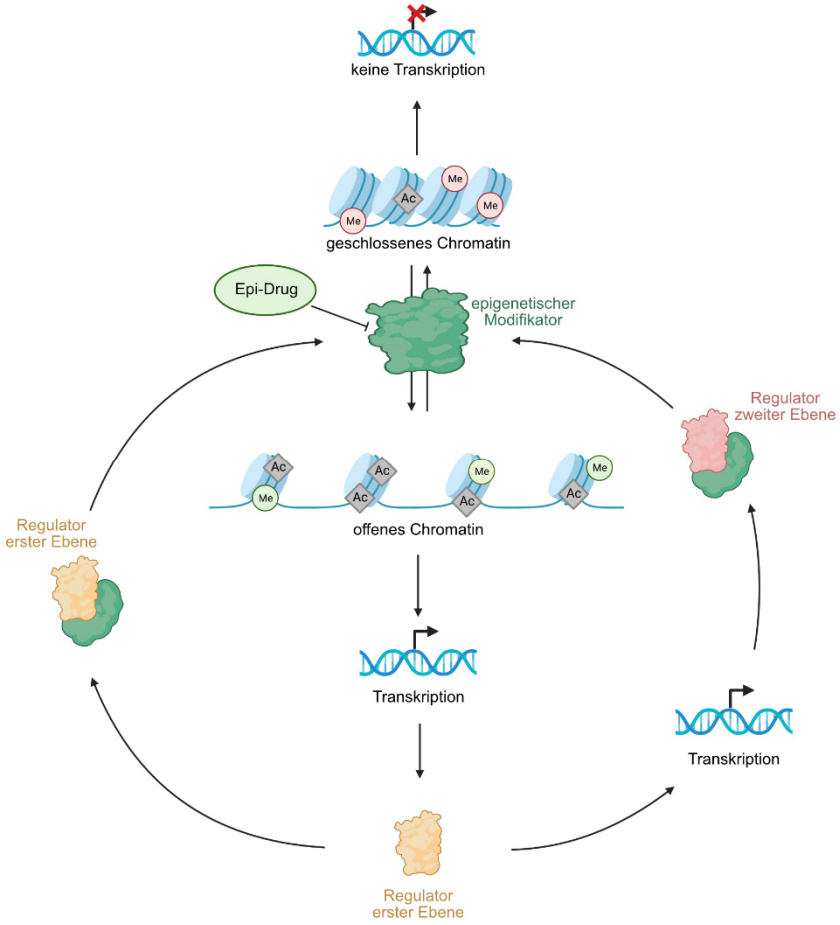


Abbildung 4.2: Funktionsweise der Epi-Drugs und die Entstehung von *off-target* Effekten durch Chromatinmodifikation
Vorgeschlagener Modus operandi der Epi-Drugs durch induzierte Änderung des Chromatinstatus, also dem Schließen des Chromatins und stillgelegter Transkription oder dem Öffnen des Chromatins, welches vor allem die Transkription von Signalmolekülen und Transkriptionsregulatoren begünstigt (Regulator erster Ebene). Diese Regulatoren der ersten Ebene können entweder direkt die Aktivität epigenetischer Modifikatoren beeinflussen (links) oder induzieren die Expression weiterer Faktoren, die dann mit epigenetischen Modifikatoren interagieren (Regulatoren zweiter Ebene, rechts). Diese Abbildung wurde mit BioRender erstellt. Modifiziert nach Müller *et al.* [212].

Die Behandlung mit Quisinostat verursachte die Deregulation der Expression von Genen im Zusammenhang mit Ionen-Transport sowie Ionen-bindender Faktoren (Abbildung 4.1). Eine Zunahme von Natrium- und Calciumionen, sowie eine Abnahme von Kalium- und Chloridionen und dem damit verbundenen Wasserverlust der Zelle, gelten als pro-apoptotische Faktoren [291,292]. In lebenden Zellen ist die Konzentration von Kalium- und Chloridionen im inneren der Zellen größer als außen, während bei Natrium- und Calciumionen die Konzentrationsverhältnisse genau entgegengesetzt auftreten. Demensprechend arbeiten K^+- und Cl^--Transporter für eine Aufnahme dieser Ionen, während die Ionenkanäle sie nach Außen passieren lassen. Die Transportrichtungen der Kanäle und Transporter für Na^+ und Ca^{2+} laufen dementsprechend entgegengesetzt. Als pro-apoptotisch gelten also die Hochregulierung von Ionenkanälen, sowie die Herabregulierung von Ionentransportern, die entgegen dem Gradienten arbeiten. Durch die Behandlung mit dem HDACi Quisinostat in chromaffinen

Nebennierenzellen kam es zu einer Hochregulation von Calciumkanaluntereinheiten (*CACNA1A/B/C/G*, Anhang 9) und somit zu einer Aufnahme von Ca^{2+}, einer darauffolgenden Depolarisierung der Zellmembran und folglich zum Zelltod [293]. Zusätzlich kam es unter Quisinostat zu einer Hochregulation von Kaliumkanaluntereinheiten (*KCN*-Gene, Anhang 9), was zu einem pro-apoptotischem Freisetzen von Kaliumionen führen kann. Mit Chaetocin behandelte 2102EP-Zellen zeigten Herabregulierung von K^+ und Na^+ Transportern (*ATP1A2*), was zu einer Reduktion von Kalium- und einer Akkumulation von Natriumionen im Inneren der Zelle führen und somit ebenfalls Apoptose verursachen bzw. unterstützend wirken kann [294]. Transkriptom-Analysen von Zellen nach verschiedenen HDACi-Behandlungen wie z.B. Romidpesin oder Panobinostat zeigen bisweilen sehr unterschiedliche Deregulationen. So wurde von Nettersheim *et al.* eine Signalkaskade um *ARID1A*, *GADD45B* und *DUSP1* für die apoptotischen und Zellzyklus-arretierenden Effekte von Romidepsin identifiziert [177]. Keines dieser Gene wurde jedoch unter Quisinostat-Behandlung in 2102EP signifikant dereguliert. In Gliomzellen wurden die transkriptionellen Deregulation durch die Behandlung mit HDACi Romidepsin, Panobinostat und Quisinostat miteinander verglichen [295]. Dabei überschnitten sich innerhalb der 100 am stärksten hoch- und herabregulierten Gene nur knapp 20 % der Gene zwischen allen drei Inhibitoren, darunter *SMIM24*, *TNNT1*, *IFITM3* und *COL20A1*. Hier sei angemerkt, dass von diesen vier Genen nur *COL20A1* in Quisinostat behandelten 2102EP Zellen signifikant dereguliert war (jedoch hochreguliert (Anhang 9), statt herunter wie in Vitanza *et al.* beschrieben). Ansonsten gab es in 2102EP weder mit Quisinostat noch mit Romidepsin Übereinstimmungen mit dem Transkriptionsänderungen der Gliomzellen. Auffällig an der Studie von Vitanza *et al.* war auch, dass die Überlappung zwischen Panobinostat und Quisinostat deutlich größer (ca. 70 %) war als mit Romidepsin (jeweils ca. 25 %) [295]. Panobinostat und Quisinostat scheinen daher zusätzlich zu einem ähnlichen Toxizitätskonzentrationsbereich (siehe Abschnitt 4.1), auch ein ähnliches Wirkspektrum zu besitzen, was vermutlich auf die strukturelle Ähnlichkeit der Substanzen im Vergleich zu Romidepsin zurückzuführen ist (Anhang 13).

Die Behandlung mit Chaetocin führte bei Zhang *et al.* zu einer reduzierten Expression der HMT *SUV39H1*, *SUV39H3* und *G9a/EHMT2*, welche in 2102EP-Zellen nicht erfolgte [228]. Die Studie von Isham *et al.* untersuchte das Transkriptom von Chaetocin behandelten OCL-My-5 (Zelllinie des multiplen Myeloms) und A549 (Adenokarzinomzellen). Dabei waren in OCL-My-5 über 1300 Gene dereguliert, während in A549 nur knapp 150 Gene nach Behandlung mit Chaetocin dereguliert wurden. Gemeinsam deregulierte Gene waren vor allem an Entzündungs- und Apoptoseprozessen beteiligt [263]. Die Regulierung der Entzündungsprozesse konnte auch in 2102EP als hochregulierter Prozess identifiziert werden, allerdings waren keine der 48 in OCL-My-5 und A549 gemeinsam deregulierten Gene auch in 2102EP signifikant verändert.

Die Behandlung mit JIB-04 und MZ-1 führte kaum zu Änderungen des Transkriptom in 2102EP. Dennoch war ein Gen, *DDIT4* (*DNA damage-inducible transcript 4 protein*) unter JIB-04 Behandlung signifikant hochreguliert. *DDIT4* zählt zu den antiproliferativen und pro-apoptotischen Genen und war unter JIB-04 Behandlung in H358-Zellen (NSCLC) ebenfalls hochreguliert [219]. Eine weitere Studie zeigte die verringerte Expression von *HOX*-Genen durch JIB-04 Behandlung [296], eine Tendenz hierfür war ebenfalls in 2102EP zu beobachten. Der analysierte Zeitpunkt lag hier jedoch bereits bei 16 h da auch die Zellviabilität bei späteren Zeitpunkten bereits deutlich geringer war, wohingegen Parrish *et al.* Effekte auf das Transkriptom erst nach 24 h untersuchten. Die Vermutung liegt nahe, dass die transkriptionellen Deregulationen anderer Studien zu späteren Zeitpunkten in KZT ebenfalls auftreten.

Die Behandlung mit GSK343 von dreifach negativen Brustkrebszellen (MDA-MB-231, MDA-MB-436 und MDA-MB-453), sowie der siRNA vermittelte *Knockdown* von *EZH2* führten zu einem Anstieg der *FOSB* Expression [297]. In 2102EP war *FOSB* das am stärksten signifikant erhöhte Gen nach GSK343 Behandlung. Nach Zhang *et al.* ist die erhöhte Transkription von *FOSB* auf eine Abnahme von H3K27me3 und stattdessen Zunahme von H3K27ac im *FOSB* Promotor zurückzuführen [297]. Beide Modifikationsänderungen konnten auf globaler Ebene in 2102EP nicht beobachtet werden, jedoch sind Loci-spezifische Effekte nicht auszuschließen und erfordern weitere Analysen. Zhang *et al.* konnten zudem eine Tumorsupressor-Funktion von *FOSB* im Brustkrebsmodell sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachweisen, da es bei *Knockout* von *FOSB* zu einer deutlich erhöhten Zellviabilität bzw. erhöhtem Tumorwachstum kam [297]. FOSB ist ein Teil der FOS-Familie, zu welcher auch FOS, FOSL1 und FOSL2 gehören. Sie können alle Untereinheiten des dimären Transkriptionsfaktorkomplexes AP-1 sein. Die Zusammensetzung des AP-1 ist sehr heterogen besteht aus den FOS-, JUN- (JUN, JUNB, JUND) oder ATF-Familien (ATF2, ATF3, ATF7) als Untereinheiten [298]. Der Großteil dieser AP-1 Untereinheiten (alle außer ATF2 und ATF7) sind durch die Behandlung mit GSK343 in 2102EP in ihrer Expression erhöht (Anhang 9). Der AP-1 Komplex ist an der Regulation sehr vieler zellulärer Prozesse beteiligt, unter anderem Zellproliferation und Zelltod. Die Überexpression von AP-1 Komponenten wird sowohl als onkogen als auch Tumor-suppressiv beschrieben und hängt stark vom Zelltyp und dem Differenzierungsstatus ab [299]. Welche Rolle AP-1 in der Pathogenese und Entwicklung von KZT spielt ist noch nicht geklärt, dennoch stellte eine neue Studie von Najih *et al.* den Zusammenhang zwischen einer in KZT häufig vorliegenden niedrigen Expression von *Gja1* (Proteinname: Connexin-43) und AP-1 her [300]. Aberrante Connexin-43 Level und Lokalisation werden als frühdiagnostischer Marker für KZT bei hohen Risikofaktoren (z.B. Kryptorchismus) diskutiert [301].

Bei der Analyse von Veränderungen in Kinase-Signalwegen kam es zu einer verringerten Phosphorylierung von CREB durch die Epi-Drug-Behandlungen (Abbildung 4.1). Dies kann ein

Effekt reduzierter Aktivität mehrerer Signalwege sein, unter anderem cAMP, MAPK, cGMP/PKG und PI3K/AKT. Reduzierte CREB-Phosphorylierung steht in Verbindung zu verringerter Proliferation und induzierter Apoptose in glatten Muskelzellen und neuronalen Zellen [302,303]. Allerdings zeigte die funktionelle Analyse deregulierter Gene eine Hochregulation von ‚cAMP-Antwort' und ‚MAPK-Signalweg' assoziierten Genen in 2102EP-Zellen unter Quisinostat- und GSK343-Behandlung. Auch für die anderen deregulierten Signalwege waren nach 16 h Behandlung keine signifikanten Transkriptionsveränderungen assoziierter Gene zu beobachten. Allerdings kann die Aktivität von Signalwegkomponenten auch direkt durch die epigenetischen Modifikatoren beeinflusst werden. Diese Nicht-Histon Interaktionen, also posttranslationale Modifikationen an Proteinen, die keine Histone oder Nukleosombestandteile sind, sind jedoch weniger gut erforscht als die Histonmodifikationen. Dennoch könnten diese posttranslationalen Modifikationen in der Funktionsweise der Epi-Drugs eine Rolle spielen und sollten in Betracht gezogen werden. Infolgedessen ergibt sich eine zweite, Nukleosom-unabhängige Interventionsebene der Epi-Drugs (Abbildung 4.3). Zu den Proteinen, deren Aktivität beispielsweise durch Acetylierungen beeinflusst wird, zählen Kinasen wie AKT oder PLK1 [304,305], sowie Transkriptionsfaktoren wie p53 und STAT3 [306–308]. Auch inaktivierende Methylierungen von Transkriptionsfaktoren wie GATA4 durch EZH2 (PrC2) wurden bereits in Cardiomyozyten identifiziert [309]. Kudithipudi *et al.* zeigten zudem eine Aktivitätsregulierung und Beeinflussung der Substrat-bindenden Eigenschaften für posttranslationale Methylierungen durch SUV39H1 (Ziel von Chaetocin) [310]. Ziele von SUV39H1 waren dabei der Chromatininteraktor RAG2 und die Modifikatoren selbst, wie die Methyltransferasen KMT5A/SET8 (Monomethylierung von H4K20 [172]) und DOT1L (Methylierung von H379 [311]). Somit stellt auch die Nicht-Histon-Modifikation eine weitere Möglichkeit der (indirekten) Steuerung der Chromatinzugänglichkeit dar (Abbildung 4.3).

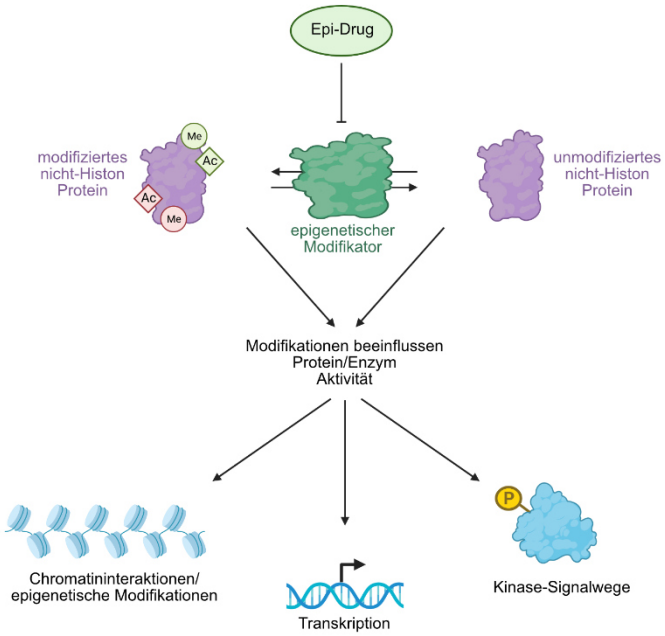


Abbildung 4.3 Funktionsweise der Epi-Drugs und die Entstehung von *off-target* Effekten durch Proteinmodifikation
Epigenetische Modifikatoren können neben dem Chromatin auch andere nicht-Histon-Proteine oder Enzyme post-translational modifizieren und damit ihre Aktivität beeinflussen. Dies können unter anderem Chromatininteraktoren, Transkriptionsfaktoren und Kinasen sein, welche wiederum Chromatinzugänglichkeit, Transkription und Signalwege beeinflussen. Diese Abbildung wurde mit BioRender erstellt. Modifiziert nach Müller *et al.* [212].

Zusammenfassend induzieren die hier untersuchten Epi-Drugs eine Vielzahl von Nebeneffekten, die teilweise zellspezifisch auftreten können. Es ist also generell empfehlenswert globale Veränderungen, welche durch Wirkstoffe induziert werden zu analysieren, um so ein möglichst umfangreiches Wirkportfolio zu kennen. Außerdem unterstützt diese Kenntnis auch die weitere Erforschung der Tumorerkrankungen, da ein besseres Verständnis für die Reaktion der Zellen auf äußere Einflüsse durch die Agenzien erworben wird. Mit dem umfangreichen Wissen über induzierte Effekte können auch neue Therapiestrategien entwickelt werden, beispielsweise durch geeignete Kombination verschiedener Wirkstoffe.

4.3. Die Auswirkungen der HDAC-Inhibition auf die Expression der *DHRS2*-Isoformen

In dieser Arbeit wurde damit begonnen die durch HDACi erhöhte *DHRS2*-Expression in KZT-Zellen genauer zu untersuchen. Mehrere Studien, unter anderem in KZT-, Brustkrebs-, Ovarialkrebs-Zelllinien, haben bereits den Anstieg der *DHRS2*-Expression unter HDACi festgestellt; welche Rolle diese Deregulation im Wirkmechanismus der HDACi jedoch spielt, ist noch nicht genau bekannt [177,179,312–314]. DHRS2 (*Dehydrogenase/Reductase SDR Family Member 2*), auch als Hep27 bekannt, ist eine im Zellkern und den Mitochondrien vorkommende, NADPH-abhängige Reduktase, welche *in vitro* die Carbonyle 3,4-Hexadion,

2,3-Heptadion und 1-Phenyl-1,2-propandion reduziert [315]. Im Zellkern ist eine durch c-Myb induzierte DHRS2 abhängige Stabilisierung von p53 beschrieben. c-Myb aktiviert die Transkription von DHRS2, welches wiederum ein Inhibitor der Ubiquitinligase MDM2 ist, ein wichtiger Regulator des Tumorsuppressors p53 [316,317]. Diese nicht-enzymatische Funktion von DHRS2 als Stabilisator von p53 und damit ein Teil der Zellzyklusregulation würde zu einem erhöhten Proteinlevel an p53 und infolgedessen auch an CDKN1A/p21 führen (Abbildung 4.4 A). In KZT-Zelllinien führte die Behandlung mit Romidepsin zu einem Anstieg von *CDKN1A*/CDKN1A auf RNA und Proteinebene, die Quisinostat-Behandlung führte jedoch nicht zu einem Anstieg der *CDKN1A* Expression [177]. Allerdings kam es sowohl durch die Behandlung mit Romidepsin als auch durch Quisinostat nicht zu einer vermehrten Aktivierung von p53 durch Phosphorylierung bei gleichzeitiger leicht verringerter *TP53* Expression [177]. Über die Funktion von DHRS2 in den Mitochondrien ist dagegen weniger bekannt. Zhou *et al.* zeigten, dass es durch eine Überexpression von *DHRS2* in Ösophagus-Plattenepithelkarzimonzellen zu einer erhöhten Konzentration von NADPH bei gleichzeitiger Abnahme von mitochondrialem ROS kam [318]. Es ist noch nicht endgültig geklärt, ob die p53-stabilisierende Funktion, eine enzymatische Reaktion in den Mitochondrien oder eine bis dato unbekannte Funktion von DHRS2 zur zytotoxischen Wirkung von HDACi beiträgt (Abbildung 4.4 B). In dieser Arbeit wurde daher zunächst der Fokus auf die verschiedenen Isoformen von DHRS2 gelegt. Das mitochondriale Translokationssignal befindet sich im N-Terminus [317], wodurch die kürzeren proteinkodierenden Isoformen 1 und 4 keine Funktion innerhalb der Mitochondrien einnehmen können. Deisenroth *et al.* konnten zudem zeigen, dass DHRS2 zunächst in den Mitochondrien lokalisiert und erst nach Abspaltung des Translokationssignales in den Nukleus gelangt, da eine DHRS2 Mutante ohne Translokationssignal im Zytosol verteilt auftrat [317]. Zusätzlich zu den proteinkodierenden Isoformen mit dem Translokationssignal (*DHRS2_5* und *7*) wurden durch HDACi (Quisinostat, LAK31, Romidepsin) jedoch vor allem die Expression der Isoformen *DHRS2_8* und *9* in 2102EP, VM-CUB-1, DU145 und Caki-1 Zellen im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle erhöht. Beides sind lange, nicht-kodierende Isoformen bei denen noch herausgefunden werden muss, ob sie eine Funktion als lncRNA (*long non-coding*) als Regulator der Transkription, auf posttranskriptionaler Ebene oder auch als epigenetischer Regulator haben können (Abbildung 4.4 C).

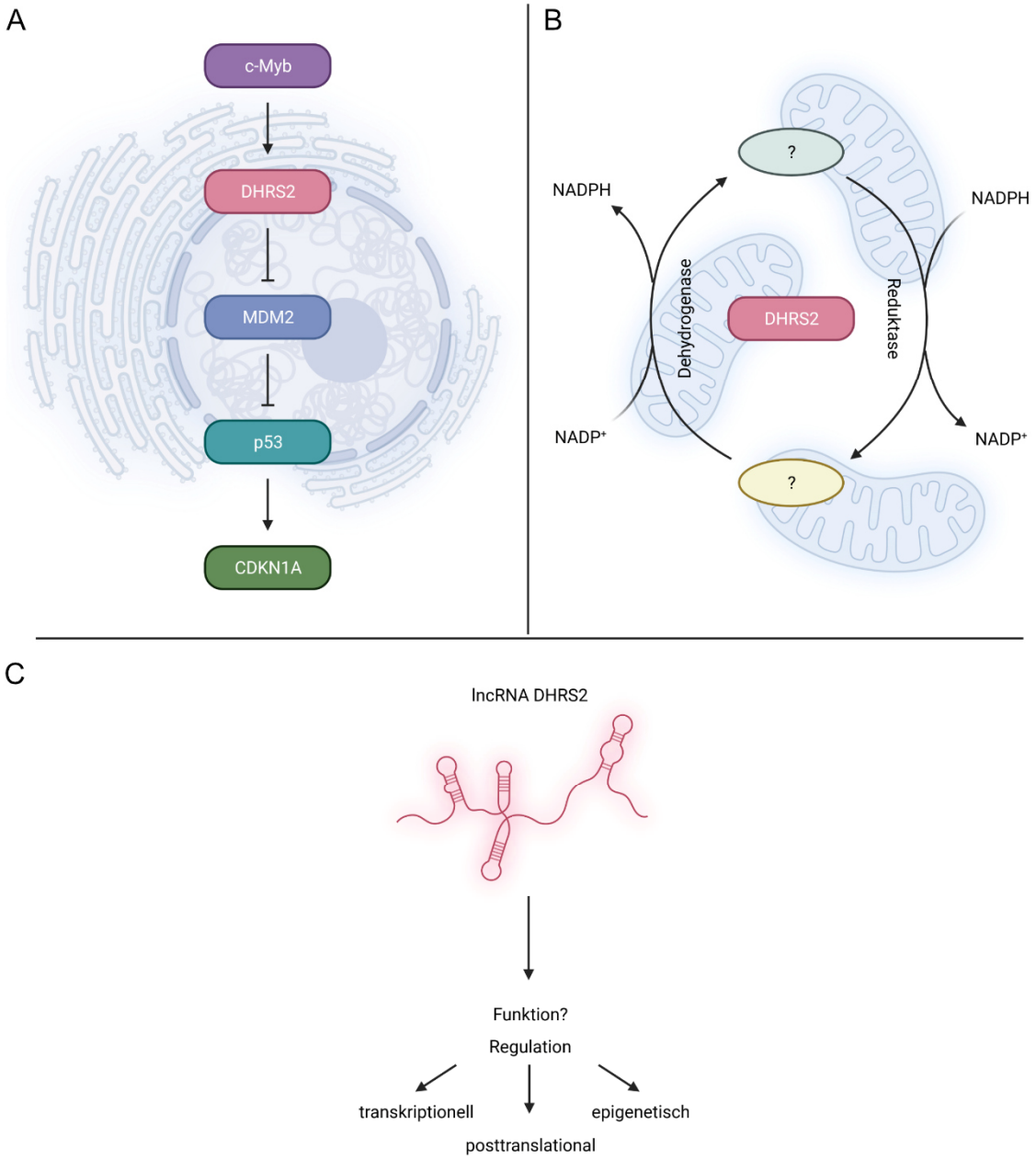


Abbildung 4.4: Mögliche Funktionen von durch HDACi ausgelöste Expression von DHRS2
A) DHRS2 als Stabilisator von p53 im Zellkern. B) Mögliche unbekannte enzymatische Dehydrogenase- und Reduktasefunktion von DHRS2 in Mitochondrien. C) Mögliche funktioneller Relevanz von DHRS2 lncRNAs. Diese Abbildung wurde mit BioRender erstellt. Diese Abbildung wurde mit BioRender erstellt.

Literaturverzeichnis

[1] Tröbs R-B. Keimzelltumoren bei Kindern und Jugendlichen. Kinderchirurgie, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018, p. 1–18.

[2] Oosterhuis JW, Looijenga LHJ. Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. Nat Rev Cancer 2005;5:210–22.

[3] Oosterhuis JW, Looijenga LHJ. Human germ cell tumours from a developmental perspective. Nat Rev Cancer 2019;19:522–37.

[4] Williamson SR, Delahunt B, Magi-Galluzzi C, Algaba F, Egevad L, Ulbright TM, et al. The World Health Organization 2016 classification of testicular germ cell tumours: a review and update from the International Society of Urological Pathology Testis Consultation Panel. Histopathology 2017;70:335–46.

[5] Bertz J, Buttmann-Schweiger N, Kraywinkel K. Epidemiologie bösartiger Hodentumoren in Deutschland. Der Onkol 2017;23:90–6.

[6] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin 2021;71:209–49.

[7] Gurney JK, Florio AA, Znaor A, Ferlay J, Laversanne M, Sarfati D, et al. International Trends in the Incidence of Testicular Cancer: Lessons from 35 Years and 41 Countries. Eur Urol 2019;76:615–23.

[8] White MC, Holman DM, Boehm JE, Peipins LA, Grossman M, Henley SJ. Age and cancer risk: a potentially modifiable relationship. Am J Prev Med 2014;46:S7-15.

[9] Mikuz G. [Testicular cancer - a matter of geography? Epidemiology and etiopathogenesis of germ cell tumors]. Pathologe 2014;35:211–7.

[10] Bray F, Richiardi L, Ekbom A, Pukkala E, Cuninkova M, Møller H. Trends in testicular cancer incidence and mortality in 22 European countries: continuing increases in incidence and declines in mortality. Int J Cancer 2006;118:3099–111.

[11] Dieckmann K-P, Pichlmeier U. Clinical epidemiology of testicular germ cell tumors. World J Urol 2004;22:2–14.

[12] Lip SZL, Murchison LED, Cullis PS, Govan L, Carachi R. A meta-analysis of the risk of boys with isolated cryptorchidism developing testicular cancer in later life. Arch Dis Child 2013;98:20–6.

[13] Chan E, Wayne C, Nasr A, FRCSC for Canadian Association of Pediatric Surgeon Evidence-Based Resource. Ideal timing of orchiopexy: a systematic review. Pediatr Surg Int 2014;30:87–97.

[14] Pettersson A, Richiardi L, Nordenskjold A, Kaijser M, Akre O. Age at surgery for undescended testis and risk of testicular cancer. N Engl J Med 2007;356:1835–41.

[15] Kharazmi E, Hemminki K, Pukkala E, Sundquist K, Tryggvadottir L, Tretli S, et al. Cancer Risk in Relatives of Testicular Cancer Patients by Histology Type and Age at Diagnosis: A Joint Study from Five Nordic Countries. Eur Urol 2015;68:283–9.

[16] Greene MH, Kratz CP, Mai PL, Mueller C, Peters JA, Bratslavsky G, et al. Familial testicular germ cell tumors in adults: 2010 summary of genetic risk factors and clinical phenotype. Endocr Relat Cancer 2010;17:R109-21.

[17] Walsh TJ, Croughan MS, Schembri M, Chan JM, Turek PJ. Increased risk of testicular germ cell cancer among infertile men. Arch Intern Med 2009;169:351–6.

[18] Tan IB, Ang KK, Ching BC, Mohan C, Toh CK, Tan MH. Testicular microlithiasis predicts concurrent testicular germ cell tumors and intratubular germ cell neoplasia of unclassified type in adults: a meta-analysis and systematic review. Cancer 2010;116:4520–32.

[19] Patel K V., Navaratne S, Bartlett E, Clarke JL, Muir GH, Sellars ME, et al. Testicular Microlithiasis: Is Sonographic Surveillance Necessary? Single Centre 14 Year Experience in 442 Patients with Testicular Microlithiasis. Ultraschall Med 2016;37:68–73.

[20] Wanderås EH, Fosså SD, Tretli S. Risk of a second germ cell cancer after treatment of a primary germ cell cancer in 2201 Norwegian male patients. Eur J Cancer 1997;33:244–52.

[21] Kliesch S, Albers P, Schmidt S, Wilborn D, Weiberg J, Bedke J, et al. S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge der Keimzelltumoren des Hodens. AWMF Leitlinienregister, Nr. 043/049OL. 1.0, Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF), Deutschen Krebsgesellschaft e.V. (DKG) und Deutschen Krebshilfe (DKH); 2019, p. 1–216.

[22] Skakkebaek NE. Testicular dysgenesis syndrome: new epidemiological evidence. Int J Androl 2004;27:189–91.

[23] Akre O, Richiardi L. Does a testicular dysgenesis syndrome exist? Hum Reprod 2009;24:2053–60.

[24] Wittekind C. TNM Klassifikation maligner Tumoren. 8th ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2017.

