Die Entwicklung neuer epigenetischer Dual-Inhibitoren zum simultanen Angriff auf Histondeacetylase und Bromodomänen-enthaltende Proteine in Keimzelltumoren und anderen urologischen Malignitäten.

An epigenetic screening and dual-inhibitor development approach to simultaneously target histone deacetylases and bromodomain-containing proteins in testicular germ cell cancer.

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Aaron Burmeister

aus Haan

Düsseldorf, März 2024

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

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

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. Daniel Nettersheim

2. Prof. Dr. Lutz Schmitt

Tag der mündlichen Prüfung: 26.August.2024

A thesis is never late. Nor is it early. It arrives precisely when it means to.

Modifiziert aus “The Lord of the Rings: The fellowship of the Ring”

Veröffentlichungen

Preisträger des MTZ®award 2023 für die Veröffentlichung „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; 21:1674–88. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-22-0207*“ der Forschungsthematik dieser Promotionsarbeit.

Dieser Studie zugehörige Veröffentlichungen

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; 21:1674–88. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-22-0207*

Weitere Veröffentlichungen

Müller MR, Burmeister A, Skowron MA, Stephan A, 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. doi: 10.1186/s13148-021-01223-1.

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. 2021 Jul 22. doi: 10.1002/1878-0261.13066.*

Publizierte Übersichtsartikel

Müller MR, Burmeister A, Skowron MA, Nettersheim D.

> Epigenetische Inhibitoren als Behandlungsoption für (Cisplatin-resistente) Keimzelltumoren. *UroForum, Mai 22*

Liste publizierter Konferenzbeiträge

13th Symposium ‚Urologische Forschung' of the German Society for Urology (AUF), 17-19th November 2022, Erlangen, Germany

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 HDAC-BET-dual inhibitors as therapeutic options for germ cell tumors and other urological malignancies. Urologie 2023. 62 (Suppl 1):4–20. https://doi.org/10.1007/s00120-023-02044-17

4th Annual Congress German Society for Urology (DGU), 21st-24th September 2022, Hamburg, Germany

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. Urologie 2022. 61 (Suppl 3):S129–S265. https://doi.org/10.1007/s00120-022-01918-07

4th Annual Congress German Society for Urology (DGU), 21st-24th September 2022, Hamburg, Germany

Burmeister A, Müller MR, Söhngen C, Skowron MA, Petzsch P, Köhrer K, Alves-Avelar L, 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. Urologie 2022. 61 (Suppl 3):S129–S265. https://doi.org/10.1007/s00120-022-01918-0

37th Annual EAU Congress, 01-04th July 2022, Amsterdam, The Netherlands, Video presentation

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. *European Urology. 81 (Suppl 1): S825-S826. https://doi.org/10.1016/S0302-2838(22)00632-7*

67. Kongress der Nordrhein-Westfälischen Gesellschaft für Urologie (NRWGU), 07-08th April, 2022, Münster, Germany, Oral presentation by A. Burmeister.

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. *German Medical Science GMS Publishing House; 2022. doi: 10.3205/22nrwgu48*

67. Kongress der Nordrhein-Westfälischen Gesellschaft für Urologie (NRWGU), 07-08th April, 2022, Münster, Germany, Poster presentation.

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. *German Medical Science GMS Publishing House; 2022. doi: 10.3205/22nrwgu84*

12th Symposium ‚Urologische Forschung' of the German Society for Urology (AUF), 25-27th November 2021, Berlin, Germany; Oral presentation

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. *Der Urologe 2022. 61 (Suppl 1):S4–S18. doi.org/ 10.1007/ s00120- 022- 01762-2*

73th Annual Congress German Society for Urology (DGU), 15th – 18th September 2021, Stuttgart, Germany; Oral presentation by A. Burmeister

Burmeister A, Stephan A, Skowron MA, Petzsch P, Köhrer K, Alves-Avelar LA, Kurz T, Albers P, Nettersheim D.

Entwicklung neuer HDAC-BET-Dualinhibitoren als epigenetische Therapieoption für urogenitale Tumoren. *Der Urologe 2021.60 (Suppl 1):S6–S114. doi.org/10.1007/s00120-021-01626-1*

13th Symposium ‚Urologische Forschung' of the German Society for Urology (AUF), 17-19th November 2022, Erlangen, Germany; Oral presentation

Burmeister A, Stephan A, Müller MR, Petzsch P, Köhrer K, Alves-Avelar LA, 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

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

_____

Aaron Burmeister

Inhaltsverzeichnis

Veröffentlichungen III

Dieser Studie zugehörige Veröffentlichungen III

Weitere Veröffentlichungen III

Publizierte Übersichtsartikel III

Liste publizierter Konferenzbeiträge IV

Eidesstattliche Erklärung VII

Inhaltsverzeichnis VIII

Zusammenfassung XI

Abstract XIII

1. Einleitung 1

1.1. Entstehung von Keimzelltumoren – Entartung der Keimzelle 1

1.2. Risikofaktoren für die Entstehung von Keimzelltumoren 3

1.3. Klassifizierungen der Keimzelltumoren 4

1.4. Demografisches Auftreten von Keimzelltumoren 5

1.5. Stadieneinteilungen der Keimzelltumoren nach TNM 8

1.6. IGCCCG-Klassifizierung zur Prognose von GCT-Patienten 10

1.7. Richtlinientherapie der GCT 12

1.8. Erweiterung der untersuchten urologischen Malignitäten 14

1.9. Epigenetik 15

1.10. Historische Entwicklung epigenetischer Inhibitoren 17

1.11. Epigenetischen Inhibitoren in Kombinationstherapien 20

1.12. Epigenetische Dual-Inhibitoren 22

1.13. Epigenetische Inhibition als Therapieoption für Keimzelltumoren 23

1.14. Ziel der Studie 25

2. Material und Methoden 27

2.1. Material 27

2.1.1. Zelllinien 27
2.1.2. Liste der im Western Blot verwendeten Antikörper und ihrer Hersteller. 28
2.1.3. Oligonukleotide 29
2.1.4. Verwendete (neuartige) Epi-Drugs 30
2.1.5. Chemikalien 34
2.1.6. Verbrauchsmaterial 36
2.1.7. Puffer, Assays und Kits 38
2.1.8. Software und Online-Tools 39
2.1.9. Geräte 41
2.2. Methoden 44
2.2.1. Proteinisolation und Western Blot 44
2.2.2. XTT-Zellviabilitätsassay 46
2.2.3. Quantitative *Real-Time*-PCR 46
2.2.4. Sequenzierungsmethoden 48
2.2.5. Enzymassays 49
2.2.6. Zellkultur 49
2.2.7. Zellzahlbestimmung 52
2.2.8. Zellzyklus- und Apoptose-Analysen am Durchflusszytometer 52
2.2.9. Xenotransplantation 53
2.2.10. *In silico*-Analysen 54
3. Ergebnisse 56
3.1. Auswahl vielversprechender Ziele zur Synthese neuartiger epigenetischer Inhibitoren. 56
3.2. Initialscreening der zytotoxischen Effekte neuartiger Inhibitoren 56
3.3. Detaillierte Analysen ausgewählter Inhibitoren 59
3.4. Analyse der Chromatinzugänglichkeit nach HDACi-Behandlung 67
3.5. Analyse des Transkriptoms nach HDACi-Behandlung 73
3.6. Korrelation der Hochdurchsatzdaten 78

3.7. Neuartige HDAC-BET-Dual-Inhibitoren 80
3.8. Dual-Inhibitor-Applikation nach Xenotransplantation 94
4. Diskussion 96
4.1. Wirksamkeit neuartiger Epi-Drugs in urologischen Malignitäten 96
4.2. Neuartige HDAC-BET-Dual-Inhibitoren in urologischen Malignitäten 104
4.3. Ausblick 111
Literaturverzeichnis 112
Abbildungsverzeichnis 133
Tabellenverzeichnis 135
Abkürzungsverzeichnis 136
Anhang 139
Danksagung XV

Zusammenfassung

Keimzelltumoren (GCT; aus dem Englischen für „germ cell tumors“) können unterteilt werden in Seminome (SE) und Nicht-Seminome (NSE). NSE sind schwerer zu therapieren und sind weiter unterteilt in Embryonalkarzinome (EC; aus dem Englischen für „embryonal cacrinoma“), Dottersacktumoren (YST, aus dem Englischen „yolk sac tumors“), Chorionkarzinome (CC, aus dem Englischen „*choriocarcinoma*“)), und Teratome (TE). GCT stellen die am häufigsten auftretende Malignität von jungen Männern im Alter zwischen 15 und 40 Jahren dar. Die Standardtherapie umfasst meist eine Orchiektomie, gefolgt von einer Radio- oder Chemotherapie und weist eine hohe Heilungsrate von über 90 % auf. Die Chemotherapie weist auch Nachteile auf. Es kann zur Entwicklung von Resistenzmechanismen des GCT oder einer Bildung von therapieinduzierten Sekundärtumoren kommen. Da für diese Patienten keine wirksame Therapie vorliegt, sind alternative Therapieoptionen dringend erforderlich. Die Entstehung von GCT ist bis heute nicht gänzlich erforscht, sie weisen eine geringe Mutationslast auf, deshalb wird davon ausgegangen, dass eine Störung der Epigenetik die Bildung von GCT begünstigt. Unter Epigenetik versteht man den Mechanismus der Genregulation, der auf Änderungen von Histon- und DNA-Anhängen basiert. Mit epigenetischen Inhibitoren kann man in die Regulation dieses übergeordneten Mechanismus eingreifen. Die Verwendung von epigenetischen Inhibitoren gilt als vielversprechende potenzielle Therapieoption für GCT. Neben der aussichtsreichen Anwendung in GCT, konnte die Wirksamkeit auch in einigen anderen urologischen Malignitäten (Harnblasenkarzinomen (BCa), Prostatakarzinom (PCa) und Nierenkarzinom (RCC)) gezeigt werden.

In dieser Studie wurde die Wirksamkeit von 35 neuartigen HDAC- und BET-Inhibitoren in GCT-, BCa-, PCa- und RCC-Zelllinien analysiert und die wirksamsten Mono-Inhibitoren wurden in HDAC-BET-Dual-Inhibitoren fusioniert. Die charakterisierten Mono- und Dual-Inhibitoren induzierten Apoptose und Zellzyklusarrest in Zelllinien der urologischen Malignitäten. Über die Korrelation von ATAC- und RNA-Sequenzierungsdaten konnte gezeigt werden, dass HDAC- und Dual-Inhibitor-Behandlung auf molekularer Ebene einen starken Anstieg der Genexpression und eine lokusspezifische Chromatinöffnung auslöst. Unter den heraufregulierten Genen befanden sich Cluster die mit zellulärem Transport, zellulärer Organisation und neuronalen Prozessen assoziiert sind. Eine Analyse der Chromatinzugänglichkeit zeigte auf globaler Ebene eine ausgeglichene Verteilung von sich öffnenden und sich schließenden Regionen, was das bisherige Verständnis der Funktionsweise von HDAC-Inhibitoren hinterfragt. Anstelle einer globalen Chromatinöffnung zeigten lokusspezifische Änderungen einen starken Effekt auf die globale Genexpressionen.

Der potenteste HDAC-BET-Dual-Inhibitor konnte nach Xenotransplantation das Tumorwachstum eines EC und seines Cis-Platin-resistenten Klons unterbinden.

Zusammenfassend stellen die neuartigen epigenetischen Inhibitoren (HDAC-, BET, Mono- und Dual-Inhibitoren) eine vielversprechende Therapieoption für GCT und andere urologische Malignitäten dar. Im Laufe der Analysen konnte ein neuer Aspekt der grundlegenden HDAC-Inhibitor Wirkweise entdeckt werden.

Abstract

Germ cell tumors (GCT) are divided in seminoma (SE) and non-seminoma (NSE). NSE possess a bigger risk for the patient, they are subdivided into embryonal carcinoma, yolk sac tumors, choriocarcinoma and teratoma. GCT are the most frequent malignancies of young men (age between 15 and 40 years). The regular treatment has a very high cure rate above 90 % it involves orchiectomy followed up by radio- or chemotherapy. Nevertheless, treatment with Cis-Platin poses risks for the patient. The young patients struggle with late term toxicity, which can result in therapy induced secondary tumors. Also, some tumors develop resistance towards Cis-Platin, which leads to poor prognosis for the patients. Therefore, novel therapy alternatives are of need. To this day the origin of GCT is not fully understood. GCT display a low mutational burden, while featuring an instable epigenetic landscape. This deregulated epigenetics led to unregulated transcription of various genes is suggested to be the most probable reason for the development of a GCT. A promising therapy alternative for GCT are the epigenetic inhibitors, which can interfere with the epigenetic landscape and alternate chromatin accessibility and gene expression. Besides the scope of therapy options for GCT, epigenetic inhibitors have shown promising results in other urologic malignancies, such as bladder cancer (BCa), prostate cancer (PCa) and renal cell cancer (RCC), which will also be investigated in this work.

In this study the effects of 35 novel HDAC- and BET-inhibitors were analysed in GCT-, BCa-, PCa- and RCC-cell lines and the most potent mono-inhibitors were fused into HDAC-BET-dual-inhibitors. The characterized mono- and dual-inhibitors induced apoptosis and cell cycle arrest in the observed cell lines of urological malignancies. Correlation of ATAC- and RNA-sequencing revealed that HDAC-inhibitors and HDAC-BET-dual-inhibitors induce a locus specific chromatin opening, which is coupled to a strong increase in gene expression. The upregulated gene clusters were associated with intra- and extracellular trafficking, cellular organization, and neuronal processes. Analysis of chromatin accessibility showed a balanced distribution of opened and closed regions, which questions the current understanding of the mode of action of HDAC-inhibitors. These loci specific chromatin openings resulted in a global increase of gene expression in all observed tumor entities. After xenotransplantation the novel HDAC-BET-dual-inhibitor was able to reduce tumor burden of EC and its Cis-Platin resistant clone.

To recap, the novel epigenetic inhibitors (HDAC-, BET-mono and dual-inhibitors) provide a promising therapy option for GCT and other urological malignancies. During the characterization of novel inhibitors, new findings provided crucial information about HDAC-

inhibitors, which induce locus-specific instead of global increased chromatin accessibility, which postulates a new hypothesis of the mode of action of HDAC-inhibition.

1. Einleitung

Diese Arbeit befasst sich mit der Charakterisierung und Analyse neuartiger epigenetischer Inhibitoren zur Behandlung von Keimzelltumoren und anderen urologischen Malignitäten. Um ein besseres Verständnis für die Relevanz von möglichen Therapieoptionen zur Behandlung von Keimzelltumoren zu entwickeln, ist es essenziell die Entstehung von Keimzelltumoren zu beleuchten.

1.1. Entstehung von Keimzelltumoren – Entartung der Keimzelle

Bis heute ist nicht bekannt, wie Keimzelltumoren (GCT, aus dem Englischen für „*germ cell tumors*“) entstehen. Es wird jedoch angenommen, dass es bereits bei der Bildung der ursprünglichen Keimzelle (PGC, aus dem Englischen für *„primordial germ cell“*) zu einer Entartung kommt, die zur Entwicklung des GCT führt (1,2). Um diese Entartung besser nachvollziehen zu können, ist es wichtig die Entwicklung der Keimzellen zu verstehen.

Keimzellen sind die Vorgängerzellen der Gameten. Sie stellen einen unabdingbaren Schlüsselpunkt der geschlechtlichen Fortpflanzung dar. Dieser essenzielle Zelltyp hat seinen Ursprung sehr früh in der embryonalen Entwicklung (3). Beim Menschen bildet sich die Vorläuferzelle der Keimzellen zwei bis drei Wochen nach der Befruchtung aus. Hier entsteht die PGC im Epiblasten (4,5). Im Laufe der Embryogenese migriert die PGC von ihrer ursprünglichen posterioren Position im Epiblasten hin zu den Gonaden in den Genitalleisten, wo sie bei der Frau zu Oogonien (weiblich) oder beim Mann zu Spermatogonien (männlich) differenziert. Diese beiden Zelltypen sind wiederum Vorläuferzellen der Eizellen, bzw. der Spermien (6,7).

Unterschiedliche Signalwege spielen eine Rolle bei der PGC-Entwicklung. So wurden die Signalwege von *BMP*, *NODAL* und *WNT* als wesentliche Treiber für die Spezifizierung der PGC identifiziert (8,9). Die Initiation und Leitung der Migration hin zur Genitalleiste wird über eine Kombination aus Nervenfasern und eines Chemogradienten von CXCL12 und KITLG gesteuert (4,10). In zweiter Linie initiieren Faktoren wie *DAZL*, *KIT*, *NANOG*, *OCT4*, *PRMD1*, *SOX17*, *TFAP2* und *TNAP* eine Entwicklung zur Pluripotenz und hemmen simultan die somatische Zelllinienentwicklung (11–16). Die genannten Faktoren in Kombination mit der Migration führen zu einer Reprogrammierung der Epigenetik der PGC. Durch diesen Effekt erlangt die PGC Totipotenz und ist in der Lage alle drei Keimblätter und extraembryonales Gewebe auszubilden (17). Nachdem diese Reprogrammierung abgeschlossen ist, erfolgt eine Re-Methylierung der DNA. In diesem Prozess werden die epigenetischen Eigenschaften der

Eltern auf das Kind übertragen (18). Es wird das parentale *imprint* (aus dem Englischen übersetzt: Einprägen) der Epigenetik etabliert und die Bildung der Gonozyte erfolgt (4). Die Gonozyte ist bei der Frau die Vorläuferzelle der Oogonien, bzw. beim Mann die Vorläuferzelle der Spermatogonien (19).

Die Erforschung der zugrundeliegenden Ursachen für die Entstehung von GCT wird durch zwei Faktoren erschwert. Es wird aber davon ausgegangen, dass der überwiegende Anteil von GCT ihren Ursprung in epigenetischen Deregulationen haben (20). Zum einen stellen GCT eine seltene Erkrankung dar, die geringen Fallzahlen erschweren die Suche nach gemeinsamen Ursachen von GCT (21). Als zweite erschwerende Bedingung für die Erforschung von GCT ist die nicht zuverlässige Reproduktion von der Bildung eines menschlichen GCT zu nennen. Es fehlt ein für den Menschen aussagekräftiger Versuchsorganismus. Bislang ist kein Tiermodell etabliert worden, dass den menschlichen Fall zuverlässig abbildet. Dies liegt vor allem daran, dass sich die Embryonalentwicklung von Mäusen, die normalerweise einen sehr gut übertragbaren Modellorganismus für die Erforschung menschlicher Erkrankungen darstellen, von der Entwicklung des Menschen unterscheidet. So nimmt bei der Maus *SOX2* die Rolle des Transkriptionsfaktors für Pluripotenz ein, wohingegen *SOX17* den menschlichen Pluripotenzfaktor in der Embryogenese darstellt (22–24). Die DNA-Bindemotive des murinen SOX2 und menschlichen SOX17 überlappen in einigen Aspekten, beispielsweise können beide Transkriptionsfaktoren einen Komplex mit OCT4 ausbilden. Die Zielgene von SOX2 und SOX17 sind jedoch nicht identisch. So können beide Pluripotenzgene wie *NANOG, OTX2, PIM1/2, PRDM14, DPPA4, TDGF1, LIN28A* und *TRIM71* regulieren, wohingegen SOX2 allein eine Auswirkung auf Schlüsselgene embryonaler Stammzellen (*GDF3, LEFTY2, SALL4, TP53, SOX2* und *OCT4*) ausübt. Die fehlende *SOX2*-Expression in PGC ist ein Indiz dafür, dass PGC nicht pluripotent sind (24). Da jedoch erhöhte Expressionen von Pluripotenzgenen (*NANOG*, *OCT4*) beobachtet werden, sind PGC als latent pluripotent definiert (25). PGC sind zwar nicht in der Lage in alle drei Keimblätter zu differenzieren, weisen jedoch aufgrund der Genexpression eine unterdrückte Pluripotenz auf. Diese Annahme beruht darauf, dass GCT, die aus der PGC entstehen, je nach Subtyp, Pluripotenz aufweisen. Embryonalkarzinome (EC, aus dem Englischen „*embryonal carcinoma*“) zeigen eine starke Expression von *SOX2* auf und sind pluripotent, wohingegen Seminome (SE) *SOX17* exprimieren und nicht pluripotent sind (26). Sowohl EC als auch SE entstehen aus der PGC. Es konnte gezeigt werden, dass SE-Tumorzellen (TCam-2) nach Xenotransplantation in die Mausflanke eine Reprogrammierung zu EC-Zellen durchlaufen. Das murine Mikromilieu induziert durch Unterdrückung des *BMP*-Signalweges die Expression von *SOX2*, während simultan die *SOX17*-Expression herunterreguliert wird (27,28). In einem Kontrollexperiment wurde ein SOX2-*knockout* in

TCam-2 mittels CRISPR-CAS9 etabliert und in die Maus eingebracht. Es fand keine Reprogrammierung der Tumorzellen statt (26). Diese Versuchsreihe konnte darlegen, dass das Mikromilieu während der embryonalen Migration der PGC einen starken Einfluss auf die Entstehung von GCT unterschiedlicher Entitäten hat (27,29).

Da das Tiermodell Maus keine exakte Abbildung der Entstehung von GCT im Menschen darbietet, muss an *knockout*-Mäusen geforscht werden. Anhand unterschiedlicher *knockout*-Versuchsreihen konnte belegt werden, dass *PRDM1* essenziell für die Repression der somatischen Zellentwicklung in PGC ist. In der Maus rekrutiert *PRDM14* den Pluripotenzfaktor *SOX2* und ist somit an der Regulation der Pluripotenz beteiligt. Es gelang einzelne Schlüsselfaktoren der PGC-Entwicklung zu identifizieren, die bei der Entartung einer PGC in einen GCT eine Rolle spielen könnten (30,31). Dennoch gibt es bis heute keine zuverlässige Aussage über die genaue Entstehung eines GCT. Auch in zukünftigen Analysen werden vor allem zelllinienbasierte und epidemiologische Studien die Ausgangslage zur Erforschung der Entstehung eines GCT bieten.

1.2. Risikofaktoren für die Entstehung von Keimzelltumoren

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, ist die Ursache für die Entstehung von GCT nicht gänzlich geklärt, dies erschwert auch die Forschung nach möglichen Risikofaktoren, die zur Entstehung eines GCT beitragen können (21). Der Versuch, eine Hypothese für das gemeinschaftliche Auftreten unterschiedlicher Erkrankungen des männlichen Reproduktionstraktes zu formulieren, stellt das „testikuläre Dysgenesie-Syndrom“ dar. Die Theorie beschreibt ein Zusammenspiel gemeinsamer Risikofaktoren für die Manifestation diverser Erkrankungen des Reproduktionstraktes. Da sich Infertilität, die Fehlbildung der Genitalien und weitere Erkrankungen gemeinsame Risikofaktoren teilen, wird in dieser Theorie davon ausgegangen, dass sie zu der Ausbildung eines GCT beitragen können (32). Epidemiologische Analysen bestätigen diese Theorie nur sehr bedingt, da es keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen dem Auftreten des „testikulären Dysgenesie-Syndroms“ und einer GCT-Erkrankung gibt (33).

Es gibt jedoch epidemiologische Statistiken, die etwaige Risikofaktoren klassifizieren. Diese Studien geben die Erkrankungswahrscheinlichkeit als „relatives Risiko“ an. Dieses vergleicht die Wahrscheinlichkeit der Erkrankung zwischen einem dem spezifischen Risikofaktor exponierten und einem nicht-exponierten Individuum (34). Als größter Risikofaktor für die Ausbildung eines GCT ist eine vorhergehender GCT auf der anderen Seite des Hodens charakterisiert. Das relative Risiko für einen Zweittumor im anderen Hoden liegt bei 25 % (35,36). Es konnte bewiesen werden, dass die familiäre Prädisposition einen Risikofaktor

darstellt. Eine Fallstudie ermittelte ein um 2 % erhöhtes relatives Risiko bei einer GCT-Diagnose des Vaters, diese Wahrscheinlichkeit steigt bei einer Erkrankung des Bruders noch weiter an (4 % relatives Risiko) (37). Forschende konnten Mutationen einzelner Basenpaare in Schlüsselgenen wie *BAK1, KITLG, PDE11A* und *SPRY4* detektieren, die wahrscheinlich autosomal rezessiv vererbt werden. Erblich weitergegebene Änderungen dieser Schlüsselgene könnten GCT-Bildung begünstigen (38). Außerdem konnte eine Verbindung zwischen dem Vorkommen eines Kryptorchismus (Hodenhochstand) und der Ausbildung eines GCT nachgewiesen werden. Diese Korrelation stellt mit einem relativen Risiko von 2,9 % einen der prominentesten Risikofaktoren dar (39). Studien stellten die Hypothese auf, dass eine möglichst frühe Korrektur der Lageanomalie des Hodens (idealerweise im ersten Lebensjahr) die Wahrscheinlichkeit einer GCT-Ausbildung senken kann (40). Ein oft diskutierter Aspekt ist die mögliche Korrelation einer Kalkeinlagerung im Hoden (*Mikrolithiasis testis*) und einer GCT-Erkrankung. Eine Studie ermittelte ein erhöhtes relatives Risiko eines GCT in Kombination mit einer Kalkeinlagerung (41). Da die Kalkeinlagerung allein keine Malignität darstellt, ist es jedoch schwer zu ermitteln, ob diese Einlagerung eine GCT-Bildung begünstigt, oder ob umgekehrt die GCT-Erkrankung zu einer Kalkeinlagerung führt (42). Eine weitere groß angelegte Analyse einer neu erkrankten MLT-Patientenkohorte (über 400 Patienten) konnte über einen Zeitraum von zwei Jahren keine Korrelation zur GCT-Bildung feststellen (43). Es ist also fraglich, ob eine Kalkeinlagerung eine Kausalität für einen GCT darstellt, oder man lediglich von einer Korrelation der beiden Krankheitsbilder ausgehen kann. Als weiterer Risikofaktor für die Bildung eines GCT ist das Klinefelter-Syndrom zu nennen. Das selten auftretende Syndrom (1 aus 600 Männern) beschreibt das Vorhandensein eines zusätzlichen X-Chromosoms. Studien korrelierten das Auftreten des Klinefelter-Syndrom in jungen Patienten mit einem erhöhten Risiko für die Bildung von GCT (44,45).

Der jetzige Forschungsstand zeigt einige beschrieben Faktoren auf, die zum erhöhten Risiko für die Ausbildung eines GCT beitragen. Den „einen“ Risikofaktor, wie es ihn bei anderen Tumorentitäten gibt (beispielsweise das Rauchen beim Lungenkrebs), zur Ausbildung eines GCT gibt es jedoch nicht (46). Ähnlich zu der Forschungslage zur Entstehung eines GCT, gibt es noch einige ungeklärte Fragen. Auch hier muss in Zukunft intensive Forschung betrieben werden, um weitere Risikofaktoren zu identifizieren.

1.3. Klassifizierungen der Keimzelltumoren

Wie in Kapitel 1.1 beschrieben haben GCT ihren Ursprung in der Entartung einer Keimzelle. Der solide Primärtumor befindet sich beim erwachsenen Patienten deshalb beim Mann in den Hoden, bzw. bei der Frau in den Eierstöcken. Da sich diese Studie auf die Erkrankung des

Mannes spezialisiert, wird im Folgenden die Tumorklassifizierung bei Männern erläutert. Es gibt zwei anerkannte Klassifizierungen der GCT. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO, ausdem Englischen „*World Health Organization*“) kategorisiert GCT danach, ob sie aus einer nicht invasiven Vorläuferläsion, der Keimzellneoplasie-in-situ (GCNIS, aus dem Englischen „*germ cell neoplasia in situ*“), hervorgehen oder nicht. Typ-I- (präpubertär) und Typ-III-GCT (Spermatozytentumoren) entstehen nach WHO-Einteilung nicht aus einer GCNIS, wohingegen Typ-II-GCT ihren Ursprung in der GCNIS haben (47). Bei den Typ-II-GCT wird weiter unterschieden in Seminome, welche ca. 55 bis 60 % der Fälle ausmachen, und Nicht-Seminome (NSE), die die verbleibenden 40 bis 45 % repräsentieren (48,49).

Die detaillierte Klassifizierung von Oosterhuis et al. umfasst insgesamt sieben unterschiedliche GCT-Subtypen (50). Bildet sich der GCT bereits im frühen Kindesalter (unter 6 Jahren) aus, so ist die Malignität häufig extragonadal auf der Körpermitte oder im zentralen Nervensystem lokalisiert. Dieser präpubertäre Typ wird als unreifes Teratom (TE) / Dottersacktumor (YST, aus dem Englischen „*yolk-sac-tumor*“) bezeichnet und stellt den Typ-I der GCT nach Oosterhuis et al. dar. GCT des Typ-II können mit Eintritt in die Pubertät bis zum ca. vierzigsten Lebensjahr auftreten. Typ-II GCT werden in Nicht-Seminome und Seminome unterteilt. Eine weitere Unterteilung der NSE charakterisiert EC, Chorionkarzinome (CC, aus dem Englischen „*choriocarcinoma*“), YST und TE. Die den embryonalen Stammzellen ähnlichen, pluripotenten EC können in CC, YST und TE ausdifferenzieren. Hierbei setzen sich CC und YST aus extraembryonalem Gewebe zusammen, wohingegen TE aus Gewebe mehrerer Keimblätter (Meso-, Endo-, Ektoderm) bestehen. Den Typ-III der GCT, stellen die spermatozytischen Tumoren dar, die vor allem bei älteren Männern (über 50 Jahre alt) auftreten. Typ-IV und Typ-V sind ausschließlich Erkrankungen der Frau. Seltene Subtypen des GCT sind Typ-0 (induziert durch einen parasitären Zwilling) und Typ-VI (Tumoren vergleichbar zum Typ-I und -II in Patienten über 60 Jahren) (50,51).

Diese Studie befasst sich mit den Typ-II-GCT, die NSE, SE und einer Mischung von NSE und SE beinhalten. Die Relevanz der Forschung an Typ-II-GCT wird im folgenden Abschnitt aufgezeigt.

1.4. Demografisches Auftreten von Keimzelltumoren

GCT stellen die häufigste Tumorart des jungen Mannes (zwischen 14 und 44 Jahren) dar (48). Dies ist besonders auffällig, da Hodentumoren (90 % der Hodentumoren sind GCT) nur ca. 1,5 % (ca. 75.000 jährliche Fälle weltweit) aller ermittelten Krebserkrankungen ausmachen (52,53). Der GCT nimmt eine Sonderstellung der Tumorentitäten ein, da er fast ausschließlich junge Männer betrifft (siehe Abbildung 1 A, B, C und D) (53,54). Betrachtet man die

Inzidenzzahlen aller Krebsentitäten für Männer aller Altersstufen, so machen die Hodentumoren einen sehr geringen Anteil aus. Der Großteil der neuen Erkrankungen teilt sich auf andere Krebsentitäten (wie zum Beispiel: Lungenkrebs, Hautkrebs und Prostatakrebs) auf (siehe Abbildung 1 A, B).

Analysiert man jedoch die Altersgruppe der jungen Männer hinsichtlich der Entwicklung von Hodentumoren, so zeigt sich, dass diese im Jahr 2020 mit weltweit über 39.000 Neuerkrankungen, die am häufigsten diagnostizierte Tumorentität bei Männern im Alter zwischen 15 und 39 Jahren ausmacht (siehe Abbildung 1 C) (55). Regional betrachtet war 2020 Hodenkrebs in 71 Ländern die am häufigsten diagnostizierte Krebsentität von jungen Männern (siehe Abbildung 1 D). Auffällig ist, dass Männer aus Ländern der ersten Welt im Vergleich zu Einwohnern weniger entwickelter Länder, vermehrt an Hodenkrebs erkranken. So zeigt die Grafik auf, dass die höchsten Hodenkrebs-Inzidenzen in Europa und (Nord-)Amerika dokumentiert sind. Afrikanische Männer erkranken signifikant seltener an Hodenkrebs als Europäer oder Nordamerikaner. Auch innerhalb Europas gibt es regionale Unterschiede. Betrachtet man die Veränderungen der Häufigkeit des Auftretens von Hodentumoren ab 1990 bis 2014, so ist innerhalb dieser 25 Jahre weltweit ein deutlicher Anstieg der Inzidenzrate zu beobachten. Erneut ist zu erkennen, dass Länder der ersten Welt (z.B. Frankreich, Deutschland und Schweden) eine deutlich höhere Inzidenzrate aufweisen als ärmere Länder (z.B. Uganda und Indien). Allerdings gibt es auch Unterschiede in Fallzahlen innerhalb der ersten Welt. Das Auftreten von Hodenkrebs ist in den südlichen Ländern Europas (Frankreich) und in Nordamerika (USA und Kanada) nur ca. halb so häufig, wie in Regionen Nordeuropas (zum Beispiel Norwegen). Die Inzidenz in diesen besonders betroffenen Ländern liegt bei über zehn Erkrankungen pro 100.000 Männern. Es wird vermutet, dass sowohl genetische Faktoren als auch exogene Umweltfaktoren (bspw. ein erhöhter Kontakt mit chemischen Substanzen) eine Erklärung für diese unterschiedliche Inzidenz-Verteilung sein können (siehe Abbildung 1 E).