[25] Mead GM. International Germ Cell Consensus Classification: a prognostic factor-based staging system for metastatic germ cell cancers. International Germ Cell Cancer Collaborative Group. J Clin Oncol 1997;15:594–603.

[26] Jordan P, Carmo-Fonseca M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. Cell Mol Life Sci 2000;57:1229–35.

[27] Hande KR. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. Eur J Cancer 1998;34:1514–21.

[28] Hay J, Shahzeidi S, Laurent G. Mechanisms of bleomycin-induced lung damage. Arch Toxicol 1991;65:81–94.

[29] Albers P, Albrecht W, Algaba F, Bokemeyer C, Cohn-Cedermark G, Fizazi K, et al. Guidelines on Testicular Cancer: 2015 Update. Eur Urol 2015;68:1054–68.

[30] Kliesch S, Bergmann M, Hertle L, Nieschlag E, Behre HM. Semen parameters and testicular pathology in men with testicular cancer and contralateral carcinoma in situ or bilateral testicular malignancies. Hum Reprod 1997;12:2830–5.

[31] Mortensen MS, Gundgaard MG, Daugaard G. Treatment options for carcinoma in situ testis. Int J Androl 2011;34:e32-6.

[32] Warde P, Specht L, Horwich A, Oliver T, Panzarella T, Gospodarowicz M, et al. Prognostic factors for relapse in stage I seminoma managed by surveillance: a pooled analysis. J Clin Oncol 2002;20:4448–52.

[33] Aparicio J, Maroto P, del Muro XG, Gumà J, Sánchez-Muñoz A, Margelí M, et al. Risk-adapted treatment in clinical stage I testicular seminoma: the third Spanish Germ Cell Cancer Group study. J Clin Oncol 2011;29:4677–81.

[34] Krege S, Beyer J, Souchon R, Albers P, Albrecht W, Algaba F, et al. European consensus conference on diagnosis and treatment of germ cell cancer: a report of the second meeting of the European Germ Cell Cancer Consensus group (EGCCCG): part I. Eur Urol 2008;53:478–96.

[35] Maroto P, García del Muro X, Aparicio J, Paz-Ares L, Arranz JA, Guma J, et al. Multicentre risk-adapted management for stage I non-seminomatous germ cell tumours. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol 2005;16:1915–20.

[36] Ondrus D, Kajo K, Stastna V, Ondrusova M. Controversies in the management of clinical stage I nonseminomatous germ cell testicular cancer. Klin Onkol 2015;28:112–5.

[37] Heidenreich A, Albers P, Hartmann M, Kliesch S, Kohrmann K-U, Krege S, et al. Complications of primary nerve sparing retroperitoneal lymph node dissection for clinical stage I nonseminomatous germ cell tumors of the testis: experience of the German Testicular Cancer Study Group. J Urol 2003;169:1710–4.

[38] Giannatempo P, Greco T, Mariani L, Nicolai N, Tana S, Farè E, et al. Radiotherapy or chemotherapy for clinical stage IIA and IIB seminoma: a systematic review and meta-analysis of patient outcomes. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol 2015;26:657–68.

[39] Stephenson AJ, Bosl GJ, Bajorin DF, Stasi J, Motzer RJ, Sheinfeld J. Retroperitoneal lymph node dissection in patients with low stage testicular cancer with embryonal carcinoma predominance and/or lymphovascular invasion. J Urol 2005;174:557–60; discussion 560.

[40] Stephenson AJ, Bosl GJ, Motzer RJ, Bajorin DF, Stasi JP, Sheinfeld J. Nonrandomized comparison of primary chemotherapy and retroperitoneal lymph node dissection for clinical stage IIA and IIB nonseminomatous germ cell testicular cancer. J Clin Oncol 2007;25:5597–602.

[41] Bokemeyer C, Kollmannsberger C, Stenning S, Hartmann JT, Horwich A, Clemm C, et al. Metastatic seminoma treated with either single agent carboplatin or cisplatin-based combination chemotherapy: a pooled analysis of two randomised trials. Br J Cancer 2004;91:683–7.

[42] Culine S, Kerbrat P, Kramar A, Théodore C, Chevreau C, Geoffrois L, et al. Refining the optimal chemotherapy regimen for good-risk metastatic nonseminomatous germ-cell tumors: a randomized trial of the Genito-Urinary Group of the French Federation of Cancer Centers (GETUG T93BP). Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol 2007;18:917–24.

[43] de Wit R, Stoter G, Sleijfer DT, Neijt JP, ten Bokkel Huinink WW, de Prijck L, et al. Four cycles of BEP vs four cycles of VIP in patients with intermediate-prognosis metastatic testicular non-seminoma: a randomized study of the EORTC Genitourinary Tract

Cancer Cooperative Group. European Organization for Research and Treatment of Cancer. Br J Cancer 1998;78:828–32.

[44] Kurobe M, Kawai K, Oikawa T, Ichioka D, Kandori S, Takaoka E-I, et al. Paclitaxel, ifosfamide, and cisplatin (TIP) as salvage and consolidation chemotherapy for advanced germ cell tumor. J Cancer Res Clin Oncol 2015;141:127–33.

[45] Mead GM, Cullen MH, Huddart R, Harper P, Rustin GJS, Cook PA, et al. A phase II trial of TIP (paclitaxel, ifosfamide and cisplatin) given as second-line (post-BEP) salvage chemotherapy for patients with metastatic germ cell cancer: a medical research council trial. Br J Cancer 2005;93:178–84.

[46] Lorch A, Rick O, Wündisch T, Hartmann J-T, Bokemeyer C, Beyer J. High dose chemotherapy as salvage treatment for unresectable late relapse germ cell tumors. J Urol 2010;184:168–73.

[47] Fosså SD, Gilbert E, Dores GM, Chen J, McGlynn KA, Schonfeld S, et al. Noncancer causes of death in survivors of testicular cancer. J Natl Cancer Inst 2007;99:533–44.

[48] Gizzi M, Oberic L, Massard C, Poterie A, Le Teuff G, Loriot Y, et al. Predicting and preventing thromboembolic events in patients receiving cisplatin-based chemotherapy for germ cell tumours. Eur J Cancer 2016;69:151–7.

[49] Ross A, Bhasin S. Hypogonadism: Its Prevalence and Diagnosis. Urol Clin North Am 2016;43:163–76.

[50] Horwich A, Fossa SD, Huddart R, Dearnaley DP, Stenning S, Aresu M, et al. Second cancer risk and mortality in men treated with radiotherapy for stage I seminoma. Br J Cancer 2014;110:256–63.

[51] Fung C, Fossa SD, Milano MT, Oldenburg J, Travis LB. Solid tumors after chemotherapy or surgery for testicular nonseminoma: a population-based study. J Clin Oncol 2013;31:3807–14.

[52] Howard R, Gilbert E, Lynch CF, Hall P, Storm H, Holowaty E, et al. Risk of leukemia among survivors of testicular cancer: a population-based study of 42,722 patients. Ann Epidemiol 2008;18:416–21.

[53] Oechsle K, Hartmann M, Mehnert A, Oing C, Bokemeyer C, Vehling S. Symptom burden in long-term germ cell tumor survivors. Support Care Cancer 2016;24:2243–50.

[54] Chovanec M, Abu Zaid M, Hanna N, El-Kouri N, Einhorn LH, Albany C. Long-term

toxicity of cisplatin in germ-cell tumor survivors. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol 2017;28:2670–9.

[55] Mäkelä J-A, Koskenniemi JJ, Virtanen HE, Toppari J. Testis Development. Endocr Rev 2019;40:857–905.

[56] Otis EM, Brent R. Equivalent ages in mouse and human embryos. Anat Rec 1954;120:33–63.

[57] Kristensen DG, Skakkebæk NE, Rajpert-De Meyts E, Almstrup K. Epigenetic features of testicular germ cell tumours in relation to epigenetic characteristics of foetal germ cells. Int J Dev Biol 2013;57:309–17.

[58] Kurimoto K, Yabuta Y, Ohinata Y, Shigeta M, Yamanaka K, Saitou M. Complex genome-wide transcription dynamics orchestrated by Blimp1 for the specification of the germ cell lineage in mice. Genes Dev 2008;22:1617–35.

[59] Arnold SJ, Robertson EJ. Making a commitment: cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo. Nat Rev Mol Cell Biol 2009;10:91–103.

[60] Ohinata Y, Payer B, O'Carroll D, Ancelin K, Ono Y, Sano M, et al. Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. Nature 2005;436:207–13.

[61] Suresh PK. Mechanisms of pluripotency and epigenetic reprogramming in primordial germ cells: Lessons for the conversion of other cell types into the stem cell lineage. Turkish J Biol 2015;39:187–93.

[62] Yamaguchi S, Kimura H, Tada M, Nakatsuji N, Tada T. Nanog expression in mouse germ cell development. Gene Expr Patterns 2005;5:639–46.

[63] Saitou M, Yamaji M. Primordial germ cells in mice. Cold Spring Harb Perspect Biol 2012;4:a008375.

[64] De Felici M. Origin, migration, and proliferation of human primordial germ cells. In: Coticchio G, Albertini DF, De Santis L, editors. Oogenesis. 1st ed., Springer-Verlag London Ltd; 2013, p. 19–37.

[65] Kerr CL, Hill CM, Blumenthal PD, Gearhart JD. Expression of pluripotent stem cell markers in the human fetal ovary. Hum Reprod 2008;23:589–99.

[66] Høyer PE, Byskov AG, Møllgård K. Stem cell factor and c-Kit in human primordial germ cells and fetal ovaries. Mol Cell Endocrinol 2005;234:1–10.

[67] Mamsen LS, Brøchner CB, Byskov AG, Møllgard K. The migration and loss of human primordial germ stem cells from the hind gut epithelium towards the gonadal ridge. Int J Dev Biol 2012;56:771–8.

[68] Anderson RA, Fulton N, Cowan G, Coutts S, Saunders PTK. Conserved and divergent patterns of expression of DAZL, VASA and OCT4 in the germ cells of the human fetal ovary and testis. BMC Dev Biol 2007;7:136.

[69] Saitou M, Barton SC, Surani MA. A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. Nature 2002;418:293–300.

[70] MacGregor GR, Zambrowicz BP, Soriano P. Tissue non-specific alkaline phosphatase is expressed in both embryonic and extraembryonic lineages during mouse embryogenesis but is not required for migration of primordial germ cells. Development 1995;121:1487–96.

[71] Jacob S, Moley KH. Gametes and embryo epigenetic reprogramming affect developmental outcome: implication for assisted reproductive technologies. Pediatr Res 2005;58:437–46.

[72] Baroni T, Arato I, Mancuso F, Calafiore R, Luca G. On the Origin of Testicular Germ Cell Tumors: From Gonocytes to Testicular Cancer. Front Endocrinol (Lausanne) 2019;10:343.

[73] Vincent SD, Dunn NR, Sciammas R, Shapiro-Shalef M, Davis MM, Calame K, et al. The zinc finger transcriptional repressor Blimp1/Prdm1 is dispensable for early axis formation but is required for specification of primordial germ cells in the mouse. Development 2005;132:1315–25.

[74] Yamaji M, Seki Y, Kurimoto K, Yabuta Y, Yuasa M, Shigeta M, et al. Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice. Nat Genet 2008;40:1016–22.

[75] Ma Z, Swigut T, Valouev A, Rada-Iglesias A, Wysocka J. Sequence-specific regulator Prdm14 safeguards mouse ESCs from entering extraembryonic endoderm fates. Nat Struct Mol Biol 2011;18:120–7.

[76] Aksoy I, Jauch R, Chen J, Dyla M, Divakar U, Bogu GK, et al. Oct4 switches partnering from Sox2 to Sox17 to reinterpret the enhancer code and specify endoderm. EMBO J 2013;32:938–53.

[77] Jostes S V., Fellermeyer M, Arévalo L, Merges GE, Kristiansen G, Nettersheim D, et al. Unique and redundant roles of SOX2 and SOX17 in regulating the germ cell tumor fate. Int J Cancer 2020;146:1592–605.

[78] Nettersheim D, Jostes S, Schneider S, Schorle H. Elucidating human male germ cell development by studying germ cell cancer. Reproduction 2016;152:R101-13.

[79] Irie N, Weinberger L, Tang WWC, Kobayashi T, Viukov S, Manor YS, et al. SOX17 is a critical specifier of human primordial germ cell fate. Cell 2015;160:253–68.

[80] Leitch HG, Smith A. The mammalian germline as a pluripotency cycle. Development 2013;140:2495–501.

[81] de Jong J, Stoop H, Gillis AJM, van Gurp RJHLM, van de Geijn G-JM, Boer M de, et al. Differential expression of SOX17 and SOX2 in germ cells and stem cells has biological and clinical implications. J Pathol 2008;215:21–30.

[82] Nettersheim D, Jostes S, Sharma R, Schneider S, Hofmann A, Ferreira HJ, et al. BMP Inhibition in Seminomas Initiates Acquisition of Pluripotency via NODAL Signaling Resulting in Reprogramming to an Embryonal Carcinoma. PLoS Genet 2015;11:e1005415.

[83] Nettersheim D, Heimsoeth A, Jostes S, Schneider S, Fellermeyer M, Hofmann A, et al. SOX2 is essential for in vivo reprogramming of seminoma-like TCam-2 cells to an embryonal carcinoma-like fate. Oncotarget 2016;7:47095–110.

[84] Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. Hum Reprod 2001;16:972–8.

[85] Szarek M, Bergmann M, Konrad L, Schuppe H-C, Kliesch S, Hedger MP, et al. Activin A target genes are differentially expressed between normal and neoplastic adult human testes: clues to gonocyte fate choice. Andrology 2019;7:31–41.

[86] Ara T, Nakamura Y, Egawa T, Sugiyama T, Abe K, Kishimoto T, et al. Impaired colonization of the gonads by primordial germ cells in mice lacking a chemokine, stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100:5319–23.

[87] Hoei-Hansen CE, Holm M, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE. Histological evidence of testicular dysgenesis in contralateral biopsies from 218 patients with testicular germ cell cancer. J Pathol 2003;200:370–4.

[88] Sonne SB, Kristensen DM, Novotny GW, Olesen IA, Nielsen JE, Skakkebaek NE, et al. Testicular dysgenesis syndrome and the origin of carcinoma in situ testis. Int J Androl 2008;31:275–87.

[89] Sonne SB, Almstrup K, Dalgaard M, Juncker AS, Edsgard D, Ruban L, et al. Analysis of gene expression profiles of microdissected cell populations indicates that testicular carcinoma in situ is an arrested gonocyte. Cancer Res 2009;69:5241–50.

[90] Waddington CH. The Epigenotype. Endeavour 1942:18–20.

[91] Waddington CH. The Epigenotype. Int J Epidemiol 2012;41:10–3.

[92] Holliday R. The inheritance of epigenetic defects. Science 1987;238:163–70.

[93] Holliday R. Epigenetics: an overview. Dev Genet 1994;15:453–7.

[94] Riggs AD, Martienssen RA, Russo VE. Introduction. Epigenetic Mech. Gene Regul., Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1996, p. 1–4.

[95] Wu C -t., Morris JR. Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. Science 2001;293:1103–5.

[96] Ndlovu MN, Denis H, Fuks F. Exposing the DNA methylome iceberg. Trends Biochem Sci 2011;36:381–7.

[97] Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. Nat Rev Genet 2008;9:465–76.

[98] Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. Genes Dev 2011;25:1010–22.

[99] Panning B. X-chromosome inactivation: the molecular basis of silencing. J Biol 2008;7:30.

[100] Ito S, D'Alessio AC, Taranova O V., Hong K, Sowers LC, Zhang Y. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. Nature 2010;466:1129–33.

[101] Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA, et al. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. Science 2011;333:1300–3.

[102] Sadakierska-Chudy A, Kostrzewa RM, Filip M. A comprehensive view of the epigenetic

landscape part I: DNA methylation, passive and active DNA demethylation pathways and histone variants. Neurotox Res 2015;27:84–97.

[103] Feng Y, Xie N-B, Tao W-B, Ding J-H, You X-J, Ma C-J, et al. Transformation of 5-Carboxylcytosine to Cytosine Through C–C Bond Cleavage in Human Cells Constitutes a Novel Pathway for DNA Demethylation. CCS Chem 2021;3:994–1008.

[104] Rossetto D, Avvakumov N, Côté J. Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events. Epigenetics 2012;7:1098–108.

[105] Keppler BR, Archer TK. Chromatin-modifying enzymes as therapeutic targets--Part 1. Expert Opin Ther Targets 2008;12:1301–12.

[106] Bagot RC, Labonté B, Peña CJ, Nestler EJ. Epigenetic signaling in psychiatric disorders: stress and depression. Dialogues Clin Neurosci 2014;16:281–95.

[107] Erler J, Zhang R, Petridis L, Cheng X, Smith JC, Langowski J. The role of histone tails in the nucleosome: a computational study. Biophys J 2014;107:2911–22.

[108] Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. Cell Res 2011;21:381–95.

[109] Rada-Iglesias A, Bajpai R, Swigut T, Brugmann SA, Flynn RA, Wysocka J. A unique chromatin signature uncovers early developmental enhancers in humans. Nature 2011;470:279–83.

[110] Zhang Y, Sun Z, Jia J, Du T, Zhang N, Tang Y, et al. Overview of Histone Modification. In: Fang D, Han J, editors. Histone Mutat. Cancer, Singapore: Springer Singapore; 2021, p. 1–16.

[111] Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, et al. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. Nature 2001;410:120–4.

[112] Vavouri T, Lehner B. Human genes with CpG island promoters have a distinct transcription-associated chromatin organization. Genome Biol 2012;13:R110.

[113] Lehnertz B, Ueda Y, Derijck AAHA, Braunschweig U, Perez-Burgos L, Kubicek S, et al. Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. Curr Biol 2003;13:1192–200.

[114] Biswas S, Rao CM. Epigenetic tools (The Writers, The Readers and The Erasers) and

their implications in cancer therapy. Eur J Pharmacol 2018;837:8–24.

[115] Tyagi M, Imam N, Verma K, Patel AK. Chromatin remodelers: We are the drivers!! Nucleus 2016;7:388–404.

[116] Skinner MK. Role of epigenetics in developmental biology and transgenerational inheritance. Birth Defects Res C Embryo Today 2011;93:51–5.

[117] Baylin SB, Jones PA. Epigenetic Determinants of Cancer. Cold Spring Harb Perspect Biol 2016;8.

[118] Zoghbi HY, Beaudet AL. Epigenetics and Human Disease. Cold Spring Harb Perspect Biol 2016;8:a019497.

[119] Von Hoff DD, Slavik M, Muggia FM. 5-Azacytidine. A new anticancer drug with effectiveness in acute myelogenous leukemia. Ann Intern Med 1976;85:237–45.

[120] Jones PA, Taylor SM. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. Cell 1980;20:85–93.

[121] Jones PA, Taylor SM, Wilson VL. Inhibition of DNA methylation by 5-azacytidine. Recent Results Cancer Res 1983;84:202–11.

[122] Santi D V., Norment A, Garrett CE. Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. Proc Natl Acad Sci U S A 1984;81:6993–7.

[123] Ahuja N, Easwaran H, Baylin SB. Harnessing the potential of epigenetic therapy to target solid tumors. J Clin Invest 2014;124:56–63.

[124] Ganesan A, Arimondo PB, Rots MG, Jeronimo C, Berdasco M. The timeline of epigenetic drug discovery: from reality to dreams. Clin Epigenetics 2019;11:174.

[125] Friend C, Scher W, Holland JG, Sato T. Hemoglobin synthesis in murine virus-induced leukemic cells in vitro: stimulation of erythroid differentiation by dimethyl sulfoxide. Proc Natl Acad Sci U S A 1971;68:378–82.

[126] Reuben RC, Wife RL, Breslow R, Rifkind RA, Marks PA. A new group of potent inducers of differentiation in murine erythroleukemia cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1976;73:862–6.

[127] Andreeff M, Stone R, Michaeli J, Young CW, Tong WP, Sogoloff H, et al.

Hexamethylene bisacetamide in myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia: a phase II clinical trial with a differentiation-inducing agent. Blood 1992;80:2604–9.

[128] Richon VM, Webb Y, Merger R, Sheppard T, Jursic B, Ngo L, et al. Second generation hybrid polar compounds are potent inducers of transformed cell differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A 1996;93:5705–8.

[129] Richon VM, Emiliani S, Verdin E, Webb Y, Breslow R, Rifkind RA, et al. A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95:3003–7.

[130] Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. J Biol Chem 1990;265:17174–9.

[131] Gregoretti I V., Lee Y-M, Goodson H V. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. J Mol Biol 2004;338:17–31.

[132] Nakajima H, Kim YB, Terano H, Yoshida M, Horinouchi S. FR901228, a potent antitumor antibiotic, is a novel histone deacetylase inhibitor. Exp Cell Res 1998;241:126–33.

[133] Furumai R, Matsuyama A, Kobashi N, Lee K-H, Nishiyama M, Nakajima H, et al. FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases. Cancer Res 2002;62:4916–21.

[134] Avendaño C, Menéndez JC. Epigenetic Therapy of Cancer. In: Avendaño C, Menéndez JC, editors. Med. Chem. Anticancer Drugs, Elsevier; 2015, p. 325–58.

[135] Singh V, Sharma P, Capalash N. DNA methyltransferase-1 inhibitors as epigenetic therapy for cancer. Curr Cancer Drug Targets 2013;13:379–99.

[136] Kantarjian HM, Roboz GJ, Kropf PL, Yee KWL, O'Connell CL, Tibes R, et al. Guadecitabine (SGI-110) in treatment-naive patients with acute myeloid leukaemia: phase 2 results from a multicentre, randomised, phase 1/2 trial. Lancet Oncol 2017;18:1317–26.

[137] Angeles E, HugoVazquez-Valadez V, Vazquez-Valadez O, Velazquez-Sanchez A, Ramirez A, Martinez L, et al. Computational Studies of 1-Hydrazinophthalazine (Hydralazine) as Antineoplasic Agent. Docking Studies on Methyltransferase. Lett Drug Des Discov 2005;2:282–6.

[138] Cavenagh JD, Popat R. Optimal Management of Histone Deacetylase Inhibitor-Related Adverse Events in Patients With Multiple Myeloma: A Focus on Panobinostat. Clin Lymphoma Myeloma Leuk 2018;18:501–7.

[139] Kaniskan HÜ, Konze KD, Jin J. Selective inhibitors of protein methyltransferases. J Med Chem 2015;58:1596–629.

[140] Stein EM, Garcia-Manero G, Rizzieri DA, Tibes R, Berdeja JG, Savona MR, et al. The DOT1L inhibitor pinometostat reduces H3K79 methylation and has modest clinical activity in adult acute leukemia. Blood 2018;131:2661–9.

[141] Manchester B. FDA approves first treatment option specifically for patients with epithelioid sarcoma, a rare soft tissue cancer. FDA - US Food Drug Adm 2020. https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-treatment-option-specifically-patients-epithelioid-sarcoma-rare-soft-tissue (accessed March 1, 2022).

[142] Gulati N, Béguelin W, Giulino-Roth L. Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) inhibitors. Leuk Lymphoma 2018;59:1574–85.

[143] Maes T, Carceller E, Salas J, Ortega A, Buesa C. Advances in the development of histone lysine demethylase inhibitors. Curr Opin Pharmacol 2015;23:52–60.

[144] Benelkebir H, Hodgkinson C, Duriez PJ, Hayden AL, Bulleid RA, Crabb SJ, et al. Enantioselective synthesis of tranylcypromine analogues as lysine demethylase (LSD1) inhibitors. Bioorg Med Chem 2011;19:3709–16.

[145] Gaweska H, Fitzpatrick PF. Structures and Mechanism of the Monoamine Oxidase Family. Biomol Concepts 2011;2:365–77.

[146] Andrieu GP, Shafran JS, Deeney JT, Bharadwaj KR, Rangarajan A, Denis G V. BET proteins in abnormal metabolism, inflammation, and the breast cancer microenvironment. J Leukoc Biol 2018;104:265–74.

[147] Delmore JE, Issa GC, Lemieux ME, Rahl PB, Shi J, Jacobs HM, et al. BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. Cell 2011;146:904–17.

[148] Li F, MacKenzie KR, Jain P, Santini C, Young DW, Matzuk MM. Metabolism of JQ1, an inhibitor of bromodomain and extra terminal bromodomain proteins, in human and mouse liver microsomes†. Biol Reprod 2020;103:427–36.

[149] Odore E, Lokiec F, Cvitkovic E, Bekradda M, Herait P, Bourdel F, et al. Phase I Population Pharmacokinetic Assessment of the Oral Bromodomain Inhibitor OTX015 in Patients with Haematologic Malignancies. Clin Pharmacokinet 2016;55:397–405.

[150] Connolly RM, Li H, Jankowitz RC, Zhang Z, Rudek MA, Jeter SC, et al. Combination Epigenetic Therapy in Advanced Breast Cancer with 5-Azacitidine and Entinostat: A Phase II National Cancer Institute/Stand Up to Cancer Study. Clin Cancer Res 2017;23:2691–701.

[151] Heinemann A, Cullinane C, De Paoli-Iseppi R, Wilmott JS, Gunatilake D, Madore J, et al. Combining BET and HDAC inhibitors synergistically induces apoptosis of melanoma and suppresses AKT and YAP signaling. Oncotarget 2015;6:21507–21.

[152] Mazzone R, Zwergel C, Mai A, Valente S. Epi-drugs in combination with immunotherapy: a new avenue to improve anticancer efficacy. Clin Epigenetics 2017;9:59.

[153] Morel D, Jeffery D, Aspeslagh S, Almouzni G, Postel-Vinay S. Combining epigenetic drugs with other therapies for solid tumours - past lessons and future promise. Nat Rev Clin Oncol 2020;17:91–107.

[154] Burmeister A, Stephan A, Alves Avelar LA, Müller MR, Seiwert A, Höfmann S, et al. Establishment and evaluation of a dual HDAC / BET inhibitor as a therapeutic option for germ cell tumors and other urological malignancies. Mol Cancer Ther 2022:(online ahead of print).

[155] Patyar S, Prakash A, Medhi B. Dual inhibition: a novel promising pharmacological approach for different disease conditions. J Pharm Pharmacol 2011;63:459–71.

[156] Sheikine Y, Genega E, Melamed J, Lee P, Reuter VE, Ye H. Molecular genetics of testicular germ cell tumors. Am J Cancer Res 2012;2:153–67.

[157] Shen H, Shih J, Hollern DP, Wang L, Bowlby R, Tickoo SK, et al. Integrated Molecular Characterization of Testicular Germ Cell Tumors. Cell Rep 2018;23:3392–406.

[158] Ellrott K, Bailey MH, Saksena G, Covington KR, Kandoth C, Stewart C, et al. Scalable Open Science Approach for Mutation Calling of Tumor Exomes Using Multiple Genomic Pipelines. Cell Syst 2018;6:271-281.e7.

[159] Müller MR, Skowron MA, Albers P, Nettersheim D. Molecular and epigenetic pathogenesis of germ cell tumors. Asian J Urol 2021;8:144–54.

[160] Knudson AG. Hereditary cancer: two hits revisited. J Cancer Res Clin Oncol 1996;122:135–40.

[161] Tomlinson IPM, Roylance R, Houlston RS. Two hits revisited again. J Med Genet 2001;38:81–5.

[162] Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. Carcinogenesis 2010;31:27–36.

[163] Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. Cancer Discov 2012;2:401–4.

[164] Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. Sci Signal 2013;6:pl1.

[165] Nettersheim D, Heukamp LC, Fronhoffs F, Grewe MJ, Haas N, Waha A, et al. Analysis of TET expression/activity and 5mC oxidation during normal and malignant germ cell development. PLoS One 2013;8:e82881.

[166] Almstrup K, Nielsen JE, Mlynarska O, Jansen MT, Jørgensen A, Skakkebæk NE, et al. Carcinoma in situ testis displays permissive chromatin modifications similar to immature foetal germ cells. Br J Cancer 2010;103:1269–76.

[167] Eckert D, Biermann K, Nettersheim D, Gillis AJM, Steger K, Jäck H-M, et al. Expression of BLIMP1/PRMT5 and concurrent histone H2A/H4 arginine 3 dimethylation in fetal germ cells, CIS/IGCNU and germ cell tumors. BMC Dev Biol 2008;8:106.

[168] Singh R, Fazal Z, Freemantle SJ, Spinella MJ. Between a Rock and a Hard Place: An Epigenetic-Centric View of Testicular Germ Cell Tumors. Cancers (Basel) 2021;13:1506.

[169] Vastenhouw NL, Schier AF. Bivalent histone modifications in early embryogenesis. Curr Opin Cell Biol 2012;24:374–86.

[170] Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, et al. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. Cell 2006;125:315–26.

[171] Pan G, Tian S, Nie J, Yang C, Ruotti V, Wei H, et al. Whole-genome analysis of histone H3 lysine 4 and lysine 27 methylation in human embryonic stem cells. Cell Stem Cell 2007;1:299–312.

[172] Couture J-F, Collazo E, Brunzelle JS, Trievel RC. Structural and functional analysis of SET8, a histone H4 Lys-20 methyltransferase. Genes Dev 2005;19:1455–65.

[173] Jostes S, Nettersheim D, Schorle H. Epigenetic drugs and their molecular targets in testicular germ cell tumours. Nat Rev Urol 2019;16:245–59.

[174] Wermann H, Stoop H, Gillis AJM, Honecker F, van Gurp RJHLM, Ammerpohl O, et al. Global DNA methylation in fetal human germ cells and germ cell tumours: association with differentiation and cisplatin resistance. J Pathol 2010;221:433–42.

[175] Beyrouthy MJ, Garner KM, Hever MP, Freemantle SJ, Eastman A, Dmitrovsky E, et al. High DNA methyltransferase 3B expression mediates 5-aza-deoxycytidine hypersensitivity in testicular germ cell tumors. Cancer Res 2009;69:9360–6.

[176] Lobo J, Guimarães-Teixeira C, Barros-Silva D, Miranda-Gonçalves V, Camilo V, Guimarães R, et al. Efficacy of HDAC Inhibitors Belinostat and Panobinostat against Cisplatin-Sensitive and Cisplatin-Resistant Testicular Germ Cell Tumors. Cancers (Basel) 2020;12.

[177] Nettersheim D, Jostes S, Fabry M, Honecker F, Schumacher V, Kirfel J, et al. A signaling cascade including ARID1A, GADD45B and DUSP1 induces apoptosis and affects the cell cycle of germ cell cancers after romidepsin treatment. Oncotarget 2016;7:74931–46.