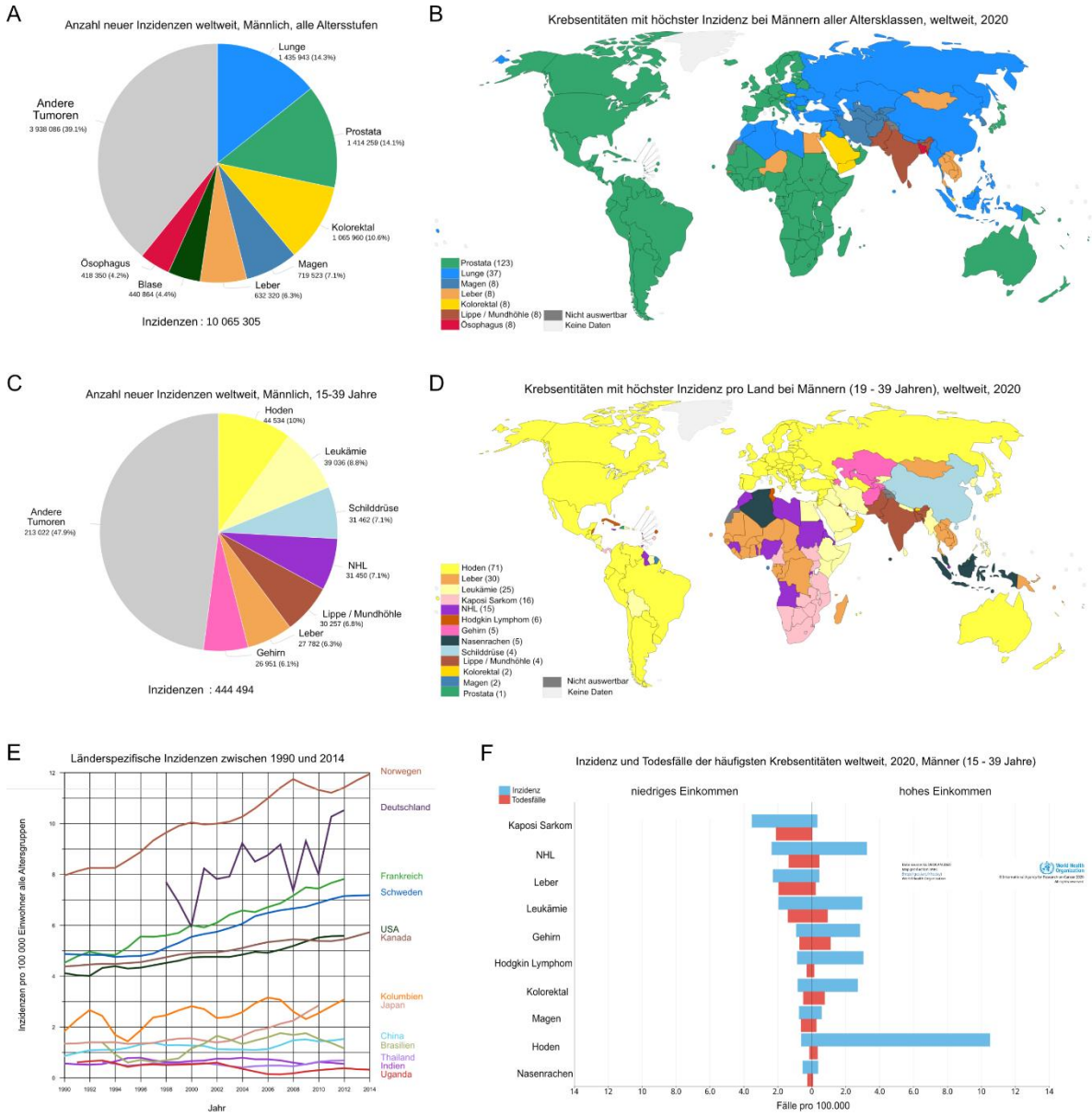


Abbildung 1: Demographische Verteilung der Hodenkrebsinzidenz.

A) Anzahl neuer Fälle von Männern aller Altersklassen, aufgeteilt in die häufigsten Krebsentitäten aus dem Jahr 2020. Die am häufigsten diagnostizierten Tumoren sind Lungen-, Prostata- und Kolorektal-Karzinome. Der Hodenkrebs macht ca. 1,5 % der Inzidenzen aus. B) Demographische Darstellung der häufigsten Krebsentität jedes Landes aus dem Jahr 2020 bei Männern aller Altersklassen. Prostatakrebs ist die häufigste Malignität Amerikas, Afrikas, Australiens und Europas, wohingegen Lungenkrebs die häufigste Malignität in Großteilen Asiens darstellt.
C) Zahl der Neuerkrankungen von Männern zwischen 19 und 35 Jahren, aufgeteilt in die häufigsten Krebsentitäten aus dem Jahr 2020. Hodenkrebs ist die häufigste Tumorentität des jungen Mannes mit ca. 10 % aller neu diagnostizierten Fälle, gefolgt von Lungenkrebs und Schilddrüsenkrebs. (NHL: Non-Hodgkin-Lymphom). D) Demographische Darstellung der häufigsten Krebsentität jedes Landes aus dem Jahr 2020 bei Männern im Alter zwischen 19 und 35 Jahren. Hodenkrebs ist in 71 Ländern der häufigste Krebs in dieser Altersgruppe. Vor allem betroffen sind Amerika, Australien und Europa. In weniger wohlhabenden Regionen wie Afrika, wird eine geringere Inzidenz dokumentiert. E) Länderspezifische Inzidenzentwicklung zwischen 1990 und 2014. Dargestellt sind Inzidenzentwicklung von Ländern, die beispielhaft für ihre umliegenden Regionen stehen. Die Inzidenzen aller beobachteter Länder der ersten Welt steigen mit der Zeit an. Die höchste Inzidenzrate wird in Norwegen gemessen (zwölf Fälle auf 100.000 Einwohner), wohingegen Uganda die niedrigsten Inzidenzen aufweist (< einem Fall auf 100.000 Einwohner). Die Daten für die Abbildung wurden der Datenbank CI5*plus* (aus dem

Englischen „*cancer incidence in 5 Continents*“) entnommen. F) Darstellung der Inzidenzrate und Todesrate ausgewählter Tumorentitäten aufgeteilt in arme Regionen (links) und wohlhabenden Regionen (rechts) aus dem Jahr 2020 bei Männern im Alter zwischen 15 und 39 Jahren. Hodenkrebs weist die höchste Inzidenz in wohlhabenden Regionen auf (zehn Fälle pro 100.000 Männern), wohingegen ärmere Regionen eine deutlich geringere Inzidenz verzeichnen (< ein Fall pro 100.000 Männern). Insgesamt führt Hodenkrebs nur selten zum Tod (< 0,5 Todesfälle bei 100.000 Männern). Abbildung 1 A, B, C, D und F wurden mittels des *cancer today* Online-tools erstellt (54).

Analysiert man den Koeffizienten der Inzidenzrate in wohlhabenden Ländern (zehn Erkrankungen bei 100.000 Männern) und die Todesfälle (< 0,5 Todesfälle bei 100.000 Männern) von Hodenkrebs aus dem Jahr 2020, so wird deutlich, dass Hodenkrebs nur selten zum Tod führt (siehe Abbildung 1 F). Hier zeigt sich erneut, dass die Häufigkeit von Hodenkrebs in ärmeren Regionen signifikant geringer ist (< 1 bei 100.000 Männern, linker Bereich in Abbildung 1 F), als in der ersten Welt (rechter Bereich in Abbildung 1 F) (54).

Überlebensraten einer Hodenkrebserkrankung liegen dank früher Erkennung und Behandlung der Malignität bei über 95 % (56,57). Dennoch gibt es einen deutlichen Unterschied zwischen hoch entwickelten Ländern und weniger entwickelten Regionen. Die Mortalitätsrate in Westeuropa liegt bei unter 0,4, in Osteuropa und Russland ist sie mehr als doppelt so hoch (Mortalitätsrate > 1) (58). Die Unterschiede lassen sich auf eine höhere Sensibilisierung der Bevölkerung in hoch entwickelten Industrieländern zurückführen. Diese führen zu einer früheren Erkennung der Hodentumoren, was eine schnellstmögliche Einleitung der geeigneten Therapie ermöglicht. Außerdem haben Patienten Zugang zu einer fachgerechten und schnellen Versorgung in spezialisierten Stützpunkten, diese Infrastruktur ist in ärmeren Regionen deutlich seltener gegeben (55,59).

1.5. Stadieneinteilungen der Keimzelltumoren nach TNM

Das TNM-System (Tumor, Nodus, Metastasen-System) teilt GCT in verschiedene Stadien ein (60). Das System wurde von der internationalen Vereinigung gegen Krebs (UICC, aus dem Französischem: „*union internationale contre le cancer*“) etabliert, um bei der Determination der richtigen Behandlungsmethoden und Sicherung einer Prognose zu unterstützen. Um eine aussagekräftige Einordnung vornehmen zu können, werden nach der Diagnose eines GCT, neben pathologischen Gutachten des betroffenen Hodens und der umliegenden Lymphknoten auch Blutserummarker analysiert. Die Aufteilung berücksichtigt Kriterien wie die Ausdehnung des Primärtumors, ob Lymphknoten (aus dem lateinischen: „*Nodus lymphoideus*“) betroffen sind und ob sich Metastasen ausgebildet haben (siehe Tabelle 1) (47,61).

Tabelle 1: Stadieneinteilung der GCT nach TNM

Charakterisierung Serumtumormarker: „leicht erhöht“: unter den Grenzwerten, „erhöht“: innerhalb der Grenzwerte, „stark erhöht“: oberhalb der Grenzwerte. Grenzwerte: hβCG (humanes β-Choriongonadotropin): 5000 - 50000 [IU/L], AFP (Alpha-Fetoprotein): 1000 - 10000 [ng/mL] und LDH (Laktatdehydrogenase) 1.5 - 10 x N. N entspricht der oberen Grenze des Normwertes für LDH.

Stadium		Charakterisierung	
0 (GCNIS)			
I	A	Tumor begrenzt auf Hoden	Kein Lymphknotenbefall oder Metastasen. Serumtumormarker unauffällig
	B	Tumor invasiv in umliegendes Gewebe	
	C	Tumor mit/ohne Invasion in umliegendes Gewebe	Kein Lymphknotenbefall oder Metastasen. Mindestens ein Serumtumormarker leicht erhöht
II	A	Lymphknotenkonglomerat < 2 cm	Tumor mit/ohne Invasion in umliegendes Gewebe, keine Metastasen, Serumtumormarker unauffällig
	B	Lymphknotenkonglomerat 2 - 5 cm	
	C	Lymphknotenkonglomerat > 5 cm	
III	A	Mit/ohne Lymphknotenkonglomerat, Metastasen in entfernen Lymphknoten oder Lunge, Serumtumormarker nicht/ leicht erhöht	Tumor mit/ ohne Invasion in umliegendes Gewebe
	B	Lymphknotenkonglomerat vorhanden, keine Metastasen, mindestens ein Serumtumormarker erhöht	
		Mit/ohne Lymphknotenkonglomerat, Metastasen in entfernen Lymphknoten oder Lunge, mindestens ein Serumtumormarker erhöht	
	C	Lymphknotenkonglomerat vorhanden, keine Metastasen, mindestens ein Serumtumormarker stark erhöht	Tumor mit/ ohne Invasion in umliegendes Gewebe

		Metastasen in entfernen Lymphknoten oder Lunge, mindestens ein Serumtumormarker stark erhöht	Tumor mit/ohne Invasion in umliegendes Gewebe, mit/ ohne Lymphknotenkonglomerat
		Andere Metastasen, Serumtumormarker nicht/ leicht erhöht	

1.6. IGCCCG-Klassifizierung zur Prognose von GCT-Patienten

Die IGCCCG (aus dem Englischen „*international germ cell cancer cooperative group*") ist eine internationale Gemeinschaft von GCT-Forschenden, die eine Klassifizierung der Prognose unterschiedlicher GCT-Stadien vornimmt. Hierbei werden unter anderem Überlebenschancen und Auftreten eines Rezidives berücksichtigt. Für diese Einteilung ist es notwendig vor jeglicher Behandlungsform die Serumtumormarker zu bestimmen (62).

Tabelle 2: GCT-Prognosen Klassifizierung nach IGCCCG.
Keimzelltumoren werden unterteilt in Fälle mit guter, intermediärer und schlechter Prognose.

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

Insgesamt weisen nur 16 % der GCT-Fälle eine schlechte Prognose für die Lebenserwartung auf (siehe Tabelle 2). Betrachtet man die Patienten mit metastasierenden Primärtumoren, so entwickelt jeder Dritte ein Rezidiv. Rezidive werden analog zu einem metastasierenden Primärtumor kategorisiert.

1.7. Richtlinientherapie der GCT

Nach der diagnostizierten Erkennung an einem GCT werden eine Reihe von Standardtherapien angewandt. Eine regelmäßige Überwachung des Tumors ist hierbei als Erstes zu nennen. In den meisten Fällen kommt es zu einer Entnahme des erkrankten Hodens und naher Lymphknoten. Als Nachfolgetherapie können Chemotherapien, Strahlentherapie und eine BEP-Kombinationstherapie (Gabe von **B**leomycin, **E**toposid und **C**is-Platin) angewandt werden (60). Hierbei induziert Bleomycin DNA-Doppelstrangbrüche durch Anhäufung von reaktiven Sauerstoffspezies (63,64). Etoposid und Cis-Platin wirken beide als Zytostatika. Etoposid inhibiert die Topoisomerase-II und führt zur Hemmung der Transkription, wohingegen Cis-Platin eine zufällige Quervernetzung von DNA-Strängen auslöst, die zu einer Störung der Replikation führen (65,66). In der Standardtherapie umfasst ein BEP-Zyklus 22 Tage. An Tag eins - fünf werden täglich 75 - 100 mg/m² Etoposid und 20 mg/m² Cis-Platin verabreicht. An Tag eins, acht und 15 werden jeweils 30 mg/m² Bleomycin hinzugefügt. In einigen Fällen kann eine Kontraindikation für Bleomycin vorliegen. Bei diesen Diagnosen, kann entweder das Bleomycin gänzlich ausgelassen werden, oder durch Ifosfamid ersetzt werden (PEI-Therapie, **C**is-Platin, **E**toposid und **I**fosfamid). Bei der PEI-Therapie wird die Bleomycin-Gabe an Tag eins, acht und 15 durch 1200 mg/m² Ifosfamid substituiert (60).

Betrachtet man die unterschiedlichen Typen von GCT genauer, so eröffnen sich differenzierte Behandlungsmethoden. Die Standardtherapie von NSE im Stadium I umfasst die operative Entnahme des betroffenen Hodens, gefolgt von einer Einteilung in Patienten mit hohem Risiko oder niedrigem Risiko. Diese Einteilung basiert auf einer pathologischen Analyse des Tumors, die den prozentualen Anteil an EC im Tumor und die Zellteilungsrate bestimmt. Die Gruppe mit niedrigem Risiko wird regelmäßig überwacht, wohingegen bei den Hoch-Risikofällen direkt ein BEP-Zyklus begonnen werden kann (67,68). Für Patienten mit erhöhtem Risiko kann auch eine retroperitoneale Lymphknotenektomie (RLA) durchgeführt werden. Dieser komplizierte Eingriff sollte nur in darauf spezialisierten Zentren vorgenommen werden (69,70). Die Behandlung der Patienten mit einem SE hängt von der Kategorisierung des SE ab. 70 - 80 % der diagnostizierten SE befinden sich im Stadium I. Die Standardtherapie sieht eine Entnahme des betroffenen Hodens vor, gefolgt von regelmäßiger Kontrolle mit speziellem Augenmerk auf die Gefahr der Rezidiv-Bildung. Ab einer Größe von mehr als vier cm kommt es statistisch häufiger zur Metastasenbildung, sodass eine Chemotherapie oder Strahlentherapie als Folgetherapie angewandt werden kann. Bei kleineren SE wird eine stetige Überwachung bevorzugt, die ein schnelles Reagieren auf Metastasen-Bildung ermöglicht (60,71,72).

Tumoren mit SE-Entitäten, die Stadium IIA oder IIB zugeordnet werden, können je nach Fall mit drei Zyklen BEP oder mit Strahlentherapie (zwischen 30 und 36 Grey) behandelt werden

(60,73). NSE im Stadium IIA oder IIB werden mit drei bis vier Zyklen BEP therapiert. Die Zyklen Anzahl hängt hierbei von der IGCCCG-Klassifizierung der Tumoren ab (gute Prognose: drei Zyklen, intermediäre Prognose: vier Zyklen) (siehe Tabelle 2). Falls ein Residualtumor entsteht, wird dieser entnommen (60,70,74). Unabhängig von SE oder NSE, werden Tumoren im Stadium IIC und III meist mit drei bis vier Zyklen BEP-Therapie behandelt (60,75,76).

Diese Standardtherapien haben eine hohe Heilungsrate, dennoch kommt es in wenigen Fällen innerhalb der ersten drei Jahre nach Initialtherapie zur Ausbildung eines Rezidivs (Stadium I Tumoren: Rezidiv-Wahrscheinlichkeit von ca. 15 % bei SE und 19 % bei NSE). Eine Behandlung mit einer Chemotherapie verspricht hierbei eine gute Prognose, da die Primärtumoren meist nicht mit Chemostatika behandelt wurden und die Tumoren deshalb keine Resistenzmechanismen ausgebildet haben (60). Ein anderes Bild stellen die metastasierenden Primärtumoren dar. Hier kommt es bei jedem dritten Patienten zur Bildung eines Rezidives. Das weitere Vorgehen schreibt eine hoch dosierte Chemotherapie als „Rettungstherapie“ vor (60,77). Diese kann zu starken Nebenwirkungen führen und ist nur notwendig, wenn die Standardtherapien nicht die gewünschten Effekte zeigten. Falls die „Rettungstherapie“ erforderlich ist, verschlechtert sich die Prognose der Patienten signifikant. So zeigt eine Kombinationsbehandlung mit hochdosiertem Cis-Platin, Ifosfamid und Paclitaxel eine 3-Jahres-Überlebensrate von ca. 60 % (60,78,79). Gründe hierfür können die Entwicklung von Resistenzmechanismen des Tumors während der Initialtherapie sein (80).

Die therapieinduzierte Toxizität ist ein wichtiger Aspekt jeder Tumortherapie. So kann die Chemotherapie zur Bildung von Sekundärtumoren, meist in Nähe des Primärtumors (beim GCT häufig in Blase, Darm, Pankreas oder Magen) führen. Das relative Risiko, innerhalb von zehn Jahren nach der ersten Behandlung eines GCT an einem soliden Sekundärtumor zu erkranken, liegt bei ca. 40 % (81,82). Der Aspekt der therapieinduzierten Sekundärtumoren ist vor allem bei der Behandlung von GCT von hohem Interesse, da GCT-Erkrankungen häufig bei jungen Patienten auftreten, die besonders unter der Entstehung von Sekundärtumoren leiden. Neben dem erhöhten Krebsrisiko kommt es durch die Standardtherapie auch zu anderer Toxizität, vor allem im kardiovaskulären System. So leiden GCT-Patienten direkt nach ihrer Therapie häufiger an Infarkten, thromboembolischen Ereignissen und Bluthochdruck (83). Zu den langfristigen Nebenwirkungen, die über ein Jahr hinweg bestehen bleiben, zählt vor allem die reduzierte Fertilität, die in ca. 30 % der Patienten bis zur Infertilität führt und durch die Entnahme eines Hodens erklärt wird (84). Um dieser entgegenzuwirken werden, falls möglich, vor der Orchiektomie in Absprache mit dem Patienten, Spermien kyrokonserviert (85).

1.8. Erweiterung der untersuchten urologischen Malignitäten

Neben den GCT umfassen urologische Malignitäten unter anderem das Harnblasenkarzinom (BCa, aus dem Englischen für *„bladder cancer“*), das Nierenzellkarzinom (RCC, aus dem Englischen für *„renal cell carcinoma“)* und das Prostatakarzinom (PCa, aus dem Englischen für *„prostate cancer“*). PCa ist die zweithäufigste Krebsart von Männern und die urologische Malignität mit der höchsten Inzidenz. 2018 wurden weltweit 1,3 Millionen Männer mit einem PCa diagnostiziert, 2020 stieg diese Fallzahl auf über 1,4 Millionen an (86,87). In einem niedrigen Stadium weist die Standardtherapie von PCa, die Behandlung mit Chemostatika, eine gute zehn-Jahres Überlebensrate von über 93 % auf (88). Es gibt jedoch Unterarten des PCa, die wesentlich aggressiver und schwerer zu therapieren sind. So sinkt die prognostizierte Überlebensrate nach fünf Jahren für kastrationsresistente PCa deutlich auf 25 % ab (89,90). Mit ca. 570.000 jährlichen Fällen (Männer und Frauen zusammen gerechnet) sind die BCa die zweithäufigste Tumorentität der in dieser Studie untersuchten urologischen Malignitäten (91). Die aggressivste Form der BCa sind die muskelinvasiven Blasenkarzinome. Diese sind schwer zu therapieren und weisen nach einer radikalen Zystektomie eine fünf-Jahres-Überlebensrate von 50 % auf (92). In besonders schweren Fällen kann es zu Metastasenbildung kommen, was die Prognose der Patienten weiter verschlechtert (fünf-Jahres-Überlebensrate ca. 15 %) (93). Die Malignitäten der RCC treten etwas seltener auf (ca. 430.000 neue Fälle im Jahr 2020), sind jedoch schwer zu therapieren (94). Eine besonders schlechte Prognose weist das metastasierende klarzellige Nierenzellkarzinom auf. Bei systemischer Behandlung liegt die fünf-Jahres-Überlebensrate unter 15 % (95).

Die Leitlinientherapie der urologischen Malignitäten sieht häufig eine systemische Behandlung mit Chemotherapeutika vor. Hierbei zeigen sich, wie auch bei den GCT-Standardtherapien, die Risiken der Resistenzbildung und die Ausbildung von Therapie-induzierten Zweittumoren (96,97).

Bei einer Ausweitung der untersuchten Malignitäten im urologischen Bereich wird deutlich, dass die Etablierung einer Therapieoption für spezifische Fälle (Versagen oder Unverträglichkeit der Standardtherapie) dringend notwendig ist. Gelänge es gänzlich auf Chemotherapeutika zu verzichten, so wäre das Risiko für die Ausbildung von Sekundärtumoren aller Patienten stark vermindert. Eine mögliche Therapieoption stellen epigenetische Inhibitoren (Epi-Drugs) dar (98). Sie stellen den Hauptbestandteil dieser Studie dar. Die Grundlagen der Epigenetik und der epigenetischen Inhibitoren werden in den folgenden Abschnitten beleuchtet. Um eine umfassende Charakterisierung neuartiger Epi-Drugs als mögliche Therapieoptionen in urologischen Malignitäten bewerten zu können, wird

in dieser Studie die Wirksamkeit der untersuchten Inhibitoren neben den GCT auch in Tumorzelllinien von BCa, PCa und RCC analysiert.

1.9. Epigenetik

Diese Studie befasst sich vor allem mit der epigenetischen Regulation von Tumorzellen. Im Mittelpunkt stehen hierbei epigenetische Regulatoren, die die epigenetische Landschaft prägen und mittels epigenetischen Inhibitoren beeinflusst werden. Der Begriff der Epigenetik stammt aus dem Griechischen und bedeutet übersetzt „zusätzlich zur Genetik“ („epi“, „ἐπί“ wörtlich übersetzt „Dazu“, „Über“ oder „Außerdem“ und Genetik, „γενεά“ wörtlich übersetzt Abstammung oder Ursprung). Der Begriff der Epigenetik wurde zunächst in den 1940er Jahren von Conrad Hal Waddington geprägt. Er beschrieb die Epigenetik als Verbindung von Entwicklungsprozessen, die zur Übertragung des Genotyps auf den Phänotyp führen (99,100). Die heutige Definition der Epigenetik wurde 1987 von Robin Holliday postuliert. Holliday schrieb dem Begriff der Genetik die Übertragung von Eigenschaften an die nächste Generation zu. Die Epigenetik hingegen definiert, nach Holliday, sowohl Veränderungen der Genaktivität im Laufe der Entwicklung eines Organismus, als auch im adulten Stadium (101,102). Heutzutage beschreibt die Epigenetik die zugrundeliegende Ursache einer veränderten Genexpression, die nicht auf ihre DNA-Sequenz zurückzuführen ist (103,104). Die Epigenetik wird durch ein Zusammenspiel unterschiedlicher, epigenetisch aktiver Enzyme im Gleichgewicht gehalten. Als epigenetisch aktiv bezeichnet man unter anderem Modifikationen von Histonen und DNA, die Dichte der Packung der Histone, die Beeinflussung durch nicht-kodierende microRNAs und die Position von Nukleosomen. Epigenetische Prägung kann sowohl meiotisch als auch mitotisch vererbt werden (103,105).

Zu den epigenetischen Modifikationen gehören kovalente DNA-Methylierungen am 5. Kohlenstoff-Atom der Cytosine, die durch DNA-Methyltransferasen enzymatisch katalysiert werden. Im Allgemeinen gelten methylierte DNA-Regionen, vor allem Promotoren, als inaktiv, wohingegen demethylierte DNA-Bereiche erhöhte Genexpression aufweisen (106,107). Die DNA-Methyltransferasen sind somit Regulatoren der Epigenetik. Neben den Anhängen, die direkt an der DNA angebracht werden, können auch Histone modifiziert werden. Diese kovalenten posttranslationalen Modifikationen (PTM) der Histone sind meist Anhänge an freiliegenden N-terminalen Aminosäuren. Hierzu gehören unter anderem Acetylierungen, Methylierungen (Mono-, Di-, oder Tri-Methylierungen) und Ubiquitinierungen (108,109).

Es werden drei Klassen von epigenetisch aktiven Enzymen unterschieden. Die bereits erwähnten Methyltransferasen gehören zu der Klasse der epigenetischen *writer* (aus dem Englischen wörtlich übersetzt: Schreiber). Enzyme der *writer*-Klasse sind in der Lage

Modifikationen an DNA oder Histonen anzubringen, die einen Einfluss auf die Epigenetik haben (110). Ihre Gegenspieler sind die Enzyme der Klasse *eraser* (aus dem Englischen, wörtlich übersetzt: Radierer oder Löscher). Diese Enzyme spalten angebrachte Modifikationen von DNA oder Histonen ab. Das Gleichgewicht der epigenetisch aktiven Modifikationen wird durch die Regulation von *writer*- und *eraser*-Enzymen eingestellt (111). Die dritte Klasse der epigenetisch aktiven Enzyme sind die *reader* (Engl, wörtlich übersetzt: Leser). Sie erkennen die angebrachten Modifikationen und initiieren daraufhin eine erhöhte oder verminderte Genexpression. Dies findet über die Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren und weiterer Enzyme statt (111,112). Alle drei Übergruppen der epigenetischen Regulatoren beinhalten eine Vielzahl unterschiedlicher Enzymklassen. Die *writer* umfassen neben den Methyltransferasen (auf DNA-Ebene: DNA-Methyltransferasen, auf Histon-Ebene: Histonmethyltransferasen), die Histonacetyltransferasen und Ubiquitin-Ligasen. Enzyme der Klasse *eraser* umfassen unter anderem Histondeacetylasen (HDAC), Histondemethylasen und DNA-Demethylasen (111,113). Die Untergruppe der HDAC-Enzyme ist für diese Studie von besonderer Bedeutung. Die HDAC-Klasse ist in weitere Sub-Klassen unterteilt: Klasse-I-HDAC (HDAC1, 2, 3 und 8), Klasse-IIA-HDAC (HDAC4, 5, 7 und 9), Klasse-IIB-HDAC (HDAC6 und 10), Klasse-III-HDAC (Sirtuine) und Klasse-IV-HDAC (HDAC11) (114,115). Die Klasse der *reader* beinhaltet Enzyme, die unterschiedliche Modifikationen der DNA und Histone erkennen können. So gehören beispielsweise Enzyme dazu, die methylierte DNA oder Histone binden können, Proteine, die Histonacetylierungen binden, und Proteine der BET-Familie (aus dem Englischen *„bromodomain and extra-terminal domain“*), welche acetylierte Lysine von Histonen erkennen und binden können. Auch die Klasse der BET-Familie ist ein Hauptbestandteil dieser Studie. Sie beinhaltet vier Enzyme: BRD2, BRD3, BRD4 und BRDT (aus dem Englischen „BRD *testis-specific protein“*) (111,116).

Das umfassende Netzwerk unterschiedlicher Enzymklassen ermöglicht eine komplexe Regulation der epigenetischen Landschaft. Eine Beeinflussung dieser Landschaft kann weitreichende Folgen für die Genexpression und Entwicklung eines Organismus haben. So konnte gezeigt werden, dass epigenetische Regulatoren eine Rolle bei der Anpassung an sich ändernde Umweltbedingungen spielen und eine gestörte epigenetische Regulation zur Ausbildung von Tumoren und anderer Malignitäten beitragen kann (117–119). Andererseits kann das gezielte Eingreifen in diese Regulatoren der Epigenetik genutzt werden, um Tumoren oder andere Krankheiten zu bekämpfen. Hierfür wurden epigenetische Inhibitoren entwickelt, die als mögliche Therapieoptionen für diverse Tumorentitäten dienen sollen (120,121). Wie in Kapitel 1.1 beschrieben, wird heute davon ausgegangen, dass GCT ihren Ursprung in einer fehlerhaften Regulation der Epigenetik haben können. Deshalb liegt es nahe, dass

Medikamente, die epigenetische Regulatoren angreifen, als mögliche Therapieoption für GCT herangezogen werden (122).

1.10. Historische Entwicklung epigenetischer Inhibitoren

Die Entwicklung epigenetischer Inhibitoren fand in drei Phasen statt. Die erste Phase begann, noch bevor das Feld der epigenetischen Inhibition bekannt war. Diese ersten Vertreter der Epi-Drugs wurden vor allem aufgrund ihrer zytotoxischen Effekte auf Krebszellen entwickelt. Ihre Wirkmechanismen und Auswirkungen auf die Epigenetik waren zunächst unbekannt (123). Mit zunehmendem Wissen wurde bekannt, dass Tumorentwicklung häufig durch eine verstärkte Expression von Onkogenen charakterisiert war. So entstand der Therapieansatz der epigenetischen Therapie, die zunächst die Verstummung dieser Onkogene durch die Gabe epigenetisch aktiver Substanzen zum Ziel hatte (124).

Als erster epigenetischer Inhibitor wurde 1967 5-Azacytidin als Therapieoption in einer Studie zu myeloischer Leukämie eingesetzt. Damals wurde 5-Azacytidin aufgrund seiner zytotoxischen Wirkung eingesetzt, die Auswirkungen auf die Epigenetik waren nicht bekannt (125,126). 5-Azacytidin und Decitabin (ein Analogon von 5-Azacytidin) stellen ein Basenanalogon zu Cytosin dar und werden während der Replikation durch die DNA-Polymerase an Stelle von Cytosin eingebaut (127). 1967 war lediglich bekannt, dass dieser Einbau von 5-Azacytidin einen zytotoxischen Effekt in den Tumorzellen induziert. 1980 gelang es der Forschungsgruppe von P. A. Jones den Effekt von 5-Azacytidin als DNA-Methyltransferase-Inhibitor (DNMTi) offenzulegen und somit den beobachteten zytotoxischen Effekt zu begründen (128,129). Der neu synthetisierte DNA-Strang beinhaltet 5-Azacytidin, welches von der DNA-Methyltransferase nicht erkannt wird und folglich nicht methyliert werden kann. Dies verhindert eine Genregulation des neuen DNA-Strangs und induziert Toxizität (127,130).