[178] Jostes S, Nettersheim D, Fellermeyer M, Schneider S, Hafezi F, Honecker F, et al. The bromodomain inhibitor JQ1 triggers growth arrest and apoptosis in testicular germ cell tumours in vitro and in vivo. J Cell Mol Med 2017;21:1300–14.

[179] Han Y, Wang Z, Sun S, Zhang Z, Liu J, Jin X, et al. Decreased DHRS2 expression is associated with HDACi resistance and poor prognosis in ovarian cancer. Epigenetics 2020;15:122–33.

[180] Vogelzang NJ, Bronson D, Savino D, Vessella RL, Fraley EF. A human embryonal-yolk sac carcinoma model system in athymic mice. Cancer 1985;55:2584–93.

[181] Pera MF, Blasco Lafita MJ, Mills J. Cultured stem-cells from human testicular teratomas: the nature of human embryonal carcinoma, and its comparison with two types of yolk-sac carcinoma. Int J Cancer 1987;40:334–43.

[182] Snel B, Lehmann G, Bork P, Huynen MA. STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene. Nucleic Acids Res 2000;28:3442–4.

[183] Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. Nucleic Acids Res 2019;47:D607–13.

[184] Heberle H, Meirelles GV, da Silva FR, Telles GP, Minghim R. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. BMC Bioinformatics 2015;16:169.

[185] Krzywinski M, Schein J, Birol I, Connors J, Gascoyne R, Horsman D, et al. Circos: an information aesthetic for comparative genomics. Genome Res 2009;19:1639–45.

[186] Rozen S, Skaletsky HJ. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S, editors. Bioinforma. Methods Protoc. Methods Mol. Biol., Humana Press, NJ; 2000, p. 356–86.

[187] Spandidos A, Wang X, Wang H, Seed B. PrimerBank: a resource of human and mouse PCR primer pairs for gene expression detection and quantification. Nucleic Acids Res 2010;38:D792-9.

[188] Spandidos A, Wang X, Wang H, Dragnev S, Thurber T, Seed B. A comprehensive collection of experimentally validated primers for Polymerase Chain Reaction quantitation of murine transcript abundance. BMC Genomics 2008;9:633.

[189] Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nat Methods 2012;9:676–82.

[190] Du Y, Cai M, Xing X, Ji J, Yang E, Wu J. PINA 3.0: mining cancer interactome. Nucleic Acids Res 2021;49:D1351–7.

[191] Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nat Protoc 2009;4:44–57.

[192] Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. Nucleic Acids Res 2009;37:1–13.

[193] Breslauer KJ, Frank R, Blöcker H, Marky LA. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. Proc Natl Acad Sci U S A 1986;83:3746–50.

[194] Uphoff CC, Drexler HG. Detection of Mycoplasma contamination in cell cultures. Curr Protoc Mol Biol 2014;106:28.4.1-14.

[195] Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. Cancer Res 1988;48:4827–33.

[196] Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. J Immunol Methods 1995;184:39–51.

[197] Fried J, Perez AG, Clarkson BD. Flow cytofluorometric analysis of cell cycle distributions using propidium iodide. Properties of the method and mathematical analysis of the data. J Cell Biol 1976;71:172–81.

[198] Zheng Y, Thomas PM, Kelleher NL. Measurement of acetylation turnover at distinct lysines in human histones identifies long-lived acetylation sites. Nat Commun 2013;4:2203.

[199] MacLean B, Tomazela DM, Shulman N, Chambers M, Finney GL, Frewen B, et al. Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. Bioinformatics 2010;26:966–8.

[200] Howe KL, Achuthan P, Allen J, Allen J, Alvarez-Jarreta J, Amode MR, et al. Ensembl 2021. Nucleic Acids Res 2021;49:D884–91.

[201] Pujar S, O'Leary NA, Farrell CM, Loveland JE, Mudge JM, Wallin C, et al. Consensus coding sequence (CCDS) database: a standardized set of human and mouse protein-coding regions supported by expert curation. Nucleic Acids Res 2018;46:D221–8.

[202] Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3--new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Res 2012;40:e115.

[203] Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, et al. The human genome browser at UCSC. Genome Res 2002;12:996–1006.

[204] Eckert D, Nettersheim D, Heukamp LC, Kitazawa S, Biermann K, Schorle H. TCam-2 but not JKT-1 cells resemble seminoma in cell culture. Cell Tissue Res 2008;331:529–38.

[205] Nettersheim D, Arndt I, Sharma R, Riesenberg S, Jostes S, Schneider S, et al. The cancer/testis-antigen PRAME supports the pluripotency network and represses somatic and germ cell differentiation programs in seminomas. Br J Cancer 2016;115:454–64.

[206] Nettersheim D, Vadder S, Jostes S, Heimsoeth A, Schorle H. TCam-2 Cells Deficient for SOX2 and FOXA2 Are Blocked in Differentiation and Maintain a Seminoma-Like Cell Fate In Vivo. Cancers (Basel) 2019;11:728.

[207] Skowron MA, Becker TK, Kurz L, Jostes S, Bremmer F, Fronhoffs F, et al. The signal transducer CD24 suppresses the germ cell program and promotes an ectodermal rather than mesodermal cell fate in embryonal carcinomas. Mol Oncol 2022;16:982–1008.

[208] Grossman RL, Heath AP, Ferretti V, Varmus HE, Lowy DR, Kibbe WA, et al. Toward a Shared Vision for Cancer Genomic Data. N Engl J Med 2016;375:1109–12.

[209] Zengerle M, Chan K-H, Ciulli A. Selective Small Molecule Induced Degradation of the BET Bromodomain Protein BRD4. ACS Chem Biol 2015;10:1770–7.

[210] Zoppi V, Hughes SJ, Maniaci C, Testa A, Gmaschitz T, Wieshofer C, et al. Iterative Design and Optimization of Initially Inactive Proteolysis Targeting Chimeras (PROTACs) Identify VZ185 as a Potent, Fast, and Selective von Hippel-Lindau (VHL) Based Dual Degrader Probe of BRD9 and BRD7. J Med Chem 2019;62:699–726.

[211] Corson TW, Aberle N, Crews CM. Design and Applications of Bifunctional Small Molecules: Why Two Heads Are Better Than One. ACS Chem Biol 2008;3:677–92.

[212] Müller MR, Burmeister A, Skowron MA, Stephan A, Bremmer F, Wakileh GA, et al. Therapeutical interference with the epigenetic landscape of germ cell tumors: a comparative drug study and new mechanistical insights. Clin Epigenetics 2022;14:5.

[213] Arts J, King P, Mariën A, Floren W, Beliën A, Janssen L, et al. JNJ-26481585, a novel “second-generation” oral histone deacetylase inhibitor, shows broad-spectrum preclinical antitumoral activity. Clin Cancer Res 2009;15:6841–51.

[214] Solomon JM, Pasupuleti R, Xu L, McDonagh T, Curtis R, DiStefano PS, et al. Inhibition of SIRT1 Catalytic Activity Increases p53 Acetylation but Does Not Alter Cell Survival following DNA Damage. Mol Cell Biol 2006;26:28–38.

[215] Bitterman KJ, Anderson RM, Cohen HY, Latorre-Esteves M, Sinclair DA. Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast Sir2 and human SIRT1. J Biol Chem 2002;277:45099–107.

[216] Mohammad HP, Smitheman KN, Kamat CD, Soong D, Federowicz KE, Van Aller GS, et al. A DNA Hypomethylation Signature Predicts Antitumor Activity of LSD1 Inhibitors in SCLC. Cancer Cell 2015;28:57–69.

[217] Prusevich P, Kalin JH, Ming SA, Basso M, Givens J, Li X, et al. A selective phenelzine analogue inhibitor of histone demethylase LSD1. ACS Chem Biol 2014;9:1284–93.

[218] Rose NR, Woon ECY, Tumber A, Walport LJ, Chowdhury R, Li XS, et al. Plant growth regulator daminozide is a selective inhibitor of human KDM2/7 histone demethylases. J Med Chem 2012;55:6639–43.

[219] Wang L, Chang J, Varghese D, Dellinger M, Kumar S, Best AM, et al. A small molecule modulates Jumonji histone demethylase activity and selectively inhibits cancer growth. Nat Commun 2013;4:2035.

[220] Sayegh J, Cao J, Zou MR, Morales A, Blair LP, Norcia M, et al. Identification of small molecule inhibitors of Jumonji AT-rich interactive domain 1B (JARID1B) histone demethylase by a sensitive high throughput screen. J Biol Chem 2013;288:9408–17.

[221] Greiner D, Bonaldi T, Eskeland R, Roemer E, Imhof A. Identification of a specific inhibitor of the histone methyltransferase SU(VAR)3-9. Nat Chem Biol 2005;1:143–5.

[222] Clark PGK, Vieira LCC, Tallant C, Fedorov O, Singleton DC, Rogers CM, et al. LP99: Discovery and Synthesis of the First Selective BRD7/9 Bromodomain Inhibitor. Angew Chem Int Ed Engl 2015;54:6217–21.

[223] Martin LJ, Koegl M, Bader G, Cockcroft X-L, Fedorov O, Fiegen D, et al. Structure-Based Design of an in Vivo Active Selective BRD9 Inhibitor. J Med Chem 2016;59:4462–75.

[224] Ismail IH, McDonald D, Strickfaden H, Xu Z, Hendzel MJ. A small molecule inhibitor of polycomb repressive complex 1 inhibits ubiquitin signaling at DNA double-strand breaks. J Biol Chem 2013;288:26944–54.

[225] Verma SK, Tian X, LaFrance L V, Duquenne C, Suarez DP, Newlander KA, et al. Identification of Potent, Selective, Cell-Active Inhibitors of the Histone Lysine Methyltransferase EZH2. ACS Med Chem Lett 2012;3:1091–6.

[226] Yoo J, Kim JH, Robertson KD, Medina-Franco JL. Molecular modeling of inhibitors of human DNA methyltransferase with a crystal structure: discovery of a novel DNMT1 inhibitor. Adv Protein Chem Struct Biol 2012;87:219–47.

[227] Christensen J, Agger K, Cloos PAC, Pasini D, Rose S, Sennels L, et al. RBP2 belongs to a family of demethylases, specific for tri-and dimethylated lysine 4 on histone 3. Cell 2007;128:1063–76.

[228] Zhang Y-M, Gao E-E, Wang Q-Q, Tian H, Hou J. Effects of histone methyltransferase inhibitor chaetocin on histone H3K9 methylation of cultured ovine somatic cells and development of preimplantation cloned embryos. Reprod Toxicol 2018;79:124–31.

[229] Peters AHFM, Kubicek S, Mechtler K, O'Sullivan RJ, Derijck AAHA, Perez-Burgos L, et al. Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. Mol Cell 2003;12:1577–89.

[230] Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, et al. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. Science 2002;298:1039–43.

[231] McCabe MT, Graves AP, Ganji G, Diaz E, Halsey WS, Jiang Y, et al. Mutation of A677 in histone methyltransferase EZH2 in human B-cell lymphoma promotes hypertrimethylation of histone H3 on lysine 27 (H3K27). Proc Natl Acad Sci U S A 2012;109:2989–94.

[232] Jun F, Peng Z, Zhang Y, Shi D. Quantitative proteomic analysis identifies novel regulators of methotrexate resistance in choriocarcinoma. Gynecol Oncol 2020;157:268–79.

[233] Tempfer C, Horn L-C, Ackermann S, Dittrich R, Ebert A, Einenkel J, et al. S2k Leitlinie: Gestationsbedingte und nicht-gestationsbedingte Trophoblasterkrankungen. AWMF Leitlinienregister, Nr. 032/049, Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG) / Deutschen Krebsgesellschaft e.V. (DKG), vertreten durch die Arbeitsgemeinschaft für Gynäkologische Onkologie (AGO e.V); 2020, p. 1–14.

[234] Exman P, Takahashi TK, Gattás GF, Cantagalli VD, Anton C, Nalesso F, et al. Primary ovary choriocarcinoma: individual DNA polymorphic analysis as a strategy to confirm diagnosis and treatment. Rare Tumors 2013;5:89–92.

[235] Wagner U, Reuß A, Harter P, Hilpert F, Mahner S, Sehouli J, et al. Konsultationsfassung S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren. 3.01. Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe.; 2018.

[236] Rejlekova K, Cursano MC, De Giorgi U, Mego M. Severe Complications in Testicular Germ Cell Tumors: The Choriocarcinoma Syndrome. Front Endocrinol (Lausanne) 2019;10:218.

[237] Duncan DA, Mazur MT. Trophoblastic tumors: ultrastructural comparison of

choriocarcinoma and placental-site trophoblastic tumor. Hum Pathol 1989;20:370–81.

[238] Skowron MA, Vermeulen M, Winkelhausen A, Becker TK, Bremmer F, Petzsch P, et al. 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. Br J Cancer 2020;123:378–91.

[239] Kurz L, Miklyaeva A, Skowron MA, Overbeck N, Poschmann G, Becker T, et al. ARID1A Regulates Transcription and the Epigenetic Landscape via POLE and DMAP1 while ARID1A Deficiency or Pharmacological Inhibition Sensitizes Germ Cell Tumor Cells to ATR Inhibition. Cancers (Basel) 2020;12:905.

[240] Burleigh DW, Kendziorski CM, Choi YJ, Grindle KM, Grendell RL, Magness RR, et al. Microarray Analysis of BeWo and JEG3 Trophoblast Cell Lines: Identification of Differentially Expressed Transcripts. Placenta 2007;28:383–9.

[241] Dietrich B, Kunihs V, Haider S, Pollheimer J, Knöfler M. 3-Dimensional JEG-3 choriocarcinoma cell organoids as a model for trophoblast expansion and differentiation. Placenta 2021;104:243–6.

[242] Cai J, Peng T, Wang J, Zhang J, Hu H, Tang D, et al. Isolation, Culture and Identification of Choriocarcinoma Stem-Like Cells from the Human Choriocarcinoma Cell-Line JEG-3. Cell Physiol Biochem 2016;39:1421–32.

[243] Peng Z, Zhang Y, Shi D, Jia Y, Shi H, Liu H. miR-497-5p/SALL4 axis promotes stemness phenotype of choriocarcinoma and forms a feedback loop with DNMT-mediated epigenetic regulation. Cell Death Dis 2021;12:1046.

[244] Oikawa T, Kamiya A, Zeniya M, Chikada H, Hyuck AD, Yamazaki Y, et al. Sal-like protein 4 (SALL4), a stem cell biomarker in liver cancers. Hepatology 2013;57:1469–83.

[245] Yang J. SALL4 as a transcriptional and epigenetic regulator in normal and leukemic hematopoiesis. Biomark Res 2018;6:1.

[246] Stichelbout M, Devisme L, Franquet-Ansart H, Massardier J, Vinatier D, Renaud F, et al. SALL4 expression in gestational trophoblastic tumors: a useful tool to distinguish choriocarcinoma from placental site trophoblastic tumor and epithelioid trophoblastic tumor. Hum Pathol 2016;54:121–6.

[247] Ardalan Khales S, Abbaszadegan MR, Abdollahi A, Raeisossadati R, Tousi MF,

Forghanifard MM. SALL4 as a new biomarker for early colorectal cancers. J Cancer Res Clin Oncol 2015;141:229–35.

[248] Bagley RG, Ren Y, Kurtzberg L, Weber W, Bangari D, Brondyk W, et al. Human choriocarcinomas: placental growth factor-dependent preclinical tumor models. Int J Oncol 2012;40:479–86.

[249] Zhao J, Chow RP, McLeese RH, Hookham MB, Lyons TJ, Yu JY. Modelling preeclampsia: a comparative analysis of the common human trophoblast cell lines. FASEB BioAdvances 2020;3:23–35.

[250] Rothbauer M, Patel N, Gondola H, Siwetz M, Huppertz B, Ertl P. A comparative study of five physiological key parameters between four different human trophoblast-derived cell lines. Sci Rep 2017;7:5892.

[251] Burleigh DW, Kendziorski CM, Choi YJ, Grindle KM, Grendell RL, Magness RR, et al. Microarray analysis of BeWo and JEG3 trophoblast cell lines: identification of differentially expressed transcripts. Placenta n.d.;28:383–9.

[252] Venugopal B, Baird R, Kristeleit RS, Plummer R, Cowan R, Stewart A, et al. A phase I study of quisinostat (JNJ-26481585), an oral hydroxamate histone deacetylase inhibitor with evidence of target modulation and antitumor activity, in patients with advanced solid tumors. Clin Cancer Res 2013;19:4262–72.

[253] Grant C, Rahman F, Piekarz R, Peer C, Frye R, Robey RW, et al. Romidepsin: a new therapy for cutaneous T-cell lymphoma and a potential therapy for solid tumors. Expert Rev Anticancer Ther 2010;10:997–1008.

[254] Marshall JL, Rizvi N, Kauh J, Dahut W, Figuera M, Kang MH, et al. A phase I trial of depsipeptide (FR901228) in patients with advanced cancer. J Exp Ther Oncol 2002;2:325–32.

[255] Sandor V, Bakke S, Robey RW, Kang MH, Blagosklonny M V, Bender J, et al. Phase I trial of the histone deacetylase inhibitor, depsipeptide (FR901228, NSC 630176), in patients with refractory neoplasms. Clin Cancer Res 2002;8:718–28.

[256] Martinez VG, Munera-Maravilla E, Bernardini A, Rubio C, Suarez-Cabrera C, Segovia C, et al. Epigenetics of Bladder Cancer: Where Biomarkers and Therapeutic Targets Meet. Front Genet 2019;10:1125.

[257] Kaletsch A, Pinkerneil M, Hoffmann MJ, Jaguva Vasudevan AA, Wang C, Hansen FK,

et al. Effects of novel HDAC inhibitors on urothelial carcinoma cells. Clin Epigenetics 2018;10:100.

[258] Thy S, Hommel A, Meneceur S, Bartkowiak AL, Schulz WA, Niegisch G, et al. Epigenetic Treatment of Urothelial Carcinoma Cells Sensitizes to Cisplatin Chemotherapy and PARP Inhibitor Treatment. Cancers (Basel) 2021;13:1–20.

[259] Wang C, Hamacher A, Petzsch P, Köhrer K, Niegisch G, Hoffmann MJ, et al. Combination of Decitabine and Entinostat Synergistically Inhibits Urothelial Bladder Cancer Cells via Activation of FoxO1. Cancers (Basel) 2020;12.

[260] Nunes SP, Henrique R, Jerónimo C, Paramio JM. DNA Methylation as a Therapeutic Target for Bladder Cancer. Cells 2020;9.

[261] Angulo JC, Manini C, López JI, Pueyo A, Colás B, Ropero S. The Role of Epigenetics in the Progression of Clear Cell Renal Cell Carcinoma and the Basis for Future Epigenetic Treatments. Cancers (Basel) 2021;13.

[262] Macedo-Silva C, Benedetti R, Ciardiello F, Cappabianca S, Jerónimo C, Altucci L. Epigenetic mechanisms underlying prostate cancer radioresistance. Clin Epigenetics 2021;13:125.

[263] Isham CR, Tibodeau JD, Bossou AR, Merchan JR, Bible KC. The anticancer effects of chaetocin are independent of programmed cell death and hypoxia, and are associated with inhibition of endothelial cell proliferation. Br J Cancer 2012;106:314–23.

[264] Lee Y-M, Lim J-H, Yoon H, Chun Y-S, Park J-W. Antihepatoma activity of chaetocin due to deregulated splicing of hypoxia-inducible factor 1α pre-mRNA in mice and in vitro. Hepatology 2011;53:171–80.

[265] Arcidiacono OA, Krejčí J, Suchánková J, Bártová E. Deacetylation of Histone H4 Accompanying Cardiomyogenesis is Weakened in HDAC1-Depleted ES Cells. Int J Mol Sci 2018;19.

[266] Kaimori J-Y, Maehara K, Hayashi-Takanaka Y, Harada A, Fukuda M, Yamamoto S, et al. Histone H4 lysine 20 acetylation is associated with gene repression in human cells. Sci Rep 2016;6:24318.

[267] Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, et al. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. Nat Genet 2005;37:391–400.

[268] Gopi LK, Kidder BL. Integrative pan cancer analysis reveals epigenomic variation in cancer type and cell specific chromatin domains. Nat Commun 2021;12:1419.

[269] Iwamori N, Zhao M, Meistrich ML, Matzuk MM. The testis-enriched histone demethylase, KDM4D, regulates methylation of histone H3 lysine 9 during spermatogenesis in the mouse but is dispensable for fertility. Biol Reprod 2011;84:1225–34.

[270] Whetstine JR, Nottke A, Lan F, Huarte M, Smolikov S, Chen Z, et al. Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases. Cell 2006;125:467–81.

[271] Di Cerbo V, Mohn F, Ryan DP, Montellier E, Kacem S, Tropberger P, et al. Acetylation of histone H3 at lysine 64 regulates nucleosome dynamics and facilitates transcription. Elife 2014;3:e01632.

[272] Paquin KL, Howlett NG. Understanding the Histone DNA Repair Code: H4K20me2 Makes Its Mark. Mol Cancer Res 2018;16:1335–45.

[273] Drost J, Mantovani F, Tocco F, Elkon R, Comel A, Holstege H, et al. BRD7 is a candidate tumour suppressor gene required for p53 function. Nat Cell Biol 2010;12:380–9.

[274] Pietrzak J, Płoszaj T, Pułaski Ł, Robaszkiewicz A. EP300-HDAC1-SWI/SNF functional unit defines transcription of some DNA repair enzymes during differentiation of human macrophages. Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech 2019;1862:198–208.

[275] Harte MT, O'Brien GJ, Ryan NM, Gorski JJ, Savage KI, Crawford NT, et al. BRD7, a subunit of SWI/SNF complexes, binds directly to BRCA1 and regulates BRCA1-dependent transcription. Cancer Res 2010;70:2538–47.

[276] Hassan AH, Neely KE, Workman JL. Histone acetyltransferase complexes stabilize swi/snf binding to promoter nucleosomes. Cell 2001;104:817–27.

[277] Alver BH, Kim KH, Lu P, Wang X, Manchester HE, Wang W, et al. The SWI/SNF chromatin remodelling complex is required for maintenance of lineage specific enhancers. Nat Commun 2017;8:14648.

[278] Hu K, Liao D, Wu W, Han A-J, Shi H-J, Wang F, et al. Targeting the anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C)- bromodomain containing 7 (BRD7) pathway for human osteosarcoma. Oncotarget 2014;5:3088–100.

[279] Bakhoum MF, Francis JH, Agustinus A, Earlie EM, Di Bona M, Abramson DH, et al.

Loss of polycomb repressive complex 1 activity and chromosomal instability drive uveal melanoma progression. Nat Commun 2021;12:5402.

[280] Wang H, Wang L, Erdjument-Bromage H, Vidal M, Tempst P, Jones RS, et al. Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. Nature 2004;431:873–8.

[281] de Napoles M, Mermoud JE, Wakao R, Tang YA, Endoh M, Appanah R, et al. Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. Dev Cell 2004;7:663–76.

[282] Topal S, Vasseur P, Radman-Livaja M, Peterson CL. Distinct transcriptional roles for Histone H3-K56 acetylation during the cell cycle in Yeast. Nat Commun 2019;10:4372.

[283] Mei Q, Xu C, Gogol M, Tang J, Chen W, Yu X, et al. Set1-catalyzed H3K4 trimethylation antagonizes the HIR/Asf1/Rtt106 repressor complex to promote histone gene expression and chronological life span. Nucleic Acids Res 2019;47:3434–49.

[284] Armeev GA, Kniazeva AS, Komarova GA, Kirpichnikov MP, Shaytan AK. Histone dynamics mediate DNA unwrapping and sliding in nucleosomes. Nat Commun 2021;12:2387.

[285] Casadio F, Lu X, Pollock SB, LeRoy G, Garcia BA, Muir TW, et al. H3R42me2a is a histone modification with positive transcriptional effects. Proc Natl Acad Sci U S A 2013;110:14894–9.

[286] Nagata S, Nagase H, Kawane K, Mukae N, Fukuyama H. Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. Cell Death Differ 2003;10:108–16.

[287] Oing C, Verem I, Mansour WY, Bokemeyer C, Dyshlovoy S, Honecker F. 5-Azacitidine Exerts Prolonged Pro-Apoptotic Effects and Overcomes Cisplatin-Resistance in Non-Seminomatous Germ Cell Tumor Cells. Int J Mol Sci 2018;20.

[288] Lobo J, Cardoso AR, Miranda-Gonçalves V, Looijenga LHJ, Lopez M, Arimondo PB, et al. Targeting Germ Cell Tumors with the Newly Synthesized Flavanone-Derived Compound MLo1302 Efficiently Reduces Tumor Cell Viability and Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest. Pharmaceutics 2021;13.

[289] Kalac M, Scotto L, Marchi E, Amengual J, Seshan VE, Bhagat G, et al. HDAC inhibitors and decitabine are highly synergistic and associated with unique gene-expression and epigenetic profiles in models of DLBCL. Blood 2011;118:5506–16.

[290] Steele N, Finn P, Brown R, Plumb JA. Combined inhibition of DNA methylation and

histone acetylation enhances gene re-expression and drug sensitivity in vivo. Br J Cancer 2009;100:758–63.

[291] Hoffmann EK, Lambert IH. Ion channels and transporters in the development of drug resistance in cancer cells. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2014;369:20130109.

[292] Kondratskyi A, Kondratska K, Skryma R, Prevarskaya N. Ion channels in the regulation of apoptosis. Biochim Biophys Acta 2015;1848:2532–46.

[293] Cano-Abad MF, Villarroya M, García AG, Gabilan NH, López MG. Calcium entry through L-type calcium channels causes mitochondrial disruption and chromaffin cell death. J Biol Chem 2001;276:39695–704.

[294] Fernández-Segura E, Cañizares FJ, Cubero MA, Warley A, Campos A. Changes in elemental content during apoptotic cell death studied by electron probe X-ray microanalysis. Exp Cell Res 1999;253:454–62.

[295] Vitanza NA, Biery MC, Myers C, Ferguson E, Zheng Y, Girard EJ, et al. Optimal therapeutic targeting by HDAC inhibition in biopsy-derived treatment-naïve diffuse midline glioma models. Neuro Oncol 2021;23:376–86.

[296] Parrish JK, McCann TS, Sechler M, Sobral LM, Ren W, Jones KL, et al. The Jumonji-domain histone demethylase inhibitor JIB-04 deregulates oncogenic programs and increases DNA damage in Ewing Sarcoma, resulting in impaired cell proliferation and survival, and reduced tumor growth. Oncotarget 2018;9:33110–23.

[297] Zhang R, Li X, Liu Z, Wang Y, Zhang H, Xu H. EZH2 inhibitors-mediated epigenetic reactivation of FOSB inhibits triple-negative breast cancer progress. Cancer Cell Int 2020;20:175.

[298] van Dam H, Castellazzi M. Distinct roles of Jun : Fos and Jun : ATF dimers in oncogenesis. Oncogene 2001;20:2453–64.

[299] Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. Nat Rev Cancer 2003;3:859–68.

[300] Najih M, Basque A, Nguyen HT, Diawara M, Martin LJ. Members of the AP-1 Family of Transcription Factors Regulate the Expression of Gja1 in Mouse GC-1 Spermatogonial Cells. Appl Sci 2022;12:1408.

[301] Chevallier D, Carette D, Segretain D, Gilleron J, Pointis G. Connexin 43 a check-point component of cell proliferation implicated in a wide range of human testis diseases. Cell

Mol Life Sci 2013;70:1207–20.

[302] Tokunou T, Shibata R, Kai H, Ichiki T, Morisaki T, Fukuyama K, et al. Apoptosis induced by inhibition of cyclic AMP response element-binding protein in vascular smooth muscle cells. Circulation 2003;108:1246–52.

[303] Riccio A, Ahn S, Davenport CM, Blendy JA, Ginty DD. Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons. Science 1999;286:2358–61.

[304] Guo J, Dai X, Laurent B, Zheng N, Gan W, Zhang J, et al. AKT methylation by SETDB1 promotes AKT kinase activity and oncogenic functions. Nat Cell Biol 2019;21:226–37.

[305] Li W, Wang H-Y, Zhao X, Duan H, Cheng B, Liu Y, et al. A methylation-phosphorylation switch determines Plk1 kinase activity and function in DNA damage repair. Sci Adv 2019;5:eaau7566.

[306] Park J-M, Jo S-H, Kim M-Y, Kim T-H, Ahn Y-H. Role of transcription factor acetylation in the regulation of metabolic homeostasis. Protein Cell 2015;6:804–13.

[307] Gu W, Roeder RG. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. Cell 1997;90:595–606.

[308] Yuan Z-L, Guan Y-J, Chatterjee D, Chin YE. Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. Science 2005;307:269–73.

[309] He A, Shen X, Ma Q, Cao J, von Gise A, Zhou P, et al. PRC2 directly methylates GATA4 and represses its transcriptional activity. Genes Dev 2012;26:37–42.

[310] Kudithipudi S, Schuhmacher MK, Kebede AF, Jeltsch A. The SUV39H1 Protein Lysine Methyltransferase Methylates Chromatin Proteins Involved in Heterochromatin Formation and VDJ Recombination. ACS Chem Biol 2017;12:958–68.

[311] Feng Q, Wang H, Ng HH, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Struhl K, et al. Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. Curr Biol 2002;12:1052–8.

[312] Caslini C, Hong S, Ban YJ, Chen XS, Ince TA. HDAC7 regulates histone 3 lysine 27 acetylation and transcriptional activity at super-enhancer-associated genes in breast cancer stem cells. Oncogene 2019;38:6599–614.

[313] Krönung SK, Beyer U, Chiaramonte ML, Dolfini D, Mantovani R, Dobbelstein M. LTR12

promoter activation in a broad range of human tumor cells by HDAC inhibition. Oncotarget 2016;7:33484–97.

[314] Nettersheim D, Berger D, Jostes S, Skowron M, Schorle H. Deciphering the molecular effects of romidepsin on germ cell tumours: DHRS2 is involved in cell cycle arrest but not apoptosis or induction of romidepsin effectors. J Cell Mol Med 2019;23:670–9.

[315] Shafqat N, Shafqat J, Eissner G, Marschall H-U, Tryggvason K, Eriksson U, et al. Hep27, a member of the short-chain dehydrogenase/reductase family, is an NADPH-dependent dicarbonyl reductase expressed in vascular endothelial tissue. Cell Mol Life Sci 2006;63:1205–13.