Der Ursprung der ersten HDAC-Inhibitoren (HDACi) liegt ebenfalls in ihren zytotoxischen Eigenschaften, nicht in ihrer bis dato unbekannte Funktion als Epi-Drug. So wurde beobachtet, dass Dimethylsulfoxid (DMSO) eine Differenzierung von Leukämiezellen zu weniger aggressiven Zelltypen auslösen kann (131). Als hypothetischer Wirkmechanismus wurde die Ausbildung eines Metallkomplexes postuliert. Um eine solche Komplexbildung zu verstärken und somit eine stärkere Differenzierung der Krebszellen auszulösen, wurde in Anlehnung an DMSO, Hexamethylamin-Bisacetamid (HMBA) synthetisiert. Erste klinische Anwendungen an Leukämie-Patienten zeigte jedoch eine zu geringe Wirksamkeit, weshalb die Substanz optimiert wurde (132,133). 1996 konnte, basierend auf HMBA, eine 100-fach potentere Substanz (SAHA, auch als Vorinostat bezeichnet) entwickelt werden. Zwei Jahre darauf wurde

die Wirkweise von Vorinostat als HDACi erforscht (134,135). Diese Einteilung war möglich, da Vorinostat eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu Trichostatin A aufwies, einer neu entwickelten Substanz, die HDAC-Enzyme beeinflusste. 1998 gelang es HDAC-Enzyme gezielt zu isolieren, was die Aufschlüsselung der Wirkweise von Vorinostat und Trichostatin A ermöglichte (134,136). Die Hydroxamsäure-Gruppe der beiden HDACi komplexiert ein Zinkkation im aktiven Zentrum des HDAC-Enzyms und agiert als kompetitive Hemmer des Enzyms (137). Mit Ausnahme der Sirtuine (Klasse III der HDAC-Enzyme), besitzen alle HDAC-Proteine ein metallisches Kation im aktiven Zentrum (137). Trichostatin A und Vorinostat sind deshalb Inhibitoren aller HDAC-Enzyme (außer Enzyme der Sirtuin-Gruppe), sogenannte pan-HDACi (138). 1994 gelang es den HDACi Romidepsin aus *Chromobacterium violaceum* zu isolieren (139). Romidepsin agiert als spezifischer Inhibitor von HDAC der Klasse I (HDAC1, 2, 3 und 8) (140,141). Dieser HDACi beruht auf einer anderen Wirkweise als Trichostatin A und Vorinostat und unterscheidet sich strukturell deutlich von diesen. So komplexiert Romidepsin in aktivierter Form mittels Disulfidbrücken Cysteinreste im aktiven Zentrum der HDAC-Enzyme und blockiert das aktive Zentrum (142). Diese vier genannten Inhibitoren (5-Azacytidin, Decitabin, Vorinostat und Romidepsin) stellen die erste Phase der Epi-Drugs dar. Sie wurden von der FDA (aus dem Englischen *„Food and Drug Administration“*) im Bereich der Therapie von Leukämie (5-Azacytidin und Decitabin) und als letztmögliche Therapieoption von T-Zell-Lymphomen (Vorinostat und Romidepsin) zugelassen (123). Diese frühen Epi-Drugs waren wegweisend für die weitere Erforschung der epigenetischen Inhibitoren als Krebstherapeutika, doch gleichzeitig zeigten sie auch einige Problematiken als Therapeutika auf. Ihre Bioverfügbarkeit und Halbwertszeit im Organismus waren sehr gering. Dies führte dazu, dass sie nicht bis zum Wirkbereich vordrangen, was eine geringe spezifische Effizienz gegenüber Tumoren begründete. Außerdem verfügten sie über eine geringe Spezifität, welche zu unerwünschten Nebeneffekten auf gesunde Zellen beitrug (123). Um diese Schwachpunkte zu umgehen, wurden die zweite und dritte Generation der Epi-Drugs entwickelt.

Ein Teil der zweiten Phase bildeten weiterentwickelte HDACi, die auf dem Ursprungsinhibitor Vorinostat basieren. Panobinostat und Belinostat wurden ebenfalls von der FDA zu Behandlung von multiplen Myelomen, bzw. T-Zell-Lymphomen freigegeben (143,144). Die beiden neuen HDACi weisen im Vergleich zu Vorinostat eine erhöhte Bioverfügbarkeit und ein verbessertes pharmakologisches Profil auf (123,145). Neben diesen HDACi wurden in der zweiten Welle der Epi-Drugs Inhibitoren entwickelt, die andere epigenetisch aktive Enzyme targetieren. Für diese Studie sind diese Inhibitoren nicht von Relevanz und werden nicht näher beschrieben.

In der dritten Phase der Epi-Drug-Entwicklung wurden zum ersten Mal Inhibitoren entwickelt, die epigenetische *reader* targetieren. Es wurde bekannt, dass Proteine der BET-Familie an

der Regulation von Onkogenen beteiligt sind und diese Regulation, während der Karzinogenese oftmals gestört vorliegt. In einigen Krebsentitäten wird die starke Expression des Onkogens *MYC* über BRD4 reguliert. Beispielsweise ist BRD4 als notwendiger Co-Aktivator in der Bildung von dreifach-negativem Brustkrebs und dem Plattenepithelkarzinom involviert (146–148). Einer dieser Prozesse ist die Bildung eines „*super enhancer complex*“ (ein Komplex, der die Expression einer Zielregion verstärkt) unter der Beteiligung von BRD4, die zur Stimulation der Expression von Onkogenen wie *MYC* führt. So entstand die Hypothese, dass eine Blockade von BRD4 die Expression von Onkogenen unterdrücken könnte und somit ein valides Ziel für Inhibitoren darstellt (149,150). Als kompetitive Hemmer wurden die kleinen Moleküle JQ1 und Birabresib entwickelt. Beide Moleküle inhibieren BRD2/3/4 und im Falle von JQ1 auch BRDT mit einer hohen Affinität, weisen allerdings die niedrigste mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) für BRD4 auf (150–152). Mehrere präklinische Studien zeigten das Potential von JQ1 auf. Behandlungen mit JQ1 konnten die *MYC*-Transkription blockieren, und somit die Tumor Angiogenese unterdrücken (153). Außerdem konnten Studien zeigen, dass die Unterdrückung des Onkogens *MYC* einen negativen Effekt auf die Proliferationsrate von Tumorzellen hat (154,155). Einige Tumorentitäten induzierten einen Zellzyklusarrest nach JQ1-Behandlung in der G1/G0-Phase (156,157). Auch in GCT-Zellen konnte ein G1/G0-Phasen Zellzyklusarrest dokumentiert werden. Dieser ging mit Apoptose-Induktion einher und zeigt deutlich das Potenzial für den Einsatz von BETi als Therapieoption für GCT auf (158). Vergleichbare Effekte von JQ1 wurden in Zelllinien anderer urologischer Malignitäten beobachtet (149,159–161).

Allerdings müssen die pharmakologischen Merkmale von JQ1 noch optimiert werden (unter anderem eine sehr geringe Halbwertszeit im Organismus), um erfolgreiche klinische Studien durchführen zu können. Birabresib weist eine höhere Stabilität im Körper auf als JQ1 und konnte in ersten Phase-I-Studien zur Behandlung von unterschiedlichen Malignitäten (Leukämien und multiplen Myelomen) angewandt werden (162,163). Sowohl JQ1 als auch Birabresib lieferten strukturelle Grundgerüste für die Synthese, der in dieser Studie untersuchten, neuartigen BETi. Im Rahmen dieser Studie wurden insgesamt 33 neuartige Epi-Drugs (20 HDACi und 18 BETi) im Labor von Herrn Prof. Dr. Thomas Kurz (Institut für pharmazeutische und medizinische Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf) synthetisiert und anschließend hinsichtlich ihrer Potenz zur Verringerung der Zellviabilität in GCT-Zelllinien und Zelllinien anderer urologischer Malignitäten untersucht.

1.11. Epigenetischen Inhibitoren in Kombinationstherapien

Aufgrund ihrer potenziell universellen Einsatzmöglichkeiten wird an möglichen Inhibitoren für alle Klassen der epigenetischen Regulatoren geforscht. Hierbei gibt es zwei unterschiedliche Ansätze der Forschung. Einerseits sollen bereits bestehende Inhibitoren in ihren pharmakologischen Profilen optimiert werden, andere Forschungsgruppen versuchen grundsätzlich neue Epi-Drugs zu entwerfen. Für diese Studie wurden Grundstrukturen von bestehenden Epi-Drugs als Grundlage der Synthese neuartiger Epi-Drugs verwendet (HDACi: Entinostat und Vorinostat; BETi: JQ1 und Birabresib). Mit dieser Optimierung sollen Faktoren wie Spezifität, Resorption und die Halbwertszeit verbessert werden. Neben der stetigen Optimierung und Entwicklung neuartiger epigenetisch aktiver Substanzen, erforscht man ebenfalls den Einsatz von Epi-Drugs in Kombinationsbehandlungen. Hierbei können Epi-Drugs mit herkömmlichen Standardtherapien (z.B. Cis-Platin oder Immuntherapien) oder zwei unterschiedliche Epi-Drugs miteinander kombiniert werden.2019 konnte gezeigt werden, dass die Kombination eines HDACi (AR-42) mit Cis-Platin eine verbesserte Wirksamkeit von Cis-Platin in BCa induzierte (164). Weiter Analysen belegten die antitumorale Wirkung der Kombination aus HDACi mit Cis-Platin in BCa-Zelllinien und PCa-Zelllinien (165,166). Eine weitere Studie zeigte, dass der HDAC-I-spezifische Inhibitor Entinostat in Kombination mit einer Immuntherapie (IL-2-Behandlung) das Wachstum von murinen Nierentumorzellen und PCa-Zellen unterbinden kann. Hierbei verbesserte der HDACi die Wirksamkeit der Immuntherapie indem die systemische Toxizität reduziert wurde (167). Rozati *et al.* konnten zeigen, dass der HDACi Romidepsin in Kombination mit der demethylierenden Substanz Azacitidine einen synergistische Apoptose-Induktion in T-Zell Lymphom-Zellen auslöste (168).

Auch BETi wurden für den Kombinationstherapie-Ansatz herangezogen. Die simultane Verwendung von JQ1 (BETi) mit Nanomycin (DNA-Methyltransferase-Hemmer) wies eine synergistische Apoptose-Induktion, gepaart mit einem G2/M-Phase-Zellzyklusarrest in Glioblastomen auf. Diese Synergie ist auf die durch JQ1 induzierte Inhibition des *NRF2*-Signalweges zurückzuführen. Dieser wird bei alleiniger Nanomycin-Behandlung aktiviert und trägt zur Resistenzentwicklung der Tumorzellen gegen die Behandlung bei (169). Ein ähnlicher synergistischer Effekt wurde bei der Kombinationstherapie von JQ1 mit *Polo-like kinase 1*-Inhibitor (*Plk1*-Inhibitor) in kastrationsresistenten RCC entdeckt. Die Inhibition von Plk1 ist mit einer erhöhten *MYC*-Expression in den Tumorzellen assoziiert, welche zu einer Resistenz gegen den Plk1-Inhibitor führt. JQ1 unterbindet das Ansteigen der *MYC*-Expression und verstärkt so die Wirkungen des Plk1-Inhibitors. Diese Befunde konnten in Zelllinien und Xenotransplantationen validiert werden (170).

Eine weitere Kombinationsmöglichkeit von Epi-Drugs ist die gepaarte Anwendung von HDACi und BETi. Diese Zusammenstellung zeigte additive und teilweise synergistische Effekte in der Behandlung unterschiedlicher Krebsentitäten. Heinemann *et al.* dokumentierten die synergistische Induktion von Apoptose in Hautkrebszellen durch die Gabe des HDACi LBH-589 und des BETi I-BET151 (171). Weiterführende Untersuchungen deuteten auf eine verstärkte Effizienz einer Immuntherapie gegen Hautkrebs hin, wenn eine vorherige Behandlung mit einer HDACi und BETi Kombination eingesetzt wurde (172). Zu einer ähnlichen Hypothese kam es bei der Forschung am nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom. Die Behandlung mit kombinierten Epi-Drugs (HDACi und BETi) verstärkte eine T-Zell vermittelte Hemmung des Tumorwachstums (173). Außerdem konnte die synergistische Wirkung des HDACi Vorinostat und des BETi JQ1 gegen Zellen des duktalen Pankreas Adenokarzinoms bewiesen werden. Zellen dieses aggressiven Tumortyps initiierten nach Vorinostat/ JQ1-Behandlung einen p57-induzierten Zelltod. Die Ergebnisse sind von besonderer Tragweite, da das duktale Pankreas Adenokarzinom häufig eine Resistenz gegen Chemotherapie entwickelt und somit der Fortschritt in der Erforschung einer Therapieoption von hoher Bedeutung für Patienten ist (174). Auch in T-Zell Lymphomen konnte die Effizienz der HDACi und BETi Kombinationsbehandlung gezeigt werden. Hierbei wiesen kutane T-Zell Lymphome nach Behandlung einen G1/G0-Phasen Zellzyklusarrest auf, der eine Apoptose-Induktion zur Folge hatte (175). BCa-Zelllinien initiierten nach Romidepsin/ JQ1 Kombinationsbehandlungen einen Caspase-abhängigen Zelltod. Die Kombinationsbehandlung löste außerdem einen Zellzyklusarrest der Tumorzellen aus. Die Ergebnisse der gleichzeitigen Gabe der Epi-Drugs waren von zusätzlicher Relevanz, da JQ1 allein zwar einen Zellzyklusarrest induzierte, aber keine signifikante Apoptose der BCa-Tumorzellen auslöste. Die simultane Behandlung verstärkte die Wirksamkeit der Epi-Drugs und wies signifikante Apoptose-Induktion auf (176). Die genannten Kombinationstherapien sind vielversprechend, allerdings weist die Kombinationstherapie auch einige Nachteile auf. Es kann zu Kreuzreaktionen der Epi-Drugs kommen, die ein verstärktes Nebenwirkungsprofil aufweisen und ungewollte und unbekannte Reaktionen auslösen. Die gleichzeitige Gabe mehrere Epi-Drugs kann beispielsweise zu einer erhöhten Toxizität für gesunde Zellen führen, eine unterschiedliche zeitliche Wirkung oder Löslichkeit induzieren (177,178). Um diese nachteiligen Aspekte zu umgehen, wurde in dieser Studie durch die Synthese von HDAC-BET-Dual-Inhibitoren der Ansatz von Fusionsmolekülen verfolgt (179).

1.12. Epigenetische Dual-Inhibitoren

Der nächste Schritt in der Optimierung von Epi-Drugs sind die Dual-Inhibitoren. Hierbei werden zwei epigenetische Inhibitoren zu einem einzigen Molekül fusioniert. Dieser Ansatz verfolgt das Ziel unterschiedliche Löslichkeiten und verschiedene zeitliche Wirkweisen einzelner Epi-Drugs zu negieren. Außerdem kann dieser multiselektive Ansatz zu verminderter Medikamenten-Resistenz führen und bessere pharmakologische Profile aufweisen (178,180,181). Ein Beispiel für einen effektiven Dual-Inhibitor ist Corin, ein HDAC/ LSD1 Fusionsmolekül. Corin targetiert mit beiden aktiven Inhibitor-Komponenten den CoREST-Komplex (182). Dieser CoREST-Komplex ist assoziiert mit einer unterdrückten Genexpression und wird in einigen Tumortypen rekrutiert, um Tumorsupressorgene zu reprimieren und eine Onkogenese zu begünstigen (183). Im Vergleich zur Kombinationsbehandlung seiner zwei Komponenten, weist Corin eine vergleichbare Inhibition von HDAC auf. Allerdings hält dieser inhibierte Status länger an als bei der Kombinationsbehandlung. Diese zeitlich verbesserte Inhibition wurde auf die simultane LSD1-Inhibition zurückgeführt (182).

Ein weiterer Dual-Inhibitor kombiniert einen HDACi mit einem Inhibitor des *EGFR*-Signalwegs. Die Targetierung des *EGFR*-Signalwegs ist seit langem als mögliches Ziel der Tumortherapie bekannt, da dieser in vielen Krebsentitäten dereguliert vorliegt. EGFR ist ein maßgeblicher Regulator von Zellproliferation, Differenzierung und Migration von Zellen (184,185). Der Dual-Inhibitor CUDC-101 (HDAC / EGFR) unterdrückte das Wachstum der Tumorzellen des anaplastischen Schilddrüsen-Karzinoms, indem ein Zellzyklusarrest induziert wurde, der einen Caspase-abhängigen Zelltod auslöste. Anschließende *in vivo* Experimente zeigten einen Rückgang der Metastasenbildung und des Wachstums der Tumorzellen des duktalen Pankreas-Adenokarzinoms, welches zu einer verbesserten Überlebensrate der Versuchstiere beitrug (186). Ein weiteres Beispiel eines HDAC / EGFR-Dual-Inhibitors ist ein Fusionsmolekül aus dem HDACi Entinostat und dem EGFR-Inhibitor Pazopanib. Dieser Dual-Inhibitor wies, bei tolerierbaren Nebenwirkungen, eine starke antitumorale Wirkung in Xenotransplantationen von Zellen eines kolorektalen Adenokarzinoms in Ratten auf (187). Um Nebenwirkungsprofile der HDAC / EGFR-Dual-Inhibitoren weiter zu minimieren, wird daran geforscht spezifische Inhibitionsprofile zu optimieren und so gezielter in die EGFR- und HDAC-Signalkaskaden einzugreifen (188). Bislang wurden keine groß angelegten Studien zur Potenz der HDAC / EGFR-Dual-Inhibitoren gegen unterschiedliche Krebsentitäten veröffentlicht.

In dieser Studie werden die ersten HDAC-BET-Dual-Inhibitoren synthetisiert und auf ihre Potenz in Zelllinien urologischer Malignitäten untersucht. Ausgangsmoleküle für die Fusion zum Dual-Inhibitor stellen hierbei die zuvor charakterisierten, potentesten neuartigen Mono-Inhibitoren dar (189).

1.13. Epigenetische Inhibition als Therapieoption für Keimzelltumoren

Die GCT stellen eine Sonderform der Krebsentitäten dar. Sie besitzen eine geringe Mutationslast und auch der Ursprung von GCT ist nicht auf eine genetische Aberration zurückzuführen. Stattdessen wird postuliert, dass die GCT ihre Entstehung in einer deregulierten Epigenetik haben könnten. Die übergeordnete Epigenetik kann, wenn sie aus der Balance gerät, dazu führen, dass viele unterschiedliche Gene herauf- oder herunterreguliert werden. Dies kann zu einer erhöhten Transkription von Onkogenen und gleichzeitigen unterdrückten Transkription von Tumorsupressorgenen führen. Diese epigenetische Aktivierung bzw. Stilllegung von Genen kann auch ohne das Vorliegen einer genetischen Ursache die Entstehung eines GCT begünstigen. Auch andere urologische Malignitäten (BCa, RCC und PCa) weisen eine geringe Mutationslast in den epigenetischen Regulatoren auf. Gleichzeitig wurde eine starke Expression von HDAC- und BET-Enzymen beobachtet (siehe Abbildung 2, (190,191)).

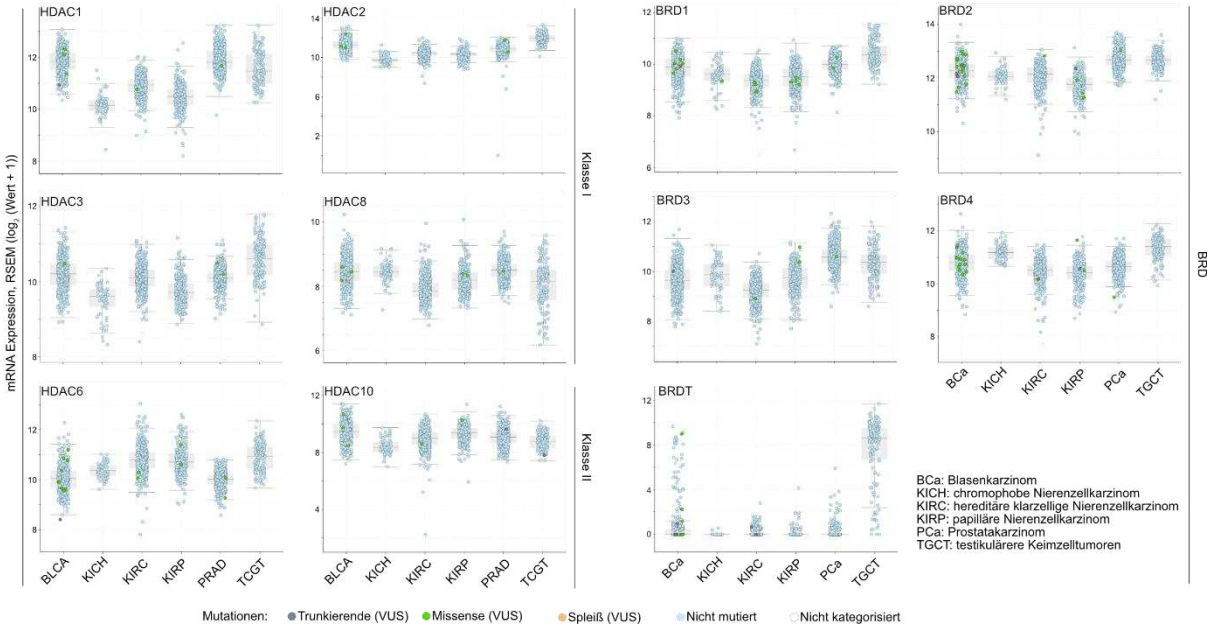


Abbildung 2: Mutationslast von epigenetischen Regulatoren in GCT, BCa, RCC und PCa.

Dargestellt ist die geringe Mutationslast und hohe Expressionslevel von HDAC Klasse I-, II- und BRD-Enzymen in Tumoren urologischer Malignitäten. Die untenstehende Legende definiert die Farbcodierung der illustrierten Mutationen. Zur Identifikation von Zielstrukturen der Inhibitoren wurden im cBioportal die Datenbanken der untersuchten Tumorentitäten analysiert (GCT: *Testicular Germ Cell Tumors* (TCGA), *PanCancer* Atlas; BCa: Blasenkrazinom (*urothelial carcinoma, TCGA, Firehose Legacy);* Prostatakarzinom: PCa (*Prostata adenocarcinoma*, TCGA, *Firehose Legacy*); Nierenzellkarzinom: RCC (*kidney renal clear cell carcinoma*, TCGA, *Firehose Legacy)* (190,191)).

So wie eine deregulierte Epigenetik an der Entstehung von GCT beteiligt sein kann, können epigenetische Inhibitoren dazu verwandt werden GCT zu bekämpfen. GCT und andere

urologische Malignitäten weisen eine starke Expression von HDAC- und BET-Enzymen auf. Vor allem HDAC-Klasse-I und -IIB, sowie BRD2 bieten valide Ziele für epigenetische Inhibitoren.

Nettersheim *et al.* zeigten, dass der HDACi Romidepsin die Zellviabilität von GCT-Zelllinien verschiedener Entitäten bereits in sehr geringen Konzentrationen (LD_{50} in nanomolaren Konzentrationen) reduzieren kann. Die GCT-Zelllinien wiesen 16 Stunden (h) nach Behandlung mit Romidepsin einen Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase auf und induzierten Apoptose. Romidepsin induzierte in GCT-Zelllinien eine Störung der Chromatinlandschaft, welche anhand lokusspezifischer Histonhyper- bzw. -hypoacetylierung nachgewiesen wurde. Schlüsselgene, die von Romidepsin beeinflusst wurden, waren unter anderem *GADD45B*, *FOS*, *ATF3* und *DHRS2*. Es wurde postuliert, dass ein starker Anstieg der Expression von *DHRS2* als allgemeiner Marker für erfolgreiche HDACi in GCT dienen könnte (192). In einer Folgestudien analysierten Jostes *et al.* die zytotoxischen Effekte des BETi JQ1 in unterschiedlichen GCT-Zelllinien (TCam-2, 2102EP, NT2/D1, NCCIT, inklusive deren Cis-Platin-resistenten Klonen) sowie in gesunden Kontrollzelllinien (Fibroblasten und Sertoli-Zellen). Die Behandlung mit JQ1 führte zu einer Apoptose-Induktion und Zellzyklusarrest in der G1/G0-Phase, spezifisch in den GCT-Zelllinien *in vitro*, wohingegen Fibroblasten resistent gegenüber der Behandlung mit JQ1 waren. Dies eröffnet ein therapeutisches Fenster, ein Konzentrationsbereich, indem der Inhibitor effektiv Tumorzellen angreift und gleichzeitig nicht toxisch auf gesunde Körperzellen wirkt. In dieser Arbeit wurden darüber hinaus die synergistischen Effekte der Kombinationstherapie dieser kommerziell erhältlichen HDAC- und BET-Inhibitoren (HDACI: Romidepsin; BETi: JQ1) analysiert. Diese Ergebnisse wurden durch Maustransplantationen von EC-Zelllinien NCCIT und NT2/D1 *in vivo* validiert. Eine Abnahme des Tumorvolumen bei niedrigen Inhibitorkonzentrationen und seltener Applikation bestätigen die Sensitivität von GCT auf Veränderungen der Epigenetik (193). Auch in BCa-Zelllinien konnte ein synergistischer Effekt der Kombination des HDACi Romidepsin und des BETi JQ1 beobachtet werden. Die Kombinationsbehandlung induzierte eine signifikante Apoptose-Induktion in BCa-Zellen (176).

Bislang liegen keine klinischen Studien der Epi-Drugs als Therapieoption der GCT vor. Dies liegt vor allem an einem hohen Nebenwirkungsprofil, welches auf die systemische Wirkung der Epi-Drugs zurückzuführen ist. Neuartige epigenetische Inhibitoren sollten vor allem hinsichtlich ihrer Spezifität und Bioverfügbarkeit optimiert werden. Ausgehend von diesen ungewünschten Nebenwirkungen ist es zwingend notwendig neuartige epigenetisch wirksame Agenzien mit einer verbesserten Verträglichkeit und geringeren Toxizität zu entwickeln.

1.14. Ziel der Studie

Die Notwendigkeit von Therapieoptionen zur Behandlung von GCT erscheint auf den ersten Blick nicht sonderlich hoch. Die Standardtherapie umfasst meist eine Orchiektomie des betroffenen Hodens, gefolgt von einer Cis-Platin-basierten Chemo- oder einer Radiotherapie. Sie weist eine hohe Überlebensrate von ca. 95 % nach zehn Jahren auf. Die Besonderheit der GCT, dass vor allem junge Männer im Alter zwischen 15 und 40 betroffen sind, offenbart allerdings einige deutliche Schwachstellen der Standardtherapie. Die Verabreichung von Chemostatika an Patienten führt oft zu Langzeittoxizität, die das Leben von jungen Patienten nachhaltig negativ beeinflusst und zur Ausbildung von therapieinduzierten Sekundärtumoren führen kann (194,195). Die aktuelle Standardtherapie führt häufig zu reduzierter Fertilität, bis hin zur Infertilität, was unter anderem zu starken psychischen Belastungen für die jungen Patienten mit Familienwunsch führt (85,196). Außerdem können Cis-Platin-resistente Tumoren auftreten, welche eine schlechte Prognose für den Patienten mit sich bringen. Deshalb ist es von hoher Wichtigkeit an Alternativen zur Therapie von GCT zu forschen, die ein geringeres Nebenwirkungsprofil aufweisen und ebenfalls als Behandungsalternative für Cis-Platin-resistente Tumoren angewandt werden könnten. Vorhergehende Studien konnten Epi-Drugs als vielversprechende Kandidaten zur Therapie von GCT identifizieren. In anderen Krebsentitäten konnten bereits erfolgreiche klinische Studien durchgeführt werden, die zur FDA-Zulassungen führten. Dies untermauert das hohe Potenzial der Epi-Drugs. In dieser Studie soll eine Batterie von neuartigen epigenetischen HDAC- und BET-Mono- und Dual-Inhibitoren, hinsichtlich ihres Potenzials als Therapieoption für (Cis-Platin-resistente) GCT eingesetzt zu werden, charakterisiert und analysiert werden. Die Behandlung mit neuartigen epigenetisch aktiven Substanzen kann auch vielversprechende Erkenntnisse für die Therapieoption anderer urologischer Tumorentitäten liefern, welche ebenfalls in dieser Studie erhoben werden.

Um diese Ziele zu erreichen, wurden folgende Fragestellungen entwickelt.

1. Weisen die neuartigen HDACi und BETi einen zytotoxischen Effekt auf Tumorzelllinien unterschiedlicher urologischer Malignitäten (GCT, BCa, PCa und RCC) auf? Falls dies der Fall ist, sind gesunde Zellen weniger sensitiv gegenüber der neuartigen Epi-Drugs?
2. Welche molekularen Effekte induzieren die neuartigen HDACi und BETi?
3. Welche Mono-Inhibitoren eignen sich für die Fusion zu einem multiselektiven HDAC-BET-Dual-Inhibitor?
4. Weisen die HDAC-BET-Dual-Inhibitoren vergleichbare zytotoxische Effekte gegenüber Zelllinien urologischer Tumoren, wie die Mono-Inhibitoren, auf? Welche Einflüsse haben sie auf molekularer Ebene?
5. Führt die Behandlung mit neuartigen HDAC-BET-Dual-Inhibitoren *in vivo* zu einer Reduktion des Tumorwachstums?

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zelllinien

In Tabelle 3 wurden alle in dieser Studie verwendeten Zelllinien, ihre Herkunft, ihre Klassifizierung und genauere Tumorentitäten zusammengestellt.

Tabelle 3: Auflistung aller genutzten menschlichen Zelllinien, ihrer Herkunft, der Klassifizierung und Spezifizierung.

Angaben zum Kulturmedium jeder Zelllinie und von wem sie zur Verfügung gestellt wurden, sind im Anhang 1 beigefügt.

Zelllinie	Herkunft	Klassifizierung	Spezifizierung
1411H	Keimzelltumoren	Nicht-Seminom	Dottersack
2102EP			Embryonalkarzinom
2102EP-R			
786-O	Niere	-	Nierenzelladenokarzinom
ACHN		-	Nierenzelladenokarzinom
Caki-1		-	Metastase eines Adenokarzinoms
DU-145	Prostata	-	Metastasierte Läsion des Zentralnervensystems
GCT-72	Keimzelltumoren	Nicht-Seminom	Dottersack
HaCaT	Haut	Kontrolle	Keratinozyten
HUVEC	Nabelschnurvene		Endothelzellen
JAR	Keimzelltumoren	Nicht-Seminom	Chorionkarzinom
JEG-3			
JEG-3-R			
JURKAT	Peripheres Blut	Kontrolle	T-Lymphozyten
LNCaP	Prostata	-	Lymphknotenkarzinom
MPAF	Haut	Kontrolle	Fibroblasten
NCCIT	Keimzelltumoren	Nicht-Seminom	Embryonalkarzinom

NCCIT-R			
NT2/D1			
NT2/D1-R			
PC-3	Prostata	-	Knochenmarkmetastasen
RT-112	Blase	-	Übergangszellkarzinom
SCaBER		-	Plattenepithelkarzinom
TCam-2	Keimzelltumoren	Seminom	Seminom
TCam-2-R			
THP-1	Peripheres Blut	Kontrolle	Monozyten
HVHF2	Vorhaut		Fibroblasten
VM-CUB-1	Blase	-	Übergangszellkarzinom

2.1.2. Liste der im Western Blot verwendeten Antikörper und ihrer Hersteller.

Tabelle 4 listet alle in dieser Studie für den Western Blot verwendeten Antikörper auf. Angegeben sind Primär- und Sekundärantikörper, ihre Hersteller und zugehörigen Bestellnummern, sowie die eingesetzte Verdünnung.

Tabelle 4: Liste der im Western Blot verwendeten Antikörper und ihrer Hersteller.
Alle eingesetzten Antikörper wurden in 5 %iger Milchsäure-PBS-Lösung inkubiert.

Antikörper	Hersteller	Klon	Bestellnummer	Verdünnung
Primärantikörper				
Monoklonaler Anti-β-Actin	Sigma-Aldrich/MERCK	AC-15	A5441	1:20000
Histone H3Ac-(pan-Acetyl) AK	Active Motif	AB_2687871	39139	1:750
Cleaved PARP	Cell Signaling	D214	9541S	1:500
PARP	Cell Signaling	45D11	9532S	1:1000

Sekundärantikörper				
Donkey-anti-goat IgG-HRP	Santa Cruz		sc-2020/ G3108	1:5000
Rabbit-Anti-Mouse IgG/HRP	Dako, Agilent Technologies		P0260	1:1000
Goat-Anti-Rabbit IgG/HRP	Dako, Agilent Technologies		P0448	1:2000

2.1.3. Oligonukleotide

In Tabelle 5 sind alle in dieser Arbeit genutzten Oligonukleotide, die als Primer der qRT-PCR eingesetzt wurden, aufgelistet.

Tabelle 5: Liste der in der qRT-PCR genutzten Oligonukleotide.
Die Schmelztemperatur der verwandten 5` (*forward)* und 3` (*reverse)* Primer lag bei 60 °C. Die Sequenzgröße der erwarteten Produkte wurde mittels Primer3Plus bestimmt und umfasste für alle untersuchten Gene zwischen 100 und 250 Basenpaaren.

Gen	Forward primer	Reverse primer
GAPDH	TGCCAAATATGATGACATCAAGAA	GGAGTGGGTGTCGCTGTTG
β-Actin	CCATCATGAAGTGTGACGTGG	GTCCGCCTAGAAGCATTTGCG
DHRS2	CTCCATGTAGGGCAGCAACT	GTAGGGAGCACTCTGGGGAC
GADD45B	GTCGGCCAAGTTGATGAAT	CACGATGTTGATGTCGTTGT
DUSP1	GTACATCAAGTCCATCTGAC	GGTTCTTCTAGGAGTAGACA
FOS	GAGAGCTGGTAGTTAGTAGCATGTTGA	AATTCCAATAATGAACCCAATAGATTAGTTA
ATF3	AAGAACGAGAAGCAGCATTTGAT	TTCTGAGCCCGGACAATACAC
ID2	TCAGCCTGCATCACCAGAGA	CTGCAAGGACAGGATGCTGATA
RHOB	GGGACAGAAGTGCTTCACCT	CGACGTCATTCTCATGTGCT
p53	CAGCACATGACGGAGGTTGT	TCATCCAAATACTCCACACGC
p21	TGGAGACTCTCAGGGTCGAAA	GGCGTTTGGAGTGGTAGAAATC
ARID1A	CGCAGCAAGGACATGGGTA	ATGGAGTCTGGCCCTGTTGA
HNF4G	TTGCAGGTTCAGTCGGCAAT	TTTCATTCCCGCTCTAAAACACT
DNM3	TCGAGGGTCGGGCATTGTA	CTTCAATCTCAAGGCGAACTTCA
ATF5	TGGCTCGTAGACTATGGGAAA	ATCAACTCGCTCAGTCATCCA

CAP2	CATCCACAGTATCAGCGTTTTCT	CCCTTTTGTAATTGCTTCTCCCT
EFCAB2	TGATCTGATTGCAGAGGTAGAGG	AGGACATCTTCTGGAATTGGTCT
CDKN1C	GCGGCGATCAAGAAGCTGT	GCTTGGCGAAGAAATCGGAGA
HAND1	AATCCTCTTCTCGACTGGGC	TGAACTCAAGAAGGCGGATG
LIN28	TGTAAGTGGTTCAACGTGCG	TGTAAGTGGTTCAACGTGCG
OCT 3/4	GGGAGATTGATAACTGGTGTGTT	GTGTATATCCCAGGGTGATCCTC
GDF3	CAGGAGGAAGCTTGGGAAAT	TGCTAGGTAAAGGAGCTGGG
DNMT3B	CCTGCTGAATTACTCACGCCCC	GTCTGTGTAGTGCACAGGAAAGC

2.1.4. Verwendete (neuartige) Epi-Drugs

In Tabelle 6 sind alle in dieser Arbeit verwendeten epigenetischen Inhibitoren mit ihrer Spezifität aufgelistet. Aufgeführt sind sowohl herkömmliche als auch neuartige HDACi, BETi und die neu hergestellten Fusionsmoleküle, die HDAC-BET-Dual-Inhibitoren. Das Hauptaugenmerk lag auf der Synthese neuartiger Inhibitoren der HDAC-Klasse I. Deshalb wurden aufbauend auf dem Inhibitor RGFP109 die neuartigen HDACi LAK78, LAK86, LAK88, LAK92, LAK94, LAK96, LAK98 und LAK100 synthetisiert. Außerdem wurde die verwandte Strukturformel Entinostat abgewandelt, um LAK102 und LAK104 zu erhalten. Die Synthese einiger neuartiger HDACi wurden bereits in Veröffentlichungen beschrieben (K79PCHy (197), MPK187 und MPK377 (198), MPK409 (199) und KSK64, LAK31, LAK39, LAK41 und YAK61 (200–202)). Die neuartigen BETi können in zwei unterschiedliche Arten kategorisiert werden. Die ASK-Inhibitoren beruhen auf der strukturellen Grundlage von JQ1, wohingegen die PWK-Inhibitoren ihren Ursprung in I-BET-762 haben.

Die Synthese der HDAC-BET-Dual-Inhibitoren wurde realisiert, indem die Synthesevorstufen der LAK-HDACi mit den freien (+)-JQ1 und I-BET 762 gekoppelt wurden. Insgesamt wurden drei Fusionsmoleküle synthetisiert, zwei (LAK-FFK11 und LAK129), die sich im Linker zwischen der HDAC- und BET-Inhibitorkomponente unterscheiden, basierten auf JQ1, wohingegen LAK-HGK7 auf I-BET 762 basiert ist. Alle hergestellten Substanzen weisen eine Reinheit von mindestens 95 % auf. Alle Epi-Drugs wurden in DMSO gelöst.

Tabelle 6: Auflistung der epigenetischen Inhibitoren (HDACi, BETi und HDAC-BET-Dual-Inhibitoren), ihrer Hersteller und der berechneten Selektivitäten gegen HDAC- bzw. BET-Enzymklassen.

Alle Epi-Drugs wurden in DMSO gelöst.

HDAC- Inhibitoren		
Substanz	**Selektivität**	**Hersteller**
K79PCHy	Klasse I	Synthetisiert und zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Thomas Kurz, Pharmazeutische und medizinische Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
KSK64	Klasse I/Klasse IIB	
LAK31	Klasse I/Klasse IIB	
LAK39	Klasse I/Klasse IIB	
LAK41	Klasse I/Klasse IIB	
LAK78	Klasse I	
LAK86	Klasse I	
LAK88	Klasse I	
LAK92	Klasse I	
LAK94	Klasse I	
LAK96	Klasse I	
LAK98	Klasse I	
LAK100	Klasse I	
LAK102	Klasse I	
LAK104	Klasse I	
MPK187	Klasse I/Klasse IIB	
MPK377	Klasse I/Klasse IIB	
MPK409	Pan-Inhibitor	
YAK61	Klasse IIB	
YAK328	Klasse IIB	
Entinostat	Klasse I/Klasse IV	Selleckchem, Berlin, Deutschland

Quisinostat	Klasse I/Klasse II/Klasse IV	Selleckchem, Berlin, Deutschland
Romidepsin	Klasse I	Selleckchem, Berlin, Deutschland
Vorinostat	Klasse I/Klasse IIB	Selleckchem, Berlin, Deutschland
BET-Inhibitoren		
Substanz	**Selektivität**	**Hersteller**
ASK24	BRD2/3/4/T	Synthetisiert und zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Thomas Kurz, Pharmazeutische und medizinische Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
ASK25		
ASK26		
ASK27		
ASK43		
ASK44		
ASK53		
ASK54		
ASK58		
ASK59		
ASK61		
ASK62		
PWK43	Pan-Inhibitor	
PWK44		
PWK45		
JQ1	BRD2/3/4/T	Selleckchem, Berlin, Deutschland

MZ-1 (PROTAC)	BRD4	opnME, Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Deutschland
HDAC-BET-Dual-Inhibitoren		
Substanz	Hersteller	
LAK129	Synthetisiert und zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Thomas Kurz, Pharmazeutische und medizinische Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf	
LAK-FFK11		
LAK-HGK7		
Substanz	**Selektivität**	Hersteller
Cis-Platin	DNA	Hexal AG, Holzkirchen, Deutschland

2.1.5. Chemikalien

In Tabelle 7 sind die in dieser Studie verwendeten Chemikalien und ihre Hersteller aufgelistet.

Tabelle 7: Liste der in der Arbeit verwendeten Substanzen und deren Hersteller.

Substanz	Hersteller	Sitz
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich/MERCK	Taufkirchen, 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
Corning® Matrigel®	VWR Chemicals	Darmstadt, Deutschland
Demethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich/MERCK	Taufkirchen, Deutschland
EDTA Lösung (pH 8,0; 0,5 M)	PanReac AppliChem/ITW Reagents	Darmstadt, Deutschland
Essigsäure (Eisessig 100 %)	MERCK	Darmstadt, Deutschland
Ethanol (70 %, 96 %, absolut)	VWR Chemicals	Darmstadt, Deutschland
Ethanol absolut	VWR Chemicals	Darmstadt, Deutschland
Iso-Propanol	VWR Chemicals	Darmstadt, Deutschland
Corning® Matrigel	VWR Chemicals	Darmstadt, Deutschland
Methanol	VWR Chemicals	Darmstadt, Deutschland
Methylenblau Certistain	MERCK	Darmstadt, Deutschland
Meyer's hemotxylin	Dako, Agilent Technologies	Santa Clara, USA
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	Qiagen GmbH	Hilden, Deutschland
RNase A	Qiagen 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 (500 mg; 5 µg)	Neofroxx	Einhausen, Deutschland
Z-VAD-FMK	Sigma-Aldrich/MERCK	Taufkirchen, Deutschland

2.1.6. Verbrauchsmaterial

In Tabelle 8 sind alle in dieser Arbeit genutzten Materialien, Zellkultur-Medien sowie deren Zusätze aufgelistet.

Tabelle 8: Liste der in der Arbeit verwendeten Materialien und deren Hersteller.

Material	Firma und Firmensitz
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	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
Zellkulturplatte (6-Well)	Greiner Bio One Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatte (12-Well)	
Zellkulturplatte (96-Well)	
Zellkulturschale 145 mm^2	
Zweiteilige Einmal-Feindosierungsspritze, 1 mL	B. Braun Melsungen, Deutschland

2.1.7. Puffer, Assays und Kits

In Tabelle 9 sind alle in dieser Arbeit genutzten gebrauchsfertigen Puffer, sowie ihre Hersteller aufgelistet.

Tabelle 9: Liste der gebrauchsfertigen Puffer und ihrer Hersteller.

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

Tabelle 10 fasst alle in dieser Studie genutzten Assays und Kits, sowie deren Hersteller zusammen.

Tabelle 10: Auflistung der genutzten Assays und Kits und ihrer Hersteller.

Kit/Assay	Hersteller	Sitz
10x PCR Puffer (mit 15 mM $MgCl_2$)	Qiagen 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	Qiagen 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
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH	Hilden, Deutschland
RT Puffer 5x	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
SuperSignal HRP- Substrate	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland

2.1.8. Software und Online-Tools

In Tabelle 11 sind alle in dieser Studie verwendeten Online-Tools und Softwareprogramme aufgelistet.

Tabelle 11: Auflistung der verwendeten Software, Online-Tools und ihrer Hersteller.

Software/Tool	Hersteller/Website	Sitz/Quelle
ADMET	https://admet.scbdd.com/	(203)
Affinity Designer 1.10.6.1665	Serif (Europe) Ltd.	Nottingham, Vereinigtes Königreich
BioRender	https://biorender.com/	Toronto, Ontario, Kanada
Cancer today	https://gco.iarc.fr/today	WHO
clc genomics wortkbench (Version 12.0.2)	Qiagen	Hilden, Deutschland
CFX Maestro Software	Bio-Rad Laboratories	Feldkirchen, Deutschland
Differential Expression in two groups‘tool (V.1.02)	Qiagen	Hilden, Deutschland
GIMP 2.10.22	https://www.gimp.org/	GNU General Public License
GraphPad Prism V8	GraphPad Software, Inc.	San Diego, Kalifornien, Vereinigte Staaten

MACSQuant Software v 2.13.0	Miltenyi Biotech	Bergisch Gladbach, Deutschland
Microplate Manager 6	Bio-Rad Laboratories	Feldkirchen, Deutschland
Microsoft Word (Version 2019)	Microsoft 365, Microsoft Corporation	Redmond, WA, USA
Microsoft Excel (Version 2019)	Microsoft 365, Microsoft Corporation	Redmond, WA, USA
NanoDrop 2000 V 1.6	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Primer3Plus	https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi	(204)
PrimerBank	https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/	(205)
Ensemble	http://www.ensembl.org/	(206)
UCSC Xena browser	http://xena.ucsc.edu/	(207)
cBioportal	http://www.cbioportal.org/	(190,191)
interactivenn	http://www.interactivenn.net/	(208)
STRING database	https://string-db.org	(209)
DAVID Bioinformatics Resources 6.8	https://david.ncifcrf.gov/	(210)
HOMER algorithm	http://homer.ucsd.edu/homer/motif/	(211)
Shinycircos	http://venyao.xyz/shinycircos/	(212)
PCAGO	http://www.biorxiv.org/content /10.1101/433078v3	(213)
Volcano Plots via Python	http://www.python.org/	(214,215)

2.1.9. Geräte

Tabelle 12 zeigt eine detaillierte Liste aller in dieser Studie genutzten Geräte und deren Hersteller.

Tabelle 12: Liste der in der Arbeit verwendeten Geräte und ihrer Hersteller.

Gerät	Hersteller	Sitz
Agarose-GLAKel-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, Australien
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 Analyzer 10	Miltenyi Biotech	Bergisch Gladbach, Deutschland
Microprocessor pH Meter	WTW	Weilheim, Deutschland
Mikrowelle	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
Multipipette E3	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
MyFuge™ Mini PCR tube Centrifuge	Benchmark Scientific	Hessisch Oldendorf, Deutschland
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
Thermomixer 5436	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge Mini Spin	Eppendorf	Hamburg, 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
Wasserbad	Köttermann GmbH	Uetze, Deutschland
Zentrifuge 5810	Eppendorf	Hamburg, Deutschland

2.2. Methoden

2.2.1. Proteinisolation und Western Blot

2.2.1.1. Proteinisolation

Nach dem Ernten eines 6-Wells (Kavität, aus dem Englischen „well“), wurden die Zellen mit PBS gewaschen, zentrifugiert (99 x g, 5 Minuten (min), bei Raumtemperatur (RT)) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde auf Eis in 40 µL 1 x RIPA-Lysepuffer, versetzt mit einem Protease-Inhibitor (1 *complete* ULTRA Tablette auf 10 mL Puffer), resuspendiert. Nach 30 min Inkubation wurden Zellmembranen und andere nicht lösliche Zellkompartimente pelletiert (12.000 x g, 10 min, 4 °C) und verworfen. Das sich im Überstand befindliche Proteinlysat wurde in ein neues Eppendorf-Tube überführt und bei -20 °C gelagert.

2.2.1.2. Proteinkonzentrationsbestimmung

Das *BCA Protein Assay Kit* wurde für die Konzentrationsbestimmung der Proteinlysate verwendet. Die analysierten Proteinlysate wurden zunächst 1:10 mit Sigma H_2O verdünnt und 10 µL der Proben in Duplikaten in das Well einer 96-Well-Platte gegeben. Um die Proteinkonzentration berechnen zu können wurde für jede Messung eine Eichgerade aus bekannten Albuminkonzentrationen (Duplikate je 10 µL, 0, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 und 2000 µg) erstellt. Pro Well wurden 200 µL einer frisch angesetzten BCA-Lösung (1:50 Lösung aus Reagenz A zu Reagenz B) hinzugegeben. Nach 30 min Inkubation (37 °C) wurde die 96-Well-Platte im *iMark Microplate Reader* bei einer Wellenlänge von 570 nM vermessen. Anhand der Standardreihe wurden die Proteinkonzentrationen der Proben berechnet.

2.2.1.3. Proteinnachweis – SDS-Page und Western Blot

Im ersten Schritt wurden 20 µg Proteine mit Sigma H_2O auf 12,5 µL aufgefüllt, mit 4 µL 4x *Roti-Load* versetzt und für 5 min bei 95 °C aufgekocht. Die denaturierten Proteine wurden ihrer Größe nach mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrlamide gel electrophoresis*) aufgetrennt. Hierzu wurden die Proben und ein Proteingrößen-Standard (100 kDa *Ladder*) auf ein 12 %iges Polyacrylamid-Gel geladen. Das 12 %ige Polyacrylamid-Gel wurde, wie in Tabelle 13 beschrieben, hergestellt. Zunächst wurde das Trenngel gegossen. Nachdem dieses quervernetzt war, wurde das Sammelgel mit den Ladetaschen gegossen (siehe Tabelle 13). Das Gel wurde bei 70 V in einem 1x TRIS / Glycin / SDS-Puffer gestartet, bis die Proben sichtbar in das Sammelgel eingelaufen waren, daraufhin wurde die Spannung auf 99 V erhöht und das Gel laufen gelassen, bis die Lauffront das Ende des Trenngels erreichte (ca. 2 h). Nach erfolgreicher Auftrennung wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran (Polyvinvylidenfluorid) transferiert. Die hydrophobe PVDF-Membran wurde zunächst für 2 min in absolutem Methanol aktiviert, bevor sie kurz in Millipore H_2O und

daraufhin 5 min in Transferpuffer (1x TRIS / Glycin-Puffer; 20 % Methanol) inkubiert wurde. Die Whatman-Blotting-Papiere wurden ebenfalls in Transferpuffer inkubiert. Der Transfer wurde mit der *Semi-Dry* Blotting-Methode über das *Trans-Blot Turbo Transfer System* bei 25 V für 20 min durchgeführt. Zwei Whatman-Papiere bildeten die Basis, hierauf wurde die aktivierte PVDF-Membran gelegt, gefolgt von dem Polyacrylamid-Gel und zwei weiteren Whatman-Papieren. Der Erfolg des Proteintransfers auf die PVDF-Membran wurde mit 0,5 % (w/v) Ponceau S-Lösung 0,5 % (w/v) in 5 % Essigsäure validiert. Nach 5 min Inkubation wurde die Membran mit Millipore H_2O entfärbt und in PBS-T Puffer (PBS versetzt mit 0,1 % (v/v) Tween) gewaschen. Im Anschluss wurde die Membran auf einem Rollschüttler in 5 % (w/v) Milchpulver in PBS-T geblockt (2h, RT). Der Primärantikörper wurde in 5 mL Milchpulver in PBS-T über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag folgten drei PBS-T Waschschritte (je 5 min) der Membran und die Inkubation des Sekundärantikörpers (2h, RT) auf dem Rollschüttler. Erneut wurde 3-mal in PBS-T gewaschen, bevor die Membran mit HRP-Substrat (*horse raddish peroxidase*) für 5 min inkubiert wurde (RT, dunkel), gefolgt von einer Chemilumineszenz-Detektion am *ChemiDoc Imaging System*. Bei der Analyse von Proteinen mit ähnlicher Größe wurden die ersten Antikörper nach der Detektion über „*Stripping*“ entfernt. Hierzu wurde die Membran schüttelnd im Wasserbad mit 5 mL 20 % SDS (w/v), 3,125 mL TRIS pH 8,8, 390 µL β-Mercaptoethanol und 41,5 mL Millipore H_2O für 30 min bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurde einmal mit Millipore H_2O und anschließend drei Mal mit PBS-T gewaschen und erneut mit Blocking-Puffer geblockt (2h, RT, Rollschüttler). Inkubation mit Primär- und Sekundär-Antikörper erfolgten wie zuvor beschrieben.

Tabelle 13: Auflistung der Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel Polyacrylamid Gels.

Reagenz	Sammelgel (4 %)	Trenngel (12 %)
1,5 M TRIS pH 8,8	-	2,50 mL
1 M TRIS pH 6,8	0,63 mL	-
Acrylamid 30 %	0,83 mL	4,00 mL
APS 10 % (w/v)	0,05 mL	0,1 mL
SDS 10 % (w/v)	0,05 mL	0,1 mL
TEMED	0,005 mL	0,005 mL
H_2O (Millipore)	3,40 mL	3,30 mL

2.2.2. XTT-Zellviabilitätsassay

Um die Potenz der neuartigen epigenetischen Inhibitoren zu ermitteln, wurde der XTT-Zellviabilitätsassay verwandt. In diesem Assay wird das gelbliche Tetrazolium-XTT-Salz (2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl-)2H-Tetrazolium-5Carboxanilid) zum orangenen Formazan-XTT-Salz reduziert. Die Reduktion findet nur an der Zelloberfläche von metabolisch aktiven, viablen Zellen statt, somit ist der orangene Farbumschlag proportional zur Zellviabilität. Mittels photometrischer Messungen wird der Farbumschlag analysiert. Um diese Reaktion zu katalysieren, wurde zu der 1 mg/mL XTT in RPMI-Lösung (1,25 mM) im Verhältnis 1:100 PMS (N-Methylphenazoniummethylsulfat) beigefügt. Vor allen vier Messpunkten (24, 48, 72 und 96 h) wurden 4 h im Voraus 50 µL/Well dieser XTT-PMS-Lösung zugegeben.

Für die Analysen wurden 96-Well-Platten mit 50 µL Wachstumsmedium und jeweils 5000, bzw. 3000 Zellen (5000 GCT und Kontrollen, 3000 Zellen für BCa, RCC und PCa) ausplattiert. Am Folgetag wurde eine Behandlung mit den neuartigen Inhibitoren in vier unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt. Um auf die gewünschte finale Konzentration in 100 µL pro Well zu gelangen, wurden 50 µL der doppelten Inhibitorkonzentration eingesetzt. In einem Zeitraum von vier Tagen wurden alle 24 h Zellviabilitätmessungen in Quadrupliakten durchgeführt. Die 96-Well-Platten wurden im *iMark Mircoplate Reader* bei der Messwellenlänge 450 nM und der Referenzwellenlänge 655 nM vermessen. Bei der Auswertung wurden zunächst die Werte der Referenzwellenlänge von der Messwellenlänge subtrahiert und anschließend der Medium-Blank (Medium ohne Zellen mit XTT-Lösung) abgezogen. Im letzten Schritt wurden die ermittelten Daten der ansteigenden Inhibitorkonzentrationen gegen eine Lösemittelkontrolle normalisiert. Die Lösemittelkontrolle bestand hierbei aus Zellen, die der höchsten DMSO-Konzentration der verwandten Epi-Drugs ausgesetzt wurden. Mittels *GraphPad Prism v8* wurde die halb letale Dosis (LD_{50}) der Substanzen ermittelt.

2.2.3. Quantitative *Real-Time*-PCR

2.2.3.1. Qiagen-Kit - Isolation aus der Zellkultur

Zur RNA-Isolation wurde eine 6-Well-Platte verwendet. Für jede Bedingung wurden 1,5 x 10^5 Zellen/ Well ausgesät und am Folgetag mit dem LD_{50} der entsprechenden Epi-Drug und einer dazugehörigen Lösemittelkontrolle behandelt. Nach 16 oder 24 h (je nach Analyse) wurden die adhärenten Zellen mit Trypsin abgelöst und geerntet (siehe 2.2.6). Die RNA wurde nach Herstellerangaben mit dem *RNeasy Mini Kit* von Qiagen isoliert und anschließend bei -20 °C gelagert. Reinheitsbestimmungen und RNA-Konzentrationsmessungen wurden mittels photospektrometrischer Messung am *NanoDrop* (260 / 280; 260 / 230 nm) analysiert.

2.2.3.2. cDNA-Synthese

Um eine vergleichbare Analyse zu ermöglichen, wurden für jede cDNA-Synthese 1000 ng RNA verwandt. Diese wurde mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben (siehe Tabelle 14). Die erhaltene cDNA wurde mit dem Faktor 1:17 (19 µL cDNA zu 304 µL H_2O) mit Sigma H_2O verdünnt und bei 4 °C gelagert.

Tabelle 14: Auflistung eines Reaktionsansatzes und Parameter der cDNA-Synthese.

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

2.2.3.3. Polymerasen-Kettenreaktion

Mittels der qRT-PCR (quantitative *Real-Time* Polymerasen-Kettenreaktion) wurden Expressionsanalysen von Schlüsselgenen nach Inhibitor-Behandlung analysiert. Die, wie in Kapitel 2.2.3.2 beschrieben, synthetisierte cDNA wurde mit ausgewählten Primerpaaren (siehe Tabelle 5) amplifiziert. Die Analyse wurde in Triplikaten mit einem Reaktionsvolumen von je 5 µL in einer 384-Well-Platte am *CFX384 Touch Thermal Cycler* durchgeführt. Die Reaktionsansätze wurden, wie in Tabelle 15 dargestellt, angesetzt. Analysiert wurden die Ergebnisse mit der *CFX Maestro Software* und *Microsoft Excel*. Zunächst wurde der Mittelwert der *Housekeeper* Gene (*β-Actin* und *GAPDH*) vom Cq-Wert der Zielgene subtrahiert, um den ΔCq zu determinieren. Darauffolgend wurde der ΔΔCq ermittelt, indem die mit Inhibitor behandelten Proben gegen die DMSO-Lösemittelkontrolle normalisiert wurden. Aus dem ΔCq Wert wurde die relative Genexpression ermittelt und aus dem ΔΔCq der FC (aus dem

Englischen „*Fold change*“, Vervielfältigung) der Expression im Vergleich zur Kontrolle bestimmt.

Tabelle 15: Reaktionsansatz und Programdetails der cDNA-Synthese.

Reaktionsansatz		**Program *CFX384 Touch Thermal Cycler***		
Reagenz	Volumen	Zeit	Temperatur	Zyklen
cDNA (verdünnt)	8,5 µL	2 min	95 °C	1
Forward Primer (10 µM)	0,5 µL	10 s	95 °C	39
Reverse Primer (10 µM)	0,5 µL	30 s	60 °C	
Luna Universal qPCR Master Mix	7,5 µL	30 s	95 °C	1
		5 s pro Schritt	95 – 65 °C in 0,5 °C Schritten	Schmelzkurve

2.2.4. Sequenzierungsmethoden

2.2.4.1. RNA-Sequenzierung

Für die Hochdurchsatzmethode der RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) wurde 300 ng RNA untersucht. Die Analyse fand im Labor für *Genomics and Transcriptomics* der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf statt. An erster Stelle stand eine Quantifizierung (*Qubit RNA HS Assay;* Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) und eine Qualitätsanalyse (Gel-Elektrophorese; *Fragment Analyzer* und *Total RNA Standard Sensitivity Assay*; Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) der RNA-Proben. Im Anschluss wurde, wie vom Hersteller vorgegeben (*VAHTS Stranded mRNA-Seq Libraray Prep Kit*), eine RNA-Fragment-Bibliothek erstellt, amplifiziert, normalisiert und mit dem *HiSeq 3000 System read setup 1x150 bp* sequenziert (Illumina, Inc., Berlin, Deutschland). Das *bcl2fastq tool* ermöglichte eine Datenausgabe im fastq-Format, sowie *Adapter trimming* und *demultiplexing*. Die bereinigten fastq-Dateien wurden mit *clc genomics wortkbench* (Version 12.0.2; Qiagen, Hilden, Deutschland) analysiert und auf die genomische Sequenz des *Homo sapiens hg38* (May 25, 2017) kartiert. Um p-Werte (unkorrigiert, „False discovery rate“ korrigiert und Bonferroni korrigiert) für weiter Analysen zu erhalten, wurde das Statistikprogram *Differential Expression*

in two groups' tool (V.1.02, Qiagen, Hilden, Deutschland) angewandt. Die Analysen und Rohdaten sind öffentlich zugänglich via GEO (GSE190022).

2.2.4.2. ATAC-Sequenzierung

Eine weiteres Hochdurchsatzverfahren dieser Arbeit ist die ATAC-Seq (*Assay für Transposase-Accessible Chromatin Sequencing)*, die von Active Motif (Active Motif, Carlsbad, USA) durchgeführt wurde. Für die Analyse wurden je Probe 1 x 10^5 Zellen nach 16 h Inhibitor-Behandlung kryokonserviert und versandt. Die Analyse der Daten fand bei Active Motif statt, die daraus resultierenden fastq-Dateien wurden in Absprache mit den Experten von Active Motif analysiert. Die Analysen und Rohdaten sind öffentlich zugänglich via GEO (GSE191184).

2.2.5. Enzymassays

Um die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) der potentesten HDAC-Mono-Inhibitoren und HDAC-BET-Dual-Inhibitoren zu charakterisieren, wurden Enzymassays von der Firma Reaction Biology (Malvern, USA) durchgeführt. Dabei wurden ebenfalls der HDACi TSA und der BETi JQ1 als Referenzkontrollen vermessen. Dies ermöglicht eine Einordnung der Affinität der neuartigen Epi-Drugs im direkten Vergleich zu anderen HDACi und BETi.

2.2.6. Zellkultur

2.2.6.1. GCT-Zelllinien

Alle verwandten GCT-Zelllinien (siehe Tabelle 3) weisen adhärentes Wachstum in T75-Zellkulturflaschen auf. Zwei Mal in der Woche wurden die Zellen beim Erreichen einer ca. 80 %igen Konfluenz in eine neue T-75 Zellkulturflasche passagiert. Hierbei wurde das Wachstumsmedium abgenommen, einmal mit ca. 5 mL PBS (aus dem Englischen „*phosphate buffered saline")* gewaschen und anschließend mit 1 mL 0,05 %igem Trypsin-EDTA bei 37 °C enzymatisch von der Zellkulturflasche abgelöst. Dabei wurde das Ablösen der adhärenten Zellen stichpunktartig im Mikroskop observiert und darauffolgend wurde die Reaktion mittels Zugabe der dreifachen Menge FBS (aus dem Englischen „*fetal bovine serum"*) -haltigem Zellkulturmedium abgestoppt. Die gewünschte Zellzahl wurde in eine neue T-75 Zellkulturflasche überführt, in der das zelllinienspezifische Wachstumsmedium vorgelegt wurde, sodass sich ein Gesamtvolumen von 15 mL ergab. Hierbei unterschied sich das Verhältnis der Passagen je nach Zelllinie zwischen 1:5 (TCam-2) und 1:20 (2102EP; JAR). Die sterilen Wachstumsbedingungen wurden konstant bei 37 °C und 7,5 % CO_2 gehalten.

Ein Sonderfall stellte die Zelllinie GCT-72 dar, da diese eine Co-Kultur mit ca. 5 % Fibroblasten benötigt. Um sicher zu stellen, dass die analysierten Zellen größtenteils der GCT-Zelllinie entstammen, wurden alle zwei Passagen die Fibroblasten ausgedünnt. Diese lösen sich während des Ablösens mittels Trypsin früher ab als die GCT-Zellen, sodass nach ca. 1 min ein Großteil der Fibroblasten abgesaugt werden konnte.

Die verwendeten Zellkulturmedien und ihre Zusätze aller untersuchten GCT-Zelllinien sind in Tabelle 16 aufgelistet.

Tabelle 16: Medienzusammensetzung der Kulturmedien unterschiedlicher Keimzelltumorzelllinien.

Medium	Zusätze	Keimzelltumorzelllinien
DMEM	10 % FBS, 1 % P/S (10,000 U), 1 % L-Glutamin (200 mM)	1411H, 2102EP(-R), JAR, JEG-3(-R), NT2/D1(-R)
RPMI	10 % FBS, 1 % P/S (10,000 U), 1 % L-Glutamin (200 mM)	GCT72, NCCIT(-R), TCam-2(-R)

2.2.6.2. Zelllinien anderer urologischer Entitäten

Die adhärenten Harnblasenkarzinom-, Prostatakarzinom- und Nierenzellkarzinom-Zelllinien wurden analog zu den GCT-Zelllinien kultiviert (siehe Kapitel 2.2.6.1). Die Zusätze der Kulturmedien (siehe Tabelle 17) und die Wachstumsbedingungen (37 °C und 5 % CO_2) unterschieden sich von denen der GCT-Zelllinien.

Tabelle 17: Kultivierungsbedingungen der analysierten Zelllinien anderer urologischer Entitäten.

Medium	Zusätze	Zelllinie(n) anderer urologischer Entitäten
DMEM	10 % FBS, 1 % P/S (10,000 U), 1 % L-Glutamin (200 mM)	ACHN
DMEM	10 % FBS, 1 % P/S (10,000 U)	Caki-1, RT-112, SCaBER, VM-CUB-1
RPMI	10 % FBS, 1 % P/S (10,000 U), 1 % L-Glutamin (200 mM)	786-O, LNCaP, PC-3,

2.2.6.3. Kontrollzelllinien

Für diese Studie wurde eine große Anzahl von adhärent wachsenden Kontrollzelllinien aus Normalgewebe herangezogen. Hierzu zählten die Fibroblasten MPAF und HVHF2, die Keratinozyten HaCaT, die Endothelzellen HUVEC und die T-Lymphozyten JURKAT. Darüber hinaus wurden Suspensionskulturen der Kontrollzelllinien THP-1 (Monozyten) analysiert. Die zelllinienspezifischen Wachstumsbedingungen sind in Tabelle 18 aufgelistet.

Tabelle 18: Kultivierungsbedingungen der analysierten Kontrollzelllinien.
Die Kulturbedingungen aller Kontrollzelllinien waren 37 °C und 7,5 % CO_2.

Kontroll-zelllinie	Entität	Medium	Zusätze
HaCaT	Keratinozyten	DMEM	10 % FBS, 1 % P/S (10,000 U), 1 % L-Glutamin (200 mM)
HUVEC	Endothelzellen	Endothelial Cell Growth Medium 2	Endothelial Cell Growth Medium-Supplements
JURKAT	T-Lymphozyten	RPMI	10 % FBS, 1 % P/S (10,000 U), 1 % L-Glutamin (200 mM)
MPAF	Fibroblasten	DMEM	10 % FBS, 1 % P/S (10,000 U), 1 % L-Glutamin (200 mM), 1x non-essential amino acids, 100 nM β-Mercaptoethanol
THP-1	Monozyten	RPMI	10 % FBS, 1 % P/S (10,000 U), 1 % L-Glutamin (200 mM)
HVHF2	Vorhaut-Fibroblasten	DMEM	10 % FBS, 1 % P/S (10,000 U)

2.2.6.4. Kryokonservierung der Zelllinien

Um Zellkulturen langfristig lagern zu können, wurden Kryokulturen von niedrigen Passagen aller Zelllinien etabliert. Nach dem Ernten der Zellen einer T-75 Zellkulturflasche wurde mittels Zentrifugation (99 x g, 5 min, bei Raumtemperatur (RT)) ein Zellpellet generiert. Nach dem Abnehmen des Mediums im Überstand, wurden die Zellen in 5 mL Kryomedium (FBS versetzt mit 10 % DMSO) resuspendiert und anschließend in 5 Kryoröhrchen (5 x 1 mL) aliquotiert. Die Kryoröhrchen wurden direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und gelagert.

Der Auftauprozess erfolgte möglichst schnell, um einem starken Zelltod vorzubeugen. Die kryokonservierten Zellen wurden mit ihrem Medium in eine T75-Zellkulturflasche überführt, in der 15 mL des zellspezifischen Wachstumsmediums vorgelegt wurden. Nach einem Tag wurde der Zustand der Zellen mikroskopisch überprüft und ein Mediumwechsel vorgenommen. Bei einer ca. 80 %igen Konfluenz wurden die Zellen das erste Mal passagiert. Alle Zellen befanden sich mindestens zwei Wochen in Kultur, bevor sie für Experimente eingesetzt wurden.

2.2.7. Zellzahlbestimmung

Zwecks exakter und gleichbleibender Versuchsbedingungen wurde vor jeder Zellaussaat eine Zellzahlbestimmung durchgeführt. Hierzu wurden aus der trypsinierten Zellsuspension 10 µL entnommen und im Verhältnis 1:1 mit 10 µL Trypanblau gemischt. Trypanblau diente hierbei als Indikator für nekrotische Zellen. 10 µL dieser Lösung wurden auf eine Zellcounter-Platte geladen. Die standardisierte Zellzahl-Bestimmung fand am Zellcounter (TC20 Automatisierter Zellzähler, Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen, Deutschland).