[316] Thorner AR, Parker JS, Hoadley KA, Perou CM. Potential tumor suppressor role for the c-Myb oncogene in luminal breast cancer. PLoS One 2010;5:e13073.

[317] Deisenroth C, Thorner AR, Enomoto T, Perou CM, Zhang Y. Mitochondrial Hep27 is a c-Myb target gene that inhibits Mdm2 and stabilizes p53. Mol Cell Biol 2010;30:3981–93.

[318] Zhou Y, Wang L, Ban X, Zeng T, Zhu Y, Li M, et al. DHRS2 inhibits cell growth and motility in esophageal squamous cell carcinoma. Oncogene 2018;37:1086–94.

[319] Gadd MS, Testa A, Lucas X, Chan K-H, Chen W, Lamont DJ, et al. Structural basis of PROTAC cooperative recognition for selective protein degradation. Nat Chem Biol 2017;13:514–21.

[320] Alchanati I, Teicher C, Cohen G, Shemesh V, Barr HM, Nakache P, et al. The E3 ubiquitin-ligase Bmi1/Ring1A controls the proteasomal degradation of Top2alpha cleavage complex - a potentially new drug target. PLoS One 2009;4:e8104.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Die demographische Verteilung von Hodentumoren bei Männern 3
Abbildung 1.2: Hodenkrebs ist eine der häufigsten Krebserkrankungen junger Männer 4
Abbildung 1.3: Methylierung und Demethylierung der DNA (Cytosin) 14
Abbildung 1.4: Das Nukleosom mit posttranslationalen Histonmodifikationen 15
Abbildung 1.5: Strukturformeln der ersten Epigenetischen Inhibitoren: DNMTi 17
Abbildung 1.6: Strukturformeln der ersten HDAC-Inhibitoren 19
Abbildung 1.7: Epi-Drugs der dritten Generation 20
Abbildung 1.8: Anzahl mutierter Gene in KZT im Vergleich zu anderen malignen (urologischen) Entitäten 22
Abbildung 1.9: Veränderungen der Expressionsprofile epigenetischer Interaktoren in KZT 23
Abbildung 3.1: Identifizierung 80 potenzieller epigenetischer Zielgene in KZT-Geweben 54
Abbildung 3.2: Identifizierung 35 potenzieller epigenetischer Zielgene in KZT-Zelllinien 55
Abbildung 3.3: Übersicht der zytotoxischen Effektivität der Epi-Drugs in KZT-Zelllinien 57
Abbildung 3.4: Expressionsprofile der acht wirksamsten Epi-Drug-Ziele in KZT- und weiteren urologischen Entitäten 59
Abbildung 3.5: Epi-Drugs induzieren Apoptose und Zellzyklusarrest in KZT 60
Abbildung 3.6: Hierarchische *Cluster-Heatmap* der MS-Daten zur Analyse der Histonmodifikationen 62
Abbildung 3.7: MS-Analyse der Histonmodifikationen getrennt nach Peptidhäufigkeit 63
Abbildung 3.8: Erwartete Effekte der Epi-Drugs auf Histonmodifikationen 64
Abbildung 3.9: Western Blot-Nachweis von Veränderungen auf Histonmodifikationen durch Epi-Drugs 66
Abbildung 3.10: Slot-Blot Analyse zur Bestimmung des DNA-Methylierungsstatus 67
Abbildung 3.11: Epi-Drugs führen zur Deregulation des Transkriptoms 68
Abbildung 3.12: Funktionelle Analyse der signifikant deregulierten Gene nach Epi-Drug-Behandlung 70
Abbildung 3.13: STRING-Analyse der Quisinostat- und Chaetocin-Behandlung in 2102EP 71
Abbildung 3.14: STRING-Analyse der LP99- und PRT4165-Behandlung in 2102EP 73
Abbildung 3.15: STRING-Analyse der GSK343-Behandlung in 2102EP und qRT-PCR-Validierung 74
Abbildung 3.16: Epi-Drugs beeinflussen Kinase-Signalwege 76
Abbildung 3.17: Die Behandlung mit Epi-Drugs beeinflusst vor allem cAMP (CREB)-, JAK-STAT (STAT3/5)- und WNT (β-Catenin)-Signalkaskaden 77

Abbildung 3.18: Die *DHRS2*-Expression wird durch Behandlung mit verschiedenen HDACi in einer Vielzahl an urologischen Tumorzelllinien stark erhöht 78
Abbildung 3.19: *DHRS2*-Isoformen und ihre Expression in KZT und Hodengewebe 79
Abbildung 3.20: Expression der *DHRS2*-Isoformen in UC, PCa und RCC, sowie ihren entsprechenden gesunden Geweben Blase, Prostata und Niere 80
Abbildung 3.21: qRT-PCR Strategie zur Expressionsananalyse der verschiedenen *DHRS2*-Isoformen 82
Abbildung 3.22: Detaillierte Analyse der Transkriptomdaten zur Identifizierung deregulierter *DHRS2*-Isoformen 83
Abbildung 3.23: Nachweis der erhöhten Expression verschiedener DHRS2-Exone nach HDACi-Behandlung Mittels qRT-PCR bestimmte Expressionsintensität A) und *Fold Change* B) verschiedener *DHRS2*-Exons nach Behandlung mit HDACi Quisinostat, Romidepsin und LAK31 für 16 h in 2102EP-Zellen. 84
Abbildung 4.1: Zusammenfassung der Effekte der sieben besten Epi-Drugs in KZT-Zellen. 89
Abbildung 4.2: Funktionsweise der Epi-Drugs und die Entstehung von *off-target* Effekten durch Chromatinmodifikation 95
Abbildung 4.3 Funktionsweise der Epi-Drugs und die Entstehung von *off-target* Effekten durch Proteinmodifikation 99
Abbildung 4.4: Mögliche Funktionen von durch HDACi ausgelöste Expression von DHRS2 101

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: TNM-Stadieneinteilung bei KZT 6
Tabelle 1.2: IGCCCG-Klassifizierung von KZT 7
Tabelle 2.1: Keimzelltumor-Zelllinien 27
Tabelle 2.2: Urothelkarzinom-Zelllinien 28
Tabelle 2.3: Prostatakarzinom-Zelllinien 28
Tabelle 2.4: Nierenzellkarzinom-Zelllinien 28
Tabelle 2.5: Kontrollzellen 29
Tabelle 2.6: Materialien zur Kultivierung humaner Zelllinien 29
Tabelle 2.7: Epigenetische Agenzien und ihre Lösungsmittel (LM) 30
Tabelle 2.8: Allgemeine Chemikalien 31
Tabelle 2.9: Kits und Assays sowie Assay-Einzelprodukte 32
Tabelle 2.10: Gebrauchsfertige Puffer 32
Tabelle 2.11: Verbrauchsmaterialien 33
Tabelle 2.12: Geräte 34
Tabelle 2.13: Benutzte Software und online Tools 35
Tabelle 2.14: Primer für qRT-PCR 37
Tabelle 2.15: Primer für genomische PCR zur Mykoplasmen Kontrolle 38
Tabelle 2.16: Liste genutzter Antikörper 38
Tabelle 2.17: Zusammensetzung der Medien zur Kultivierung der KZT 40
Tabelle 2.18: Zusammensetzung der Medien zur Kultivierung von UC-, PCa- und RCC-Zelllinien 40
Tabelle 2.19: Zusammensetzung der Medien zur Kultivierung der Kontrollzellen 40
Tabelle 2.20: Zusammensetzung und Programm der Mykoplasmen-PCR 41
Tabelle 2.21: DNA-Extraktionspuffer 44
Tabelle 2.22: Zusammensetzung und Reaktionsbedingungen der reversen Transkription 46
Tabelle 2.23: Reaktionsansatz und -bedingungen der qRT-PCR 46
Tabelle 2.24: Zusammensetzung Tris-Polyacrylamidgel 48
Tabelle 3.1: Finale Liste der 16 in dieser Arbeit untersuchten Epi-Drugs 56

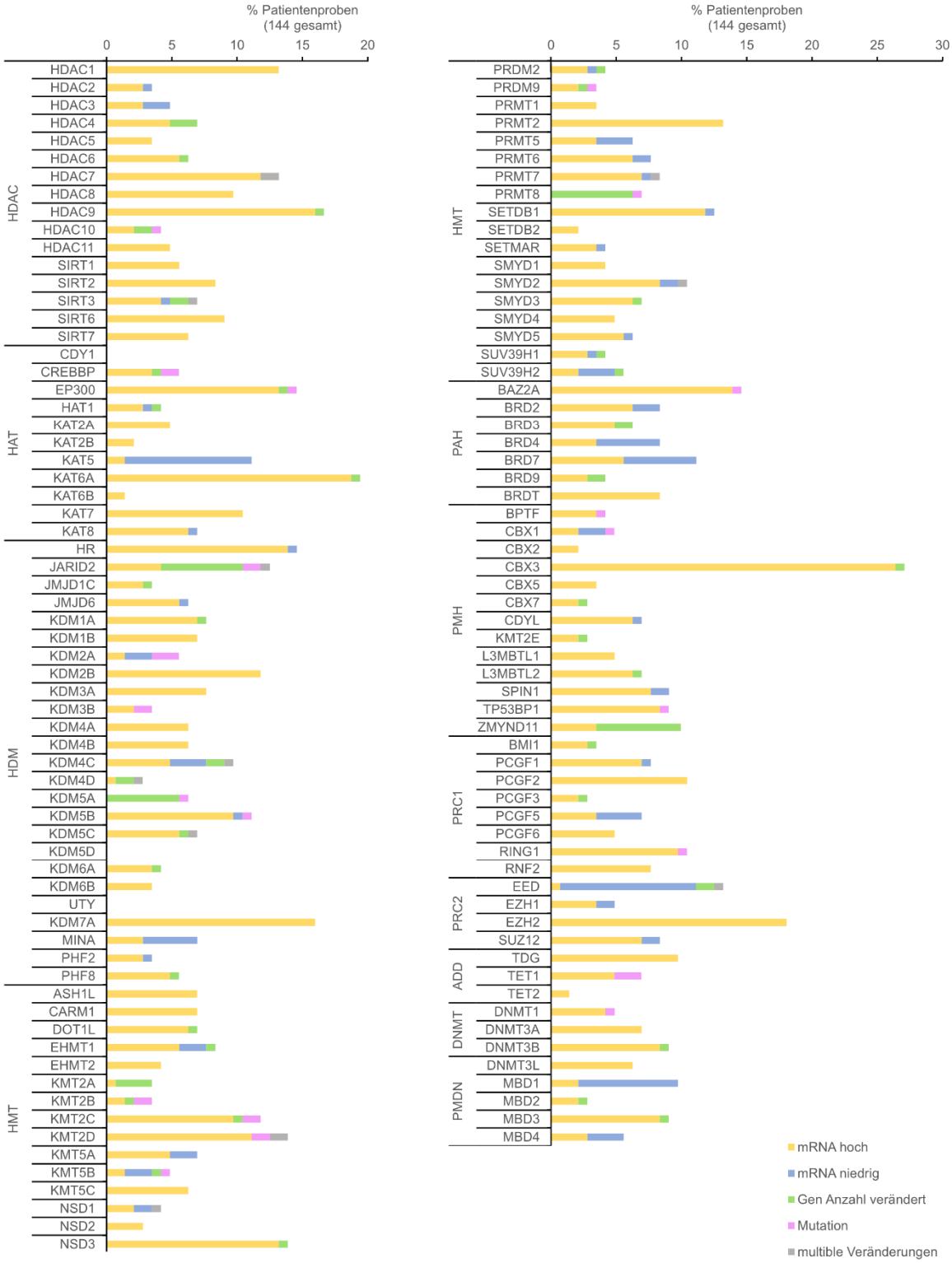
Abkürzungsverzeichnis

∞	unendlich
-R	Cisplatin-resistenter Subklon
% v/v	Volumenprozent pro Volumen: 1 % = 1 ml in 100 ml
% w/v	Gewichtprozent pro Volumen: 1 % = 1 g in 100 ml
5mC	5-Methylcytosin
5hmC	5-Hydroxymethylcytosin
ADD	aktive DNA-Demethylase
ac	Acetylierung
BEP	Cisplatin, Etoposid, Bleomycin
bp	Basenpaare
BRD	Bromodomäne
DNMT	DNA-Methyltransferase
EC	Embryonalkarzinom
EC_{50}	mittlere effektive Konzentration
EP	Etoposid, Cisplatin
Epi-Drug	epigenetisch agierendes Agenz/Inhibitor
F	*forward primer*
FBS	Fetales Kälberserum
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
GCNIS	*germ cell neoplasia in situ*
GCT	*germ cell tumor*
h	Stunden
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HDM	Histondemethylase
HMT	Histonmethyltransferase
i	Inhibitor
M	männlich
me	methylierung
min	Minuten
MLT	Mikrolithiasis testis
MS	Massenspektrometer
NSCLC	*Non-small cell lung cancer*
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAH	*proteins binding acetylated histones*
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung

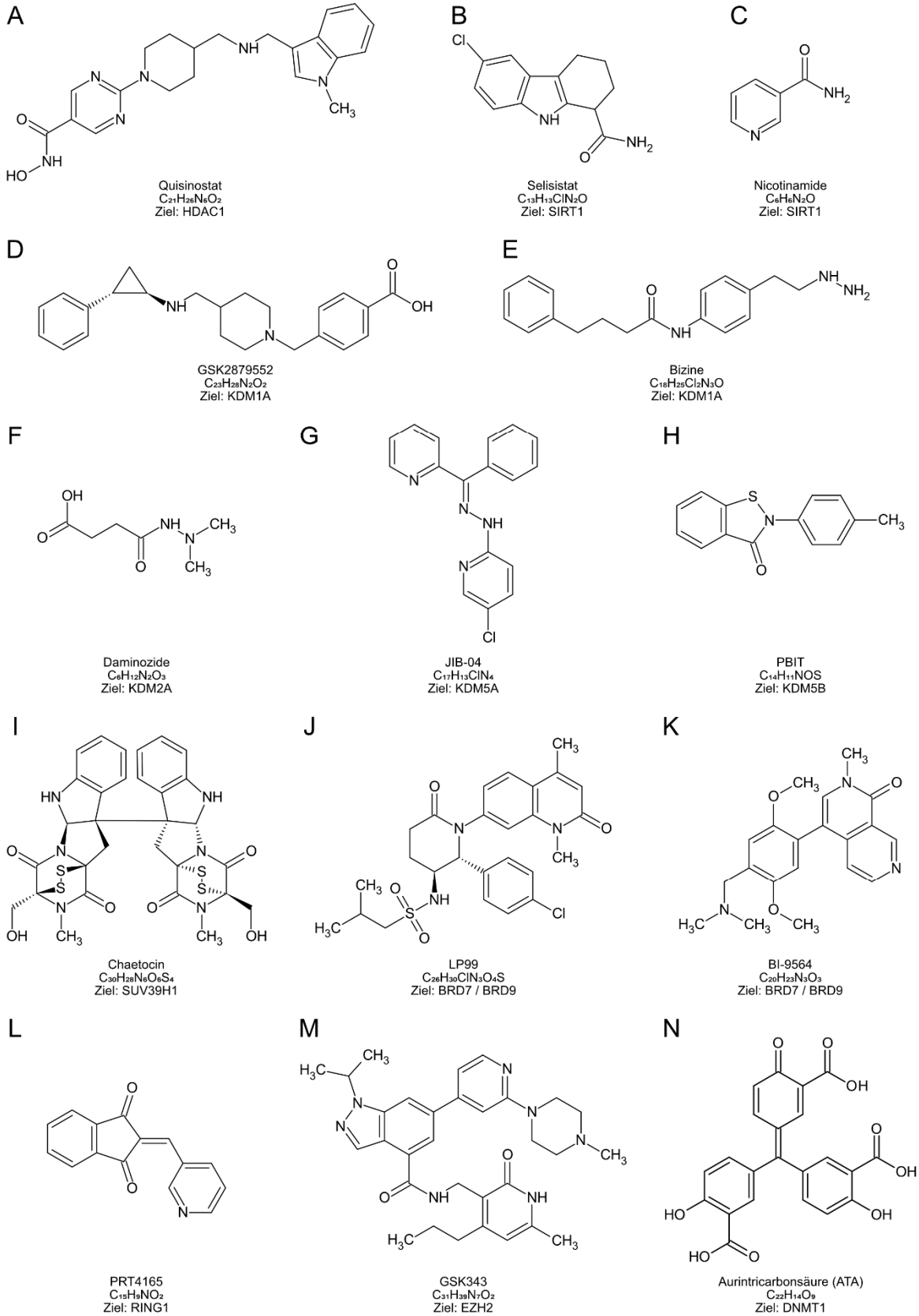
PBST	PBS mit 0,1 % (v/v) Tween
PCa	Prostatakrebs
PCA	*principal component analysis*
PCG	primordiale Keimzelle
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMDN	*proteins binding methylated DNA*
PMH	*proteins binding methylated histones*
PMS	N-Methylphenazinium-Methylsulfat
PRC	*polycomb repressive complex*
R	*reverse primer*
RCC	klares Nierenzellkarzinom
RLA	Retroperitoneale Lymphadenektomie
RNA-Seq	RNA-Sequenzierung
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RRID	Research Resource Identifiers
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SAM	*S*-Adenosylmethionin
SE	Seminom
TDS	testikuläres Dysgenesi-Syndrom
TE	Teratom
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TSS	*transcription start site*
UC	Urothelkarzinom
ub	Ubiquitinierung
W	weiblich
YST	Dottersack-Tumor

Anhang

Anhang 1: Auflistung einer Auswahl epigenetischer Interaktoren und ihrer Expressionsprofile
Die gezeigten Daten stammen aus der TCGA-Studie (The Cancer Genome Atlas, [158]) und wurden über das Online-Tool cBioPortal [163,164] analysiert.

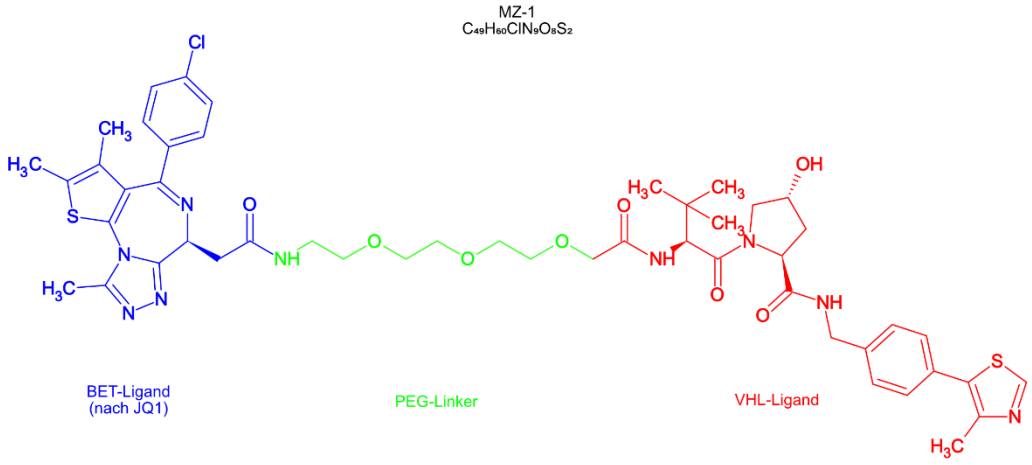


Anhang 2: Strukturformeln der in dieser Arbeit genutzten Inhibitoren
A) HDACi Quisinostat [213], B) HDACi Selisistat [214], C) HDACi Nicotinamide [215], D) HDMi GSK2879552 [216], E) HDMi Bizine [217], F) HDMi Daminozide [218], G) HDMi JIB-04 [219], H) HDMi PBIT [220], I) HMTi Chaetocin [221], J) PAHi LP99 [222], K) PAHi BI-9564 [223], L) PRC1i PRT4165 [224], M) PRC2i GSK343 [225], DNMTi ATA [226].

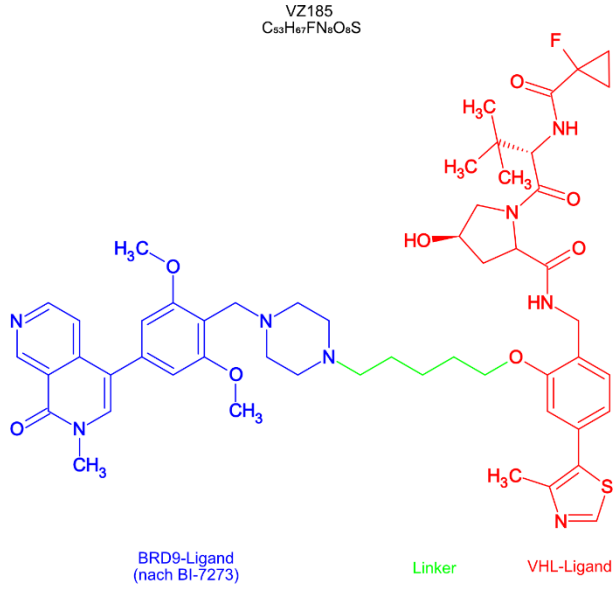


Anhang 3: Struktur und Aufbau der in dieser Arbeit genutzten PROTACs
A) BRD4/BET PROTAC MZ-1 [209], B) BRD7/BRD9 PROTAC VZ185 [210].

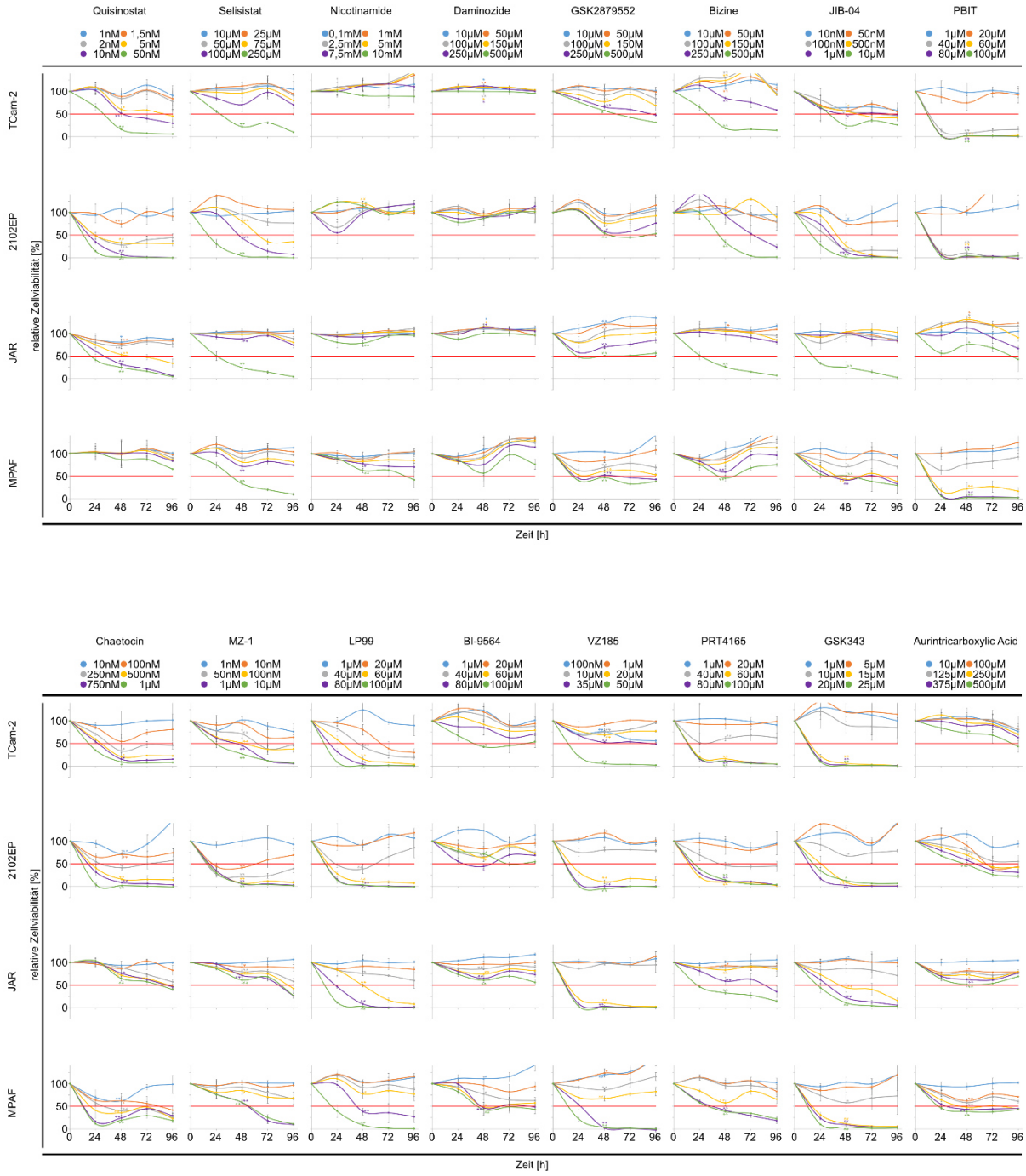
A



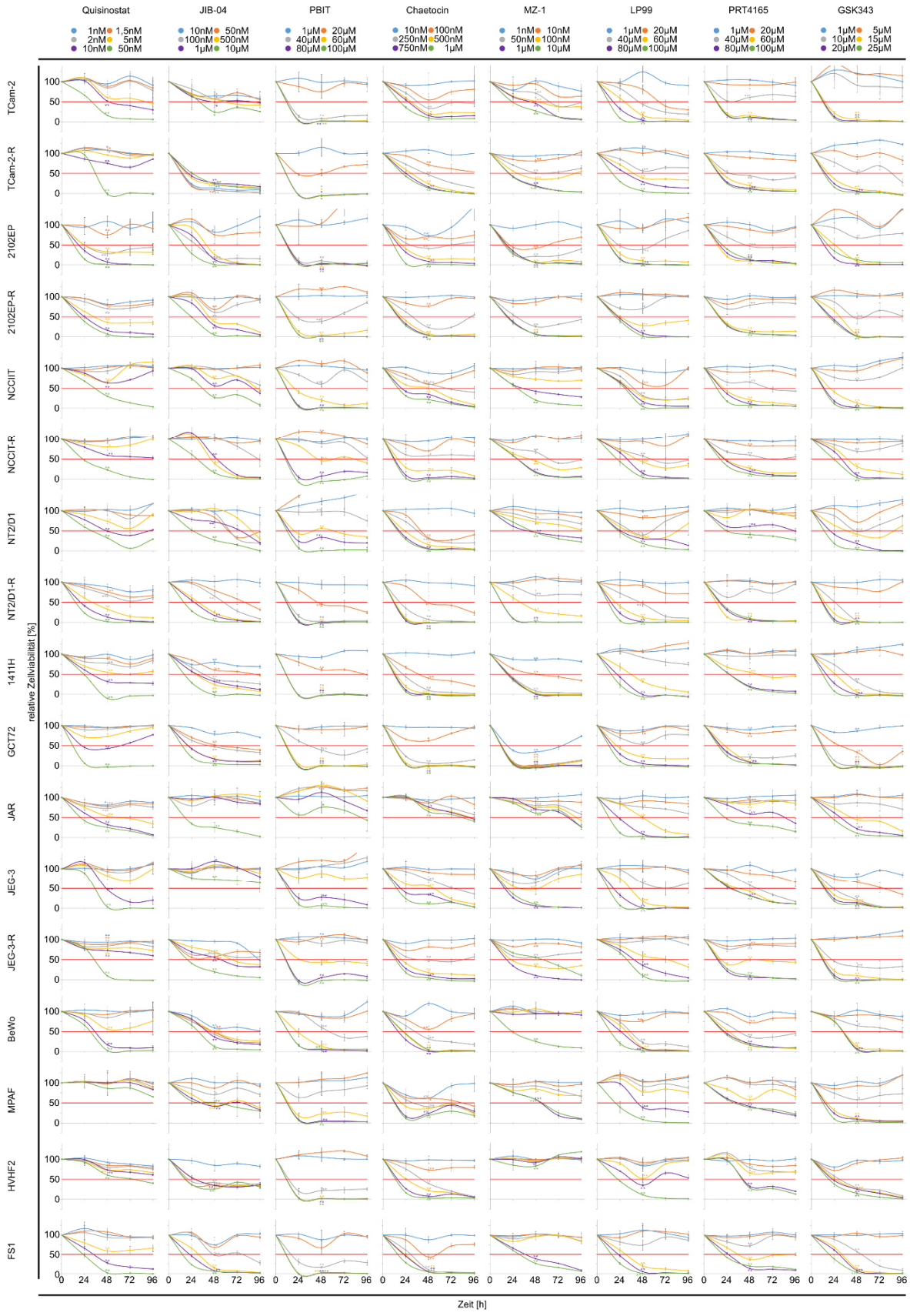
B



Anhang 4: XTT-Rohdaten aller 16 Epi-Drugs in vier KZT-Zelllinien
Zellviabilitätsmessungen (XTT) der 16 Epi-Drugs in drei KZT-Zelllinien (TCam-2, 2102EP und JAR), sowie der Fibroblastenkontrolle MPAF (n = 4). Die Zellen wurden einmalig mit den Epi-Drugs behandelt und die Zellviabilität nach 24, 48, 72 und 96 h bestimmt. Asteriske geben signifikante Änderungen zwischen Epi-Drug-Behandlung und Lösungsmittelkontrolle nach 48 h (Zeitpunkt EC_{50} Bestimmung) an (*p < 0,05, **p < 0,005). Modifiziert nach Müller *et al.* [212].



Anhang 5: XTT-Rohdaten der acht wirksamsten Epi-Drugs in 14 KZT-Zelllinien
Ausweitung der Zellviabilitätsmessungen (XTT) der acht wirksamsten Epi-Drugs in 14 KZT-Zelllinien inklusive Cisplatin-resistenter Subklone, sowie zwei Fibroblasten MPAF und HVHF2 und Sertoli-Zellen (n = 4). Die Zellen wurden einmalig mit den Epi-Drugs behandelt und die Zellviabilität nach 24, 48, 72 und 96 h bestimmt. Asteriske geben signifikante Änderungen zwischen Behandlung und DMSO-Kontrolle nach 48 h an (*p < 0,05, **p < 0,005). Modifiziert nach Müller *et al.* [212].



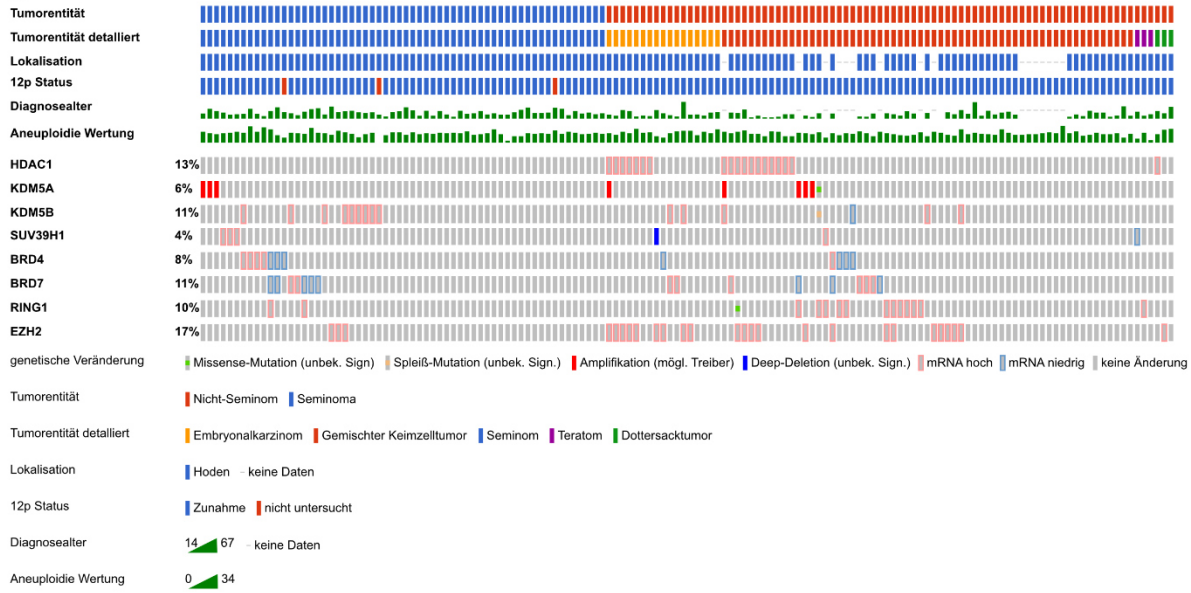
Anhang 6: Epi-Drugs verringern Zellviabilität in KZT und anderen urologischen Entitäten
A) EC_{50}-Werte für alle KZT-Zelllinien und Fibroblasten und jede Behandlung (Rohdaten Anhang 5). B) cBioPortal OncoPrint Analyse der KZT Proben der TCGA Kohorte nach Mutations- und Expressionsprofilen der Zielgene. XTT-Rohdaten für Quisinostat, JIB-04 und Chaetocin Behandlung in je drei Zelllinien aus UC (C), PCa (D) and RCC (E) mit daraus resultierenden EC_{50}-Werten in F) (Berechnung mit GraphPad Prism v8). Die XTT-Analysen zu Quisinostat in den allen UC-, PCa- und RCC-Zelllinien wurden von Alexa Stephan durchgeführt. Die XTT-Analysen zu JIB-04 und Chaetocin wurden von mir selbst durchgeführt.Modifiziert nach Müller *et al.* [212].

A

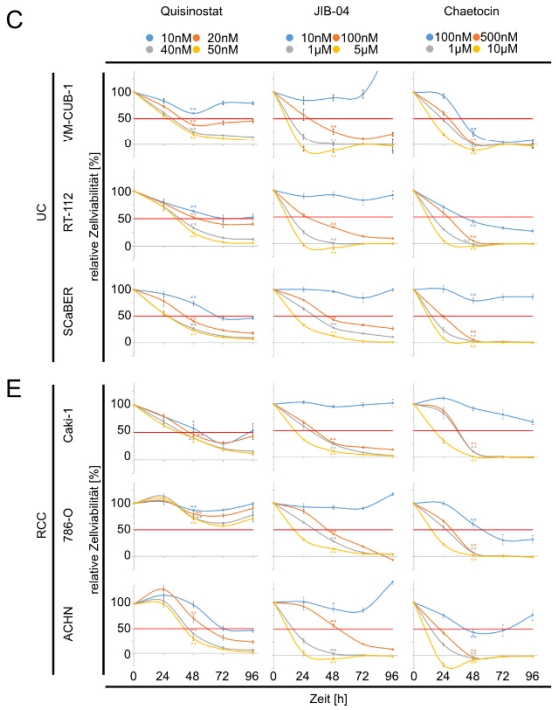
	SE		EC						YST		CC				Fibroblasts		SC
EC_{50} [nM]	TCam-2	TCam-2-R	2102EP	2102EP-R	NCCIT	NCCIT-R	NT2/D1	NT2/D1-R	1411H	GCT72	JAR	JEG-3	JEG-3-R	BeWo	MPAF	HVHF2	FS1
Quisinostat	9,48	13,22	1,76	3,40	17,52	15,46	15,38	3,18	5,47	8,29	6,12	9,51	10,67	5,20	>50	>50	6,25
Chaetocin	122,10	217,50	173,20	158,10	118,60	227,10	91,15	97,17	82,65	114,80	>1000	478,40	232,90	126,60	84.56	191,30	69,33
JIB-04	344,60	0,01	68,36	213,00	1999,00	786,20	1005,00	184,80	69,70	65,85	8309,00	>10000	1165,00	52,02	1469.00	144,30	82,60
MZ-1	487,00	63,54	9,21	27,41	751,30	97,69	2087,00	69,06	8,42	0,67	>10000	83,04	59,11	5261,00	>10000	>10000	1001,00

EC_{50} [µM]																	
GSK343	12,06	10,07	10,71	9,80	11,30	12,04	9,63	6,39	9,15	3,21	14,66	5,52	9,06	11,03	10.50	9,08	10,61
PBIT	24,77	19,99	35,84	38,31	44,17	57,70	39,83	19,28	20,40	36,06	>100	72,79	57,16	41,76	49.12	37,18	24,56
LP99	34,66	48,97	35,90	48,73	26,26	47,19	39,72	38,16	54,38	39,94	55,00	44,30	67,25	28,30	73.04	63,40	47,66
PRT4165	43,36	38,02	37,00	48,07	45,23	43,02	91,36	47,05	62,74	28,74	85,56	51,97	60,05	30,70	75.17	67,54	53,45

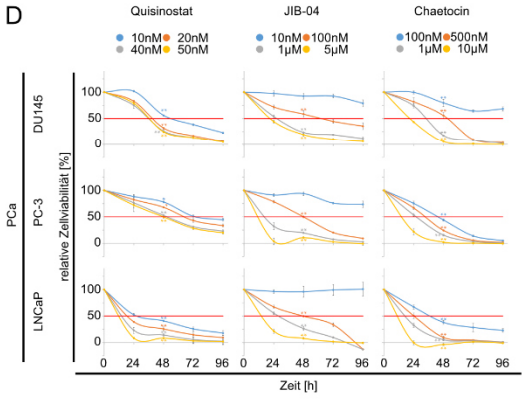
B



C



D



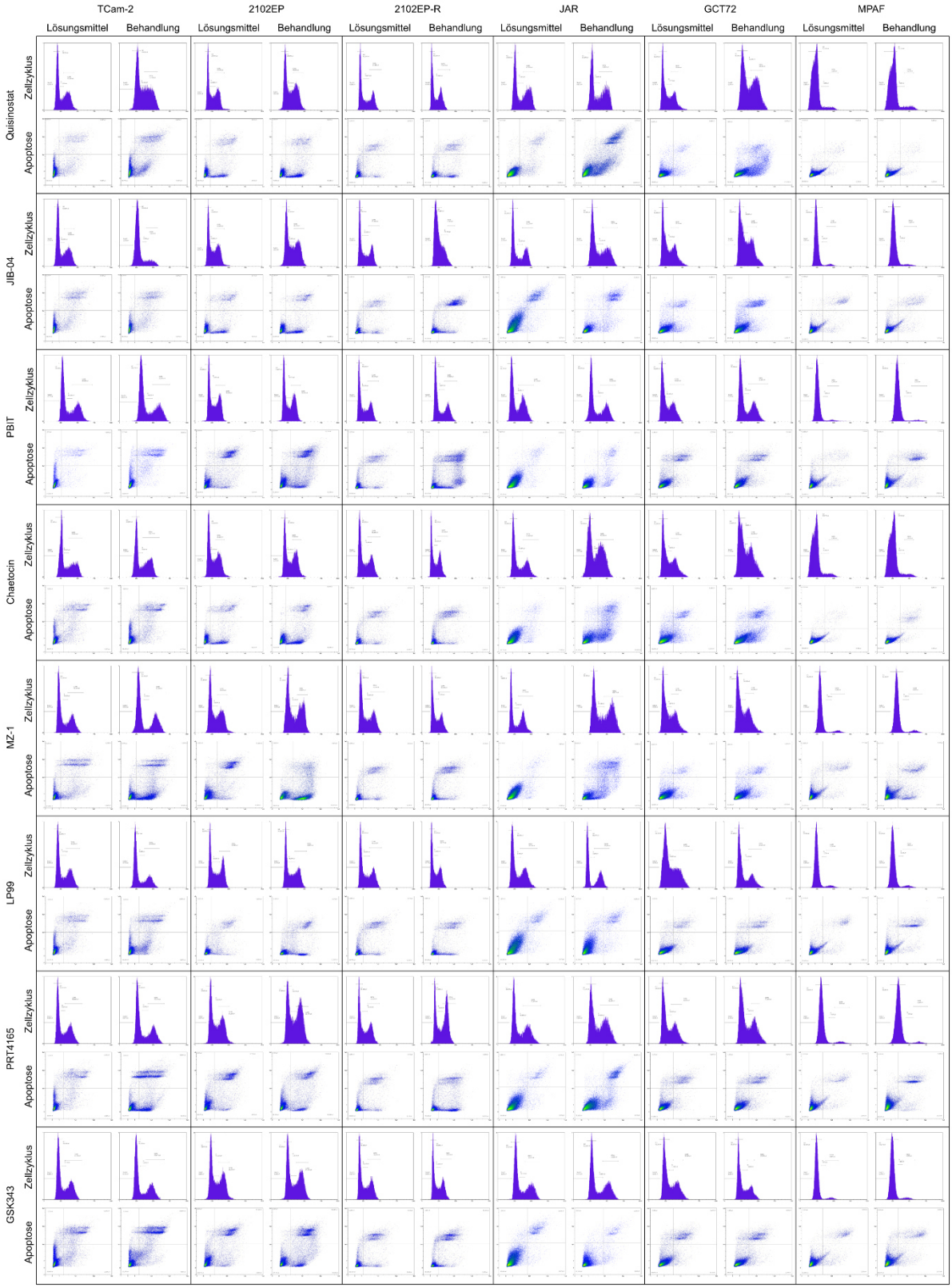
E

F

EC_{50} [nM]	UC			PCa		
	VM-CUB-1	RT-112	SCaBER	DU145	PC-3	LNCaP
Quisinostat	14,02	19,18	18,30	11,37	47,85	7,33
Chaetocin	47,03	82,97	168,90	563,30	72,06	64,31
JIB-04	46,56	55,50	143,50	211,90	130,90	155,90

EC_{50} [nM]	RCC		
	Caki-1	786-O	ACHN
Quisinostat	>50	>50	33,01
Chaetocin	242,60	128,10	96,94
JIB-04	55,35	132,40	113,80

Anhang 7: Rohdaten der durchflusszytometrischen Analysen
Rohdaten der durchflusszytometrischen Analysen der Annexin V/PI Co-Färbung (Apoptose-Messung) und PI-Einzelfärbung (Zellzyklus) der angegebenen Zelllinien (Spalten) nach je 16 h Behandlung mit den 8 wirksamsten Epi-Drugs (Zeilen). Modifiziert nach Müller *et al.* [212].



Anhang 8: Rohdaten Massenspektrometrische Analyse der Histonmodifikationen (MODSpec)
Aufgelistet sind die Lysinreste der Histone mit und ohne (m/o) Modifikation. UN: unmodifiziert, AC: acetyliert, ME1: monomethyliert, ME2: dimethyliert, ME3: trimethyliert. %: Prozentualer Anteil des Peptidpools, STABW: Standardabweichung.

Histon: Lysinrest m/o Modifikation	DMSO		Quisinostat		JIB-04		Chaetocin	
	%	STABW	%	STABW	%	STABW	%	STABW
H1.4: K25UN	97.88822	0.029327	98.10089	0.03035	97.75278	0.040596	97.81196	0.041919
H1.4: K25AC	0.005989	0.003118	0.024194	0.003206	0.003915	0.002468	0.029878	0.010392
H1.4: K25ME1	2.087281	0.034541	1.754251	0.020201	2.179996	0.040596	2.018963	0.035151
H1.4: K25ME2	0.013733	0.002165	0.101705	0.012155	0.060406	0.00186	0.118596	0.012131
H1.4: K25ME3	0.004773	0.002372	0.018957	0.008257	0.002903	0.000473	0.020605	0.005903
H2A: K5UN	84.78838	0.068116	69.4975	0.486039	82.65652	0.117012	85.68121	0.311381
H2A: K5AC	15.21162	0.068116	30.5025	0.486039	17.34348	0.117012	14.31879	0.311381
H2A: K9UN	98.03185	0.046631	95.27345	0.018422	97.39161	0.04381	98.32476	0.05882
H2A: K9AC	1.968147	0.046631	4.726546	0.018422	2.608388	0.04381	1.675241	0.05882
H2A: K36UN	99.97526	0.002498	99.96377	0.005466	99.97347	0.001869	99.94062	0.006384
H2A: K36AC	0.024736	0.002498	0.036225	0.005466	0.026532	0.001869	0.059381	0.006384
H2A1: K13UN	99.98585	0.000968	99.97555	0.001799	99.98226	0.001103	99.9854	0.004004
H2A1: K13AC	0.014153	0.000968	0.024454	0.001799	0.017743	0.001103	0.014605	0.004004
H2A1: K15UN	99.99581	0.003158	99.99164	0.003965	99.99305	0.004411	99.98841	0.010491
H2A1: K15AC	0.004187	0.003158	0.008356	0.003965	0.006947	0.004411	0.011594	0.010491
H2A3: K13UN	99.97308	0.001937	99.96884	0.002697	99.9551	0.004659	99.95107	0.000499
H2A3: K13AC	0.026918	0.001937	0.03116	0.002697	0.044901	0.004659	0.04893	0.000499
H2A3: K15UN	99.79876	0.002558	99.90011	0.002712	99.95324	0.007005	99.92341	0.005433
H2A3: K15AC	0.20124	0.002558	0.099886	0.002712	0.046763	0.007005	0.076588	0.005433
H3R2UN: K4UN	82.0904	0.691847	75.95874	0.224347	81.87812	0.593401	81.82812	0.847266
H3R2UN: K4ME1	17.60969	0.684154	23.49335	0.294022	17.77159	0.584299	17.50278	0.797374
H3R2UN: K4ME2	0.201883	0.007013	0.291235	0.05069	0.223102	0.014356	0.338644	0.018962
H3R2UN: K4ME3	0.049881	0.005652	0.053625	0.00334	0.068441	0.001049	0.148151	0.021172
H3R2UN: K4AC	0.048148	0.006977	0.203051	0.021403	0.058756	0.004855	0.182311	0.010306
H3R2UN: Q5UN	99.94978	0.006055	99.93355	0.00944	99.97169	0.003063	99.90313	0.020327
H3R2UN: Q5ME1	0.050225	0.006055	0.066448	0.00944	0.028308	0.003063	0.096872	0.020327
H3: K9UN	36.32597	0.844686	35.75843	0.597885	32.20941	0.201653	37.88783	0.486109
H3: K9AC	0.994	0.014821	3.622552	0.053229	0.70262	0.007721	0.866207	0.08401
H3: K9ME1	31.18862	0.282724	30.79141	0.13557	34.40107	0.067676	34.17942	0.70515
H3: K9ME2	28.5571	0.639425	27.53151	0.575969	29.54371	0.190099	24.64084	0.460022
H3: K9ME3	2.934314	0.075289	2.296095	0.020947	3.143197	0.052473	2.425707	0.064691
H3: K14UN	67.48198	0.068956	41.60727	0.311293	70.28694	0.106704	70.11398	0.4006
H3: K14AC	32.51802	0.068956	58.39273	0.311293	29.71306	0.106704	29.88602	0.4006
H3: K18UN	85.1213	0.230982	61.61342	0.455764	85.9064	0.40422	86.97092	0.105393
H3: K18AC	14.70753	0.230332	38.28448	0.464697	13.90584	0.408558	12.87483	0.080342
H3: K18ME1	0.171176	0.001465	0.102096	0.010684	0.187759	0.004921	0.154252	0.027717
H3: Q19UN	99.99609	0.001038	99.99376	0.001536	99.99683	0.000906	99.96923	0.019578
H3: Q19ME1	0.00391	0.001038	0.00624	0.001536	0.003167	0.000906	0.030772	0.019578
H3: K23UN	78.15731	0.479619	53.5295	0.561151	78.33767	0.596756	80.7437	0.135474
H3: K23AC	21.8256	0.482131	46.44147	0.564707	21.65186	0.595733	19.22046	0.136332
H3: K23ME1	0.017083	0.002917	0.02903	0.008582	0.010475	0.00141	0.035845	0.015144
H3: R42UN	98.99439	0.075275	97.13738	0.479834	98.10409	0.20917	97.75411	0.348489
H3: R42ME2	1.005608	0.075275	2.862619	0.479834	1.895914	0.20917	2.245891	0.348489
H3: R49UN	97.92835	0.209048	93.54286	0.88382	95.78901	0.204243	93.15969	0.324017
H3: R49ME2	2.07165	0.209048	6.457143	0.88382	4.210991	0.204243	6.840309	0.324017
H3: Q55UN	99.876	0.083036	99.69041	0.021233	99.968	0.011523	99.73125	0.068246
H3: Q55ME1	0.123995	0.083036	0.309588	0.021233	0.031998	0.011523	0.268749	0.068246
H3: K56UN	99.85496	0.008634	98.8174	0.035425	99.8611	0.019352	98.77184	0.338282
H3: K56AC	0.077275	0.017052	0.171347	0.042028	0.093236	0.008722	0.239352	0.178426
H3: K56ME1	0.067761	0.016144	1.01125	0.037599	0.04566	0.010631	0.988805	0.218199
H3: K64UN	99.99101	0.002202	99.96905	0.016863	99.98647	0.001266	99.96259	0.007056
H3: K64AC	0.008991	0.002202	0.030946	0.016863	0.013526	0.001266	0.037405	0.007056
H3: K79UN	66.18848	0.328616	61.96914	0.970702	75.89788	1.038352	59.71896	0.528904
H3: K79AC	0.046269	0.024317	0.677632	0.122661	0.036835	0.017328	1.813168	0.312882
H3: K79ME1	14.1974	0.054851	18.20277	1.254906	12.29386	0.36782	15.42248	0.685781
H3: K79ME2	6.418178	0.25858	5.702285	0.108827	5.570472	0.533184	5.182452	0.154844
H3: K79ME3	13.14967	0.193663	13.44817	0.560574	6.200953	0.17234	17.86294	0.19918
H3: K122UN	99.95586	0.004913	99.83617	0.035566	99.96644	0.001865	99.81866	0.086475
H3: K122AC	0.044137	0.004913	0.163828	0.035566	0.033561	0.001865	0.181335	0.086475
H3.1: K27UN	28.47769	0.268761	27.08004	0.234311	30.23821	0.323057	28.09995	0.33953
H3.1: K27AC	2.830355	0.054848	8.049048	0.153603	2.413908	0.063667	2.461908	0.021585
H3.1: K27ME1	47.28857	0.52042	45.24069	0.479317	49.33035	0.467897	46.58275	0.37072
H3.1: K27ME2	19.18054	0.291544	17.07945	0.154952	16.20397	0.172807	19.94898	0.314362
H3.1: K27ME3	2.22284	0.018249	2.550772	0.1044	1.813559	0.075563	2.906412	0.079732
H3.1: K36UN	16.10202	0.209014	16.37911	0.095683	13.9372	0.248748	19.30969	0.48779
H3.1: K36AC	0.106583	0.032599	0.295645	0.061209	0.110593	0.007553	0.356615	0.067026
H3.1: K36ME1	13.75135	0.291025	12.44815	0.362287	13.27019	0.1464	14.59865	0.240048

H3.1: K36ME2	49.8922	0.489259	50.58269	0.305427	51.75531	0.582512	44.4208	0.740027
H3.1: K36ME3	20.14784	0.136219	20.2944	0.133396	20.92671	0.234098	21.31424	0.272359
H3.3: K27UN	23.70722	0.427745	24.11024	0.690006	28.48799	0.612982	28.05642	0.550311
H3.3: K27AC	5.580779	0.360071	13.78787	1.085705	4.408177	0.500275	5.581231	0.095344
H3.3: K27ME1	52.68854	0.588233	42.10957	1.087827	52.21822	0.784029	45.97133	1.577525
H3.3: K27ME2	14.53568	0.144116	14.18242	0.695949	11.91298	0.464163	14.99791	1.453155
H3.3: K27ME3	3.487776	0.09632	5.809896	0.515571	2.972626	0.337503	5.393107	0.375026
H3.3: K36UN	11.29174	0.284332	11.81558	1.233183	9.961394	0.817033	14.6709	0.243234
H3.3: K36AC	1.396913	0.118607	4.026635	0.653736	1.291698	0.156063	3.238351	0.593226
H3.3: K36ME1	12.39762	0.727957	9.935569	0.643138	11.43667	0.687166	13.40782	0.941344
H3.3: K36ME2	54.46011	1.364083	52.92643	1.488403	56.74363	2.860489	46.36749	1.133015
H3.3: K36ME3	20.45362	0.819472	21.29579	0.516446	20.5666	1.309677	22.31544	1.25784
H4: K5UN	92.20981	0.033414	86.66042	0.138917	92.53336	0.06138	92.43349	0.496642
H4: K5AC	7.790189	0.033414	13.33958	0.138917	7.466642	0.06138	7.566515	0.496642
H4: K8UN	87.92157	0.140518	67.32126	0.276995	88.61245	0.139419	88.15627	0.379403
H4: K8AC	12.07843	0.140518	32.67874	0.276995	11.38755	0.139419	11.84373	0.379403
H4: K12UN	92.86997	0.013639	78.264	0.293902	93.28622	0.125972	93.11029	0.28094
H4: K12AC	7.130035	0.013639	21.736	0.293902	6.713784	0.125972	6.889711	0.28094
H4: K16UN	50.30574	0.328909	30.64536	0.121349	53.31781	0.156707	51.18504	0.363364
H4: K16AC	49.69426	0.328909	69.35464	0.121349	46.68219	0.156707	48.81496	0.363364
H4: K20UN	16.81469	0.304663	19.07346	0.694127	24.18203	0.585118	26.28734	0.597357
H4: K20ME1	4.270314	0.249119	5.018307	0.11481	5.183269	0.550037	5.498137	0.557619
H4: K20ME2	58.44586	0.005557	57.68006	0.806167	53.9426	0.616326	42.90154	0.719157
H4: K20ME3	2.603068	0.070327	3.191631	0.309087	2.176965	0.308531	1.55969	0.70081
H4: K20AC	17.86607	0.394759	15.03655	0.376242	14.51514	0.217392	23.7533	0.392683
Histon: Lysinrest m/o Modifikation	MZ-1		LP99		PRT4165		GSK343	
	%	STABW	%	STABW	%	STABW	%	STABW
H1.4: K25UN	97.91093	0.024018	97.69332	0.019233	97.52196	0.089569	97.67046	0.028494
H1.4: K25AC	0.008625	0.001361	0.009028	0.002511	0.051733	0.007627	0.006216	0.003082
H1.4: K25ME1	2.068095	0.0221	2.269408	0.020582	2.29814	0.094075	2.263309	0.028644
H1.4: K25ME2	0.007907	0.001314	0.022673	0.002838	0.104219	0.015387	0.053794	0.005461
H1.4: K25ME3	0.004447	0.002207	0.00557	0.00073	0.023951	0.010468	0.00622	0.002826
H2A: K5UN	83.23076	0.164151	87.46245	0.165329	84.58184	0.317497	86.89942	0.174239
H2A: K5AC	16.76924	0.164151	12.53755	0.165329	15.41816	0.317497	13.10058	0.174239
H2A: K9UN	98.08005	0.016173	98.64746	0.027406	98.04961	0.030176	98.36128	0.010531
H2A: K9AC	1.91995	0.016173	1.352537	0.027406	1.950387	0.030176	1.638718	0.010531
H2A: K36UN	99.97127	0.002821	99.9653	0.007491	99.94408	0.006725	99.96007	0.007863
H2A: K36AC	0.028732	0.002821	0.034696	0.007491	0.055921	0.006725	0.039935	0.007863
H2A1: K13UN	99.98336	0.001661	99.98907	0.003389	99.99166	0.002539	99.99165	0.002223
H2A1: K13AC	0.016639	0.001661	0.010934	0.003389	0.008344	0.002539	0.008349	0.002223
H2A1: K15UN	99.99757	0.000844	99.99825	0.000652	99.99727	0.001117	99.98845	0.011551
H2A1: K15AC	0.002429	0.000844	0.001748	0.000652	0.002728	0.001117	0.011551	0.011551
H2A3: K13UN	99.97691	0.001811	99.96804	0.005774	99.96302	0.0052	99.93305	0.012791
H2A3: K13AC	0.023094	0.001811	0.031962	0.005774	0.036981	0.0052	0.066953	0.012791
H2A3: K15UN	99.70282	0.005859	99.96638	0.003095	99.91715	0.002258	99.93286	0.008596
H2A3: K15AC	0.297178	0.005859	0.033622	0.003095	0.082852	0.002258	0.067145	0.008596
H3R2UN: K4UN	83.0582	0.214974	82.37328	0.423145	81.28224	0.242107	81.28349	0.685036
H3R2UN: K4ME1	16.63701	0.216244	17.3555	0.43148	18.19352	0.194451	18.45838	0.710347
H3R2UN: K4ME2	0.216544	0.010738	0.160699	0.019733	0.235603	0.005677	0.134637	0.023924
H3R2UN: K4ME3	0.041923	0.002028	0.061219	0.008217	0.090079	0.012812	0.0559	0.00752
H3R2UN: K4AC	0.046328	0.004349	0.049298	0.00384	0.198562	0.05214	0.067588	0.015518
H3R2UN: Q5UN	99.91852	0.00372	99.9411	0.009833	99.88965	0.004533	99.88747	0.018264
H3R2UN: Q5ME1	0.081484	0.00372	0.058898	0.009833	0.110347	0.004533	0.112535	0.018264
H3: K9UN	36.24001	0.229241	35.10656	0.443971	31.51826	0.563704	28.96632	0.811931
H3: K9AC	0.887905	0.036694	0.687564	0.037562	0.779085	0.025102	0.699299	0.044587
H3: K9ME1	31.62756	0.165288	38.12573	0.435369	33.77832	0.167804	34.21596	0.682847
H3: K9ME2	28.36623	0.354102	23.71348	0.0769	30.8531	0.533257	32.7434	1.229425
H3: K9ME3	2.878291	0.04076	2.366662	0.06486	3.071246	0.054657	3.375021	0.126692
H3: K14UN	66.85436	0.135462	70.74685	0.326768	67.90392	0.3006	68.29079	0.156037
H3: K14AC	33.14564	0.135462	29.25315	0.326768	32.09608	0.3006	31.70921	0.156037
H3: K18UN	84.80525	0.420122	89.66109	0.202744	86.84009	0.076828	87.26248	0.209915
H3: K18AC	15.01571	0.402255	10.13752	0.204359	12.99851	0.094559	12.55171	0.211912
H3: K18ME1	0.179046	0.018146	0.201388	0.013094	0.161401	0.018114	0.185811	0.008427
H3: Q19UN	99.99549	0.00168	99.99184	0.005277	99.98445	0.002179	99.99229	0.003406
H3: Q19ME1	0.004515	0.00168	0.008159	0.005277	0.015552	0.002179	0.007707	0.003406
H3: K23UN	78.24644	0.415743	83.29432	0.162355	80.49045	0.135073	78.75995	0.277797
H3: K23AC	21.74513	0.416708	16.68355	0.161246	19.44981	0.12187	21.22283	0.276428
H3: K23ME1	0.008431	0.002018	0.022133	0.004247	0.059745	0.017569	0.017215	0.00154
H3: R42UN	98.61312	0.238447	97.97834	0.357648	97.02226	0.561905	96.80393	0.198158
H3: R42ME2	1.386883	0.238447	2.021659	0.357648	2.977742	0.561905	3.196074	0.198158
H3: R49UN	96.90843	0.230075	94.16424	0.728925	90.02709	1.712092	92.36392	0.413718
H3: R49ME2	3.091573	0.230075	5.835761	0.728925	9.972913	1.712092	7.636081	0.413718