2.2.8. Zellzyklus- und Apoptose-Analysen am Durchflusszytometer

Die Analysen des Zellzyklus und der Apoptose-Induktion nach Epi-Drug-Behandlung fanden am Durchflusszytometer (*MACSQuant Analyzer 10*) statt. Für die Zellzyklusanalysen wurde PI (Propidiumiodid) verwendet, um die DNA der Zellen anzufärben, wohingegen bei den Apoptose Messungen Annexin V an FITC gekoppelt und PI detektiert wurde.

Zu Beginn der Analyse wurden 1,5 x 10^5 Zellen in einem 6-Well ausplattiert. Nach einem Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und die Behandlung mit Epi-Drugs und der Lösemittelkontrolle begonnen. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet (siehe Kapitel 2.2.6) und mit PBS gewaschen, um etwaige Rückstände des Mediums zu entfernen. Alle weiteren Schritte fanden auf Eis statt, um unspezifische Zellschäden zu minimieren.

Für die Analyse des Zellzyklus wurden die Zellen nach dem Ernten zunächst in 300 µL PBS resuspendiert und darauffolgend wurden, parallel zum Vortexen, 700 µL 100 %iger eiskalter Ethanol zugetropft. Somit wurden die Zellen mit 70 %igem Ethanol fixiert und permeabilisiert. Nachdem die fixierten Zellen zentrifugiert worden waren und der Überstand abgesaugt war, fanden zwei Waschschritte mit PBS statt, ehe sie in 500 µL FACS-Zellzyklus-Puffer (2 µg/mL PI; 200 µg/mL RNase A in PBS) resuspendiert und vermessen wurden. Das PI interkaliert in die doppelsträngige DNA und färbt diese an. Die aufgenommene Menge PI ist direkt

proportional zur DNA-Menge der Zelle. Somit nehmen Zellen, die sich in der S-Phase befinden, mehr PI auf als Zellen in der G1-Phase. Zellen mit einem doppelten Chromosomensatz (G2/M-Phase) binden die zweifache Menge PI.

Für eine realistische Analyse der Apoptose-Induktion wurden neben den adhärenten Zellen zusätzlich alle sich im Medium befindenden Zellen analysiert. Nach der Zellernte und anschließender Zentrifugation (99 x g, 5 min, RT) wurden die Zellen mit 1 mL 1 x Annexin-V-Bindepuffer gewaschen und zentrifugiert (99 x g, 5 min, RT). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 70 µL 1 x Annexin-V-Bindepuffer resuspendiert. Für die Färbung wurden 15 µg PI (entspricht 7,5 µL aus 2 mg/mL Stock) und 2,5 µL Annexin-V-FITC-Konjugat eingesetzt. Die Lösung wurde gemischt und für 15 min bei RT im Dunklen gefärbt. Kurz vor der Messung wurden 500 µL 1 x Annexin-V-Bindepuffer beigefügt und einmal gevortext. Das Protein Annexin-V bindet mit hoher Affinität Phosphatidylserine (PS) von Phospholipiden. PS sind Bestandteile der Plasmamembran von Zellen und sind in gesunden Zellen immer nach innen, zum Zytoplasma gewandt. Annexin-V bindet nicht an lebendige Zellen. Im Prozess der Apoptose werden die PS nach außen gekehrt und Annexin-V kann an sie binden (216). Um diesen Apoptose Marker detektieren zu können, wird ein Fluoreszenzfarbstoff-Konjugat (Annexin-V-FITC) eingesetzt, welches im Durchflusszytometer analysiert werden kann. Das nicht membrangängige PI wurde eingesetzt um in die DNA von nekrotischen Zellen zu interkalieren. Somit lassen sich nekrotische Zellen (Annexin-V positiv, PI positiv) mit einer zerstörten Zellmembran, apoptotischen Zellen (Annexin-V positiv, PI negativ) und viable Zellen (für beide Marker negativ) voneinander unterscheiden.

In beiden Analysen wurden 5 x 10^4 Zellen detektiert. Die Analyse wurde mit *MACSQuant Software v 2.13.0* durchgeführt.

2.2.9. Xenotransplantation

Die Tierversuche wurden unter den Leitlinien des deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt. Vor Beginn der Arbeiten wurde eine Zustimmung des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW (AZ: 81-02.04.2018.A350) eingeholt.

Für die Xenotransplantation wurden 1 x 10^7 GCT-Zellen (2102EP und 2102EP-R) in 500 µL Corning® Matrigel® resuspendiert und in die Flanke einer sechs Wochen alten, männlichen CD1 Nacktmaus injiziert. Die Mäuse wogen zu Beginn des Versuchs 25 - 30 g. Das Tumorwachstum wurde über zwei Wochen kontrolliert, ehe die Injektion mit HDAC-BET-Dual-Inhibitor (LAK-FFK11) und Lösemittelkontrolle (DMSO) subkutan gespritzt wurde. Die Tiere wurden in einem Zeitraum von drei Wochen alle zwei Tage behandelt, vermessen und

gewogen. Nach Entnahme der Tumoren wurden diese in FFPE-Gewebe (Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe) eingebettet. 2 µM dicke FFPE-Schnitte wurden für acht min mit *Meyer's hemotxylin* gefärbt und mittels Lichtmikroskopie analysiert.

2.2.10. *In silico*-Analysen

2.2.10.1. Synthese-Primer

Die Aussagekraft und Reproduzierbarkeit der qRT-PCR (siehe Kapitel 2.2.3) hängt maßgeblich von den verwendeten Oligonukleotiden ab, die als Primer-Paare verwendet werden. Im ersten Schritt der Synthese von zuverlässigen Oligonukleotid-Primern wurde die Online-Datenbank *PrimerBank* (https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/index.html (205)) durchsucht. In dieser Datenbank sind zum Zielgen passende Primer-Paare aus bereits publizierten Studien aufgelistet. Falls keine Einträge in der *PrimerBank* existierten, wurden die Oligonukleotide selbst entworfen. Hierzu wurde die Sequenz des Zielgens mit Ensembl (https://www.ensembl.org/ (206)) ermittelt und anschließend wurden mit Primer3Plus (Online-tool, https://primer3plus.com/ (204)) passende Primersequenzen bestimmt. Es wurde darauf geachtet, dass die Primerpaare Exon-überspannend und ca. 20 Basenpaare groß waren, die Produktgröße zwischen 50 – 200 Basenpaaren lagen und einen GC-Gehalt von über 50 %, sowie eine Schmelztemperatur von 60 °C aufwiesen. Zur Validierung ausgewählter Oligonukleotide wurde eine *in silico*-PCR durchgeführt (https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr). Zeigte diese ausschließlich eine Amplifikation der Zielsequenz, wurden die Primerpaare bei Merck / Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) in Auftrag gegeben. In einer ersten Test-qRT-PCR wurden die Primerpaare auf die Amplifikation des Zielgens (passende Schmelztemperatur) und auf ihre Spezifität (ein Peak der Schmelzkurve des amplifizierten Produkts) hin analysiert.

2.2.10.2. Bioinformatik-Tools

Um die in den RNA-Seq ermittelten Gene, die nach Epi-Drug-Behandlung dereguliert vorlagen, näher zu charakterisieren, wurde das Online Tool *DAVID Bioinformatics Resources 6.8* (https://david.ncifcrf.gov) verwandt (210). Hierzu wurden in einer Excel Tabelle Gene zusammengetragen, die in allen untersuchten Tumorentitäten herauf- oder herunterreguliert vorlagen. Die Listen wurden in DAVID mit den Datenbanken *‚Gene Ontology term biological process direct', ‚KEGG Pathway', ‚molecular function'* und ‚*UniProt Keywords'* abgeglichen. Die Analyse erfolgte über den Reiter ‚*Functional Annotation Chart'*. Das Programm ermittelt

zur Einordnung der Signifikanz einen p-Wert. Anhand dieses p-Werts wurde ein Balkendiagramm der bedeutendsten Ergebnisse erstellt.

Eine weitere bioinformatische Analyse der RNA-Seq Daten stellte die Proteinnetzwerkanalyse mittels *STRING-Datenbank* (https://string-db.org) dar (209). Wie zuvor wurde die Liste gemeinschaftlich deregulierter Gene analysiert. Das Online-Tool gleicht bekannte Interaktionen dieser Gene miteinander ab und erstellt ein Interaktionsnetzwerk. Gene eines Funktionsbereichs wurden in gleichen Farben dargestellt, um einen schnelleren Überblick zu ermöglichen.

HOMER basierte Algorithmen wurden bei der Auswertung der ATAC-Seq von Active Motif angewandt, um Änderungen der Chromatinzugänglichkeit von Transkriptionsfaktoren nach Inhibitor-Behandlung zu ermitteln. Die zehn signifikantesten Änderungen wurden anhand des p-Werts ermittelt und in einem Balkendiagramm dargestellt.

Um die Gemeinsamkeiten der Effekte von HDAC-Mono- und HDAC-BET-Dual-Inhibitor-Behandlungen der unterschiedlichen Tumorentitäten hervorzuheben, wurden Venn Diagramme erstellt (Interactivevenn, http://www.interactivenn.net/ (208)).

2.2.10.3. Öffentliche Datensätze

Zur Identifikation von Zielstrukturen der Inhibitoren wurden im cBioportal (https://www.cbioportal.org/) die Datenbanken der untersuchten Tumorentitäten analysiert (GCT: *Testicular Germ Cell Tumors* (TCGA, The Cancer Genome Atlas (217)), *PanCancer* Atlas; Harnblasenkarzinom: *urothelial carcinoma, TCGA, Firehose Legacy;* Prostatakarzinom: *Prostata adenocarcinoma*, TCGA, *Firehose Legacy*; Nierenzellkarzinom: *kidney renal clear cell carcinoma*, TCGA, *Firehose Legacy*) (190,191).

3. Ergebnisse

Zielsetzung dieser Arbeit war die Identifikation und Charakterisierung potenter neuartiger HDAC- und BET-Mono-Inhibitoren und die daraus resultierende Synthese multiselektiver HDAC-BET-Dual-Inhibitoren als mögliche Therapieoption von Keimzelltumoren und anderen urologischen Malignitäten.

3.1. Auswahl vielversprechender Ziele zur Synthese neuartiger epigenetischer Inhibitoren.

Zunächst wurden die Expressionslevel von epigenetischen Regulatoren in Zelllinien urologischer Malignitäten überprüft. Hierfür wurden Analysen (RNA-Seq-Daten) der Arbeitsgruppe reanalysiert. Basierend auf einem hohen Expressionslevel, wurden die Enzymklassen der epigenetischen *reader* und *eraser* als mögliche Ziele charakterisiert. Bei den epigenetischen *reader* Enzymen zeigten GCT-, BCa-, RCC- und PCa-Zelllinien eine starke Expression von BRD2 / BRD4 und BRD-T. Wohingegen in der Klasse der *eraser* vor allem Enzyme der HDAC-Klasse-I und -IIB stark exprimiert wurden (siehe Abbildung 3).

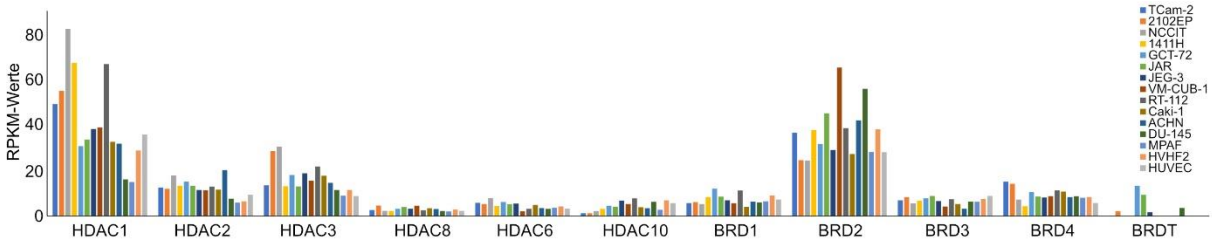


Abbildung 3: Relative Expression von HDAC- und BET-Enzymen in urologischen Zelllinien und Kontrollzelllinien.

Dargestellt sind die RPKM-Werte von GCT- (SE: TCam-2; EC: 2102EP, NCCIT; YST: 1411H, GCT-72; CC: JAR, JEG-3), BCa- (VM-CUB-1, RT-112), RCC- (Caki-1, ACHN) und PCa- (DU-145) Tumorzelllinien, sowie einiger Kontrollzelllinien (Fibroblasten: MPAF, HVHF2; Endothelzellen: HUVEC). Die höchste Expression zeigten *HDAC1*, *2*, *3* und *BRD2*.

Auf der Grundlage dieser Expressionsanalysen wurden 33 neuartige HDAC- und BET-Inhibitoren (18 HDACi und 15 BETi) im Labor von Herrn Prof. Dr. Thomas Kurz synthetisiert (siehe Anhang 2 und Anhang 3).

3.2. Initialscreening der zytotoxischen Effekte neuartiger Inhibitoren

In einem ersten Überblicksexperiment wurden alle 33 neuartigen Epi-Drugs in drei GCT-Zelllinien und einer Kontrollzelllinie auf ihre zytotoxischen Effekte untersucht. Hierbei wurden die GCT-Zelllinien TCam-2 (SE), 2102EP (EC) und JAR (CC) so gewählt, dass alle Entitäten der GCT abgedeckt wurden. Über einen Zeitraum von 96 h wurden XTT-Zellviabilitätsassays

durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.2). Aus den erhobenen Daten wurde für einen Zeitpunkt (48 h) eine LD_{50}-Konzentration für jede Inhibitor-Zelllinien-Kombination berechnet. Einige der Epi-Drugs zeigten keine Auswirkungen auf die malignen Zelllinien (HDACi: K79PCHy und MPK187; BETi: ASK24, ASK25, ASK26, ASK54, PWK43, PWK44 und PWK45), andere zeigten eine hohe Wirksamkeit gegen alle untersuchten Zelllinien (HDACi: KSK64, LAK31, LAK39, LAK41, LAK78, LAK94, LAK102, LAK104, MPK409 und YAK61) und einige wiesen eine zelllinienspezifische Wirkung auf (HDACi: LAK86, LAK88, LAK92, LAK96, LAK98 und LAK100; BETi: ASK27, ASK43, ASK44, ASK53, ASK58, ASK59, ASK61 und ASK62). Als genereller Effekt der Analysen zeigte sich, dass die EC-Zelllinie 2102EP am sensitivsten auf die neuartigen Epi-Drugs reagierte, wohingegen die CC-Zelllinie JAR deutlich höhere Konzentrationen der Inhibitoren tolerierte (siehe Abbildung 4 A).

Die Auswirkungen der neuartigen Epi-Drugs auf Zelllinien anderer urologischer Malignitäten wurden beispielhaft anhand einer Zelllinie jeder untersuchten Entität analysiert (BCa: VM-CUB-1, RCC: Caki-1, PCa: DU-145). Hier zeigte sich, dass einige der neuartigen HDACi bereits bei einer Konzentration von 5 µM starke Effekte auf die Zellviabilität der drei Zelllinien aufwiesen (KSK64, LAK31, LAK39, LAK41 und MPK409). Die BETi beeinflussten vor allem die BCa-Zelllinie, und zeigten keinen Effekt auf die PCa-Zelllinie (siehe Abbildung 4 B). Abbildung 4 stellt eine graphisch vereinfachte Zusammenfassung der Ergebnisse der XTT-Zellviabilitätsassays dar. Die Rohdaten dieser Assays sind im Anhang beigefügt (siehe Anhang 4 und Anhang 5).

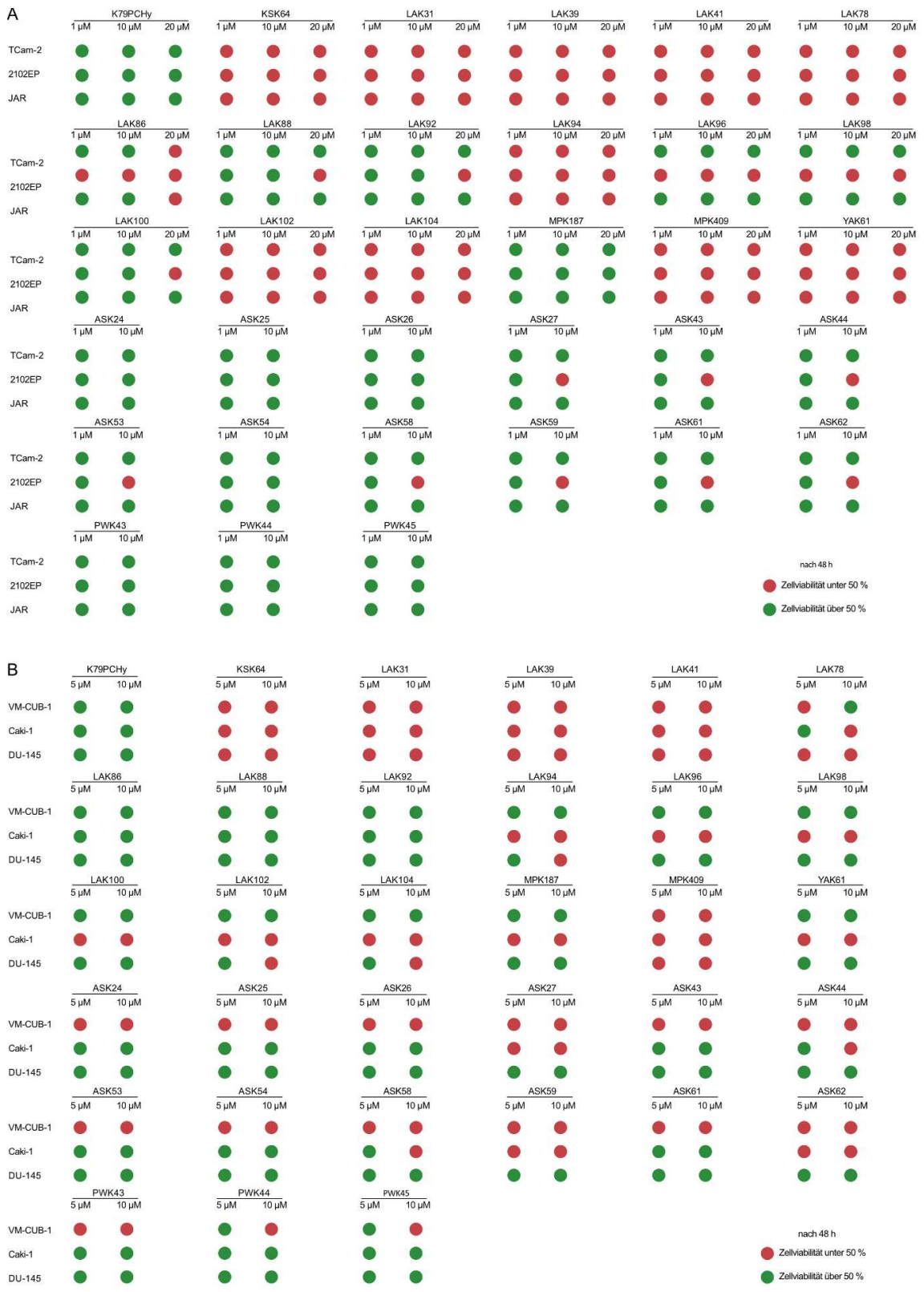


Abbildung 4: Relative Zellviabilität von GCT-, BCa-, RCC- und PCa-Zelllinien nach Behandlung mit neuartigen Epi-Drugs.

Die Veränderungen in der Zellviabilität wurden farbkodiert: grün: Zellviabilität nach 48 h Behandlung > 50 %; rot: Zellviabilität nach 48 h Behandlung < 50 %. Dargestellt ist die relative Viabilität von A) GCT-Zelllinien und B) pan-urologische Tumorzelllinien nach 48 h Behandlung mit 18 HDACi und 15 BETi, die mit XTT-Zellviabilitätsassay erhoben wurden.

Anhand der ersten Überblicksanalyse zeigten jeweils drei HDAC-Inhibitoren (KSK64, LAK31 und MPK409) und BET-Inhibitoren (ASK44, ASK58 und ASK62) vielversprechende Toxizitätslevel. Die Strukturformeln und die mittels Enzymassay (durchgeführt von der Firma Reaction Biology, Malvern, USA) ermittelten IC_{50}-Werte dieser potentesten Inhibitoren sind dargestellt. Die IC_{50}-Werte zeigen deutlich, dass die neuartigen HDACi die höchste Affinität zu HDAC1, 2, 3 und 6 (Klasse-I und -IIB) aufweisen. Die BETi targetieren vor allem BRD2 (siehe Abbildung 5 A für HDACi; Abbildung 5 B für BETi). Diese sechs Inhibitoren wurden in den folgenden Analysen ausgiebig charakterisiert.

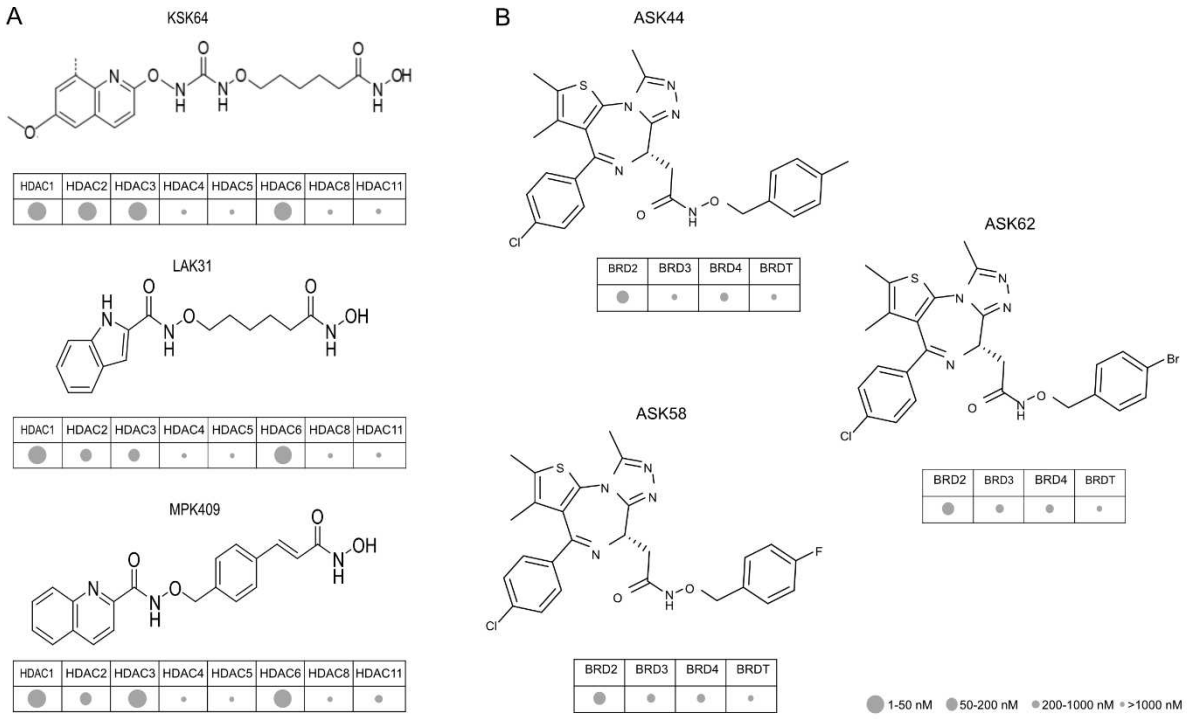


Abbildung 5: Charakterisierung der jeweils drei potentesten neuartigen HDACi und BETi.

A) Zeigt die Strukturformel der drei potentesten neuartigen HDACi (KSK64, LAK31 und MPK409) und deren Affinität (IC_{50}-Werte) zu den jeweiligen HDAC-Enzymen. B) Zeigt die Strukturformel der drei potentesten neuartigen BETi (ASK44, ASK58 und ASK62) und deren Affinität (IC_{50}-Werte) zu den jeweiligen BET-Enzymen. Die größten Sphären stehen für einen IC_{50}-Wert zwischen 1 - 50 nM, die nächstkleinere Sphäre stellt 50 – 200 nM dar, gefolgt von 200 – 1000 nM. Die kleinste Sphäre steht für einen IC_{50} > 1000 nM.

3.3. Detaillierte Analysen ausgewählter Inhibitoren

In der nächsten Analyse wurden die Effekte der vielversprechendsten Epi-Drugs auf eine umfassende Anzahl unterschiedlicher GCT- und Kontroll-Zelllinien untersucht.

Die Toxizität der sechs Mono-Inhibitoren KSK64, LAK31, MPK409, ASK44, ASK58 und ASK62 wurden in einer repräsentativen Auswahl unterschiedlicher GCT-Zelllinien analysiert. Die Auswirkungen der Epi-Drugs auf Zelllinien der SE (TCam-2) und der NSE (EC: 2102EP,

NCCIT und NT2/D1; YST: 1411H und GCT-72; CC: JAR und JEG-3) wurden charakterisiert. Darüber hinaus wurden die existierenden Cis-Platin-resistenten Klone der parentalen Zelllinien (TCam-2-R, 2102EP-R, NCCIT-R und JEG-3-R) untersucht. Um einen Vergleich zu bereits existierenden Inhibitoren zu ermöglichen, wurden die XTT-Zellviabilitätsassays ebenfalls mit den strukturell verwandten HDAC-Inhibitoren Entinostat und Vorinostat und den BET-Inhibitor JQ1 durchgeführt. Eine Übersicht der resultierenden LD_{50}-Werte ist in Abbildung 6 visualisiert. Es ist deutlich zu sehen, dass die drei HDACi einen Wirkungsbereich im nanomolaren bis zum niedrigen mikromolaren Bereich ausweisen. Alle untersuchten Tumorzelllinien zeigen eine Reduktion in Zellviabilität nach neuartiger HDACi-Applikation. Im direkten Vergleich zu den kommerziell erhältlichen HDACi Entinostat und Vorinostat, zeigt sich eine erhöhte Potenz unserer Substanzen. Die neuartigen BETi zeigen ihre höchste Wirksamkeit in EC-Zelllinien in niedrigen mikromolaren Konzentrationen. Die restlichen GCT-Entitäten weisen nur teilweise eine Änderung der Zellviabilität auf (SE: TCam-2-R; YST: GCT-72). Die Analysen decken sich mit der Wirksamkeit des etablierten BETi JQ1. Die CC-Zelllinien illustrierten auch nach Behandlung mit der maximal applizierten Dosis von 10 µM keine Effekte (siehe Abbildung 6, die Rohdaten der Analysen sind in Anhang 6 beigefügt).

Tumorentität			Zelllinie	HDACi					BETi			
				Entinostat	Vorinostat	KSK64	LAK31	MPK409	JQ1	ASK44	ASK58	ASK62
GCT	Seminome		TCam-2	2,4	0,2	1,2	0,5	0,6	>5	>10	>10	>10
			TCam-2-R	>10	0,2	0,6	0,6	0,6	2,4	>10	>10	5,6
	Nicht-Seminome	EC	2102EP	1,9	>10	0,2	0,2	0,2	>5	2,4	9,5	4,1
			2102EP-R	3,5	1,8	0,2	0,3	0,3	>5	>10	>10	8,1
			NCCIT	2,9	0,4	0,6	0,6	0,7	0,1	0,3	0,2	0,4
			NCCIT-R	2,3	1,0	0,6	0,6	0,7	1,0	3,3	8,4	5,4
			NT2/D1	4,1	0,3	0,6	0,5	0,7	0,1	0,3	0,4	0,7
			NT2/D1-R	3,1	2,9	0,3	0,3	0,3	1,8	1,3	0,6	1,1
		YST	1411H	3,9	1,2	0,4	0,4	0,6	>5	>10	>10	>10
			GCT-72	1,1	0,4	0,1	0,3	0,4	>5	8,1	4,9	7,9
		CC	JAR	4,6	1,4	0,9	0,5	1,0	>5	>10	>10	>10
			JEG-3	3,8	1,6	0,8	0,7	1,0	>5	>10	>10	>10
			JEG-3-R	3,6	1,2	0,9	0,7	0,9	>5	>10	>10	>10
BCa			VM-CUB-1	5,9	4,0	1,2	1,2	2,1	0,3	1,4	1,5	1,6
			SCaBER	>10	5,9	2,3	1,5	1,8	1,5	>10	>10	>10
			RT-112	>10	5,4	2,4	2,6	3,7	>10	>10	>10	>10
RCC			Caki-1	>10	3,3	2,0	2,5	3,3	>10	5,3	5,3	3,3
			786-O	>10	>10	2,5	5,0	3,2	>10	>10	>10	>10
			ACHN	>10	7,1	1,7	2,4	2,8	2,8	2,7	4,5	2,9
PCa			DU-145	1,4	3,0	0,8	0,7	0,7	>10	>10	>10	>10
			PC-3	8,5	8,3	2,2	1,9	2,8	3,8	>10	5,1	6,5
			LNCaP	1,0	2,0	0,6	1,0	0,8	0,2	1,3	1,1	1,5

LD_{50} 48 h 0.5 µM 5 µM 10 µM

Abbildung 6: Toxizitätsscreening der neuartigen HDACi und BETi in Zelllinien von Keimzelltumoren.

Dargestellt sind die mit Hilfe von XTT-Zellviabilitätassays erhobenen LD_{50}-Werte der Zelllinien von Keimzelltumoren nach 48 h Behandlung mit neuartigen Epi-Drugs. Die HDACi Entinostat und Vorinostat wurden verglichen mit den neuartigen HDACi (KSK64, LAK31 und MPK409). Der BETi JQ1 wurde verglichen mit den neuartigen BET (ASK44, ASK58 und ASK62). Die Werte sind für eine leichteres Verständnis farbcodiert. Orange Werte deuten auf hohe LD_{50}-Werte (> 5 µmol/L) hin, wohingegen grüne Zahlen niedrige LD_{50}-Werte (<2 µmol/L) anzeigen. Die Cis-Platin-resistenten Zelllinien der GCTs wurden inkludiert und sind mit einem (-R) gekennzeichnet.

Um eine mögliche Kombinationsbehandlung der neuartigen Epi-Drugs mit Cis-Platin zu untersuchen, wurde eine Versuchsreihe mit XTT-Zellviabilitätassays in den resistenten Zelllinien (2102EP-R, NCCIT-R und NT2/D1-R) durchgeführt. Eine Vorbehandlung mit einer geringen Dosis der Epi-Drugs (LD_{10} 48 h und LD_{25} 48 h) wurde 24 h vor Cis-Platin-Applikation durchgeführt. Anschließend wurde Cis-Platin in steigenden Konzentrationen eingesetzt (1 – 10 µM). Dargestellt sind die relativen Zellviabilitäten 48 h nach Behandlung mit Cis-Platin. Die Kombinationsbehandlung (Abbildung 7, blaue Balken) wurde mit der jeweiligen Einzelbehandlung (Abbildung 7, grau: Cis-Platin, orange: Epi-Drug) verglichen. Es zeigte sich lediglich ein additiver Effekt der Kombinationstherapie, kein synergistischer Effekt (siehe Abbildung 7).

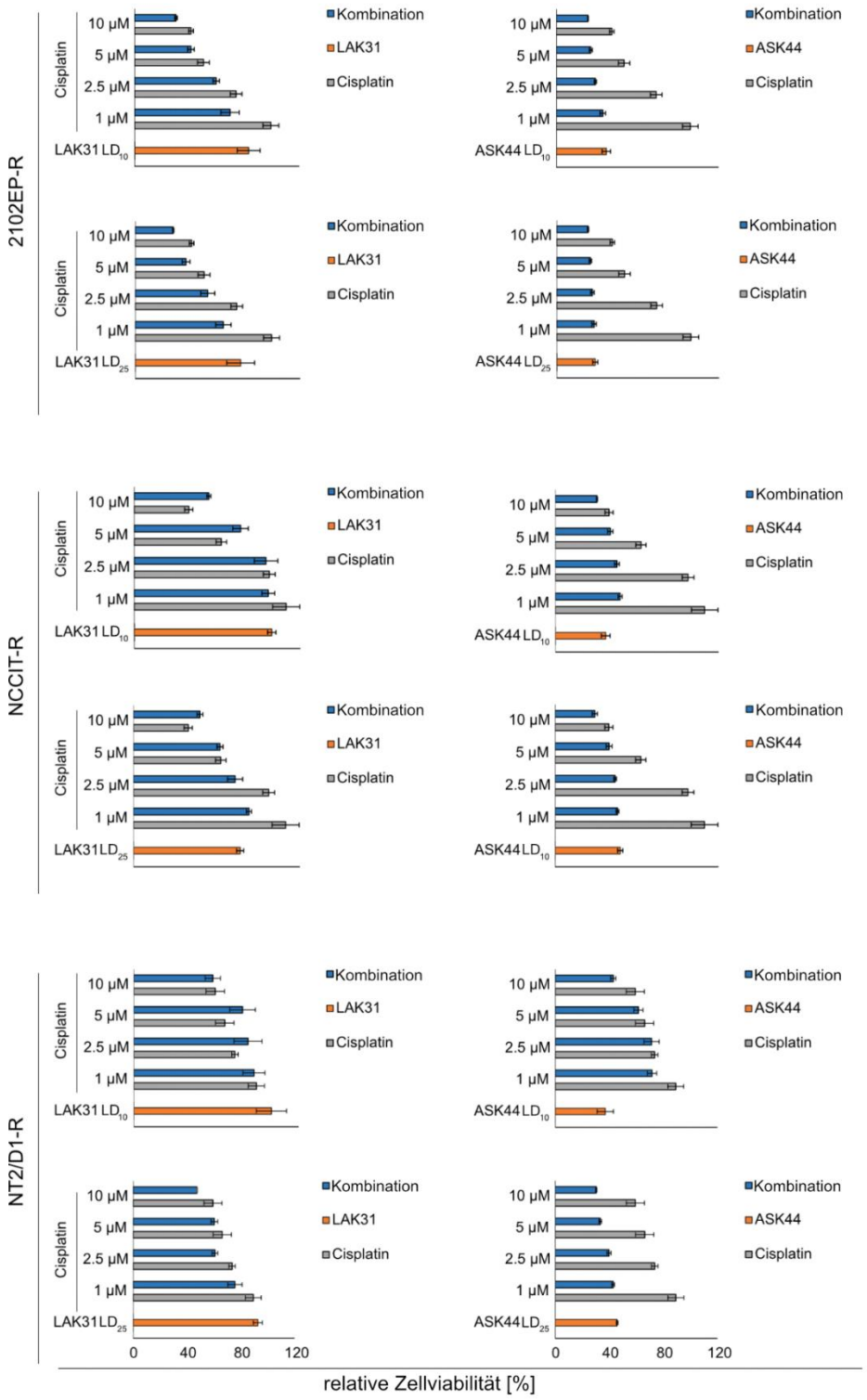


Abbildung 7: XTT-Zellviabilitätsassay in Cis-Platin-resistenten GCT-Zelllinien nach Kombinationsbehandlung mit HDACi (LAK31) / BETi (ASK44) und Cis-Platin über 48 h.

Die GCT-Zelllinien 2102EP-R, NCCIT-R und NT2/D1-R wurden zunächst mit einer geringen Dosis der Epi-Drugs vorbehandelt. Der HDACi LAK31 wurde in LD_{10} bzw. LD_{25} eingesetzt (links). Der BETi ASK44 wurde in LD_{10} bzw. LD_{25}-Konzentrationen eingesetzt (rechts) (Zellviabilität der Einzelbehandlung mit Epi-Drug nach 48 h in orange dargestellt). Die vorbehandelten Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Cis-Platin behandelt (1 – 10 µM). Die Zellviabilität der Kombinationsbehandlung ist in blau dargestellt, die Zellviabilität nach Cis-Platin-Applikation ohne Vorbehandlung mit Epi-Drugs ist in grau illustriert.

Um ein besseres Verständnis der potenziellen Anwendungsbereiche der neuartigen Epi-Drugs zu bekommen, wurden die Analysen auf ausgewählte Zelllinien weiterer urologischer Malignitäten erweitert. Es wurden Zelllinien von Harnblasenkarzinomen (VM-CUB-1, SCaBER und RT-112), Nierenzellkarzinomen (Caki-1, 786-O und ACHN) und Prostatakarzinomen (DU-145, PC-3 und LNCaP) untersucht (siehe Abbildung 8.) Die Experimente wurden im Rahmen ihrer Masterarbeit von Alexa Stephan durchgeführt (189). Es zeigt sich ein vergleichbares Muster zu den GCT-Zelllinien. Die neuartigen HDACi induzierten eine starke Reduktion der Zellviabilität in niedrigen mikromolaren Konzentrationen und waren potenter als die Vergleichssubstanzen Entinostat und Vorinostat. Die BETi induzierten nur in einigen Zelllinien Toxizität (BCa: VM-CUB-1; RCC: Caki-1, ACHN; PCa: PC-3, LNCaP) und waren in diesen weniger potent. Die neuen BETi zeigten ähnliche Aktivitäten wie der etablierte BETi JQ1 (siehe Abbildung 8, die Rohdaten dieser Analysen sind in Anhang 7 beigefügt).

Tumorentität	Zelllinie	HDACi					BETi			
		Entinostat	Vorinostat	KSK64	LAK31	MPK409	JQ1	ASK44	ASK58	ASK62
BCa	VM-CUB-1	5,9	4,0	1,2	1,2	2,1	0,3	1,4	1,5	1,6
	SCaBER	>10	5,9	2,3	1,5	1,8	1,5	>10	>10	>10
	RT-112	>10	5,4	2,4	2,6	3,7	>10	>10	>10	>10
RCC	Caki-1	>10	3,3	2,0	2,5	3,3	>10	5,3	5,3	3,3
	786-O	>10	>10	2,5	5,0	3,2	>10	>10	>10	>10
	ACHN	>10	7,1	1,7	2,4	2,8	2,8	2,7	4,5	2,9
PCa	DU-145	1,4	3,0	0,8	0,7	0,7	>10	>10	>10	>10
	PC-3	8,5	8,3	2,2	1,9	2,8	3,8	>10	5,1	6,5
	LNCaP	1,0	2,0	0,6	1,0	0,8	0,2	1,3	1,1	1,5

LD_{50} 48 h 0.5 µM 5 µM 10 µM

Abbildung 8: Toxizitätsscreening der neuartigen HDACi und BETi in Zelllinien urologischer Malignitäten.

Dargestellt sind die mit Hilfe von XTT-Zellviabilitätassays erhobenen LD_{50}-Werte der Zelllinien urologischer Malignitäten (BCa, RCC und PCa) nach 48 h Behandlung mit neuartigen Epi-Drugs. Die HDACi Entinostat und Vorinostat wurden verglichen mit den neuartigen HDACi (KSK64, LAK31 und MPK409). Der BETi JQ1 wurde verglichen mit den neuartigen BETi (ASK44, ASK58 und ASK62). Die Werte sind für eine leichteres Verständnis farbcodiert. Orange Werte deuten auf hohe LD_{50}-Werte (> 5 µmol/L) hin, wohingegen grüne Zahlen niedrige LD_{50}-Werte (<2 µmol/L) anzeigen.

Um mögliche Nebeneffekte der Epi-Drugs abschätzen zu können, wurden die Auswirkungen der Anwendung auf eine Bandbreite von Normalgewebe-Zelllinien analysiert. Hierzu wurden Fibroblasten (MPAF, HVHF2), Keratinozyten (HaCaT), T Lymphozyten (JURKAT), Endothelzellen (HUVEC) und Monozyten (THP-1) mit den neuen Epi-Drugs behandelt. Die Fibroblasten wiesen eine hohe Resistenz gegen die HDACi und BETi auf. Die HDACi reduzierten die Zellviabilität von Keratinozyten, T-Lymphozyten, Endothelzellen und Monozyten. Allerdings lagen die LD_{50}-Werte der Normalzellen höher als die der GCT-Zelllinien.

Alle Zelllinien wiesen eine höhere Resistenz gegen die BETi auf, die Fibroblasten- und Keratinozyten-Zelllinien zeigten keine Beeinträchtigung der Zellviabilität (siehe Abbildung 9).

Kontrollzelllinien		HDACi				BETi			
		Entinostat	KSK64	LAK31	MPK409	JQ1	ASK44	ASK58	ASK62
Fibroblasten	MPAF	>10	>10	>10	>10	>5	>10	>10	>10
	HVHF2	>10	4,2	9,1	9,8	>5	>10	>10	>10
Keratinozyten	HaCaT	8,3	1,3	1,4	1,2	>5	>10	>10	>10
T-Lymphozyten	JURKAT	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	2,4	4,2	6,7	3,7
Endothelzellen	HUVEC	6,8	<0,5	0,7	0,7	4,0	<2	<2	4,6
Monozyten	THP-1	1,3	<0,5	<0,5	0,5	<2	<2	<2	<2

LD_{50} 48 h 0.5 µM 5 µM 10 µM

Abbildung 9: Toxizitätsscreening der neuartigen HDACi und BETi in Kontrollzelllinien unterschiedlicher Herkunft.

Dargestellt sind die mit Hilfe von XTT-Zellviabilitätsassays erhobenen LD_{50}-Werte der Kontrollzelllinien nach 48 h Behandlung mit neuartigen Epi-Drugs. Die HDACi Entinostat wurde verglichen mit den neuartigen HDACi (KSK64, LAK31 und MPK409). Der BETi JQ1 wurde verglichen mit den neuartigen BETi (ASK44, ASK58 und ASK62). Die Werte sind für eine leichteres Verständnis farbcodiert. Orangene Werte deuten auf hohe LD_{50}-Werte (> 5 µmol/L) hin, wohingegen grüne Zahlen niedrige LD_{50}-Werte (< 2 µmol/L) anzeigen.

Um die induzierte Zelltoxizität näher zu charakterisieren, wurden durchflusszytometrische Messungen der Apoptose-Induktion und des Zellzyklus durchgeführt. Die Messungen erfolgten nach 24 h Behandlung mit den berechneten LD_{50}-Konzentrationen (48 h) der Epi-Drugs (siehe Abbildung 6, Abbildung 8 und Abbildung 9). Die Auswirkungen der neuartigen Epi-Drugs wurden hierbei mit dem behandlungsspezifischen Volumen des Lösemittels DMSO verglichen, um sicherzustellen, dass etwaige Effekte auf den epigenetischen Inhibitoren beruhen und nicht von dem Lösemittel der Inhibitoren ausgelöst wurden. Die Analysen der HDACi zeigten eine Apoptose-Induktion von über 5 % in einer Mehrheit der GCT-Zelllinien, die Zelllinien-spezifisch an einen G2/M-Phase-Zellzyklusarrest gekoppelt war (Zelllinien: TCam-2-R, 2102EP-R, NCCIT, 1411H und JEG-3). Die Zelllinien NT2/D1-(R), JAR und JEG-3-R, zeigten neben der Apoptose-Induktion eine Anhäufung im G1/G0-Phasen Zellzyklus auf. Zwei der drei Zelllinien der anderen urologischen Malignitäten induzierten ebenfalls Apoptose 24 h nach HDACi-Behandlung (BCa: VM-CUB-1; PCa: DU-145). Die Zellzyklus-Veränderungen wiesen eine G1/G0-Phasen-Akkumulation der VM-CUB-1 Zellen auf, wohingegen es bei Caki-1 und DU-145 zu einer Anhäufung in der G2/M-Phase kam. Die neuartigen HDACi induzierten in der untersuchten Kontrollzelllinie keine Apoptose, jedoch lösten sie einen G2/M-Phase-Zellzyklusarrest aus (siehe Abbildung 10 (links) und Abbildung 11 (links)).

Die BETi induzierten in der Mehrheit der GCT-Zelllinien einen G1/G0-Phasen Zellzyklusarrest, welcher gekoppelt an eine Apoptose-Induktion auftrat (NCCIT-R, NT2/D1-(R), GCT-72 und JEG-3-R). Nur die Zelllinien TCam-2-R, 2102EP-(R) und JEG-3 wiesen einen BETi-spezifischen Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase auf, der an eine Apoptose-Induktion gekoppelt war. Die Zelllinien der anderen urologischen Malignitäten zeigten geringe Apoptose-

Induktionen auf, nachdem sie mit den neuartigen BETi behandelt wurden (nur die PCa-Zelllinie DU-145 zeigte Apoptose > 5 %). Allerdings konnte in diesen Entitäten ebenfalls ein G1/G0-Phase-Zellzyklusarrest dokumentiert werden. Die untersuchten Fibroblasten wiesen im direkten Vergleich zur DMSO-Kontrolle keine Veränderungen in Apoptose und Zellzyklus auf (siehe Abbildung 10 (rechts) und Abbildung 11 (rechts), die Rohdaten der durchflusszytometrischen Analysen sind in Anhang 8 beigefügt).

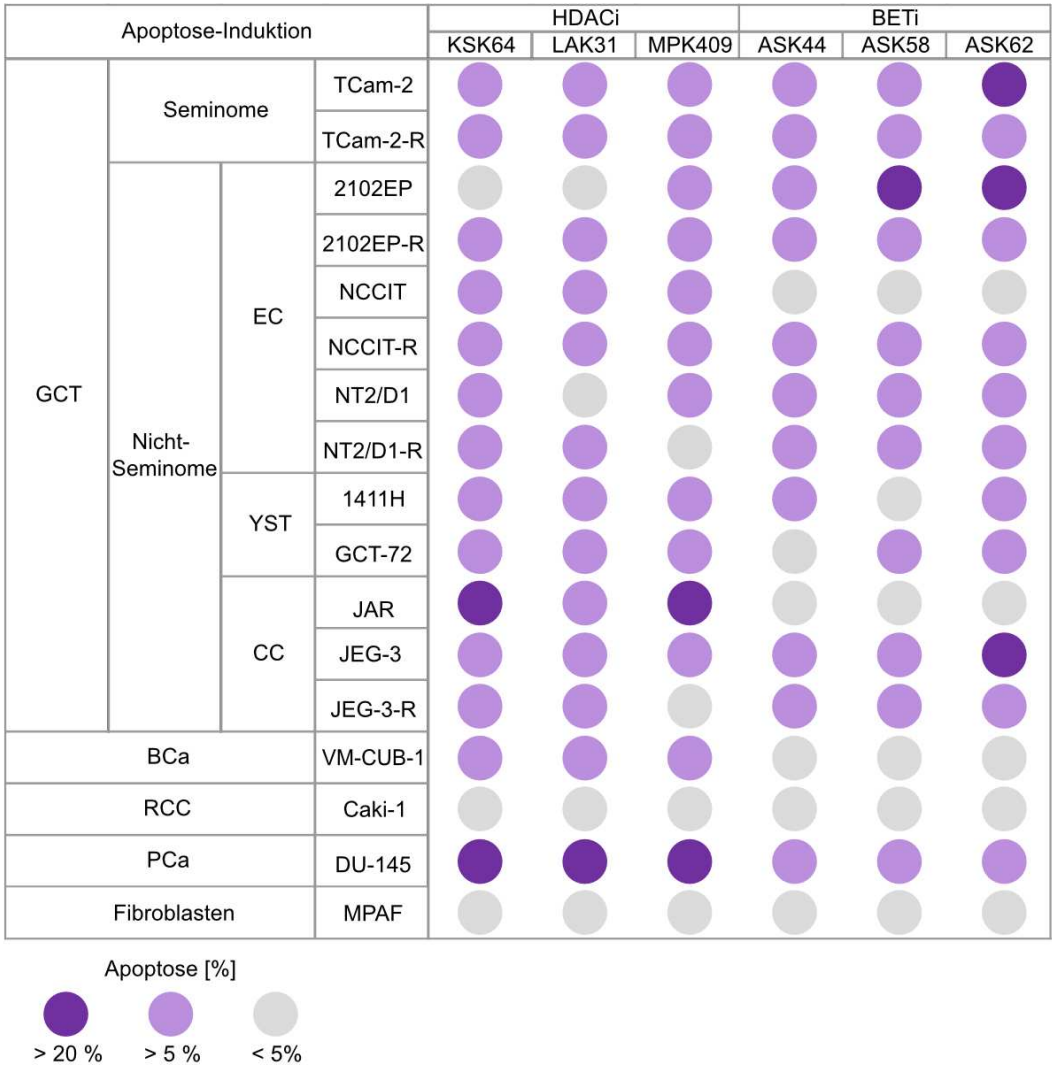


Abbildung 10: Durchflusszytometrische Analysen der Apoptose-Induktion 24 h nach Epi-Drugs-Behandlung.

Untersucht wurde eine breit gefächerte Auswahl von GCT-Zelllinien und einzelne Vertreter anderer urologischer Malignitäten, sowie eine Fibroblasten-Zelllinie. Die Behandlung fand für 24 h mit der LD_{50}-Dosis (48 h) der HDACi und BETi statt. Die Auswirkungen der Epi-Drugs wurden mit der Lösemittelkontrolle DMSO verglichen. Die Analysen der Apoptose-Induktion wurden farbcodiert (grau: Apoptose im Vergleich zu DMSO < 5 %; helllila: Apoptose im Vergleich zu DMSO zwischen 5 und 20 %; dunkellila: Apoptose im Vergleich zu DMSO > 20 %).

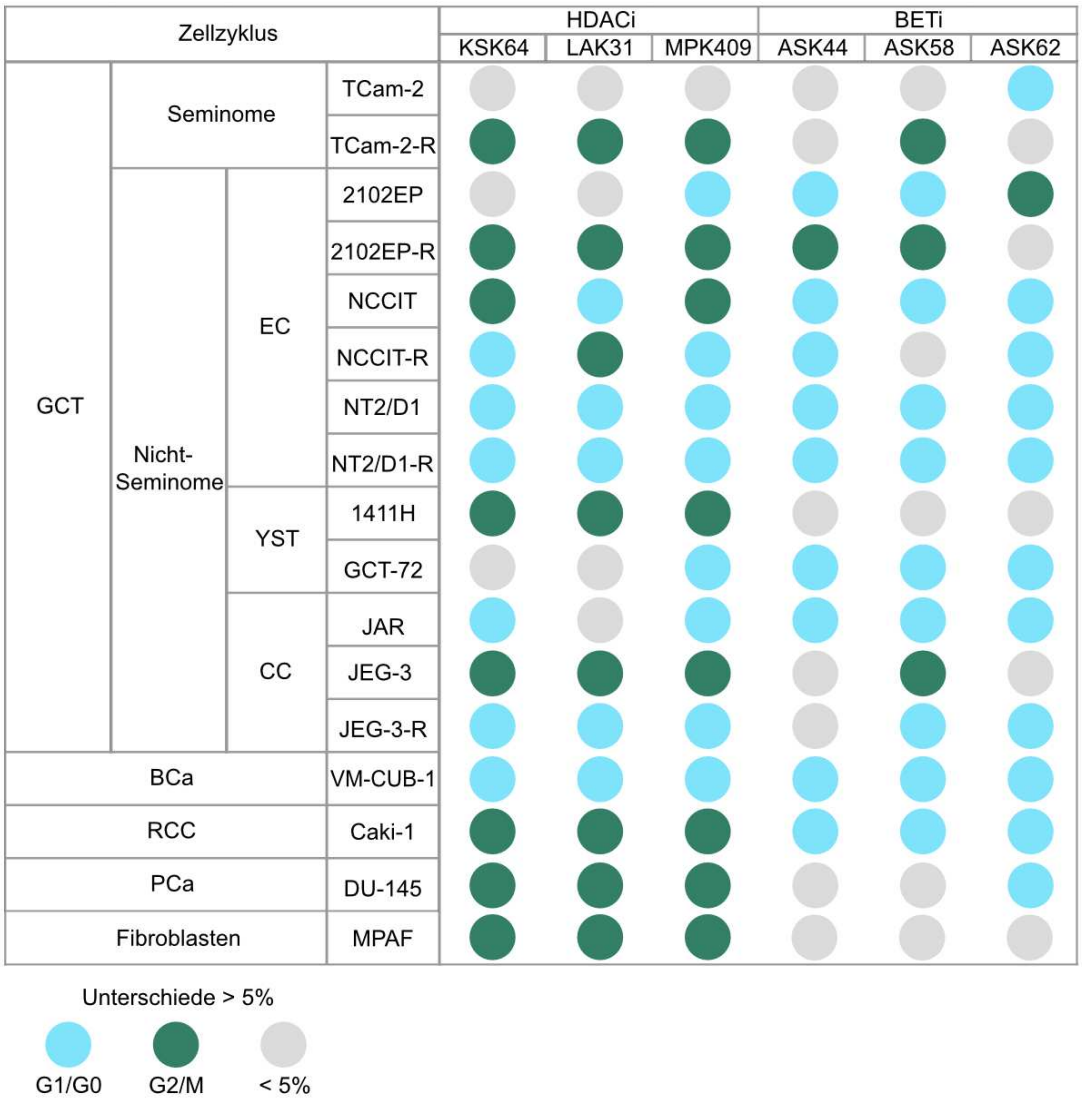


Abbildung 11: Durchflusszytometrische Analysen des Zellzyklus 24 h nach Epi-Drugs-Behandlung.

Untersucht wurde eine breit gefächerte Auswahl von GCT-Zelllinien und einzelne Vertreter anderer urologischer Malignitäten, sowie eine Fibroblasten-Zelllinie. Die Behandlung fand für 24 h mit der LD_{50}-Dosis (48 h) der HDACi und BETi statt. Die Auswirkungen der Epi-Drugs wurden mit der Lösemittelkontrolle DMSO verglichen. Die Analysen des Zellzyklus wurden farbcodiert (grau: Unterschiede zu DMSO < 5 %; hellblau: > 5 % erhöhter Anteil in G1/G0-Phase im Vergleich zu DMSO; dunkelgrün: > 5 % erhöhter Anteil in G2/M-Phase im Vergleich zu DMSO).

3.4. Analyse der Chromatinzugänglichkeit nach HDACi-Behandlung

Über Hochdurchsatzmethoden wurden die Effekte der neuartigen Epi-Drugs auf molekularer und epigenetischer Ebene charakterisiert.

Um die Auswirkungen der neuartigen HDACi auf die Chromatinzugänglichkeit von Tumorzellen zu untersuchen, wurde ATAC-Seq mit dem potentesten HDACi (LAK31) durchgeführt. Hierzu wurden vier Tumorzelllinien unterschiedlicher urologischer Entitäten (GCT: 2102EP; BC: VM-CUB-1; RCC: Caki-1; PCa: DU-145) herangezogen. Als Grundlage der Hochdurchsatzanalysen wurden Western Blots der Veränderungen pan-Histon3-Acetylierung (pan-H3ac) nach HDACi-Behandlung (KSK64, LAK31 und MPK409) durchgeführt (siehe Abbildung 12). Die Inhibitorkonzentrationen wurden basierend auf den LD_{50}-Werten (48 h) der jeweiligen HDACi-Zelllinien Kombination gewählt (siehe Abbildung 7 und Abbildung 8). Alle Zelllinien zeigten bereits nach einer kurzen Behandlungsdauer von 16 h einen Anstieg der Histon-H3-Acetylierung im Vergleich zur Lösemittelkontrolle DMSO auf. Am stärkste fiel der Anstieg des Histon-H3-Acetylierung-Levels in der GCT-Zelllinie 2102EP aus, der geringste Anstieg war in der PCa-Zelllinie Caki-1 zu verzeichnen (siehe Abbildung 12). Als Positivkontrolle wurde der charakterisierte HDACi Romidepsin eingesetzt. Es ist beschrieben, dass eine erhöhte Histonacetylierung mit steigender Chromatinzugänglichkeit assoziiert ist.

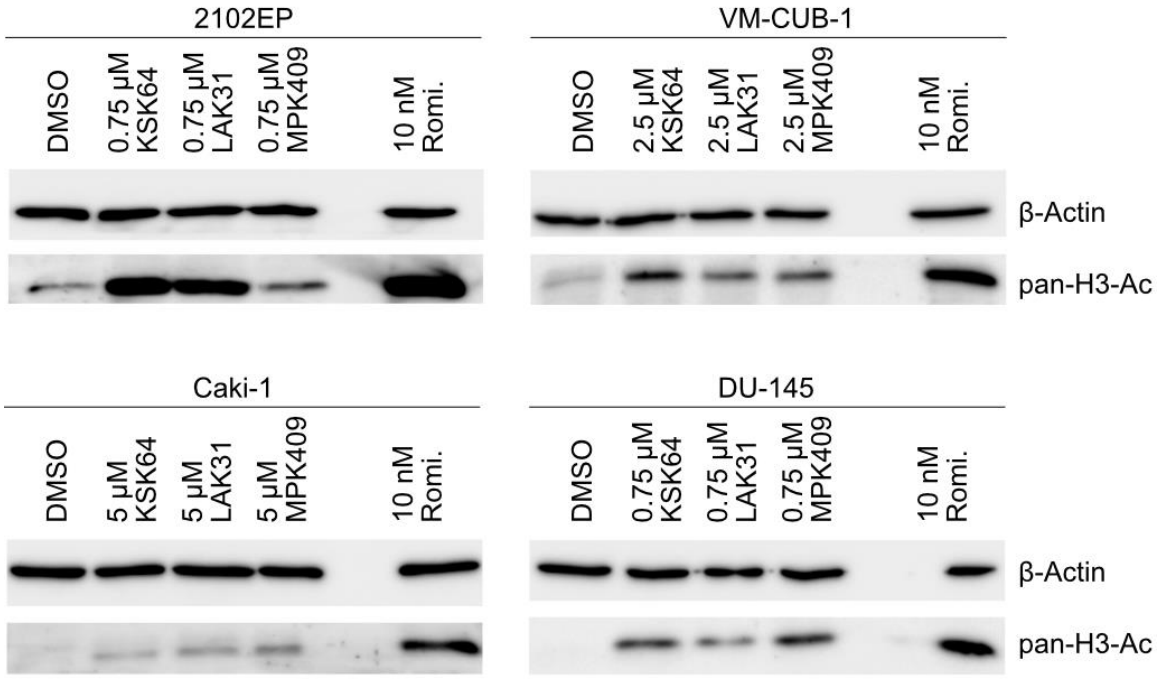


Abbildung 12: Western Blots zum Nachweis der ansteigenden Histon-H3-Acetylierung nach HDACi-Behandlung.

Dargestellt sind die Auswirkungen der HDACi-Behandlung (neuartige HDACi: KSK64, LAK31 und MPK409; herkömmlicher HDACi: Romidepsin, hier abgekürzt mit Romi.) auf die Histon-H3-Acetylierung

in vier Zelllinien unterschiedlicher urologischer Tumoren. Die Inhibitorkonzentrationen wurden basierend auf den LD_{50}-Werten der jeweiligen HDACi-Zelllinien Kombination gewählt. Die Western Blots wurden nach 16 h Behandlung durchgeführt.

Um die beobachteten globalen Effekte näher aufschlüsseln zu können, wurde in Zusammenarbeit mit dem Biotechnologie-Unternehmen Active Motif eine ATAC-Seq mit Zellen nach HDACi-Behandlung (LD_{50} 48h) für 16 h durchgeführt und mit Zellen, die ausschließlich der Lösemittelkontrolle (DMSO) ausgesetzt waren, verglichen. Diese Analyse wurde im ersten Schritt für eine repräsentative Zelllinie jeder urologischen Malignität mit dem potentesten neuartigen HDACi LAK31 durchgeführt (GCT: 2102EP; BCa: VM-CUB-1; RCC: Caki-1; PCa: DU-145). Um die Ergebnisse zu verifizieren, wurden in einer zweiten Analyse die Auswirkungen von herkömmlichen HDACi (Romidepsin und Quisinostat) mit dem neuartigen HDACi LAK31 auf die GCT-Zelllinie 2102EP verglichen. Die Analyse der ATAC-Seq ergab nach Normalisierung insgesamt 224.159 „*peak*“-Regionen nach LAK31-Behandlung der vier Zelllinien unterschiedlicher urologischer Malignitäten (siehe Abbildung 13 A links) und 109.103 absolute „*peak*“-Regionen nach Behandlung von 2102EP mit unterschiedlichen HDACi (Romidepsin, Quisinostat und LAK31) (siehe Abbildung 13 A rechts). In einer ersten Auswertung wurden anhand der Pearson-Korrelation-Koeffizient-Matrix globale Änderungen der Chromatinzugänglichkeit nach HDACi-Behandlung illustriert (siehe Abbildung 13 B). Die Zelllinie mit den stärksten Veränderungen der Chromatinzugänglichkeit nach LAK31-Behandlung war die GCT-Zelllinie 2102EP, die geringsten Effekte wies die PCa-Zelllinie DU-145 auf. Vergleicht man die Auswirkungen der verschiedenen HDACi auf die GCT-Zelllinie, so induzieren alle drei untersuchten HDACi eine vergleichbare Veränderung der Chromatinzugänglichkeit. In einer weiteren Analyse sind Veränderungen in „*gene bodies*“, „*promotors*“ und „*merge peak regions*“ dargestellt (siehe Abbildung 13 C). Die globalen Analysen zeigen, dass die ermittelten Auswirkungen auf die Zugänglichkeit des Chromatins sich nicht nur auf die Promotorregionen, oder gencodierenden Regionen beschränken, sondern gleichmäßig auf das Genom verteilt sind. Dies ist der Fall für alle beobachteten Zelllinien nach LAK31-Behandlung (siehe Abbildung 13 C links) und für 2102EP nach Behandlung mit unterschiedlichen HDACi (siehe Abbildung 13 C rechts, die Rohdaten der ATAC-Seq-Analysen sind in Anhang 9 beigefügt).

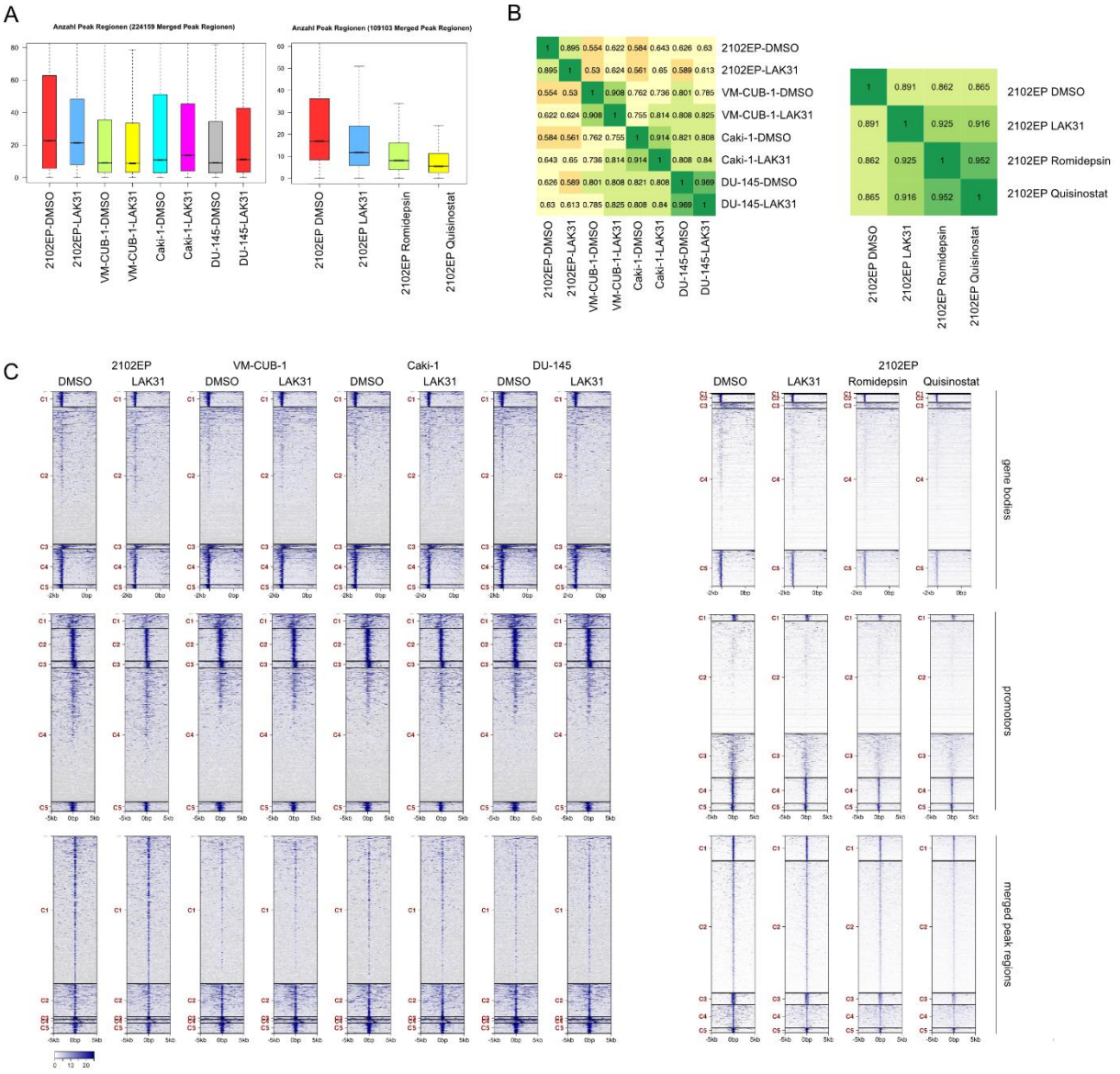


Abbildung 13: ATAC-Seq-Analyse nach HDACi-Behandlungen von vier repräsentativen Zelllinien unterschiedlicher urologischer Malignitäten.

Die Effekte wurden 16 h nach Inhibitor-Behandlung (LD_{50} 48 h) beobachtet. Es sind die Auswirkungen von LAK31-Behandlung in 2102EP, VM-CUB-1, Caki-1 und DU-145 dargestellt. Außerdem sind die Auswirkungen der HDACi (LAK31, Romidepsin und Quisinostat) im Vergleich zu DMSO in 2102EP dargestellt. A) Balkendiagramme der prozentualen Anteile der global gemessenen „*peak*"-Regionen nach HDACi-Behandlung im Vergleich zur Lösemittelkontrolle (DMSO). B) Pearson-Korrelation der Ähnlichkeiten der Auswirkungen auf die Chromatinzugänglichkeit nach HDACi-Behandlung im Vergleich zur Lösemittelkontrolle (DMSO). C) Verteilung der Auswirkungen auf die Chromatinzugänglichkeit auf die „*gene bodies*", Promotorregionen („*promotors*") und „*merged peak reagions*".