H3: Q55UN	99.80631	0.014122	99.87496	0.060352	99.47126	0.272138	99.85222	0.022483
H3: Q55ME1	0.193694	0.014122	0.12504	0.060352	0.528736	0.272138	0.14778	0.022483
H3: K56UN	99.89461	0.03193	99.56971	0.146459	98.51365	0.137242	99.26886	0.185355
H3: K56AC	0.069008	0.027749	0.126487	0.089361	0.411746	0.012516	0.29465	0.100574
H3: K56ME1	0.036384	0.01213	0.303802	0.112452	1.074601	0.147363	0.436493	0.220172
H3: K64UN	99.93898	0.005127	99.98536	0.008265	99.97742	0.005441	99.98333	0.00596
H3: K64AC	0.06102	0.005127	0.014641	0.008265	0.022579	0.005441	0.016666	0.00596
H3: K79UN	68.06121	0.421179	70.10292	0.983647	53.73249	2.096526	65.71244	0.467769
H3: K79AC	0.054324	0.029246	0.68282	0.092132	3.311276	0.469177	0.71837	0.191141
H3: K79ME1	14.34396	0.511674	14.72888	0.596851	23.50797	0.722659	16.78481	0.219876
H3: K79ME2	7.356781	0.213565	6.113242	0.404883	7.992153	0.528978	6.651031	0.477855
H3: K79ME3	10.18372	0.365203	8.372146	0.436536	11.45611	0.625175	10.13335	0.223964
H3: K122UN	99.96392	0.012076	99.88945	0.028764	99.82605	0.058626	99.864	0.024405
H3: K122AC	0.036078	0.012076	0.110551	0.028764	0.173949	0.058626	0.136003	0.024405
H3.1: K27UN	28.76023	0.160998	26.27808	0.351717	24.0551	0.083039	30.54667	0.237633
H3.1: K27AC	2.91484	0.069982	1.847869	0.240506	2.4319	0.217861	2.59477	0.109335
H3.1: K27ME1	46.41616	0.188088	50.28721	0.204706	48.16789	0.480926	48.96326	0.403078
H3.1: K27ME2	19.54603	0.246795	19.00016	0.186173	21.91599	0.26439	15.63738	0.145805
H3.1: K27ME3	2.362741	0.05442	2.586681	0.042177	3.429119	0.236306	2.257925	0.121377
H3.1: K36UN	16.44838	0.088869	16.71055	0.240813	17.20165	0.447357	14.99586	0.272368
H3.1: K36AC	0.09043	0.007443	0.193394	0.05533	0.435642	0.038512	0.223758	0.034768
H3.1: K36ME1	14.15583	0.142475	15.1441	0.175514	14.9062	0.134402	13.89019	0.165659
H3.1: K36ME2	48.86455	0.173728	47.75779	0.34589	45.08407	0.511898	50.28381	0.419148
H3.1: K36ME3	20.44081	0.208575	20.19416	0.116171	22.37244	0.318143	20.60638	0.24437
H3.3: K27UN	26.81189	0.968218	27.22405	1.549344	24.47779	1.593805	31.67575	1.231434
H3.3: K27AC	6.232838	0.162666	4.526435	0.330235	6.481608	1.288358	7.138458	0.614152
H3.3: K27ME1	47.83955	0.328404	50.64826	0.861688	46.81138	1.160472	44.26882	0.61155
H3.3: K27ME2	15.57332	0.872125	13.39617	1.252797	16.0905	1.275416	12.62128	0.433782
H3.3: K27ME3	3.542396	0.394546	4.205076	0.517081	6.138714	0.165991	4.295696	0.230541
H3.3: K36UN	12.6864	0.723294	13.68472	0.543548	13.90887	0.610078	13.02822	0.876584
H3.3: K36AC	1.864161	0.279762	1.988445	0.488178	3.389874	0.541209	3.015064	0.209741
H3.3: K36ME1	12.21281	0.295081	13.50468	0.680986	13.37863	0.50394	12.2658	1.105862
H3.3: K36ME2	53.27553	1.776613	50.9616	2.099611	45.58343	1.754881	51.70598	0.687519
H3.3: K36ME3	19.96109	0.700851	19.86056	0.884576	23.73919	1.477831	19.98494	1.789819
H4: K5UN	92.16397	0.133099	93.28193	0.28781	91.96139	0.39382	92.31586	0.137676
H4: K5AC	7.836031	0.133099	6.718068	0.28781	8.038609	0.39382	7.684143	0.137676
H4: K8UN	87.59255	0.186239	90.9409	0.286525	87.69255	0.202724	89.31769	0.213906
H4: K8AC	12.40745	0.186239	9.059096	0.286525	12.30745	0.202724	10.68231	0.213906
H4: K12UN	92.79447	0.210828	94.91522	0.372651	93.04502	0.115917	93.96095	0.168666
H4: K12AC	7.20553	0.210828	5.084781	0.372651	6.954983	0.115917	6.039054	0.168666
H4: K16UN	50.81726	0.29381	57.62546	0.24892	54.4218	0.339849	58.43043	1.17235
H4: K16AC	49.18274	0.29381	42.37454	0.24892	45.5782	0.339849	41.56957	1.17235
H4: K20UN	17.75555	0.271181	28.8535	0.449147	16.85171	0.109955	31.3272	0.144836
H4: K20ME1	4.396094	0.310896	4.448862	0.190933	4.329657	0.112466	3.554151	0.28487
H4: K20ME2	54.21575	0.814325	43.65173	0.560632	44.5336	0.480041	42.04991	0.480762
H4: K20ME3	2.467229	0.120721	1.291879	0.229717	2.101723	0.161885	1.778311	0.252013
H4: K20AC	21.16538	0.364934	21.75403	0.645909	32.1833	0.305018	21.29043	0.496302

Anhang 9: Liste der signifikant deregulierten Gene der RNA-Seq-Analyse
Dargestellt sind alle Gene mit einem *Fold Change* (FC) >1,5 (<-1,5) und einem FDR *p*-Wert ≤ 0,05

Quisinostat vs. DMSO - Hochreguliert								
Gen	Log2 FC	FDR *p*-Wert	Gen	Log2 FC	FDR *p*-Wert	Gen	Log2 FC	FDR *p*-Wert
TSPY4	5.17	3.31E-03	GAL3ST1	2.50	3.56E-03	MLXIPL	1.98	4.95E-02
HBA1	5.01	1.08E-04	PRKCB	2.50	3.01E-03	PDLIM3	1.97	3.62E-02
TTC9B	4.98	3.59E-02	PLIN5	2.50	1.32E-02	CSPG4	1.97	2.11E-02
SPATA31A6	4.77	2.13E-03	SYT11	2.46	4.16E-02	ZDHHC22	1.96	4.99E-02
CPNE5	4.18	3.34E-02	ELAVL3	2.44	8.53E-04	CELF5	1.95	2.25E-02
PAX1	3.87	2.77E-02	COL5A3	2.43	5.32E-03	CILP2	1.93	5.59E-03
SCN3A	3.84	1.31E-02	CHRNA4	2.40	3.08E-02	ENTPD2	1.93	2.17E-02
SCN1A	3.81	2.33E-02	ONECUT3	2.40	2.50E-02	TMEM121	1.93	3.50E-02
CPED1	3.64	1.21E-02	ICAM5	2.40	3.50E-02	CLIC6	1.92	3.08E-02
DHRS2	3.63	1.98E-16	SLC13A5	2.39	1.71E-02	NOS2	1.90	3.39E-02
ABCD2	3.59	4.21E-02	FER1L4	2.38	1.06E-02	COL9A2	1.90	4.73E-04
GPAT2	3.49	2.47E-02	ST8SIA1	2.37	1.47E-02	SOX18	1.90	3.31E-02
GBP5	3.43	3.35E-02	COMP	2.37	1.11E-02	PRKCG	1.89	4.96E-02
WNT11	3.42	2.02E-04	MAPT	2.37	4.55E-03	NEFM	1.89	2.50E-02
SLC7A10	3.40	8.44E-04	AIPL1	2.37	2.47E-02	CBARP	1.88	2.02E-04
KIF19	3.39	1.33E-02	PMEL	2.36	2.42E-04	GOLGA8N	1.87	4.14E-02
FOXF1	3.38	3.00E-02	GABRD	2.34	4.48E-02	MAPK8IP2	1.87	3.73E-04
C1QL4	3.36	8.44E-04	SEMA3B	2.34	4.36E-04	TSPAN7	1.87	2.07E-02
GSTA2	3.36	4.84E-02	ENOX1	2.33	4.34E-02	ADGRB2	1.85	2.50E-02
KCNH4	3.29	4.08E-03	CCDC184	2.32	2.28E-02	UBE2L6	1.84	3.40E-02
RP1	3.21	4.94E-02	SLC38A4	2.31	2.18E-02	KIFC2	1.84	2.89E-02
EDN2	3.19	2.28E-02	FOXN4	2.31	4.88E-02	DNAH3	1.84	8.07E-03
CDH22	3.17	1.10E-02	HMCN2	2.30	1.54E-02	CAMK2N2	1.83	3.34E-02
KCNH3	3.12	5.32E-03	SYT5	2.29	4.15E-02	SUSD3	1.82	1.07E-02
CD8B	3.10	2.67E-02	TFR2	2.29	4.14E-02	CPLX1	1.82	2.69E-02
REM1	3.08	2.90E-02	NMUR2	2.28	4.29E-02	DLX3	1.80	2.87E-02
GFRA2	3.07	3.62E-02	NXF2	2.27	3.03E-02	HSPA12B	1.80	1.22E-02
SPATA31A1	3.07	2.98E-02	LPAR5	2.26	3.81E-02	RBMY1A1	1.79	2.11E-02
SLC18A2	3.06	3.45E-03	GNG13	2.25	2.83E-02	CACNA1C	1.79	2.50E-02
ALOXE3	2.97	2.25E-02	SOX3	2.24	2.99E-04	CAPN6	1.78	5.59E-03
ZNF716	2.95	4.96E-03	PLIN4	2.22	3.48E-02	CPLX2	1.78	1.23E-02
GRIN2B	2.93	6.69E-03	LY6H	2.21	4.21E-02	GRIK3	1.78	1.71E-02
SCRT1	2.93	1.83E-02	SHD	2.21	4.72E-02	ANKRD13B	1.77	4.24E-04
CGREF1	2.92	1.32E-06	RORC	2.20	3.08E-02	COL1A1	1.77	8.77E-07
FCER2	2.92	4.07E-02	GCK	2.18	4.95E-02	TINAGL1	1.77	3.29E-02
RHBG	2.91	1.24E-02	NEURL1B	2.17	1.13E-03	CDH6	1.77	4.94E-02
FRRS1L	2.88	2.45E-02	GALNT18	2.17	2.55E-02	BCAN	1.76	1.77E-02
ABLIM3	2.88	4.13E-03	SGSM1	2.17	4.25E-02	JUNB	1.76	7.41E-03
PLEKHH2	2.86	3.37E-04	ANPEP	2.17	1.71E-02	HMX1	1.76	5.32E-03
RTBDN	2.86	7.20E-03	RCN3	2.16	2.00E-03	DUSP9	1.76	1.82E-02
CYP4F22	2.86	4.52E-03	SCUBE1	2.14	2.90E-02	CACNG7	1.75	1.79E-02
LAMP5	2.85	3.57E-04	ATP8B3	2.14	4.01E-02	PCBP3	1.74	3.90E-02
PADI1	2.84	1.67E-02	RAB26	2.14	3.79E-02	FAM171A2	1.74	7.31E-03
GOLGA8IP	2.82	1.32E-02	STX1B	2.14	3.85E-03	DUSP8	1.74	7.03E-03
TGM2	2.76	4.45E-06	PKP1	2.14	3.81E-02	NKD2	1.73	4.95E-02
BHMT	2.71	3.38E-03	PNMA5	2.14	3.67E-02	RRAGD	1.73	4.21E-02
CACNA1G	2.71	3.66E-04	CRABP1	2.13	3.01E-03	CEBPA	1.73	6.52E-03
CCDC103	2.71	1.90E-02	UNC5A	2.13	2.57E-02	SLC22A17	1.73	2.72E-02
HS3ST6	2.70	2.28E-02	DDN	2.12	4.78E-02	MATK	1.73	3.43E-03
GALNT16	2.70	6.34E-04	CRB2	2.11	2.85E-02	TESC	1.72	2.36E-02
COL8A2	2.68	3.98E-03	ZCCHC12	2.10	2.00E-03	PRSS35	1.72	4.96E-02
PTGS1	2.68	5.40E-05	COL20A1	2.10	2.02E-02	GPRIN1	1.71	8.44E-04
DCAF8L2	2.67	1.22E-02	NCAM1	2.10	3.86E-02	CACNG8	1.71	4.96E-02
CHRNB2	2.67	2.41E-02	FXYD7	2.10	2.89E-02	ATP1A3	1.70	8.07E-03
DCAF8L1	2.65	1.59E-02	P2RY2	2.08	4.95E-02	NRXN2	1.70	3.81E-02
CHRM4	2.65	1.47E-02	TNFRSF1B	2.08	2.39E-02	STAC2	1.70	3.82E-02
HES4	2.65	3.79E-03	DPYSL5	2.07	1.16E-03	CLDN3	1.70	3.82E-02
HLA-F	2.64	9.80E-03	ANKRD6	2.05	1.24E-02	PPFIA3	1.69	1.41E-02
ASIC1	2.61	1.25E-02	ATP2C2	2.05	1.18E-02	PTPRU	1.69	1.72E-05
F12	2.61	1.30E-02	KCNAB3	2.05	1.41E-02	SLC16A3	1.68	5.99E-06
FMOD	2.59	2.95E-02	VCX3A	2.05	3.37E-02	SERPINB9	1.68	1.01E-04
KCNC1	2.57	6.58E-03	PYY	2.04	3.81E-02	PAX5	1.67	3.84E-02
TRIM46	2.54	5.02E-03	IRX6	2.04	2.80E-02	DPYSL4	1.66	1.25E-02
CACNG5	2.54	1.90E-02	CACNA1B	2.04	3.43E-03	SLFN13	1.65	7.00E-04
ESPNL	2.53	4.52E-02	ADGRE2	2.03	1.18E-02	CACNA1A	1.65	2.39E-02
TEX13A	2.53	1.44E-02	ELFN1	2.02	3.78E-03	LRRC32	1.65	4.94E-02
CHGA	2.52	2.00E-03	RPRML	2.01	1.54E-02	KCNC3	1.64	1.35E-02
CES1	2.51	8.28E-03	DGAT2	1.98	6.63E-03	SRRM3	1.64	2.24E-02

Quisinostat vs. DMSO – Hochreguliert (Fortsetzung)								
Gen	Log2 FC	FDR *p*-Wert	Gen	Log2 FC	FDR *p*-Wert	Gen	Log2 FC	FDR *p*-Wert
RADIL	1.64	1.82E-02	SLITRK4	1.57	4.14E-02	EPOP	1.52	3.17E-03
NDRG4	1.63	3.01E-03	CD74	1.57	4.01E-02	CASZ1	1.52	4.53E-02
CDKN1C	1.63	3.29E-02	SLC8B1	1.56	2.06E-03	NPAS1	1.52	3.34E-02
NPTX2	1.62	2.00E-03	MMP16	1.55	7.07E-03	EEF1A2	1.51	5.97E-03
TMEM59L	1.62	5.84E-03	KCNQ2	1.54	3.21E-03	HSPA2	1.50	2.02E-04
LRFN1	1.61	4.96E-02	PLPPR3	1.53	1.09E-03			
PIANP	1.58	1.29E-03	DIRAS1	1.53	3.87E-03			

Quisinostat vs. DMSO – Herabreguliert								
Gen	Log2 FC	FDR *p*-Wert	Gen	Log2 FC	FDR *p*-Wert	Gen	Log2 FC	FDR *p*-Wert
EIF3CL	-3.69	3.49E-16	PAPPA	-1.96	1.47E-02	RGS4	-1.64	1.01E-04
LYST	-2.73	3.62E-05	DPPA3	-1.95	1.05E-03	LRP1B	-1.59	4.71E-02
IL13RA2	-2.69	4.81E-04	CALCR	-1.89	1.63E-02	SMAGP	-1.54	1.01E-04
NAV3	-2.55	6.69E-03	HORMAD1	-1.86	2.57E-02	TTN	-1.53	2.42E-04
AK4	-2.11	4.15E-13	GAD2	-1.78	3.87E-03	CAP2	-1.52	2.50E-02
LYPD1	-2.07	2.00E-03	EFCAB2	-1.77	1.82E-02	LRAT	-1.51	2.50E-02
PTCHD4	-2.02	4.94E-02	CCDC141	-1.67	2.00E-03			

JIB-04 vs. DMSO – Hochreguliert				JIB-04 vs. DMSO - Herabreguliert		
FDR *p*-Wert	Log2 FC	FDR *p*-Wert		Name	Log2 FC	FDR *p*-Wert
SLC16A3	1.76	6.25E-06		EIF3CL	-1.72	4.61E-02
DDIT4	1.60	2.59E-04				

Chaetocin vs. DMSO – Hochreguliert								
Gen	Log2 FC	FDR *p*-Wert	Gen	Log2 FC	FDR *p*-Wert	Gen	Log2 FC	FDR *p*-Wert
SERPINB3	6.77	5.71E-04	CLIP4	3.32	5.68E-05	NLRC3	2.35	1.18E-02
DLX5	5.91	5.16E-07	TBC1D9	3.27	6.54E-04	PLAGL1	2.33	2.71E-06
DLX6	5.90	9.31E-08	HMOX1	3.17	5.90E-29	ACTC1	2.30	1.47E-02
ESX1	5.33	1.61E-03	SERPINB4	3.13	5.84E-03	RUNX1	2.29	4.60E-04
OLR1	5.07	4.33E-09	POU3F2	3.05	9.99E-03	TBX2	2.23	6.54E-04
CD36	4.87	2.86E-05	GATA3	3.01	2.62E-08	FLRT3	2.18	1.38E-03
MAP2	4.75	1.68E-07	OLAH	2.97	4.31E-04	NPTX1	2.13	3.38E-03
RORB	4.69	2.87E-06	LRRC4C	2.97	3.53E-02	PDGFB	2.13	1.37E-02
FILIP1L	4.55	4.23E-06	CCDC85A	2.95	1.38E-03	RPL3L	2.06	4.89E-02
ACSM1	4.41	9.72E-03	LRRN3	2.92	1.14E-02	INPP4B	2.04	6.61E-03
PCLAF	4.40	7.97E-10	PTHLH	2.87	1.03E-02	CHD7	2.00	2.11E-04
CA3	4.27	1.17E-04	MBNL2	2.82	4.29E-03	TMEM155	1.92	2.06E-02
DIO2	4.23	2.19E-10	CCDC92	2.77	1.59E-02	ZNF436	1.89	1.54E-02
CDX2	3.97	1.62E-05	ZFHX3	2.76	2.77E-09	AMOT	1.89	1.72E-05
GATA6	3.85	4.28E-04	DUSP4	2.75	1.51E-06	BCL6	1.78	1.65E-02
CLEC4C	3.83	4.07E-03	SOX3	2.74	1.32E-06	DNAH3	1.73	2.47E-02
TNFSF8	3.80	3.73E-02	COL2A1	2.72	1.70E-04	BASP1	1.71	1.20E-08
DNAH12	3.78	9.53E-03	COL8A1	2.68	5.57E-04	AHNAK	1.69	3.34E-06
GSG1	3.73	1.35E-02	DCDC2	2.64	1.86E-03	NBPF20	1.69	1.18E-02
SOX6	3.67	3.53E-02	ANKRD1	2.61	1.83E-05	TBX3	1.67	4.04E-05
SLITRK6	3.61	6.13E-03	FRMD4B	2.61	9.39E-06	USP3	1.66	3.62E-02
BHLHE22	3.61	1.34E-03	FER1L4	2.60	4.35E-03	ZNF664	1.64	3.38E-05
SOST	3.53	5.84E-03	MEIS2	2.60	4.09E-03	GAB2	1.61	3.63E-03
AGTR1	3.52	4.60E-02	PAX3	2.55	1.59E-02	ZIC2	1.60	1.62E-05
TMEM52B	3.50	4.85E-04	ACE2	2.49	1.23E-02	ZIC5	1.59	9.84E-03
PRKD1	3.49	7.32E-05	PRTG	2.48	1.21E-09	SOCS3	1.55	1.70E-04
LCT	3.43	3.08E-02	SOX5	2.39	2.24E-03			
ERG	3.37	2.05E-02	YAF2	2.39	1.79E-03			

Chaetocin vs. DMSO – Herabreguliert								
Gen	Log2 FC	FDR *p*-Wert	Gen	Log2 FC	FDR *p*-Wert	Gen	Log2 FC	FDR *p*-Wert
ATP1A2	-3.26	1.69E-05	CPLX2	-2.19	1.23E-02	ADGRA2	-1.95	1.22E-07
CASQ1	-2.99	4.66E-03	ADAM33	-2.09	1.30E-02	ADORA1	-1.69	3.93E-02
POU2F3	-2.99	3.49E-05	RGS4	-2.09	4.39E-08	TIMP4	-1.52	1.08E-04
LRAT	-2.50	1.20E-05	TMEM132B	-2.05	8.90E-06	ARHGAP40	-1.52	1.57E-02
SLC13A3	-2.36	1.47E-02	SEMG1	-1.98	2.73E-03			

MZ-1 vs. DMSO – Hochreguliert						MZ-1 vs. DMSO - Herabreguliert		
Gen	Log2 FC	FDR *p*-Wert				Gen	Log2 FC	FDR *p*-Wert
						EIF3CL	-2.31	1.35E-04

LP99 vs. DMSO – Hochreguliert								
Gen	Log2 FC	FDR *p*-Wert	Gen	Log2 FC	FDR *p*-Wert	Gen	Log2 FC	FDR *p*-Wert
TAC1	3.33	4.36E-04	NPIPA3	2.37	2.04E-02	DDIT3	1.72	2.54E-06
GJD3	3.31	4.16E-02	DDR2	2.36	1.06E-02	ARRDC4	1.69	1.32E-02
MTRNR2L8	3.16	1.83E-02	COL20A1	2.32	7.45E-03	RIMS3	1.68	1.43E-04
GNG13	3.08	3.95E-04	CEBPB	2.29	1.56E-07	DDIT4	1.66	5.91E-06
MTRNR2L12	3.03	2.46E-02	VEGFA	2.11	4.23E-08	AKNA	1.65	4.19E-07
TRIB3	2.94	5.43E-20	TXNIP	2.08	4.24E-06	JDP2	1.56	5.31E-03
C17orf49	2.91	4.58E-05	SLC1A4	2.06	1.17E-05	SLC6A9	1.56	1.18E-03
ULBP1	2.79	5.34E-04	NPPB	2.05	3.16E-03	PABPC1L	1.55	1.69E-05
GNRHR2	2.73	1.31E-03	ALDH1L2	1.96	1.35E-03	BHLHE40	1.54	8.73E-04
LAMP3	2.70	9.63E-03	ATP2C2	1.93	2.42E-02	GDF15	1.52	2.69E-03
KIF1A	2.66	7.59E-18	SEMA3B	1.86	1.18E-02	FLNC	1.52	1.02E-05
HRK	2.61	2.75E-03	ADM2	1.86	4.58E-05	SESN2	1.51	1.70E-05
PCK2	2.54	4.40E-07	DHRS2	1.82	7.26E-04	RHOB	1.50	5.61E-04
THRB	2.44	3.22E-03	ASNS	1.77	1.14E-06			
SGCG	2.43	4.77E-02	IL21R	1.74	1.55E-02			

LP99 vs. DMSO – Herabreguliert								
Gen	Log2 FC	FDR *p*-Wert	Gen	Log2 FC	FDR *p*-Wert	Gen	Log2 FC	FDR *p*-Wert
GOLGA6A	-4.35	1.29E-02	MT-ND3	-2.30	2.18E-23	LRP1B	-1.94	1.06E-02
NCKAP1L	-3.90	7.71E-04	MAGEC1	-2.30	4.96E-02	EIF3CL	-1.94	2.13E-04
GLIPR1L1	-3.59	2.68E-02	DPPA3	-2.28	2.20E-05	CSMD1	-1.92	3.48E-02
RGS4	-3.36	2.48E-22	CST1	-2.22	2.39E-02	GDF3	-1.88	1.44E-10
CSH2	-3.24	1.09E-02	APLNR	-2.21	7.66E-03	MT-CO3	-1.87	4.61E-15
SAMD3	-3.18	4.25E-02	SPN	-2.20	4.85E-02	APLN	-1.85	1.97E-02
OR52A1	-3.00	1.24E-02	MT-ND2	-2.19	1.15E-20	RAB3A	-1.82	3.06E-02
LYST	-2.92	2.25E-06	CNR2	-2.19	5.86E-03	GAD2	-1.80	3.40E-03
HAS2	-2.87	6.67E-09	MT-ND4	-2.19	5.47E-19	UMODL1	-1.78	4.28E-02
KCND3	-2.66	3.77E-02	MT-CYB	-2.18	5.52E-20	POU2F3	-1.69	4.99E-02
CLEC6A	-2.63	3.30E-05	KLHDC8A	-2.14	7.59E-03	FGF19	-1.65	2.17E-03
GJA5	-2.50	2.48E-03	IL13RA2	-2.11	1.18E-02	SPRY3	-1.65	2.99E-02
MT-ATP6	-2.43	2.07E-25	CMKLR1	-2.10	1.03E-02	TOX3	-1.63	8.05E-03
ADAMTS4	-2.39	1.32E-02	MT-ATP8	-2.09	1.85E-19	CBR3	-1.56	4.62E-02
ERVW-1	-2.34	1.23E-02	LEFTY2	-1.99	2.56E-02	MT-ND4L	-1.55	1.97E-09
PDE1B	-2.33	8.80E-03	CLEC4D	-1.95	5.39E-08	TERF1	-1.50	6.15E-06

PRT4165 vs. DMSO – Hochreguliert								
Gen	Log2 FC	FDR *p*-Wert	Gen	Log2 FC	FDR *p*-Wert	Gen	Log2 FC	FDR *p*-Wert
MMP10	6.89	1.19E-07	POSTN	2.49	2.30E-03	TGM2	2.00	6.62E-03
MMP1	6.18	1.61E-04	NPPB	2.35	6.99E-04	CD44	1.91	2.04E-05
SPANXA1	5.74	6.99E-04	FLNC	2.32	4.13E-13	KCNJ2	1.87	3.43E-02
NPB	4.48	7.58E-03	DIO2	2.27	1.90E-02	COL9A2	1.81	1.92E-03
SPANXC	4.27	2.77E-05	GATA3	2.17	6.99E-04	GLIPR2	1.81	7.37E-04
MMP3	4.10	3.70E-02	TIMP3	2.14	1.19E-07	CLDN10	1.80	5.59E-03
SPANXB1	3.71	2.59E-05	HAND1	2.14	4.07E-04	SEMG1	1.73	7.62E-03
CPA4	3.70	4.71E-04	GDF15	2.12	3.57E-06	PLK2	1.68	2.64E-04
ACE2	3.41	3.86E-05	ANXA1	2.08	8.86E-11	CDKN1A	1.65	7.81E-04
OLR1	3.34	2.26E-03	ADAMTS9	2.07	3.75E-04	DHRS2	1.58	2.02E-02
COMP	3.24	9.61E-05	ANK1	2.05	1.64E-03	EEF1A2	1.51	1.61E-02
ALOXE3	3.04	5.00E-02	GPRC5A	2.04	9.98E-09			

PRT4165 vs. DMSO – Herabreguliert								
Gen	Log2 FC	FDR *p*-Wert	Gen	Log2 FC	FDR *p*-Wert	Gen	Log2 FC	FDR *p*-Wert
EIF3CL	-2.52	4.93E-07	SULT1A4	-1.95	4.91E-02	DPPA5	-1.79	5.65E-03
PPFIA4	-2.26	1.81E-02	DPPA3	-1.81	6.78E-03	PCDHGC4	-1.64	9.75E-03
BST2	-2.05	2.74E-02						

GSK343 vs. DMSO – Hochreguliert								
Gen	Log2 FC	FDR *p*-Wert	Gen	Log2 FC	FDR *p*-Wert	Gen	Log2 FC	FDR *p*-Wert
FOSB	3.96	8.81E-03	EMP1	2.22	1.08E-02	SRXN1	1.81	6.19E-10
CSF1R	3.81	1.46E-03	SERPINE1	2.18	5.57E-07	JUNB	1.80	3.89E-03
TAC1	3.59	6.04E-05	JUN	2.15	3.84E-06	GADD45B	1.80	2.57E-05
SQSTM1	3.30	9.91E-42	ANKRD1	2.15	7.47E-04	THBS1	1.77	5.18E-07
TLR6	3.29	1.32E-03	GDF15	2.15	5.55E-07	ZNF165	1.77	6.22E-03
TWIST1	3.17	1.35E-07	MCOLN3	2.14	4.03E-05	STX3	1.76	3.10E-10
HRK	3.16	4.17E-05	UAP1L1	2.13	7.54E-05	ATF3	1.75	1.54E-05
BHLHE40	3.13	1.42E-17	RUNX1	2.10	1.17E-03	ABHD4	1.74	1.22E-06
IFIT2	2.82	3.03E-03	PLAU	2.09	2.67E-05	FOSL2	1.73	1.55E-02
DLX2	2.77	2.30E-02	DDIT3	2.06	2.76E-09	FTL	1.71	2.61E-11
KIF1A	2.76	7.91E-19	NAB2	2.06	9.89E-06	SAMD4A	1.71	1.10E-04
DUSP1	2.72	1.79E-08	FOSL1	2.06	1.85E-03	RBM11	1.65	4.46E-02
IL11	2.64	1.15E-04	KLF6	2.05	2.26E-06	RHOB	1.65	6.04E-05
ULBP1	2.62	1.23E-03	KIAA0319	2.04	4.77E-02	TRIB3	1.64	1.02E-05
VGF	2.58	1.37E-23	NLRC5	1.99	3.93E-02	EMILIN2	1.62	6.51E-04
FOS	2.54	3.12E-02	PPP1R15A	1.98	1.62E-06	TNFRSF12A	1.60	2.26E-06
LIPG	2.51	3.11E-05	PLEKHA7	1.97	1.36E-06	JUND	1.59	9.46E-08
GNG13	2.50	8.59E-03	MAFF	1.95	6.04E-05	NDRG1	1.58	1.09E-02
NXF2	2.49	1.09E-02	RRAGD	1.95	1.40E-02	ZHX2	1.57	4.89E-02
RBM20	2.47	1.68E-05	IRS2	1.94	1.88E-05	PSTPIP2	1.57	1.74E-03
ADM	2.47	6.61E-04	C17orf49	1.92	3.38E-02	RRAGC	1.56	6.01E-07
TMEM200C	2.46	2.24E-02	NUPR1	1.91	4.78E-02	AMOTL2	1.54	2.64E-06
PKD1L2	2.43	2.82E-03	UPP1	1.89	2.15E-07	ARRDC3	1.54	7.47E-04
ADAMTS9	2.42	1.36E-06	NUAK2	1.87	1.33E-06	PTPRN	1.54	3.61E-02
ZFP36	2.39	6.04E-05	MAP1A	1.85	2.79E-07	CD44	1.53	7.61E-04
DMRT1	2.33	3.11E-02	KCNJ2	1.83	1.19E-02	HSPB8	1.52	7.48E-05
CCR7	2.25	3.09E-03	GADD45A	1.82	1.69E-07	SOCS3	1.52	1.34E-04
HDAC9	2.23	1.72E-09	MRNIP	1.81	4.47E-06	GATA2	1.52	3.80E-04

GSK343 vs. DMSO – Herabreguliert								
Gen	Log2 FC	FDR *p*-Wert	Gen	Log2 FC	FDR *p*-Wert	Gen	Log2 FC	FDR *p*-Wert
GOLGA6D	-4.42	8.65E-03	IRX4	-2.21	2.05E-03	IL13RA2	-1.84	3.12E-02
SCNN1B	-4.06	4.34E-02	NR5A1	-2.20	9.57E-03	FGF19	-1.82	2.97E-04
UMODL1	-3.29	5.34E-06	DND1	-2.18	8.18E-04	HOMER3	-1.82	7.87E-03
FCGBP	-3.13	2.16E-03	MYB	-2.16	4.23E-02	C1orf94	-1.81	3.59E-02
RGS4	-2.92	6.53E-17	DPPA3	-2.15	7.54E-05	SCUBE2	-1.81	1.78E-02
TRPC5	-2.92	4.75E-03	HMCN1	-2.15	2.74E-04	EPHA4	-1.77	2.11E-02
LYST	-2.79	5.80E-06	LRP1B	-2.14	2.05E-03	SPRY3	-1.77	1.13E-02
FGF23	-2.78	3.94E-02	CNR2	-2.11	6.50E-03	HAS2	-1.76	1.54E-03
PPP1R17	-2.54	1.10E-02	CLEC6A	-2.10	1.88E-03	PPP1R1B	-1.75	4.29E-04
ESRRB	-2.49	1.92E-03	BST2	-2.05	8.05E-03	CORO1A	-1.75	3.70E-02
LMO1	-2.46	3.24E-02	ACKR3	-2.04	4.50E-02	METTL7A	-1.75	1.39E-07
HTR1D	-2.44	4.60E-02	PDE1B	-2.01	2.70E-02	MYH2	-1.74	3.83E-02
ABCA4	-2.42	2.36E-02	EVPL	-2.01	1.05E-02	GDF3	-1.70	2.07E-08
TMOD1	-2.40	4.64E-02	PCDHGC4	-1.99	9.76E-05	INPP5D	-1.68	3.20E-02
BBOX1	-2.39	3.70E-02	CLEC4D	-1.99	3.10E-08	CBR3	-1.65	2.20E-02
DES	-2.36	4.77E-02	KLHDC8A	-1.96	1.40E-02	HOXB1	-1.63	4.03E-02
SYT12	-2.36	3.07E-03	TMEM215	-1.93	4.42E-02	CDK18	-1.61	3.45E-02
EIF3CL	-2.35	1.35E-06	KHDC3L	-1.92	2.09E-02	SYNE2	-1.61	5.67E-08
NCKAP1L	-2.32	3.97E-02	CMKLR1	-1.92	1.87E-02	MT1H	-1.59	2.38E-02
TCL1B	-2.26	2.84E-02	GAD2	-1.91	9.43E-04	HAPLN1	-1.57	1.93E-03
JAML	-2.26	2.22E-03	EPHB2	-1.89	2.32E-05	CCDC80	-1.57	3.77E-04
OPCML	-2.25	5.63E-03	VIL1	-1.89	1.71E-02	ABCA1	-1.54	1.68E-05
TLE6	-2.23	2.70E-02	FBN2	-1.88	4.00E-09	FGF4	-1.53	1.33E-07
SULF1	-2.22	8.52E-04	GMPR	-1.87	3.68E-03	TUBB4A	-1.53	6.76E-05
POU2F3	-2.21	2.36E-03	APLNR	-1.87	2.62E-02	ATP2A3	-1.53	1.12E-02
TOX3	-2.21	3.48E-05	MAP2K6	-1.86	5.55E-07	SLC52A3	-1.51	2.74E-03

Anhang 10: Funktionelle Analyse der RNA-Seq-Daten
Die in Anhang 9 gelisteten Gene wurden mit dem Online Tool DAVID Bioinformatics Resources 6.8 (https://david.ncifcrf.gov/) genutzt [191,192] auf potentielle Funktionen der Gene analysiert. Es wurden dabei die Datenbanken „UniProt (UP) Keywords“, „Gene Ontology (GO term) Biological Process“ und „Molecular Function“ sowie KEGG-Pathway berücksichtigt.

Quisinostat vs. DMSO – Hochreguliert		
Datenbank	Funktionsannotation	*p*-Wert
UP_KEYWORDS	Calcium	1,8E-11
UP_KEYWORDS	Ion channel	5,3E-11
UP_KEYWORDS	Voltage-gated channel	8,2E-11
UP_KEYWORDS	Ion transport	3,2E-10
UP_KEYWORDS	Glycoprotein	3,3E-10
GOTERM_BP	regulation of ion transmembrane transport	6,0E-7
UP_KEYWORDS	Membrane	7,0E-7
UP_KEYWORDS	Cell membrane	1,1E-6
UP_KEYWORDS	Calcium transport	1,1E-6
UP_KEYWORDS	Transport	2,4E-6
UP_KEYWORDS	Disulfide bond	7,2E-6
KEGG_PATHWAY	Cholinergic synapse	7,9E-6
GOTERM_BP	calcium ion transmembrane transport	9,5E-6
UP_KEYWORDS	Transmembrane helix	1,1E-5
KEGG_PATHWAY	MAPK signaling pathway	1,1E-5
UP_KEYWORDS	Transmembrane	1,3E-5
GOTERM_BP	chemical synaptic transmission	2,2E-5
UP_KEYWORDS	Synapse	3,4E-5
UP_KEYWORDS	Epilepsy	7,0E-5
UP_KEYWORDS	Calcium channel	7,6E-5
GOTERM_MF	voltage-gated calcium channel activity	8,0E-5
UP_KEYWORDS	Extracellular matrix	1,1E-4
KEGG_PATHWAY	Nicotine addiction	1,2E-4
KEGG_PATHWAY	Dopaminergic synapse	1,7E-4
GOTERM_BP	calcium ion transport	2,4E-4
GOTERM_BP	membrane depolarization during action potential	2,8E-4
KEGG_PATHWAY	Serotonergic synapse	4,1E-4
GOTERM_MF	voltage-gated potassium channel activity	4,7E-4
KEGG_PATHWAY	GABAergic synapse	6,0E-4
UP_KEYWORDS	Postsynaptic cell membrane	7,2E-4
GOTERM_BP	regulation of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate selective glutamate receptor activity	7,5E-4
GOTERM_MF	extracellular matrix structural constituent	9,2E-4
KEGG_PATHWAY	Synaptic vesicle cycle	1,0E-3
UP_KEYWORDS	Cell junction	1,0E-3
UP_KEYWORDS	Signal	1,1E-3
GOTERM_MF	ion channel activity	1,3E-3
GOTERM_BP	transmission of nerve impulse	1,5E-3
KEGG_PATHWAY	Retrograde endocannabinoid signaling	1,5E-3
UP_KEYWORDS	Potassium transport	1,6E-3
UP_KEYWORDS	Sodium transport	1,7E-3
GOTERM_BP	regulation of membrane potential	1,7E-3
UP_KEYWORDS	Proteoglycan	1,9E-3
UP_KEYWORDS	Cell projection	2,1E-3
UP_KEYWORDS	Sodium	2,2E-3
UP_KEYWORDS	Potassium	2,7E-3
KEGG_PATHWAY	Glutamatergic synapse	2,7E-3
GOTERM_BP	neurotransmitter secretion	2,8E-3
KEGG_PATHWAY	Type II diabetes mellitus	2,8E-3
GOTERM_BP	membrane depolarization	2,9E-3
GOTERM_MF_DIRECT	calcium ion binding	2,9E-3
GOTERM_BP	regulation of exocytosis	3,2E-3
GOTERM_MF	channel regulator activity	3,3E-3
UP_KEYWORDS	Collagen	4,1E-3
UP_KEYWORDS	EGF-like domain	4,3E-3
KEGG_PATHWAY	Morphine addiction	5,2E-3
UP_KEYWORDS	Spinocerebellar ataxia	5,3E-3
GOTERM_MF	high voltage-gated calcium channel activity	5,3E-3
KEGG_PATHWAY	Circadian entrainment	6,2E-3
UP_KEYWORDS	Neurotransmitter transport	7,3E-3
GOTERM_BP	regulation of insulin secretion	7,4E-3
GOTERM_BP	extracellular matrix organization	7,6E-3
UP_KEYWORDS	Potassium channel	8,3E-3
KEGG_PATHWAY	Amphetamine addiction	8,7E-3

UP_KEYWORDS	Protein kinase inhibitor	9,6E-3
KEGG_PATHWAY	Amoebiasis	9,8E-3
GOTERM_BP	prostaglandin biosynthetic process	1,1E-2
GOTERM_BP	potassium ion transmembrane transport	1,3E-2
KEGG_PATHWAY	Cardiac muscle contraction	1,4E-2
GOTERM_BP	sodium ion transport	1,4E-2
GOTERM_BP	cardiac muscle cell action potential involved in contraction	1,4E-2
GOTERM_BP	potassium ion transport	1,5E-2
UP_KEYWORDS	Cell adhesion	1,5E-2
GOTERM_BP	cardiac conduction	1,5E-2
GOTERM_BP	response to pain	1,6E-2
UP_KEYWORDS	Cytoplasmic vesicle	1,7E-2
GOTERM_BP	cell adhesion	1,7E-2
GOTERM_BP	cell differentiation	1,8E-2
KEGG_PATHWAY	Insulin secretion	2,1E-2
GOTERM_BP	skeletal system development	2,1E-2
UP_KEYWORDS	Disease mutation	2,2E-2
KEGG_PATHWAY	Calcium signaling pathway	2,3E-2
UP_KEYWORDS	Developmental protein	2,7E-2
GOTERM_BP	single organismal cell-cell adhesion	2,9E-2
GOTERM_MF	microtubule binding	3,0E-2
GOTERM_BP	ionotropic glutamate receptor signaling pathway	3,1E-2
GOTERM_BP	associative learning	3,1E-2
UP_KEYWORDS	Secreted	3,1E-2
GOTERM_BP	heart looping	3,3E-2
GOTERM_MF	voltage-gated calcium channel activity involved in AV node cell action potential	3,3E-2
GOTERM_BP	positive regulation of killing of cells of other organism	3,4E-2
GOTERM_BP	protein targeting to plasma membrane	3,6E-2
GOTERM_BP	neuromuscular synaptic transmission	3,6E-2
GOTERM_BP	collagen catabolic process	3,7E-2
KEGG_PATHWAY	Oxytocin signaling pathway	3,8E-2
UP_KEYWORDS	Sodium channel	3,9E-2
GOTERM_BP	B cell activation	4,4E-2
GOTERM_MF	calcium-dependent protein kinase C activity	4,4E-2
GOTERM_BP	cellular response to carbohydrate stimulus	4,5E-2
GOTERM_BP	acetylcholine receptor signaling pathway	4,5E-2
KEGG_PATHWAY	Long-term potentiation	4,8E-2
GOTERM_BP	nervous system development	4,8E-2
UP_KEYWORDS	Lipid droplet	4,9E-2
GOTERM_BP	adult walking behavior	4,9E-2
KEGG_PATHWAY	Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)	5,0E-2
GOTERM_BP	central nervous system development	5,0E-2
GOTERM_BP	sodium ion transmembrane transport	5,2E-2
KEGG_PATHWAY	Neuroactive ligand-receptor interaction	5,5E-2
UP_KEYWORDS	Ligand-gated ion channel	5,5E-2
GOTERM_BP	negative regulation of neurotransmitter secretion	5,6E-2
GOTERM_BP	membrane depolarization during AV node cell action potential	5,6E-2
UP_KEYWORDS	Differentiation	5,7E-2
GOTERM_BP	regulation of calcium ion-dependent exocytosis	6,1E-2
GOTERM_MF	ligand-gated ion channel activity	6,1E-2
GOTERM_MF	delayed rectifier potassium channel activity	6,1E-2
KEGG_PATHWAY	African trypanosomiasis	6,2E-2
GOTERM_MF	phosphorelay sensor kinase activity	6,5E-2
KEGG_PATHWAY	Antigen processing and presentation	6,7E-2
GOTERM_BP	synaptic transmission, cholinergic	6,7E-2
UP_KEYWORDS	Autism spectrum disorder	6,9E-2
GOTERM_BP	blood vessel development	7,1E-2
KEGG_PATHWAY	Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	7,2E-2
GOTERM_BP	locomotory behavior	7,3E-2
GOTERM_BP	somitogenesis	7,4E-2
GOTERM_BP	calcium ion-regulated exocytosis of neurotransmitter	7,4E-2
GOTERM_BP	collagen fibril organization	7,4E-2
GOTERM_BP	response to toxic substance	7,5E-2
UP_KEYWORDS	Lipoprotein	7,6E-2
GOTERM_BP	phosphorelay signal transduction system	7,8E-2
KEGG_PATHWAY	Aldosterone synthesis and secretion	7,8E-2
UP_KEYWORDS	Hydroxylation	8,3E-2
KEGG_PATHWAY	Aldosterone-regulated sodium reabsorption	8,3E-2
KEGG_PATHWAY	Dilated cardiomyopathy	8,5E-2
GOTERM_BP	neurological system process	8,8E-2
GOTERM_BP	regulation of cardiac muscle cell membrane potential	8,8E-2
KEGG_PATHWAY	Adrenergic signaling in cardiomyocytes	9,1E-2
UP_KEYWORDS	Paired box	9,3E-2

GOTERM_BP	visual learning	9,4E-2
KEGG_PATHWAY	Protein digestion and absorption	9,5E-2
GOTERM_BP	ion transmembrane transport	9,5E-2
UP_KEYWORDS	Cleavage on pair of basic residues	9,8E-2
KEGG_PATHWAY	Cell adhesion molecules (CAMs)	9,8E-2
GOTERM_BP	transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	9,9E-2
GOTERM_BP	phototransduction, visible light	9,9E-2
GOTERM_BP	positive regulation of fatty acid beta-oxidation	9,9E-2
GOTERM_BP	maintenance of epithelial cell apical/basal polarity	9,9E-2
GOTERM_BP	behavioral response to nicotine	9,9E-2
Quisinostat vs. DMSO – Herabreguliert		
Datenbank	Funktionsannotation	*p*-Wert
GOTERM_BP	activation of adenylate cyclase activity	3,7E-2
GOTERM_BP	protein transport	5,3E-2
GOTERM_BP	response to glucocorticoid	6,0E-2
JIB-04 vs. DMSO – keine Funktionen gefunden		
	Chaetocin vs. DMSO – Hochreguliert	
Datenbank	Funktionsannotation	*p*-Wert
GOTERM_MF	transcription factor activity, sequence-specific DNA binding	7,5E-9
UP_KEYWORDS	DNA-binding	5,1E-7
GOTERM_BP	negative regulation of transcription, DNA-templated	1,1E-6
UP_KEYWORDS	Activator	1,5E-6
GOTERM_BP	positive regulation of transcription, DNA-templated	1,5E-6
UP_KEYWORDS	Transcription regulation	5,1E-6
UP_KEYWORDS	Transcription	8,3E-6
GOTERM_BP	negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	8,7E-6
UP_KEYWORDS	Developmental protein	1,6E-5
GOTERM_BP	palate development	1,7E-5
GOTERM_MF	sequence-specific DNA binding	5,2E-5
GOTERM_BP	transcription from RNA polymerase II promoter	5,6E-5
GOTERM_BP	inner ear morphogenesis	6,8E-5
UP_KEYWORDS	Homeobox	7,2E-5
GOTERM_BP	positive regulation of reactive oxygen species metabolic process	2,7E-4
GOTERM_BP	cellular response to BMP stimulus	2,7E-4
GOTERM_BP	skeletal system development	2,8E-4
GOTERM_BP	anatomical structure formation involved in morphogenesis	9,5E-4
GOTERM_MF	RNA polymerase II transcription factor binding	9,7E-4
UP_KEYWORDS	Deafness	1,1E-3
GOTERM_MF	DNA binding	1,1E-3
GOTERM_BP	in utero embryonic development	1,2E-3
UP_KEYWORDS	Nucleus	1,4E-3
GOTERM_MF	transcription corepressor activity	1,5E-3
GOTERM_MF	RNA polymerase II regulatory region sequence-specific DNA binding	1,7E-3
GOTERM_MF	transcription regulatory region DNA binding	1,9E-3
GOTERM_BP	sensory perception of sound	2,4E-3
GOTERM_MF	HMG box domain binding	2,5E-3
GOTERM_BP	positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	2,6E-3
GOTERM_BP	positive regulation of blood vessel endothelial cell migration	2,9E-3
UP_KEYWORDS	Neurogenesis	2,9E-3
GOTERM_BP	positive regulation of cell proliferation	3,5E-3
GOTERM_MF	RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific DNA binding	3,5E-3
UP_KEYWORDS	Disease mutation	3,6E-3
GOTERM_MF	transcription factor binding	6,5E-3
GOTERM_BP	organ morphogenesis	7,0E-3
GOTERM_MF	transcriptional activator activity, RNA polymerase II transcription regulatory region sequence-specific binding	7,2E-3
UP_KEYWORDS	Zinc-finger	8,3E-3
GOTERM_BP	negative regulation of mast cell cytokine production	8,4E-3
GOTERM_BP	negative regulation of JAK-STAT cascade	1,2E-2
GOTERM_BP	mammary placode formation	1,3E-2
GOTERM_BP	positive regulation of angiogenesis	1,3E-2
UP_KEYWORDS	Proto-oncogene	1,4E-2
GOTERM_MF	core promoter sequence-specific DNA binding	1,4E-2
GOTERM_BP	central nervous system development	1,4E-2
GOTERM_BP	transcription, DNA-templated	1,5E-2
GOTERM_BP	paracrine signaling	1,7E-2
GOTERM_BP	positive regulation of mesenchymal stem cell differentiation	1,7E-2
UP_KEYWORDS	Zinc	1,7E-2
GOTERM_BP	cellular response to transforming growth factor beta stimulus	1,8E-2

GOTERM_MF	protein kinase inhibitor activity	2,0E-2
GOTERM_BP	female genitalia development	2,1E-2
GOTERM_BP	otic vesicle development	2,1E-2
GOTERM_MF	chromatin binding	2,3E-2
GOTERM_MF	RNA polymerase II core promoter sequence-specific DNA binding	2,3E-2
GOTERM_MF	transcriptional repressor activity, RNA polymerase II transcription regulatory region sequence-specific binding	2,5E-2
GOTERM_BP	regulation of systemic arterial blood pressure by renin-angiotensin	2,5E-2
UP_KEYWORDS	Repressor	2,8E-2
GOTERM_BP	positive regulation of synapse assembly	2,8E-2
GOTERM_BP	regulation of inflammatory response	2,9E-2
GOTERM_BP	intestinal epithelial cell differentiation	2,9E-2
GOTERM_BP	atrioventricular canal development	2,9E-2
UP_KEYWORDS	Atrial septal defect	3,1E-2
GOTERM_BP	response to estrogen	3,1E-2
KEGG_PATHWAY	Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	3,1E-2
UP_KEYWORDS	Leucine-rich repeat	3,3E-2
GOTERM_BP	low-density lipoprotein particle clearance	3,3E-2
GOTERM_BP	mesenchymal to epithelial transition	3,3E-2
UP_KEYWORDS	Chromosomal rearrangement	4,1E-2
GOTERM_BP	head development	4,1E-2
GOTERM_MF	platelet-derived growth factor binding	4,5E-2
GOTERM_BP	cardiac muscle tissue morphogenesis	5,0E-2
GOTERM_BP	regulation of vasodilation	5,0E-2
GOTERM_BP	dephosphorylation	5,1E-2
GOTERM_MF	low-density lipoprotein receptor activity	5,3E-2
GOTERM_BP	visual perception	5,3E-2
GOTERM_BP	aorta morphogenesis	5,4E-2
GOTERM_BP	muscle organ development	5,5E-2
UP_KEYWORDS	Collagen	5,6E-2
GOTERM_BP	erythrocyte development	6,2E-2
GOTERM_BP	cellular response to hypoxia	6,2E-2
UP_KEYWORDS	Metal-binding	6,3E-2
GOTERM_BP	response to growth factor	6,6E-2
GOTERM_BP	positive regulation of macrophage derived foam cell differentiation	6,6E-2
GOTERM_BP	positive regulation of cartilage development	6,6E-2
GOTERM_BP	negative regulation of protein kinase activity	6,6E-2
UP_KEYWORDS	Kallmann syndrome	6,8E-2
GOTERM_BP	negative regulation of peptidase activity	7,0E-2
GOTERM_BP	response to ethanol	7,3E-2
GOTERM_BP	innervation	7,3E-2
GOTERM_BP	face development	7,3E-2
GOTERM_MF	transcriptional activator activity, RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific binding	7,5E-2
GOTERM_BP	positive regulation of chondrocyte differentiation	7,7E-2
GOTERM_BP	regulation of neurogenesis	7,7E-2
GOTERM_MF	transcriptional repressor activity, RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific binding	7,8E-2
GOTERM_BP	regulation of vasoconstriction	8,1E-2
GOTERM_BP	positive regulation of cardiac muscle cell proliferation	8,9E-2
GOTERM_BP	outflow tract septum morphogenesis	9,3E-2
GOTERM_BP	negative regulation of myoblast differentiation	9,3E-2
GOTERM_BP	cellular senescence	9,3E-2
GOTERM_BP	regulation of axonogenesis	9,3E-2
KEGG_PATHWAY	Amoebiasis	9,6E-2
GOTERM_BP	cochlea development	9,7E-2
GOTERM_BP	myeloid cell differentiation	9,7E-2
UP_KEYWORDS	Hypogonadotropic hypogonadism	1,0E-1

Chaetocin vs. DMSO – Herabreguliert		
Datenbank	Funktionsannotation	*p*-Wert
GOTERM_BP	regulation of respiratory gaseous exchange by neurological system process	9,3E-3
GOTERM_BP	response to organic substance	2,0E-2
GOTERM_BP	regulation of cardiac conduction	3,9E-2
GOTERM_BP	sodium ion transport	5,6E-2
KEGG_PATHWAY	cGMP-PKG signaling pathway	6,7E-2
UP_KEYWORDS	Sodium transport	7,1E-2
UP_KEYWORDS	Sodium	7,6E-2
GOTERM_BP	central nervous system development	8,2E-2
KEGG_PATHWAY	cAMP signaling pathway	8,4E-2

MZ-1 vs. DMSO – keine Funktionen gefunden		
LP99 vs. DMSO – Hochreguliert		
Datenbank	Funktionsannotation	*p*-Wert
GOTERM_BP	intrinsic apoptotic signaling pathway in response to endoplasmic reticulum stress	2,7E-3
GOTERM_BP	negative regulation of fat cell differentiation	4,3E-3
GOTERM_BP	negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	5,9E-3
GOTERM_BP	response to glucose	1,1E-2
GOTERM_MF	transcription corepressor activity	1,1E-2
GOTERM_BP	response to endoplasmic reticulum stress	1,3E-2
GOTERM_MF	protein heterodimerization activity	2,2E-2
UP_KEYWORDS	Apoptosis	2,7E-2
GOTERM_BP	positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter in response to endoplasmic reticulum stress	2,8E-2
GOTERM_BP	positive regulation of renal sodium excretion	2,8E-2
GOTERM_BP	PERK-mediated unfolded protein response	2,8E-2
GOTERM_BP	positive regulation of angiogenesis	2,9E-2
GOTERM_MF	neuropilin binding	3,4E-2
GOTERM_BP	natural killer cell activation	4,5E-2
GOTERM_MF	RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific DNA binding	4,8E-2
GOTERM_BP	positive regulation of ubiquitin-protein transferase activity	5,0E-2
UP_KEYWORDS	Secreted	5,4E-2
KEGG_PATHWAY	PI3K-Akt signaling pathway	6,7E-2
UP_KEYWORDS	Neurotransmitter transport	7,6E-2
GOTERM_BP	reactive oxygen species metabolic process	7,8E-2
GOTERM_MF	protein homodimerization activity	8,7E-2
UP_KEYWORDS	Amidation	9,2E-2
GOTERM_BP	ovarian follicle development	9,3E-2
GOTERM_BP	angiogenesis	9,5E-2
LP99 vs. DMSO – Herabreguliert		
Datenbank	Funktionsannotation	*p*-Wert
UP_KEYWORDS	Leber hereditary optic neuropathy	1,2E-6
KEGG_PATHWAY	Oxidative phosphorylation	3,1E-5
KEGG_PATHWAY	Parkinson's disease	4,2E-5
UP_KEYWORDS	Ubiquinone	6,1E-5
GOTERM_MF	NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity	2,0E-4
UP_KEYWORDS	Signal	2,0E-4
GOTERM_BP	mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone	2,3E-4
UP_KEYWORDS	Respiratory chain	3,5E-4
UP_KEYWORDS	Electron transport	1,7E-3
UP_KEYWORDS	Transmembrane helix	1,7E-3
UP_KEYWORDS	Transmembrane	1,8E-3
GOTERM_BP	skeletal system development	4,5E-3
UP_KEYWORDS	NAD	6,6E-3
UP_KEYWORDS	Membrane	6,8E-3
GOTERM_BP	mitochondrial respiratory chain complex I assembly	1,0E-2
GOTERM_BP	ATP synthesis coupled electron transport	1,2E-2
UP_KEYWORDS	Disulfide bond	1,2E-2
UP_KEYWORDS	Cleavage on pair of basic residues	2,6E-2
GOTERM_BP	leukocyte chemotaxis	2,9E-2
UP_KEYWORDS	CF(0)	3,0E-2
UP_KEYWORDS	Growth factor	3,3E-2
UP_KEYWORDS	ATP synthesis	3,4E-2
GOTERM_BP	chemotaxis	3,6E-2
UP_KEYWORDS	Oxidoreductase	3,8E-2
GOTERM_BP	response to hyperoxia	4,1E-2
UP_KEYWORDS	Leigh syndrome	4,3E-2
UP_KEYWORDS	Disease mutation	4,6E-2
GOTERM_BP	defense response to bacterium	4,9E-2
KEGG_PATHWAY	Metabolic pathways	5,0E-2
GOTERM_BP	mitochondrial ATP synthesis coupled proton transport	5,0E-2
GOTERM_BP	ATP synthesis coupled proton transport	5,2E-2
GOTERM_MF	growth factor activity	5,6E-2
UP_KEYWORDS	Polymorphism	5,7E-2
GOTERM_BP	positive regulation of phosphorylation	5,9E-2
UP_KEYWORDS	Transport	6,3E-2
GOTERM_BP	ATP biosynthetic process	6,8E-2
GOTERM_BP	positive regulation of vasodilation	6,8E-2
GOTERM_BP	negative regulation of blood pressure	7,1E-2
GOTERM_BP	response to amphetamine	7,3E-2
GOTERM_MF	hydrogen ion transmembrane transporter activity	7,3E-2

GOTERM_BP	regulation of heart rate by cardiac conduction	8,2E-2
GOTERM_BP	immune response	8,3E-2
GOTERM_BP	cell development	9,3E-2
GOTERM_MF	transforming growth factor beta receptor binding	9,5E-2
GOTERM_BP	regulation of apoptotic process	9,5E-2
GOTERM_BP	regulation of MAPK cascade	9,5E-2
UP_KEYWORDS	Mitochondrion	9,6E-2
PRT4165 vs. DMSO – Hochreguliert		
Datenbank	Funktionsannotation	*p*-Wert
UP_KEYWORDS	Secreted	1,5E-7
UP_KEYWORDS	Extracellular matrix	1,8E-7
UP_KEYWORDS	Metalloprotease	4,8E-6
UP_KEYWORDS	Disulfide bond	1,6E-4
GOTERM_BP	negative regulation of apoptotic process	2,3E-4
UP_KEYWORDS	Signal	3,9E-4
UP_KEYWORDS	Collagen degradation	4,0E-4
UP_KEYWORDS	Zymogen	4,1E-4
GOTERM_BP	extracellular matrix disassembly	4,4E-4
GOTERM_MF	metalloendopeptidase activity	1,4E-3
KEGG_PATHWAY	Proteoglycans in cancer	1,5E-3
UP_KEYWORDS	Protease	1,9E-3
GOTERM_BP	proteolysis	2,7E-3
GOTERM_MF	endopeptidase activity	5,0E-3
GOTERM_BP	extracellular matrix organization	6,6E-3
GOTERM_BP	collagen catabolic process	7,0E-3
GOTERM_MF	metallopeptidase activity	1,1E-2
GOTERM_BP	cell adhesion	1,2E-2
GOTERM_MF	protein binding	1,3E-2
UP_KEYWORDS	Calcium	1,4E-2
GOTERM_BP	regulation of vasodilation	2,3E-2
GOTERM_BP	leukocyte migration	2,4E-2
GOTERM_MF	zinc ion binding	2,4E-2
GOTERM_BP	positive regulation of protein oligomerization	2,7E-2
UP_KEYWORDS	Metal-binding	2,8E-2
GOTERM_BP	skeletal system development	3,0E-2
UP_KEYWORDS	Zinc	3,4E-2
GOTERM_BP	response to X-ray	4,2E-2
UP_KEYWORDS	Cell adhesion	4,4E-2
GOTERM_MF	calcium ion binding	5,0E-2
GOTERM_MF	metallocarboxypeptidase activity	5,2E-2
UP_KEYWORDS	Polymorphism	5,2E-2
UP_KEYWORDS	Disease mutation	5,2E-2
UP_KEYWORDS	Carboxypeptidase	5,3E-2
UP_KEYWORDS	Glycoprotein	5,5E-2
GOTERM_BP	positive regulation of reactive oxygen species metabolic process	5,7E-2
GOTERM_BP	cellular response to fibroblast growth factor stimulus	5,7E-2
UP_KEYWORDS	Pharmaceutical	7,5E-2
UP_KEYWORDS	Proteoglycan	7,8E-2
GOTERM_MF	structural molecule activity	8,4E-2
UP_KEYWORDS	Cleavage on pair of basic residues	8,5E-2
GOTERM_MF	serine-type endopeptidase activity	8,8E-2
GOTERM_BP	peptide cross-linking	9,4E-2
PRT4165 vs. DMSO – Herabreguliert		
Datenbank	Funktionsannotation	*p*-Wert
UP_KEYWORDS	Cytoplasm	3,4E-3
GSK343 vs. DMSO – Hochreguliert		
Datenbank	Funktionsannotation	*p*-Wert
GOTERM_BP	response to cAMP	4,2E-11
GOTERM_BP	positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	2,2E-8
GOTERM_MF	transcription factor activity, RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific binding	7,1E-8
KEGG_PATHWAY	Osteoclast differentiation	8,2E-8
GOTERM_MF	transcription factor binding	1,1E-7
GOTERM_BP	positive regulation of apoptotic process	1,7E-7
GOTERM_MF	transcription corepressor activity	5,4E-7
GOTERM_BP	negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	1,3E-6
GOTERM_BP	cellular response to hormone stimulus	2,3E-6
GOTERM_BP	response to mechanical stimulus	8,9E-6
GOTERM_BP	positive regulation of angiogenesis	1,8E-5