Als Übersichtsdarstellung wurden die von LAK31 induzierten, globalen Veränderungen von sich öffnenden und schließenden Chromatinabschnitten in einem Circos-Diagramm zusammengefasst. In allen vier Tumorzelllinien zeigte sich eine gleichmäßige Verteilung der veränderten Chromatinzugänglichkeit über das gesamte Genom (siehe Abbildung 14 A). Vergleichbare Resultate wurden für die Behandlung der GCT-Zelllinie 2102EP mit den gut charakterisierten HDACi (Romidepsin und Quisinostat) ermittelt. Als Negativkontrolle wurde

eine Behandlung von 2102EP mit dem BET-PROTAC MZ-1, von der keine starke Auswirkung auf die Chromatinzugänglichkeit erwartet wird, durchgeführt und analysiert. Es zeigten sich minimale Veränderungen der Chromatinzugänglichkeit über das gesamte Genom verteilt (siehe Abbildung 14 B).

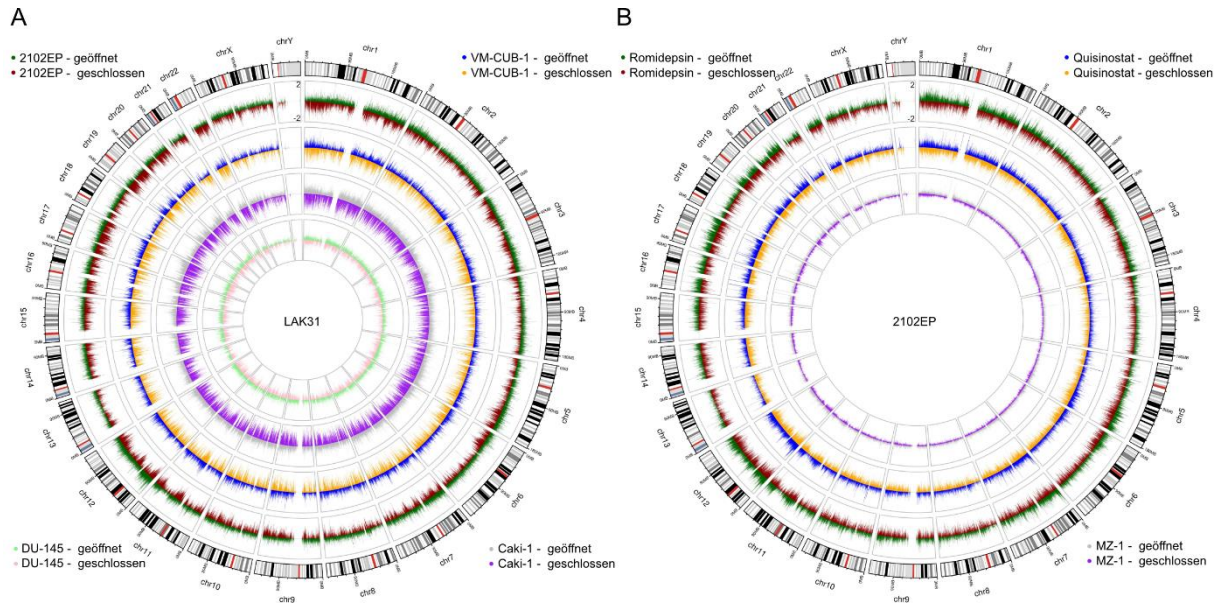


Abbildung 14: Circos-Diagramme der Änderungen der Chromatinzugänglichkeit nach HDACi-Behandlung.

Dargestellt sind die genomweiten signifikanten (Chromatin geöffnet: FC ≥ 2; Chromatin geschlossen: FC ≤ -2) Veränderungen der Chromatinzugänglichkeit nach A) LAK31-Behandlung von 2102EP (äußerster Ring), VM-CUB-1 (zweitäußerster Ring), Caki-1 (zweitinnerster Ring) und DU-145 (innerster Ring) und B) der Behandlung von 2102EP mit unterschiedlichen HDACi (Romidepsin: äußerster Ring, Quisinostat: mittlerer Ring). Behandlung mit einem BET-PROTAC diente als Negativkontrolle (MZ-1: innerer Ring).

Diese gleichmäßige Verteilung spiegelte sich auch in der absoluten Zahl von sich öffnenden Regionen zu sich schließenden Regionen wider. In Abbildung 15 sind alle signifikanten Veränderungen der Chromatinzugänglichkeit (FC, aus dem Englischen „f*old change“)* ≥ 2; bzw. FC ≤ -2) nach LAK31-Behandlung im Vergleich zur Lösemittelkontrolle (DMSO) dargestellt. Die Analyse zeigte, dass die Chromatinzugänglichkeit an mindestens gleichvielen Regionen abnimmt, wie sie an anderen zunimmt (siehe Abbildung 15 A). Diese Entdeckung widerspricht der Erwartung, dass HDACi eine globale Öffnung des Chromatins induzieren. Um auszuschließen, dass die gezeigten Widersprüche lediglich bei den neuartigen HDACi zu beobachten sind, wurden weitere ATAC-Seq-Analysen in der GCT-Zelllinien 2102EP mit dem bereits etablierten HDACi Romidepsin und Quisinostat inkludiert. Zusätzlich analysierten wir den BET-PROTAC MZ-1. Dieser wurde als Negativkontrolle genutzt, von welcher keine direkte Beeinflussungen der Chromatinzugänglichkeit erwartet wurde. Beide etablierten HDACi zeigten ein vergleichbares Profil der Änderungen der Chromatinzugänglichkeit wie der

neuartige Inhibitor LAK31. Die Auswirkungen von MZ-1 fielen gering aus (siehe Abbildung 15 B).

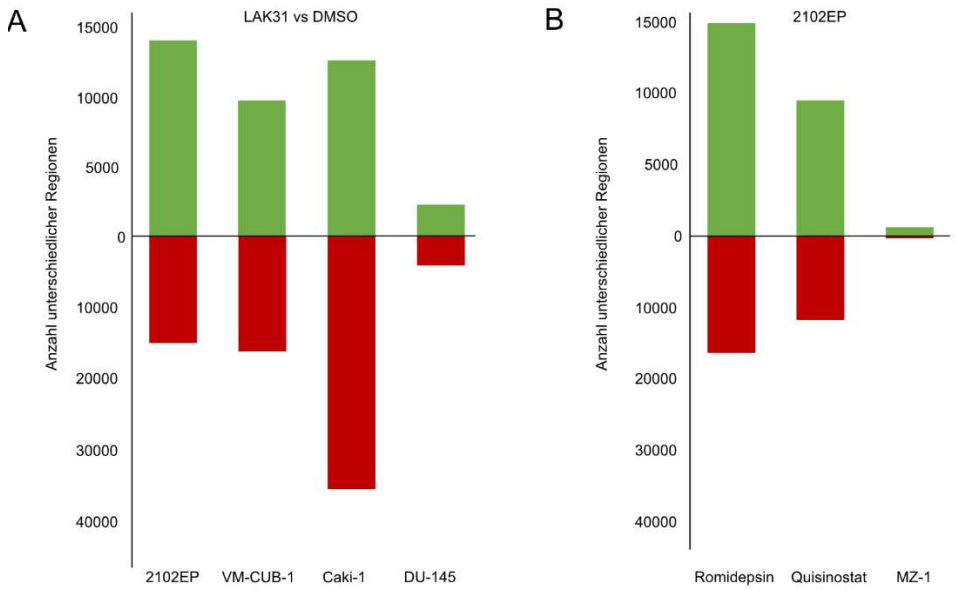


Abbildung 15: Balkendiagramme der signifikanten Veränderungen (geöffnetes Chromatin in Grün: FC ≥ 2, Chromatin geschlossen in Rot: FC ≤ -2) der Chromatinzugänglichkeit nach HDACi-Behandlung.

Da das Hauptaugenmerk dieser Studie auf den Keimzelltumoren liegt, wurde die GCT-Zelllinie 2102EP als Ausgangspunkt für tiefgehende Analysen genutzt.

Der HOMER-Algorithmus ermöglicht einen Vergleich von DNA-Datensätzen hinsichtlich überlappender Motive, die regulatorische Aufgaben innehaben (211). In dieser Studie identifizierte der HOMER-Algorithmus eine hohe Ähnlichkeit in der Wirkweise des neuartigen HDACi LAK31 mit den herkömmlichen HDACi (Romidepsin und Quisinostat). So zeigten beispielsweise alle drei Inhibitoren veränderte Chromatinzugänglichkeit in Transkriptionsfaktorbindestellen. Insgesamt wurden in den jeweiligen TOP50-Motiven von LAK31, 41 überlappende Motive in den Regionen mit erhöhter Zugänglichkeit und 35 überlappende Motive in den Chromatinregionen mit verminderter Zugänglichkeit identifiziert (siehe Abbildung 16 Venn Diagramme oben). Zu den DNA-Regionen mit erhöhter Zugänglichkeit nach HDACi-Behandlung zählten *FOS*- (*FOSL2*, *FRA1/2*) und *ATF3*-verwandte Motive. Die geschlossenen Regionen bestehen unter anderem aus Bereichen der Chromatin-Remodellierung und -Modifizierung, wie zum Beispiel *CTCF* und *CTCFL* (*BORIS*), aber auch Pluripotenzfaktoren (*OCT4* und *SOX2*) (siehe Abbildung 16 Balkendiagramme unten).

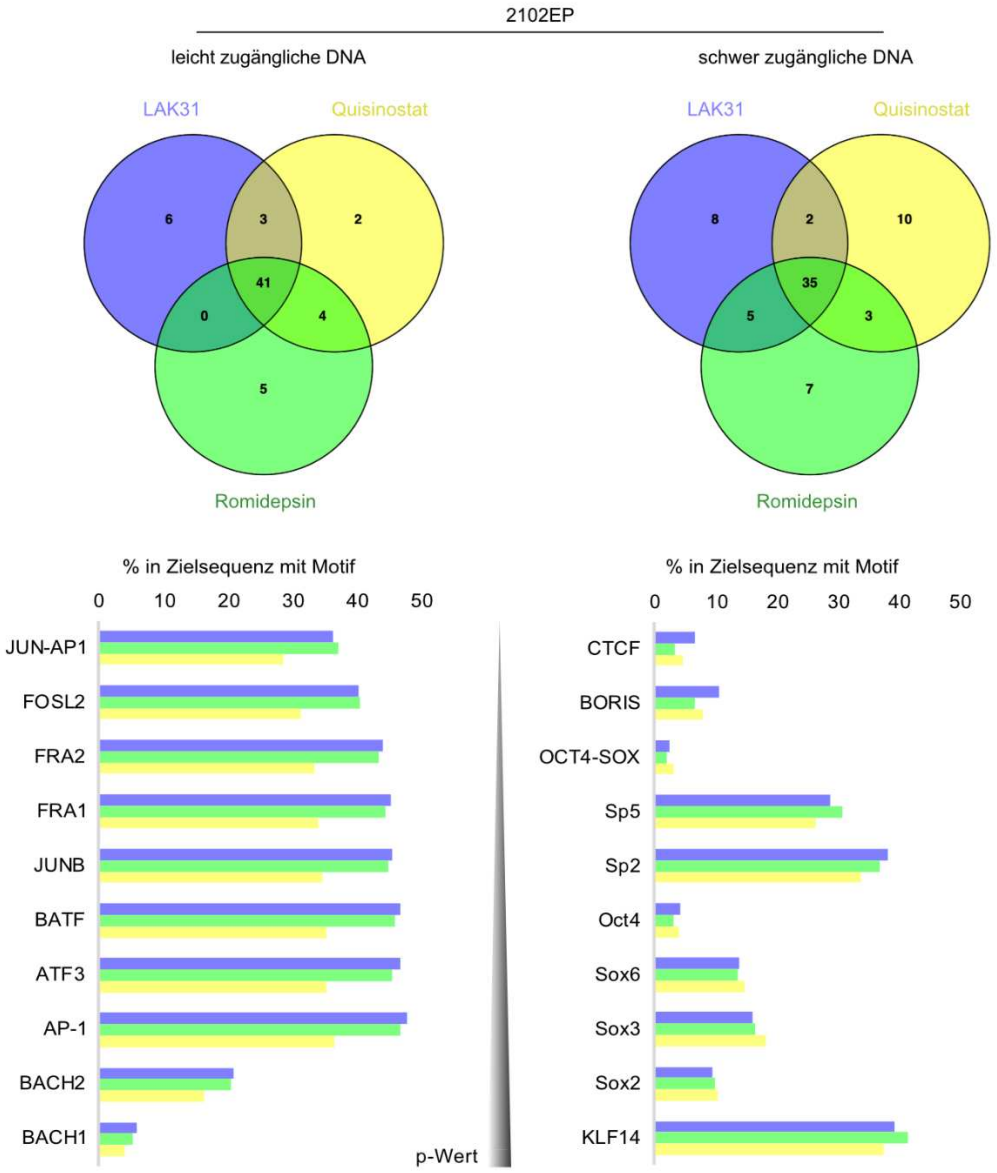


Abbildung 16: HOMER-Algorithmus-Analyse der Zugänglichkeitsveränderungen von Transkriptionsfaktoren in 2102EP nach HDACi-Behandlung.

Verglichen wurden die mittels ATAC-Seq erhobenen Daten der veränderten Chromatinzugänglichkeit von Transkriptionsfaktoren in der GCT-Zelllinie 2102EP nach Behandlung mit drei unterschiedlichen HDACi (LAK31, Romidepsin und Quisinostat). Die Abbildung zeigt links die Chromatinregionen mit erhöhter Zugänglichkeit und rechts die Chromatinregionen mit verringerter Zugänglichkeit. (Oben) Venn Diagramme der TOP50-Motive illustrieren die starke Überschneidung der Wirkweise des neuartigen HDACi LAK31 (blau) zu den herkömmlichen HDACi Romidepsin (grün) und Quisinostat (gelb) in der Zelllinie 2102EP. (Unten) Balkendiagramme zeigen detailliert die ähnlichen Auswirkungen der drei HDACi auf die TOP10-Bindungsmotive. Dargestellt sind die Verteilungen der beeinflussten Regionen der Transkriptionsfaktoren in Prozent. Die TOP10-Motive sind nach p-Wert-Signifikanz geordnet.

3.5. Analyse des Transkriptoms nach HDACi-Behandlung

Um die Auswirkungen der veränderten Chromatinzugänglichkeit auf das Transkriptom aufzuschlüsseln, wurde eine RNA-Seq durchgeführt. Um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit der beiden Sequenzierungsmethoden zu garantieren, wurden die Bedingungen gleich gehalten. Es wurden Zelllinien aus jeder Tumorentität (GCT: 2102EP; BC: VM-CUB-1; RCC: Caki-1; PCa: DU-145) nach 16 h LAK31-Behandlung (LD_{50} für 48 h) zur Lösemittelkontrolle verglichen. In einer ersten Übersichtsdarstellung wurden Vulcano Diagramme der deregulierten Transkripte (p-Wert ≤ 0,05; FC ≥ ± $\log_2 2$) nach HDACi-Behandlung illustriert. Über alle untersuchten Tumorzelllinien konnte ein Transkriptionsanstieg beobachtet werden (2102EP: 2526 Gene; VM-CUB-1: 4948 Gene; Caki-1: 4103 Gene; DU-145: 3010 Gene) (siehe Abbildung 17 A). Diese veränderte Genexpression zeigte sich auch in dem PCA-Diagramm (aus dem Englischen *„principal component analysis")* der RNA-Seq Daten (siehe Abbildung 17 B). Es wurden insgesamt 28.133 Gene aus allen Proben analysiert, wobei sich eine deutliche Auftrennung der Lösemittelkontrolle (dargestellt als Kreis) zu den HDACi-Behandlungen (dargestellt als Dreiecke) offenbart (siehe Abbildung 17 B, die Rohdaten der RNA-Seq-Analysen sind im Anhang 9 beigefügt).

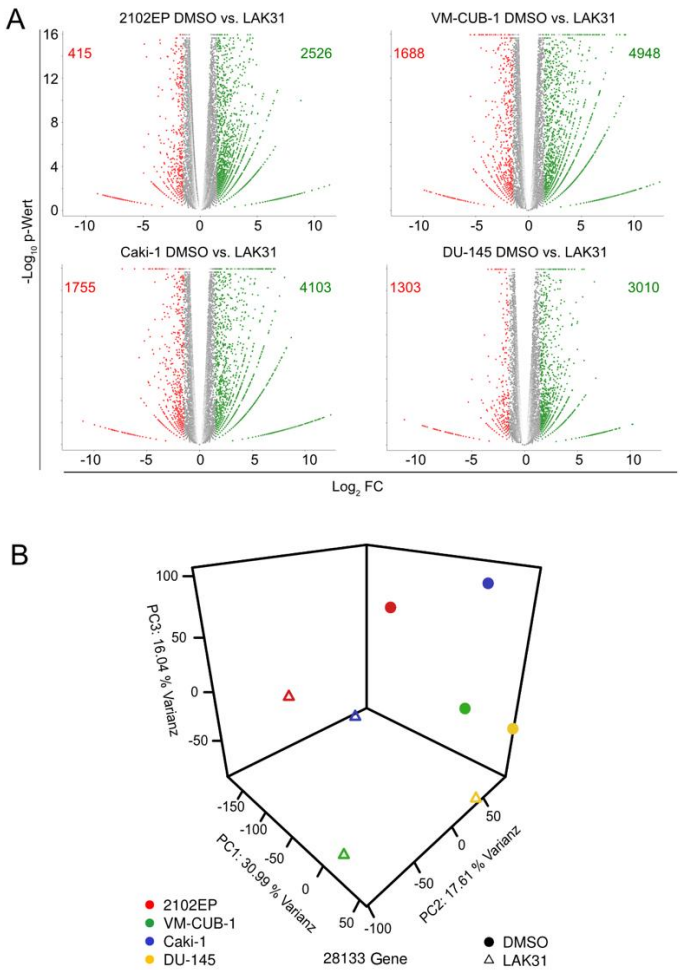


Abbildung 17: Globale Veränderungen der Transkriptionsrate nach LAK31-Behandlung in urologischen Malignitäten.

A) Vulcano Diagramme der durch RNA-Seq ermittelten Veränderungen der Transkriptionsrate nach 16 h LAK31-Behandlung im direkten Vergleich zur Lösemittelkontrolle DMSO in Zelllinien urologischer Malignitäten (GCT: 2102EP, BCa: VM-CUB-1, RCC: Caki-1 und PCa: DU-145). Die Anzahl der signifikant beeinflussten Gene ist in den oberen Ecken der Diagramme angegeben. Dargestellt sind Veränderungen mit FC ≥ 2 in Grün und FC ≤ -2 in Rot gegen den negativen dekadischen Logarithmus des p-Werts. B) Ein PCA-Diagramm der global veränderten Transkription nach LAK31-Behandlung (illustriert als Dreieck) im Vergleich zu DMSO (dargestellt als Kreis) in den vier beobachteten urologischen Entitäten (Rot: 2102EP, Grün: VM-CUB-1, Blau: Caki-1 und Gelb: DU-145).

In Anschluss an den dargestellten Überblick über die globalen Veränderungen des Transkriptoms nach LAK31-Behandlung, wurden funktionelle Analysen durchgeführt. Hierzu wurden nur Gene mit signifikanten Veränderungen der Transkription (FC ≥ 2 bzw. FC ≤ -2 und p-Wert ≤ 0,05) berücksichtigt. Venn-Diagramme zeigten gemeinschaftlich deregulierte Gene der untersuchten Zelllinien unterschiedlicher Tumorentitäten. Die Analysen ergaben 190 gemeinschaftlich heraufregulierte Gene, wohingegen lediglich sechs Gene herunterreguliert vorlagen (siehe Abbildung 18). Eine GO-Analyse („*gene ontology*") dieser gemeinschaftlich heraufregulierten Gene nach LAK31-Behandlung wurde durchgeführt. Identifizierte Gene inkludierten Faktoren, die mit der extrazellulären Matrix („*extracellular matrix*"), dem intra- und extrazellulärem Membrantransport („*intra- and extracellular membrane-associated*

trafficking“), der Zell-Zell Kommunikation („*cell-cell communication*“), dem Zytoskelett („*intracellular trafficking and cytoskeleton“, „cilium“)*, der Zellentwicklung („*cell projection*“), neuronalen Funktionen („*neuronal associated factors*“) und generellen Proteineigenschaften („*gylcoproteins*“ und „*disulfide bonds*“) assoziiert sind (siehe Abbildung 18).

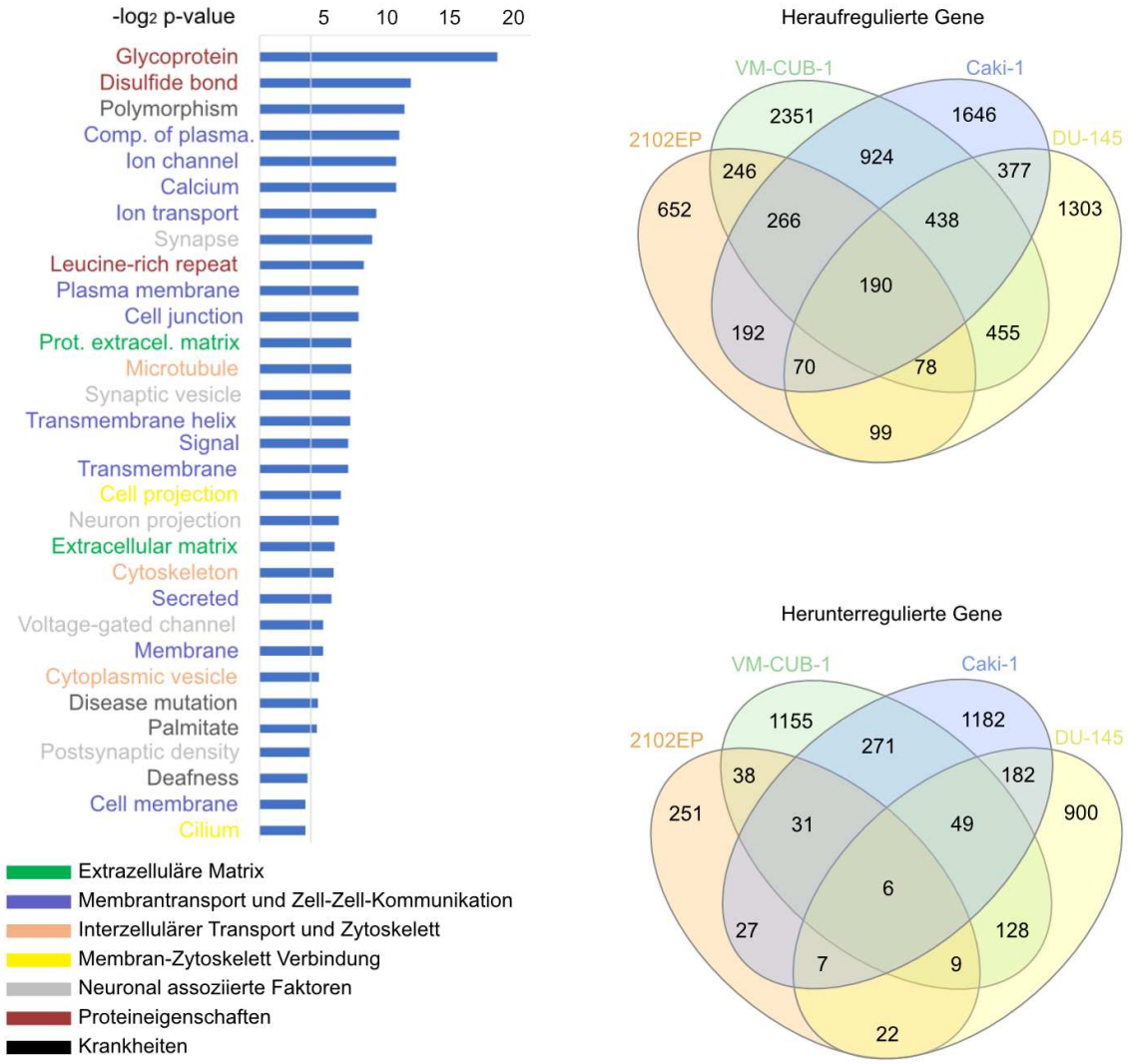


Abbildung 18: GO-Analyse und Venn-Diagramme von gemeinschaftlich herauf- und herunterregulierter Gene nach LAK31-Behandlung in urologischen Malignitäten.

Die Venn Diagramme zeigen die Auswirkungen der LAK-31 Behandlungen auf die Transkription, indem signifikant herauf- bzw. herunterregulierte Gene (FC ≥ 2 bzw. FC ≤ -2 und p-Wert ≤ 0,05) in allen vier untersuchten Zelllinien (2102EP, VM-CUB-1, Caki-1 und DU-145) illustriert sind. Das Balkendiagramm links spiegelt die DAVID-GO-Analyseergebnisse der 190 gemeinschaftlich heraufregulierten Gene an. Dargestellt sind signifikanten Analyseergebnisse gegen den -$\log_2$ p-Wert. Die Ergebnisse sind farbcodiert. Die zugehörige Legende ist unten links aufgelistet.

Mittels STRING-Netzwerk-Analyse (aus dem Englischen „*search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*“) wurden Interaktionen zwischen den in allen vier Zelllinien gemeinschaftlich heraufregulierten Genen identifiziert. Das Netzwerk inkludiert Histon-

codierende Gene (*HIST1H1B / H1E / H3H*) und einen Knotenpunkt aus Genen, die mit dem Motorprotein Dynein des Flagellums in Verbindung stehen (*DNAH2 / IL*). Das größte Netzwerk besteht aus Genen die mit der Kollagenbildung (*COL9A2 / 5A3 / 1A1)* und Ionenkanälen (*CACNA1G, GRIN1* und *SLC17A7*) assoziiert sind. Darüber hinaus ergab sich ein Netzwerk aus heraufregulierten Genen, die mit neuronaler Entwicklung und Differenzierung verknüpft sind (*CHRM4*, *DNAH2*, *DNER*, *DPYSL4*, *GIPR*, *GRIN1*, *LHX9*, *NCAM1*, *NDNF*, *NRXN2*, *NTRK1*, *NYAP1*, *PTGER3* und *SYP*, siehe Abbildung 19 A). Insgesamt wurden nur sechs Gene in allen Tumorentitäten gemeinschaftlich herunterreguliert, hierbei ergaben sich keine Interaktionen (siehe Abbildung 18).

Zur Verifizierung der RNA-Seq-Analysen wurden qRT-PCR der identifizierten Schlüsselgene in ausgewählten GCT-Zelllinien aller Entitäten (SE: TCam-2, EC: 2102EP, YST: GCT-72 und CC: JAR) nach HDACi-Behandlung durchgeführt. Diese Zelllinienauswahl wurde getroffen, da GCT das Hauptaugenmerk der Studie sind und so ein repräsentativer Datensatz über die molekularen Effekte der neuartigen Epi-Drugs auf die unterschiedlichen GCT-Entitäten analysiert werden konnte. Die Schlüsselgene ergaben sich aus einer Kombination der RNA-Seq-Daten und einigen Genen, die durch bekannte HDACi (Romidepsin) beeinflusst werden (192,218). Diese Analysen wurden mit den drei potentesten neuartigen HDACi (LAK31, KSK64 und MPK409) durchgeführt. Die Effekte der untersuchten HDACi ähnelten den Effekten des herkömmlichen HDACi (Romidepsin) in allen Tumorentitäten. Bei der Deregulation der Genexpression wurde eine Heraufregulation von Stress-Antwort-Faktoren, Apoptose-Faktoren und Zellzyklus-Regulatoren (*ATF3*, *CDKN1A*, *DHRS2*, *DUSP1*, *FOS* und *GADD45B*) ausgelöst, wohingegen *ATF5*, *CAP2* und *EFCAB2* herunterreguliert wurden. Die stärksten Effekte wurden von LAK31 induziert, mit den prominentesten Veränderungen in der GCT-Zelllinie 2102EP. Insgesamt zeigten alle beobachteten urologischen Malignitäten Auswirkungen auf die Expression von HDACi-Schlüsselgenen nach neuartiger HDACi-Behandlung auf (siehe Abbildung 19 B und Abbildung 19 C). Parallel zu den Analysen der HDACi wurden auch die Auswirkungen der neuartigen BETi (ASK44, ASK58 und ASK62) auf die etablierten Schlüsselgene von JQ1-Inhibition untersucht. Es zeigte sich eine Heraufregulation von Genen die mit der Stressantwort und der Zellzyklusregulation (*ATF3* und *CDKN1C*) assoziiert sind. Darüber hinaus zeigte sich die Herunterregulation der Expression eines *TGF-Beta*-Liganden, des Wachstumsfaktors (*GDF3*) und einer DNA-Methyltransferase (*DNMT3B).* Diese veränderte Expression von Schlüsselgenen zeigte einen deutlichen Einfluss der BETi auf die epigenetische Landschaft von Tumorzellen (siehe Abbildung 19 D). Die Analysen der BETi wurden nur in GCT-Zelllinien durchgeführt, da die anderen urologischen Malignitäten nur marginal von den (neuartigen) BETi beeinflusst wurden.

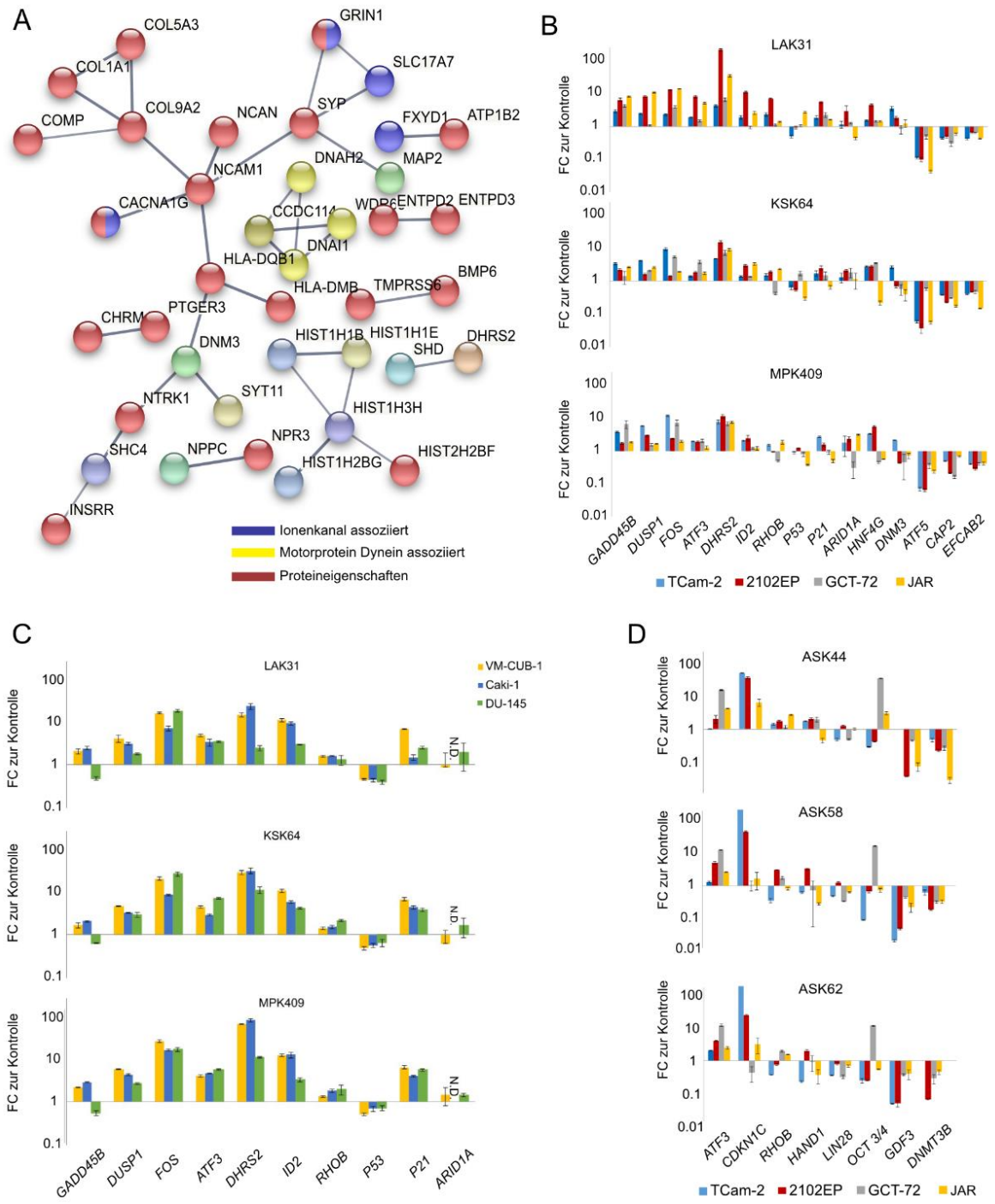


Abbildung 19: RNA-Seq Analyse STRING Netzwerkanalyse und qRT-PCR von Schlüsselgenen.