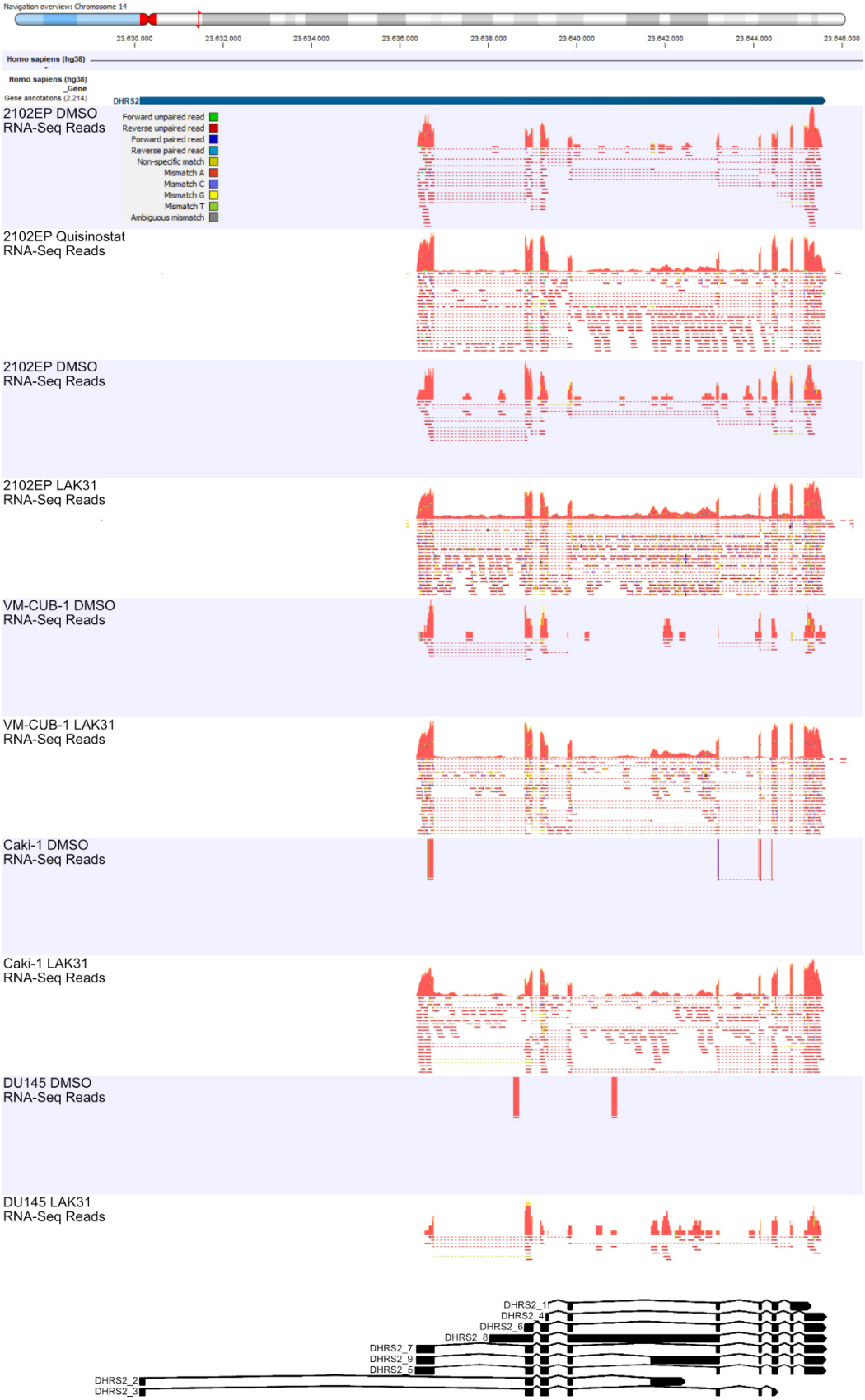
GOTERM_BP	transcription from RNA polymerase II promoter	3,0E-5
GOTERM_MF	transcription factor activity, sequence-specific DNA binding	4,5E-5
UP_KEYWORDS	Stress response	5,3E-5
GOTERM_MF	protein heterodimerization activity	7,5E-5
GOTERM_BP	skeletal muscle cell differentiation	8,6E-5
GOTERM_MF	transcriptional activator activity, RNA polymerase II transcription regulatory region sequence-specific binding	9,3E-5
GOTERM_BP	cellular response to calcium ion	1,0E-4
GOTERM_BP	response to cytokine	1,1E-4
GOTERM_BP	response to lipopolysaccharide	1,3E-4
UP_KEYWORDS	DNA-binding	1,5E-4
UP_KEYWORDS	Nucleus	2,9E-4
GOTERM_MF	RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific DNA binding	3,0E-4
UP_KEYWORDS	Apoptosis	3,1E-4
GOTERM_BP	positive regulation of DNA-templated transcription, initiation	4,6E-4
GOTERM_BP	cell cycle arrest	5,6E-4
GOTERM_MF	protein binding	5,9E-4
UP_KEYWORDS	Repressor	6,3E-4
GOTERM_BP	positive regulation of cell differentiation	7,2E-4
GOTERM_BP	response to progesterone	8,4E-4
GOTERM_MF	transcriptional activator activity, RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific binding	9,5E-4
GOTERM_BP	regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	1,2E-3
GOTERM_BP	regulation of cell death	1,2E-3
GOTERM_BP	positive regulation of cell motility	2,0E-3
UP_KEYWORDS	Transcription regulation	2,0E-3
GOTERM_MF	protein homodimerization activity	2,5E-3
GOTERM_BP	response to muscle stretch	2,6E-3
UP_KEYWORDS	Transcription	2,8E-3
GOTERM_BP	regulation of cell cycle	2,9E-3
GOTERM_BP	response to light stimulus	2,9E-3
GOTERM_BP	response to corticosterone	3,3E-3
GOTERM_BP	response to drug	3,3E-3
GOTERM_MF	sequence-specific DNA binding	3,4E-3
GOTERM_MF	R-SMAD binding	4,5E-3
KEGG_PATHWAY	MAPK signaling pathway	4,5E-3
GOTERM_BP	response to endoplasmic reticulum stress	5,5E-3
GOTERM_BP	apoptotic process	5,5E-3
GOTERM_BP	negative regulation of apoptotic process	5,9E-3
GOTERM_BP	positive regulation of cell proliferation	6,7E-3
GOTERM_BP	response to radiation	7,8E-3
KEGG_PATHWAY	p53 signaling pathway	8,3E-3
GOTERM_BP	female pregnancy	8,8E-3
GOTERM_MF	RNA polymerase II transcription factor activity, sequence-specific DNA binding	9,2E-3
GOTERM_BP	inflammatory response	9,4E-3
GOTERM_MF	identical protein binding	9,6E-3
GOTERM_BP	negative regulation of transcription, DNA-templated	9,6E-3
GOTERM_BP	intrinsic apoptotic signaling pathway in response to endoplasmic reticulum stress	1,1E-2
GOTERM_MF	chromatin binding	1,1E-2
GOTERM_BP	negative regulation of protein kinase activity	1,2E-2
GOTERM_BP	regulation of cell proliferation	1,2E-2
GOTERM_BP	response to starvation	1,2E-2
GOTERM_BP	response to cold	1,3E-2
UP_KEYWORDS	Amidation	1,4E-2
UP_KEYWORDS	Proto-oncogene	1,5E-2
UP_KEYWORDS	Pharmaceutical	1,5E-2
UP_KEYWORDS	Coiled coil	1,6E-2
GOTERM_BP	negative regulation of fat cell differentiation	1,7E-2
UP_KEYWORDS	Activator	1,7E-2
GOTERM_MF	RNA polymerase II regulatory region sequence-specific DNA binding	1,8E-2
GOTERM_BP	negative regulation of plasma membrane long-chain fatty acid transport	1,9E-2
GOTERM_BP	regulation of wound healing	1,9E-2
GOTERM_MF	transcription regulatory region DNA binding	1,9E-2
UP_KEYWORDS	Phosphoprotein	2,0E-2
KEGG_PATHWAY	Transcriptional misregulation in cancer	2,0E-2
GOTERM_BP	negative regulation of plasminogen activation	2,4E-2
GOTERM_BP	negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter in response to endoplasmic reticulum stress	2,4E-2
GOTERM_BP	response to hydrogen peroxide	2,5E-2
GOTERM_BP	positive regulation of cytosolic calcium ion concentration	2,6E-2
KEGG_PATHWAY	Chagas disease (American trypanosomiasis)	2,7E-2
GOTERM_BP	defense response to Gram-negative bacterium	2,8E-2
KEGG_PATHWAY	TNF signaling pathway	2,9E-2

GOTERM_BP	cell growth	2,9E-2
GOTERM_MF	RNA polymerase II core promoter sequence-specific DNA binding	3,1E-2
UP_KEYWORDS	Neurodegeneration	3,1E-2
UP_KEYWORDS	Cleavage on pair of basic residues	3,1E-2
GOTERM_BP	hemopoiesis	3,2E-2
GOTERM_BP	negative regulation of sequence-specific DNA binding transcription factor activity	3,3E-2
GOTERM_BP	response to stress	3,4E-2
GOTERM_BP	SMAD protein signal transduction	3,5E-2
GOTERM_BP	response to gravity	3,7E-2
GOTERM_BP	positive regulation of JNK cascade	3,8E-2
GOTERM_BP	B cell differentiation	4,0E-2
GOTERM_BP	response to insulin	4,1E-2
GOTERM_BP	positive regulation of fatty acid beta-oxidation	4,2E-2
GOTERM_BP	branching involved in labyrinthine layer morphogenesis	4,2E-2
GOTERM_BP	regulation of receptor activity	4,2E-2
GOTERM_BP	positive regulation of peptidyl-serine phosphorylation	4,4E-2
GOTERM_BP	aging	4,4E-2
UP_KEYWORDS	Endosome	4,5E-2
GOTERM_BP	cellular response to mechanical stimulus	4,5E-2
GOTERM_BP	placenta blood vessel development	4,7E-2
GOTERM_BP	negative regulation of fibrinolysis	4,7E-2
GOTERM_BP	antifungal humoral response	4,7E-2
GOTERM_BP	circadian rhythm	5,0E-2
GOTERM_BP	macroautophagy	5,1E-2
GOTERM_BP	positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade	5,1E-2
GOTERM_BP	activation of MAPKKK activity	5,1E-2
UP_KEYWORDS	Neuropathy	5,1E-2
GOTERM_BP	cellular response to insulin stimulus	5,2E-2
UP_KEYWORDS	Differentiation	5,3E-2
GOTERM_BP	microglial cell activation	5,6E-2
GOTERM_BP	positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter in response to endoplasmic reticulum stress	5,6E-2
GOTERM_BP	negative regulation of DNA biosynthetic process	5,6E-2
GOTERM_BP	positive regulation of chemotaxis	5,6E-2
GOTERM_BP	PERK-mediated unfolded protein response	5,6E-2
GOTERM_BP	heart development	5,7E-2
GOTERM_BP	positive regulation of cell migration	5,8E-2
GOTERM_BP	eyelid development in camera-type eye	6,0E-2
GOTERM_BP	mitotic cell cycle arrest	6,0E-2
GOTERM_BP	response to yeast	6,0E-2
GOTERM_BP	negative regulation of DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator	6,0E-2
KEGG_PATHWAY	Amphetamine addiction	6,4E-2
GOTERM_BP	ruffle organization	6,5E-2
GOTERM_BP	positive regulation of blood coagulation	6,5E-2
KEGG_PATHWAY	Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)	6,8E-2
UP_KEYWORDS	Growth arrest	7,0E-2
GOTERM_BP	transforming growth factor beta receptor signaling pathway	7,1E-2
KEGG_PATHWAY	HTLV-I infection	7,3E-2
GOTERM_BP	positive regulation of p38MAPK cascade	7,4E-2
GOTERM_BP	cellular response to hypoxia	7,7E-2
GOTERM_BP	monocyte differentiation	7,8E-2
UP_KEYWORDS	Ubl conjugation	8,0E-2
GOTERM_BP	cellular response to extracellular stimulus	8,2E-2
GOTERM_BP	mRNA catabolic process	8,2E-2
GOTERM_BP	olfactory bulb development	8,7E-2
UP_KEYWORDS	Developmental protein	8,8E-2
UP_KEYWORDS	Innate immunity	8,9E-2
GOTERM_BP	neuron migration	8,9E-2
UP_KEYWORDS	Lysosome	9,0E-2
GOTERM_BP	angiogenesis	9,0E-2
GOTERM_BP	positive regulation of pri-miRNA transcription from RNA polymerase II promoter	9,1E-2
GOTERM_BP	fibrinolysis	9,5E-2
GOTERM_BP	cellular response to tumor necrosis factor	9,7E-2
GOTERM_BP	cell proliferation	9,7E-2
UP_KEYWORDS	Growth factor	9,8E-2
GOTERM_BP	cellular response to cytokine stimulus	1,0E-1
GOTERM_BP	positive regulation of ubiquitin-protein transferase activity	1,0E-1

GSK343 vs. DMSO – Herabreguliert		
Datenbank	Funktionsannotation	*p*-Wert
GOTERM_BP	leukocyte chemotaxis	1,1E-3
UP_KEYWORDS	Disease mutation	2,2E-3
GOTERM_MF	protein tyrosine kinase activity	2,4E-3

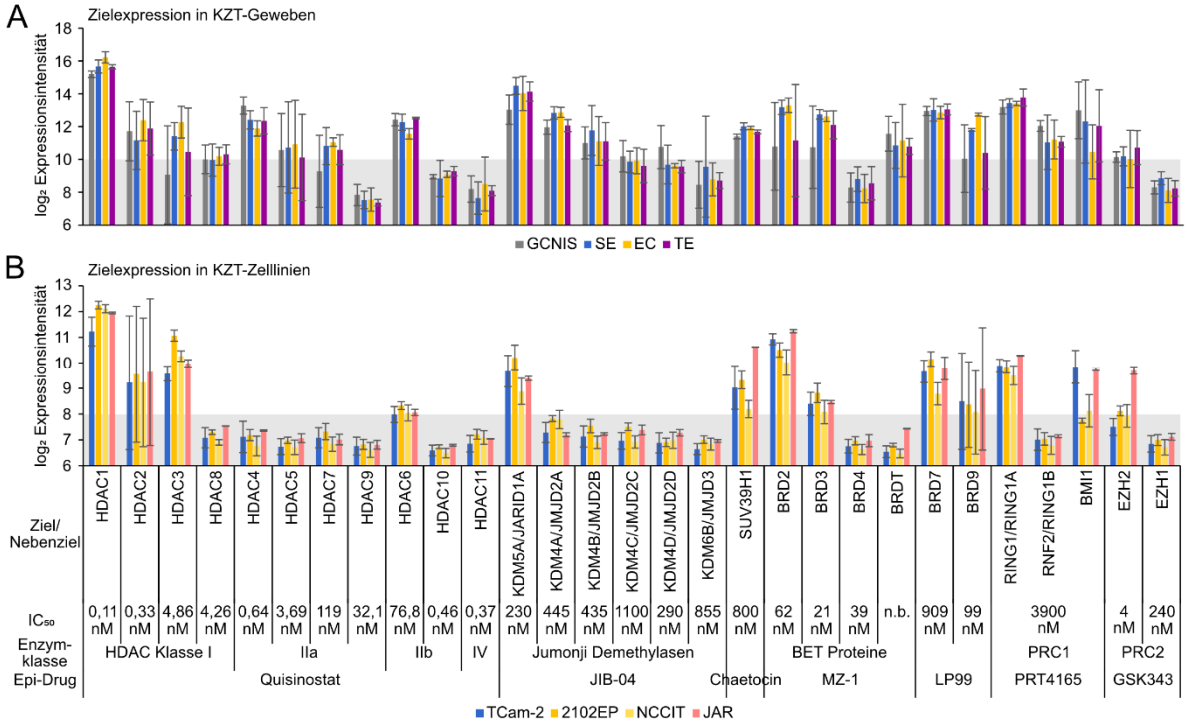
UP_KEYWORDS	Glycoprotein	3,1E-3
GOTERM_BP	peptidyl-tyrosine phosphorylation	3,8E-3
UP_KEYWORDS	Calcium	5,4E-3
UP_KEYWORDS	Disulfide bond	6,3E-3
GOTERM_BP	response to amphetamine	7,4E-3
UP_KEYWORDS	Developmental protein	8,8E-3
GOTERM_MF	calcium ion binding	1,0E-2
GOTERM_BP	muscle filament sliding	1,1E-2
UP_KEYWORDS	Cell membrane	1,1E-2
UP_KEYWORDS	EGF-like domain	1,2E-2
UP_KEYWORDS	Growth factor	1,3E-2
UP_KEYWORDS	Cell junction	1,3E-2
GOTERM_MF	1-phosphatidylinositol-3-kinase activity	1,4E-2
GOTERM_BP	regulation of body fluid levels	1,7E-2
GOTERM_BP	phosphatidylinositol-3-phosphate biosynthetic process	1,8E-2
GOTERM_MF	actin filament binding	1,8E-2
UP_KEYWORDS	Actin-binding	1,9E-2
UP_KEYWORDS	Polymorphism	2,4E-2
UP_KEYWORDS	Cytoplasm	2,5E-2
GOTERM_MF	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase activity	2,8E-2
GOTERM_MF	actin binding	3,0E-2
GOTERM_MF	growth factor activity	3,1E-2
UP_KEYWORDS	Transmembrane helix	3,1E-2
UP_KEYWORDS	Transmembrane	3,3E-2
GOTERM_BP	positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade	3,7E-2
GOTERM_MF	transmembrane-ephrin receptor activity	3,7E-2
GOTERM_BP	response to drug	3,8E-2
UP_KEYWORDS	Membrane	4,0E-2
GOTERM_BP	calcium ion transport	4,0E-2
GOTERM_BP	positive regulation of cell migration	4,2E-2
GOTERM_BP	regulation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling	4,2E-2
GOTERM_BP	immunoglobulin mediated immune response	4,5E-2
GOTERM_MF	protein serine/threonine phosphatase inhibitor activity	4,5E-2
GOTERM_MF	ephrin receptor activity	4,5E-2
GOTERM_BP	fibroblast growth factor receptor signaling pathway	4,6E-2
KEGG_PATHWAY	Melanoma	4,8E-2
UP_KEYWORDS	Age-related macular degeneration	5,1E-2
GOTERM_BP	positive regulation of B cell differentiation	5,7E-2
GOTERM_BP	phosphatidylinositol phosphorylation	5,9E-2
UP_KEYWORDS	Proto-oncogene	5,9E-2
UP_KEYWORDS	Tyrosine-protein kinase	6,6E-2
GOTERM_BP	phosphatidylinositol-mediated signaling	7,2E-2
UP_KEYWORDS	Extracellular matrix	7,3E-2
GOTERM_BP	muscle contraction	7,3E-2
KEGG_PATHWAY	Regulation of actin cytoskeleton	8,4E-2
KEGG_PATHWAY	Rap1 signaling pathway	8,4E-2
GOTERM_MF	Ras guanyl-nucleotide exchange factor activity	8,4E-2
UP_KEYWORDS	Receptor	8,7E-2
GOTERM_BP	apoptotic process	8,7E-2
GOTERM_BP	phospholipid translocation	8,8E-2
KEGG_PATHWAY	PI3K-Akt signaling pathway	8,8E-2
GOTERM_MF	fibroblast growth factor receptor binding	8,9E-2
GOTERM_BP	chemotaxis	9,2E-2
GOTERM_BP	positive regulation of erythrocyte differentiation	9,5E-2
GOTERM_BP	MAPK cascade	9,6E-2

Anhang 11: Darstellung der einzelnen *Reads* der RNA-Seq-Daten der DHRS2-Isoformen
Hier dargestellt sind die einzelnen, in der RNA-Seq Analyse detektierten *Reads* verteilt auf die verschiedenen Exons von DHRS2. Diese Abbildung wurde mit der CLC Genomics Workbench von Patrick Petzsch (Genomics & Transcriptomics Labor (GTL) Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Core Facility für RNA-Seq). Die RNA-Isolation erfolgte bei Quisinostat nach 16 h, bei LAK31 nach 24 h. Die Transkriptomdaten für LAK31 wurden von Aaron Burmeister generiert [154].



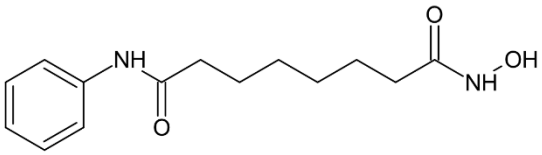
Anhang 12: Expression der Zielgene der 7 besten Epi-Drugs in KZT-Geweben und Zelllinien sowie publizierte IC_{50}-Werte gegen die jeweiligen Enzyme

Reanalyse von Microarray-Daten aus A) KZT-Gewebe [165,204] und B) KZT-Zelllinien [82,83,177,178,205]. Die IC_{50}-Werte sind aus folgenden Publikationen entnommen: Quisinostat [213], JIB-04 [219], Chaetocin [221], MZ-1 [319], LP99 [222], PRT4165 [320] und GSK343 [225]. Modifiziert nach Müller *et al.* [212].

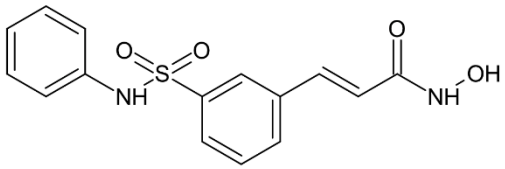


Anhang 13: Strukturformel verschiedener HDACi im Vergleich
Dargestellt sind Vorinostat, Belinostat, Panobinostat, Quisinostat und Romidepsin.

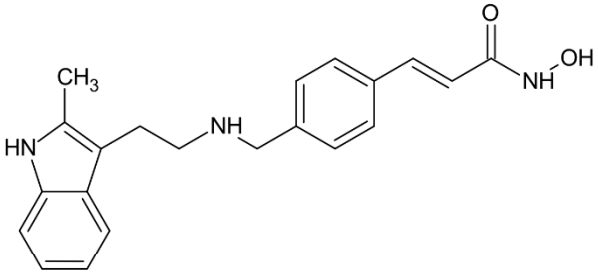
Vorinostat



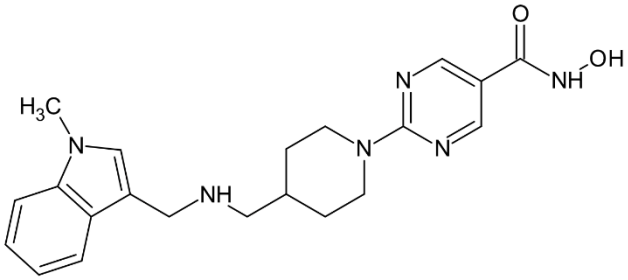
Belinostat



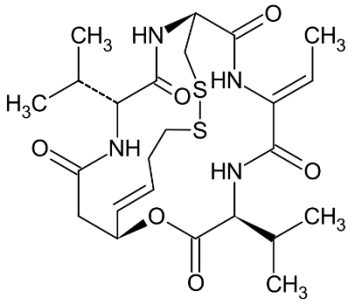
Panobinostat



Quisinostat



Romidepsin



Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Thomas Kurz für die Übernahme der Begutachtung meiner Arbeit bedanken, sowie für die Bereitstellung der HDACi LAK31, KSK64 und MPK409 an unser Labor (ein zusätzlicher Dank auch an Dr. Leandro Alves-Avelar).

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Daniel Nettersheim. Vielen Dank für die Überlassung des sehr interessanten und anwendungsbezogenen Themas, sowie der Möglichkeit meine Doktorarbeit im Urologischen Forschungslabor an der HHU an Düsseldorf durchzuführen. Ein großes Dankeschön auch für die engagierte Förderung und Forderung in allen wissenschaftlichen Belangen in den letzten Jahren. Ich bin durch deine Unterstützung wissenschaftlich und persönlich auf jeden Fall gewachsen und zu der Naturwissenschaftlerin geworden, die ich heute bin.

Ein großer Dank geht ebenfalls and die Brigitte und Dr. Konstanze Wegener-Stiftung, ohne deren finanzielle Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Des Weiteren möchte ich mich bei der opnMe Initiative von Boehringer Ingelheim für die kostenlos zur Verfügung gestellten Epi-Drugs bedanken.

Ein besonderer Dank geht an die gute Seele unseres Labors: Liebe Maggi, vielen, vielen Dank für all die Unterstützung in den letzten Jahren. Bei jedem Wehwehchen und Problemchen warst du stets mit Rat und Tat zur Stelle. Ich wüsste nicht, wie ich all die XTT Wochenenden ohne dich logistisch überhaupt hätte meistern können. Auch vielen Dank für deine Zeit und Geduld beim Korrekturlesen meiner Publikationen.

Liebe Anna, auch dir ein riesengroßes Dankeschön für deine liebevolle Pflege unserer Zellen. Niemand macht das mit so viel Feingefühl wie du. Auch möchte ich keinen unserer Spaziergänge zum Südpark und keine unserer Bahnfahrten zum Hauptbahnhof missen. Du hast diese 30 Minuten auf jeden Fall sehr viel erträglicher gemacht. Vor allem wenn die Bahn mal wieder nicht kam.

Lieber Aaron, an dich einfach ein großes Dankeschön, dass du da warst. Ich wüsste nicht wer meine Zeit im Labor und Büro angenehmer gestalten hätte können als du und der mit mir über diesen ganzen Wahnsinn immer lachen konnte. Dank unseres ähnlichen Dissertationsthemas waren wir quasi „partners in crime“. Das Sprichwort „geteiltes Leid ist halbes Leid“ haben wir dann auch gleich noch weiter ausgedehnt und gleich alles geteilt denn: „Ach. Mein. Dein. … Das sind doch alles bürgerliche Kategorien.“ Ich gebe den Staffelstab jetzt an dich weiter. Du machst das schon. Go Team Melron!

Liebe Alexa, als unser Epi-Drugs-Küken in unserer Epi-Drug-Familie hast du angefangen. Du hast zwar dann die Seiten gewechselt, aber einmal Team Epi-Drugs immer Team Epi-Drugs. Besten Dank auch für deine Unterstützung mit den UC-, RCC- und PCa-Zelllinien. Ohne dich,

unsere Meme-Queen, würden auf jeden Fall die Highlights im Labor nicht so präsent im Gedächtnis bleiben. Merke dir: du bist großartig und hast schon viel mehr geschafft als du vielleicht denkst.

Liebe Mara, was wäre unser Labor doch viel langweiliger ohne dich. Vielen Dank für unsere qPCR-Pipettier-Singing-Sessions und fürs einfach mal kurz den Dampf ablassen, indem man die komischsten Geräusche macht oder durchs Labor tanzt. Ich gebe zu du hast das öfter gemacht als ich, aber mir hat das mindestens so viel gebracht wie dir. Als eher ruhigen Typ hat mich deine umwerfende Persönlichkeit anfangs vielleicht etwas überrumpelt, aber jetzt möchte ich dich auf jeden Fall nicht mehr missen müssen. Mara, du bist einfach die beste.

Vielen Dank auch an die anderen Hodis, die meine Zeit in Düsseldorf innerhalb und außerhalb des Labors bereichert haben: Marieke, Maike, Elvira, Anna, Kathi, Lukas, Alissa, Gillian, Gamal, David, Christian, Katja. Ihr alle seid mehr als nur Kollegen geworden.

Ich möchte mich auch bei der Blasen-AG für ihre Unterstützung bedanken. Allen voran Priv.-Doz. Michèle Hoffmann, Prof. Wolfgang Schulz, Sarah und Christiane, die bei offenen Fragen stets gute Ansprechpartner waren. Ein weiterer Dank an Alex für seinen Input bei Antikörperfragen und an Amp für den Austausch über kulinarische Köstlichkeiten des asiatischen Raums.

Besonders möchte ich mich hier bei Merve bedanken, die meine Anfangszeit im Labor sehr bereichert hat und mit der es auf jeden Fall immer was zu lachen gab sei es in der Mittagspause oder beim Karnevalskostüme anprobieren. Vielen Dank für dein offenes Ohr und deine mentale Unterstützung.

Vielen Dank auch an meine Bayreuther Kommilitonen, allen voran Franzi und Julia. Auch wenn wir weit verstreut sind, ist es immer wieder schön euch wenigstens online mal zu Gesicht zu bekommen. Vielen Dank für den wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Input außerhalb meiner NRW-Bubble. Gerade in den harten Zeiten von Corona wart ihr jedenfalls eine bitter nötige und willkommene Abwechslung von meinem Alltag.

Ein riesengroßes Danke auch an Hiro. Ich wüsste nicht, was ich ohne dich machen würde. Irgendwie bist du ja auch schuld daran, dass ich überhaupt bei meinen Hodis gelandet bin. Denn wärst du nicht nach NRW voraus gegangen, wäre ich nicht hinterhergekommen. Du hast alle Höhen und Tiefen mit mir gemeinsam miterlebt und es war immer schön zu wissen, dass da jemand ist, der gerade in einer ähnlich stressigen Situation steckt und genau versteht, was man gerade durchmacht. Mit dem Ende dieser Dissertation ist dann auch dieses Kapitel in unserem Leben abgeschlossen, dass so viele glückliche Momente beinhaltet, die ich um

keinen Preis der Welt missen möchte. Auf ein neues Abenteuer! Mit dir kann das sowieso nur gut werden <3.

Zum Schluss möchte ich mich natürlich bei meinen Eltern und meiner Familie bedanken, die mich immer bedingungslos unterstützt und angefeuert haben. Es ist schön zu wissen, dass ihr immer für mich da seid und ich, wenn ich sie brauche, immer auf eure Hilfe zählen kann. Ich kann euch gar nicht genug danken, dass ihr mir all das ermöglicht habt.