A) Eine STRING Netzwerkanalyse der 190 gemeinschaftlich heraufregulierten Gene nach LAK31-Behandlung von 2102EP, VM-CUB-1, Caki-1 und DU-145. Gene, die mit Ionenkanälen assoziiert sind, sind in blau dargestellt. Gelbe Punkte markieren Gene, die mit dem Motorprotein Dynein interagieren und in Rot sind Gene markiert, die nachweislich Proteineigenschaften beeinflussen. B), C) Validierung und Ausweitung der erhobenen Daten anhand von qRT-PCR Expressionsanalysen von Schlüsselgenen der HDACi nach Behandlung von GCT-Zelllinien (B) und Zelllinien anderer urologischer Malignitäten (C) mit den drei potentesten neuartigen HDACi (LAK31, KSK64 und MPK409). D) qRT-PCR Expressionsanalysen von Schlüsselgenen der BETi nach Behandlung mit den drei potentesten neuartigen BETi (ASK44, ASK58 und ASK62). Die qRT-Analysen wurden jeweils in vier repräsentativen GCT-Zelllinien (SE: TCam-2, EC: 2102EP, YST: GCT-72 und CC: JAR), sowie für die HDACi in Zelllinien anderer urologischer Malignitäten (BCa: VM-CUB-1, RCC: Caki-1 und PCa: DU-145) durchgeführt.

3.6. Korrelation der Hochdurchsatzdaten

Durch die Korrelation der molekularbiologischen Analysen (durchflusszytometrische Analysen und qRT-PCR) und der Hochdurchsatzverfahren (ATAC- und RNA-Seq) konnten lokusspezifische Veränderungen der Chromatinzugänglichkeit und Transkription nach LAK31-Behandlung ermittelt werden (siehe Abbildung 20). Im Vergleich der Auswirkungen auf unterschiedliche Tumorentitäten zeigte sich, dass die PCa-Zelllinie (DU-145) die geringsten Gemeinsamkeiten mit den restlichen Zelllinien aufwies. Hierbei ist hervorzuheben, dass in dieser Zelllinie auch insgesamt am wenigsten Veränderungen nach LAK31-Behandlung beobachtet wurden. Die BCa- (VM-CUB-1) und die RCC-Zelllinie (Caki-1) wiesen die höchsten Übereinstimmungen von Regionen mit heraufregulierter Transkription / Euchromatin (66 gemeinsame Regionen, siehe Abbildung 20 A) und herunterregulierter Transkription / Heterochromatin (116 gemeinsame Regionen, siehe Abbildung 20 B) auf. Gemeinschaftlich in allen vier untersuchten Tumorentitäten wurde *TEX14* (*Testis Expressed 14*) heraufreguliert und wies eine erhöhte Chromatinzugänglichkeit des Lokus auf. *TEX14* ist an der interzellulären Brückenbildung während der Spermatogenese beteiligt. Gegensätzlich lagen *KIRREL* und *MARVELD1* in allen Entitäten herunterreguliert und mit geringerer Chromatinzugänglichkeit vor. *KIRREL* (*Kirre Like Nephrin Family Adhesion Molecule 1*) induziert die Transaktivierung des Transkriptionsfaktors *AP-1* in Anwesenheit der TEC-Kinase. *MARVELD1* (*MARVEL Domain Containing 1*) inhibiert Proliferation und Migration und ist mit Mikrotubuli assoziiert (siehe Abbildung 20 C). Die Datenbank „*The Human Protein Atlas*“ zeigt, dass die Expression von *KIRREL* und *MARVELD1* einen signifikanten Einfluss auf die Prognose der Patienten einiger Tumoren (RCC, BCa, Lungenkarzinome und Gebärmutterhalskrebs) hat (siehe Abbildung 20 D) (219).

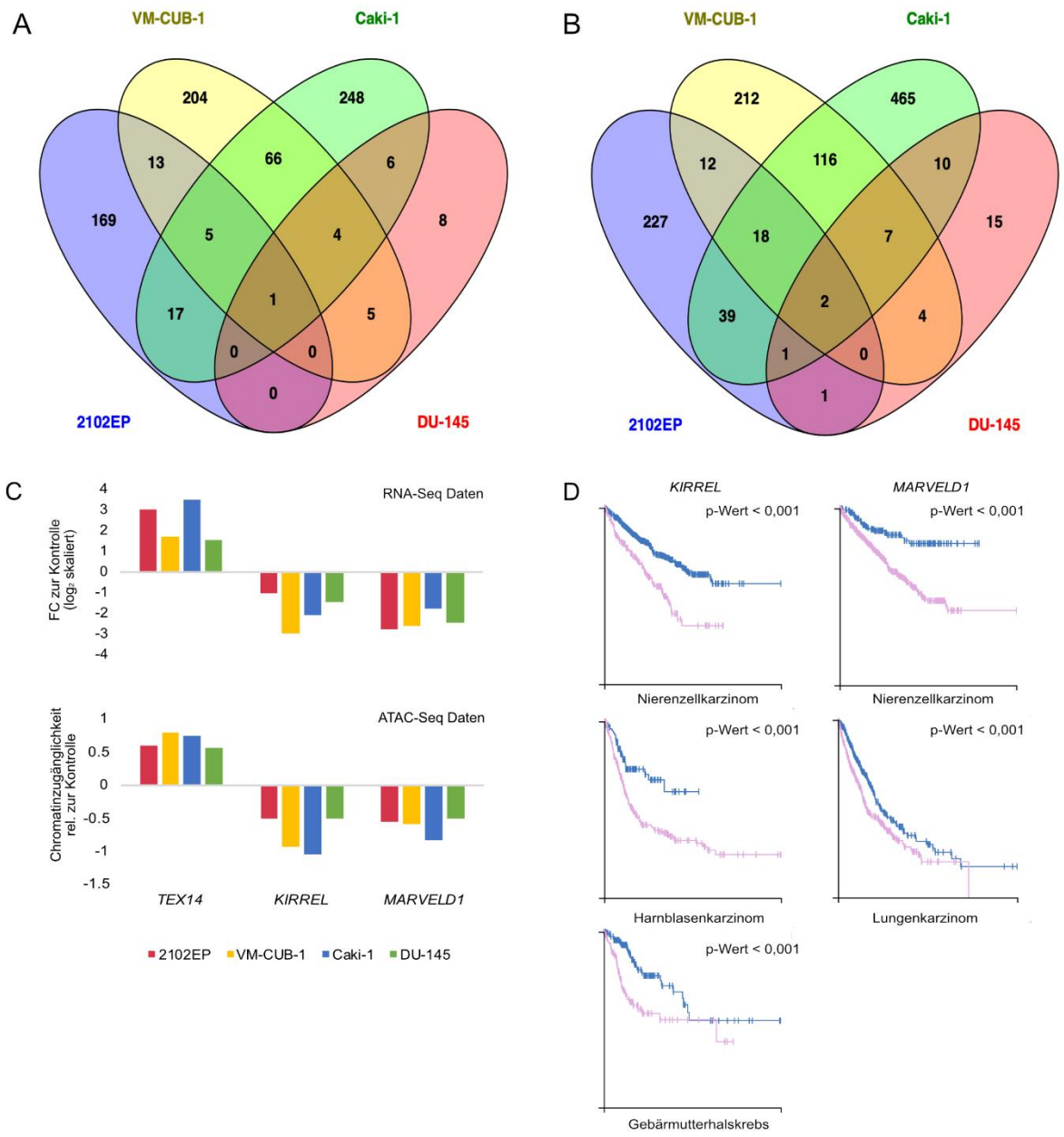


Abbildung 20: Korrelation der ATAC- und RNA-Seq-Analysen nach LAK31-Behandlung in urologischen Malignitäten.

Dargestellt sind VENN-Diagramme der Genregionen, die A) Euchromatin und heraufregulierte Genexpression, bzw. B) Heterochromatin und eine herunterregulierte Genexpression aufweisen. Gemeinsamkeiten der Tumorzelllinien 2102EP (GCT, in Blau), VM-CUB-1 (BCa, in Gelb), Caki-1 (RCC, in Grün) und DU-145 (PCa, in Rot) nach 16 h Behandlung mit dem HDACi LAK31 sind illustriert. C) Korrelation der RNA-Seq-Analysen, dem FC der Genexpression im Vergleich zur Lösemittelkontrolle und der ATAC-Seq Analysen, der Chromatinzugänglichkeit relativ zur Lösemittelkontrolle von *TEX14, KIRREL* und *MARVELD1.* D) Kaplan-Meier-Kurven zur prognostischen Signifikanz von *KIRREL*- und *MARVELD*-Expression in den dargestellten Tumorentitäten (entnommen aus „*The Human Protein Atlas*“) (219).

3.7. Neuartige HDAC-BET-Dual-Inhibitoren

Ausgehend von der Charakterisierung der HDAC- und BET-Mono-Inhibitoren wurden im Labor von Prof. Dr. Thomas Kurz drei neuartige HDAC-BET-Dual-Inhibitoren synthetisiert. Diese Fusionsmoleküle bestehen zum einen aus einer HDAC-Inhibitor-Domäne, an die ein Linker gebunden ist, an welchen wiederum die BET-Inhibitor-Domäne gekoppelt ist. In einer ersten Generation der Dual-Inhibitoren (LAK-FFK11) ersetze die BET-Inhibitor-Komponente die ursprüngliche CAP-Gruppe des HDACi. Zusätzlich wurden zwei weitere Fusionsmoleküle synthetisiert, bei denen die HDACi-CAP-Gruppe unverändert vorlag und die BET-Inhibitor-Komponente direkt an diese CAP-Gruppe konjugiert wurde (LAK129 und LAK-HGK7). Die Strukturformeln der konjugierten Dual-Inhibitoren sind in Abbildung 21 illustriert.

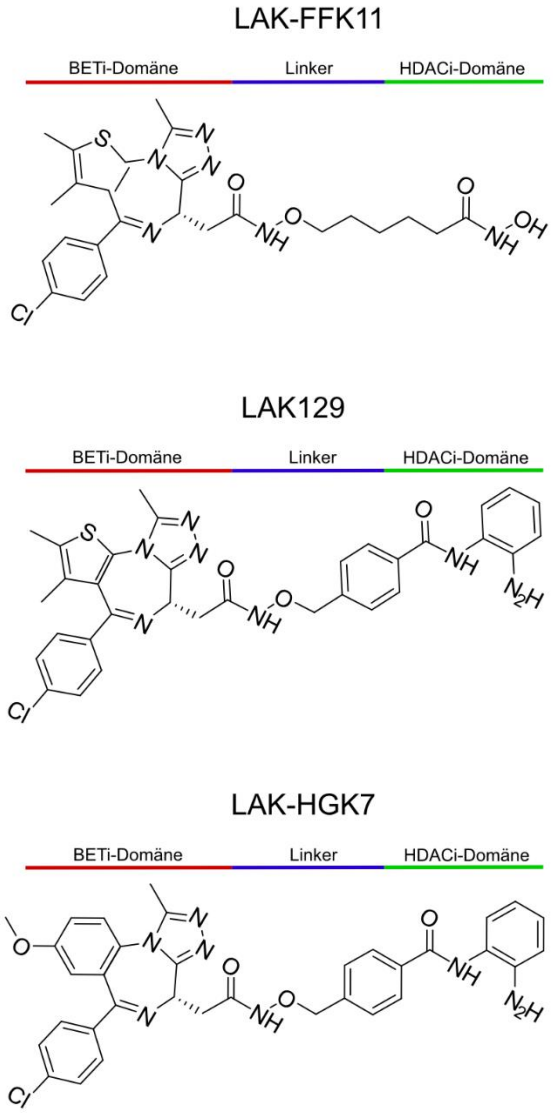


Abbildung 21: Strukturformel der neuartigen HDAC-BET-Dual-Inhibitoren.

Die neuartigen Fusionsmoleküle wurden im Labor von Prof. Dr. Kurz von Dr. Alvarez hergestellt. Sie bestehen grundsätzlich aus einer HDACi-Domäne, die über einer Kopplungsgruppe („*Linker*") an eine BETi-Domäne gebunden ist. Von oben nach unten: LAK-FFK11, LAK129 und LAK-HGK7.

In einer ersten Analyse wurden Enzymassays exemplarisch für eines der neuartigen Fusionsmoleküle durchgeführt, um sicher zu stellen, dass nach Kopplung beide Inhibitor-Komponenten funktionsfähig sind. Die Enzymassays wurden von der Firma Reaction Biology (Malvern, USA) durchgeführt. Es wurde die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) des Dual-Inhibitors LAK-FFK11 zu HDAC- und BET-Enzymen ermittelt. Je niedriger dieser IC_{50}-Wert ist, desto höher ist die Affinität des Inhibitors zum Enzym. Es zeigte sich, dass LAK-FFK11 HDAC1 / 3 / 6 mit einer hohen Affinität (IC_{50}-Werte im hohen nanomolaren Bereich) und BRD2 / 3 / 4 / T (IC_{50}-Werte im niedrigen nanomolaren Bereich) mit hoher Affinität targetiert. Als Vergleichssubstanzen wurden die IC_{50}-Daten von gut charakterisierten epigenetischen Inhibitoren JQ1 (BETi) und Trichostatin A (TSA, HDACi) herangezogen (siehe Tabelle 19).

Tabelle 19: Ein Enzymassay des HDAC-BET-Dual-Inhibitors LAK-FFK11 ermittelt IC_{50}-Werte gegen HDAC- und BET-Enzyme.

Als Vergleichssubstanzen wurden der BETi JQ1 und der HDACi TSA angegeben. Dargestellt sind die IC_{50}-Werte in nM-Konzentrationen.

IC_{50} [nM] BET-Enzyme				
Substanz	BRD2	BRD3	BRD4	BRDT
LAK-FFK11	12,3	2,7	9,4	16,7
JQ1	36,9	46,7	58,3	198,9

IC_{50} [nM] HDAC-Enzyme						
Substanz	HDAC1	HDAC2	HDAC3	HDAC6	HDAC8	HDAC11
LAK-FFK11	472,3	1065,0	633,0	50,0	1816,0	15860,0
TSA	2,3	5,0	3,0	1,0	856,5	4693,0

Um diese Aktivitäten zu validieren, wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Die aktive HDACi-Domäne wurden anhand erhöhter Histon-H3-Acetylierungen (H3pan-Ac) nach Dual-Inhibitor-Behandlung verifiziert. Die Analysen konnten bereits nach 16 h Behandlung einen Anstieg der Histon-Acetylierung in Tumorzelllinien unterschiedlicher GCT-Entitäten (TCam-2, 2102EP und JAR) nachweisen. Für die Behandlung wurden die LD_{50}-Konzentrationen nach 48 h verwandt. Der stärkste Anstieg der Histon-3-Acetylierung war in 2102EP zu beobachten,

wohingegen in TCam-2 die geringsten Auswirkungen induziert wurden (siehe Abbildung 22 A). Da gezeigt wurde, dass BETi wie JQ1 eine verminderte Chromatinzugänglichkeit in anderen Krebsentitäten (Magenkrebs) auslösten (220), wurde der Status der Histon-3-Acetylierung nach Behandlung mit dem Dual-Inhibitor LAK-FFK11 mit den Auswirkungen des zugrundeliegenden HDACi LAK31 verglichen. Beide neuartigen Inhibitoren führten zu einem vergleichbaren Anstieg an Histon-3-Acetylierung. Somit konnte gezeigt werden, dass die BET-Inhibitor-Komponente des Dual-Inhibitors die erhöhte Histon-Acetylierung nicht negiert. Außerdem konnte anhand steigender *cleaved* (aus dem Englischen übersetzt: gespalten) PARP-Level nachgewiesen werden, dass die beobachtete Apoptose über den *PARP*-Signalweg induziert wurde (siehe Abbildung 22 B).

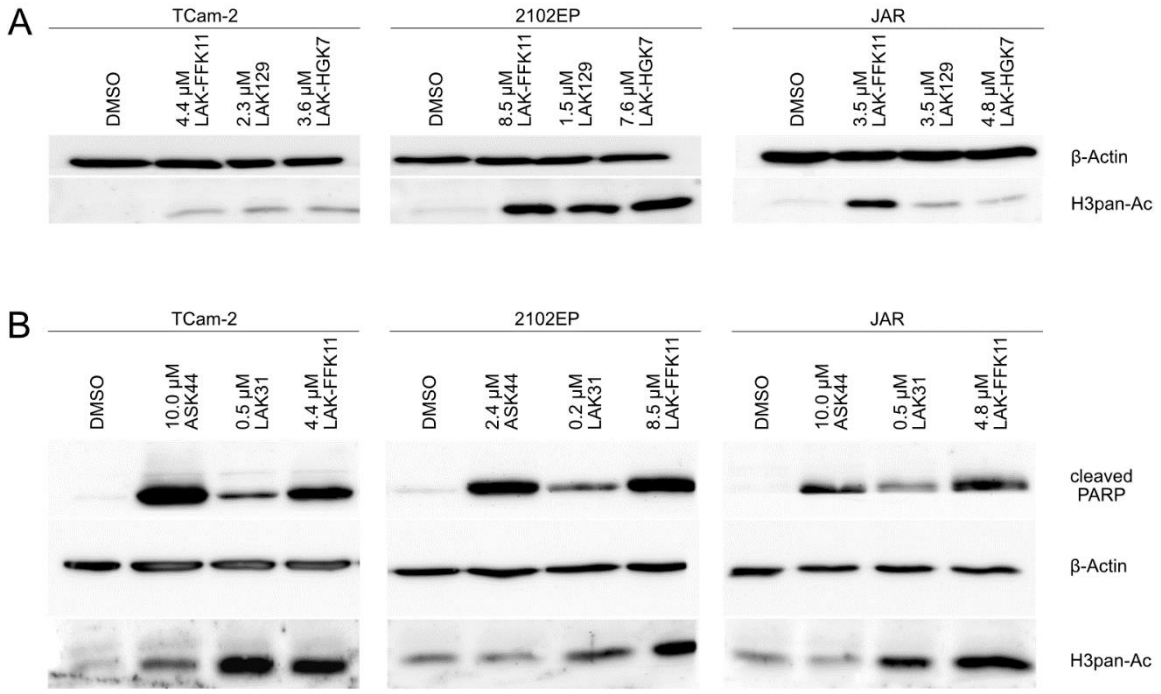


Abbildung 22: Western Blot-Nachweise der ansteigenden Histon-3-Acetylierung 16 h nach Behandlung mit Dualinhibitoren.

A) Western Blot von TCam-2, 2102EP und JAR 16 h nach Behandlung (LD_{50} nach 48 h) mit den drei HDAC-BET-Dual-Inhibitoren (LAK-FFK11, LAK129 und LAK-HGK7) zeigt einen Anstieg der Histon-3-Acetylierung. B) Nachweis der Zunahme von *cleaved* PARP nach Behandlung mit ASK44, LAK31 und LAKFFK11 nach 16 h Behandlung (LD_{50} nach 48 h) in TCam-2, 2102EP und JAR. Außerdem ansteigende Histon-3-Acetylierung (H3pan-Ac) nach LAK31 und LAK-FFK11-Behandlung.

Nachdem die Validierung der Aktivität der Fusionsmoleküle abgeschlossen war, wurde mittels XTT-Zellviabilitätsassays die Potenz der Dual-Inhibitoren ermittelt. Die daraus resultierenden LD_{50}-Werte für alle untersuchten GCT-, BCa-, PCa- und RCC-Zelllinien sind in µmol/L angegeben (siehe Abbildung 23). Es zeigte sich die höchste Aktivität in GCT-Zelllinien, die je

nach Zelllinie zwischen 0,1 – 10 µmol/L lag. Die Fusionsmoleküle zeigten geringere Effektivität in den anderen urologischen Tumorentitäten (BCa: SCaBER, RT-112; RCC: Caki-1, 786-O, ACHN; PCa: DU-145, PC-3). Ausnahme hierbei waren die sensitiven Zelllinien VM-CUB-1 (BCa) und LNCaP (PCa). In der Analyse von gesunden Kontrollzelllinien (Fibroblasten, Keratinozyten, Endothelzellen, T-Lymphozyten und Monozyten) zeigte sich eine erhöhte Toleranz gegenüber den Dual-Inhibitoren, im Vergleich zu den GCT-Zelllinien. Als potenteste der drei Fusionsmoleküle konnte LAK-FFK11 ermittelt werden (siehe Abbildung 23).

Tumorentität			Zelllinie	HDAC-BET-Dual-Inhibitor		
				LAK-FFK11	LAK129	LAK-HGK7
GCT	Seminome		TCam-2	4.4	2.3	3.6
			TCam-2-R	>10	3.0	3.5
	Nicht-Seminome	EC	2102EP	8.5	1.5	7.6
			2102EP-R	4.2	>10	>10
			NCCIT	7.0	0.1	0.9
			NCCIT-R	1.9	0.6	1.1
			NT2/D1	0.7	0.2	0.8
			NT2/D1-R	2.0	1.3	3.9
		YST	1411H	2.1	>10	4.9
			GCT-72	3.5	3.5	4.8
		CC	JAR	4.6	3.0	2.6
			JEG-3	6.5	2.8	3.5
			JEG-3-R	7.2	4.5	4.9
BCa			VM-CUB-1	>10	1.5	8.4
			SCaBER	>10	6.2	>10
			RT-112	>10	>10	>10
RCC			Caki-1	>10	>10	>10
			786-O	>10	>10	>10
			ACHN	>10	7.7	>10
PCa			DU-145	>10	>10	>10
			PC-3	>10	9.7	>10
			LNCaP	2.4	1.0	4.6
Fibroblasten			MPAF	>10	>10	7.2
			HVHF2	>10	>10	>10
Keratinozyten			HaCaT	>10	>10	>10
Endothelzellen			HUVEC	8.0	1.9	>10
T-Lymphozyten			JURKAT	6.7	>10	>10
Monozyten			THP-1	2.2	2.0	>10

LD_{50} 48h 0.5 µM 5 µM 10 µM

Abbildung 23: Toxizitätsscreening der neuartigen HDAC-BET-Dual-Inhibitoren in Zelllinien von GCT, BCa, RCC und PCa, sowie Normalzellen (Fibroblasten, Keratinozyten, Endothelzellen, T-Lymphozyten und Monozyten).

Dargestellt sind die LD_{50}-Werte [µM] für eine Behandlung über 48 h. Die LD_{50}-Werte sind farbcodiert, in Grün sind Werte unter 2,5 µM, in Gelb Werte zwischen 2,5 und 7,5 µM und in Orange Werte über 10 µM.

Analog zu den Mono-Inhibitoren wurde untersucht, ob die Fusionsmoleküle synergistische Effekte mit niedrigen Cis-Platin-Konzentrationen induzieren können. Eine Kombinationsbehandlung (LD_{10} bzw. LD_{25} 48 h) mit LAK-FFK11-Vorbehandlung (24 h vor

Gabe des Cis-Platins) und anschließende Cis-Platin-Behandlung zeigte, ähnlich wie die Mono-Inhibitoren, nur einen additiven Effekt (Abbildung 24). Es ist deutlich zu erkennen, dass die Viabilitätsminderung der Cis-Platin-resistenten Zelllinien vor allem durch den Dual-Inhibitor LAK-FFK11 begründet ist. Es gibt keine Anzeichen für einen synergistischen Effekt der Behandlung.

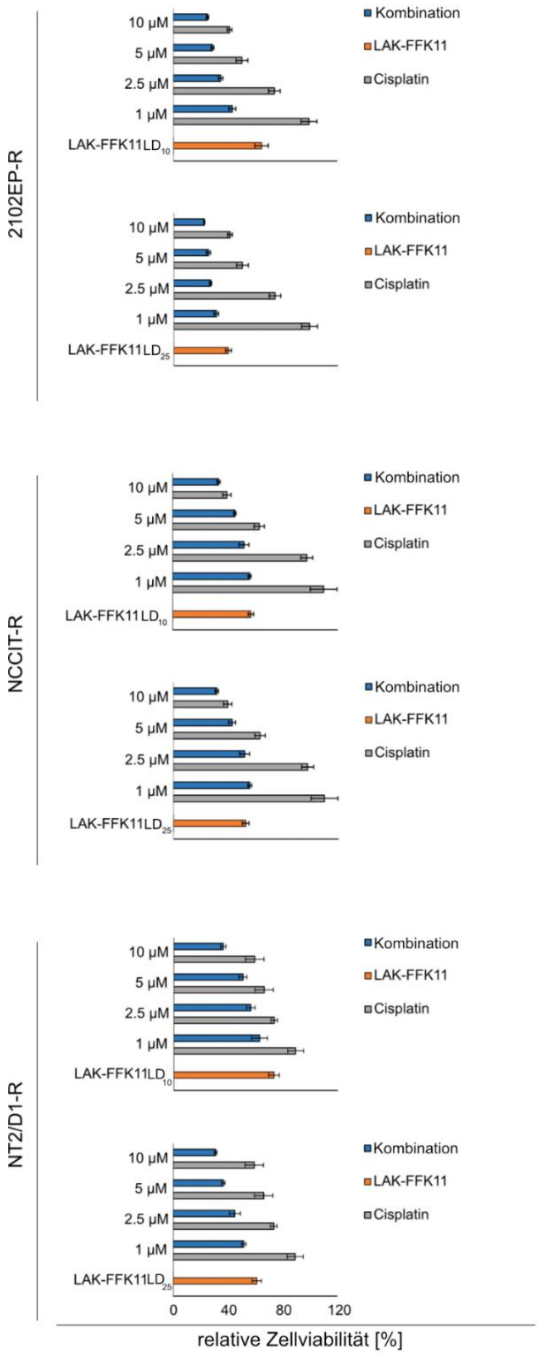


Abbildung 24: XTT-Zellviabilitätsassay in Cis-Platin-resistenten GCT-Zelllinien nach Kombinationsbehandlung mit dem Dual-Inhibitor LAK-FFK11 mit Cis-Platin über 48 h.

Die GCT-Zelllinien 2102EP-R, NCCIT-R und NT2/D1-R wurden zunächst mit einer geringen Dosis des HDAC-BET-Dual-Inhibitors vorbehandelt. LAK-FFK11 wurde in LD_{10} bzw. LD_{25} eingesetzt (Zellviabilität der Einzel-Behandlung nach 48 h in orange dargestellt). Die vorbehandelten Zellen wurden mit

unterschiedlichen Konzentrationen von Cis-Platin behandelt (1 – 10 µM). Die Zellviabilität der Kombinationsbehandlung ist in blau dargestellt, die Zellviabilität nach Cis-Platin-Applikation ohne Vorbehandlung mit Epi-Drugs ist in grau illustriert.

Durchflusszytometrische Messungen zeigten eine eindeutige Apoptose-Induktion (> 5 %) in GCT-Zelllinien bereits 24 h nach Behandlung mit den Dual-Inhibitoren (LD_{50} 48 h) (siehe Abbildung 25 A). Die anderen urologischen Tumorentitäten zeigten keine Anzeichen von Apoptose nach Behandlung mit der Höchstdosis (10 µmol/L). Um einen Einblick in den zugrundeliegenden molekularen Mechanismus der Apoptose-Induktion zu erlangen, wurden die Zellen neben den Fusionsmolekülen simultan mit einem Caspase-Inhibitor (Z-VAD-FMK) behandelt. Die Auslösung der Apoptose konnte hierbei verhindert werden. Die Kombinationsbehandlung weist somit darauf hin, dass die neuartigen HDAC-BET-Dual-Inhibitoren eine Caspase-abhängige Apoptose der GCT-Zelllinien einleiten (siehe Abbildung 25 B).

Betrachtet man die Einflüsse auf den Zellzyklus der Tumorzellen, induzieren die neuartigen Fusionsmoleküle nach 24 h Behandlung in der Mehrheit der untersuchten Tumorzelllinien einen G1/G0-Phasen Zellzyklusarrest (NCCIT(-R), NT2/D1 (-R), JAR und VM-CUB-1). Nur zwei Zelllinien (2102EP-R und JEG-3) wiesen eine Akkumulation in der G2/M-Phase auf, wohingegen einige Zelllinien mit unterschiedlichen Veränderungen des Zellzyklus auf die drei Fusionsmoleküle reagierten (TCam-2, 2102EP, 1411H, GCT-72 und Caki-1) (siehe Abbildung 25 C). Insgesamt ähneln die Auswirkungen der Dual-Inhibitoren auf den Zellzyklus der Tumorzellen eher denen der neuartigen BETi als den HDACi. Die untersuchten Fibroblasten (MPAF) zeigten auch bei der höchsten Konzentration keine Beeinträchtigung der Zellviabilität oder des Zellzyklus (siehe Abbildung 10, Abbildung 11 und Abbildung 25).

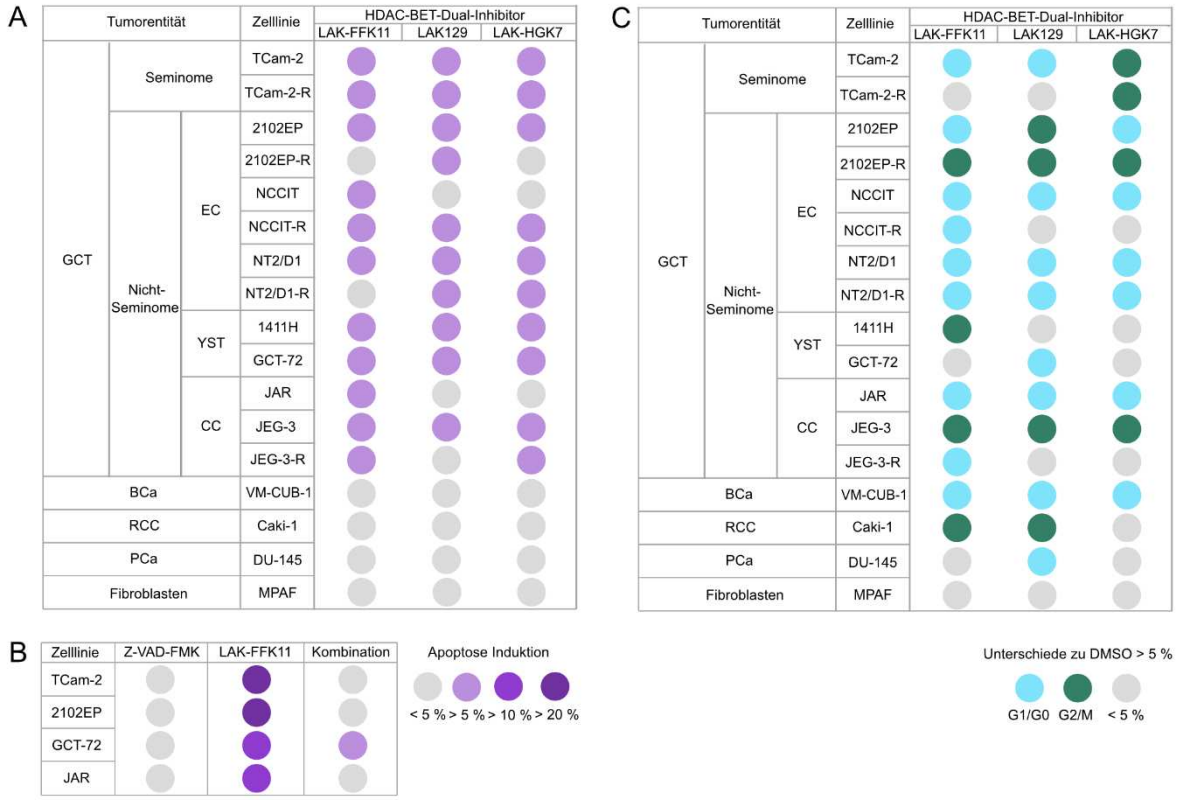


Abbildung 25: Durchflusszytometrische Analysen der Apoptose-Induktion und des Zellzyklus 24 h nach HDAC-BET-Dual-Inhibitor-Behandlung.

Untersucht wurde eine breit gefächerte Auswahl von GCT-Zelllinien und einzelne Vertreter anderer urologischer Malignitäten, sowie eine Fibroblasten-Zelllinie. Die Behandlung fand für 24 h mit der LD_{50}-Dosis (48 h) der drei Dual-Inhibitoren (LAK-FFK11, LAK129 und LAK-HGK7) statt. Die Auswirkungen der Epi-Drugs wurden mit der Lösemittelkontrolle DMSO verglichen. A) Farbcodierte Darstellung der Apoptose-Induktion nach 24 h. In grau sind nicht-signifikante Veränderungen dargestellt (< 5 %), wohingegen unterschiedlich starke Apoptose-Induktion in lila dargestellt ist (helllila 5 – 10 %, lila 10 – 20 % und dunkellila > 20 %). B) Vorbehandlung der Zellen mit dem Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK induziert allein keine Apoptose, und verhindert eine starke Apoptose-Induktion durch die Dual-Inhibitoren. C) Die Analysen des Zellzyklus wurden farbcodiert (grau: Unterschiede zu DMSO < 5 %; hellblau: > 5 % erhöhter Anteil in G1/G0-Phase im Vergleich zu DMSO; dunkelgrün: > 5 % erhöhter Anteil in G2/M-Phase im Vergleich zu DMSO).

Molekulare Analysen der Schlüsselgene der Einzelkomponenten (HDACi und BETi) wurden mittels qRT-PCR in GCT-Zelllinien (TCam-2, 2102EP, GCT-72 und JAR) nach 24 h Behandlung mit HDAC-BET-Dual-Inhibitoren durchgeführt (siehe Abbildung 26). Es zeigten sich ein HDACi-charakteristische erhöhte Expression von *GADD45B, DUSP1* und *DHRS2* und BETi-charakteristische Herunterregulation von *OCT3/4* und *GDF3*. Die Analyse ergibt die stärksten Auswirkungen nach Behandlung von 2102EP mit LAK-FFK11. Die geringsten Effekte haben die drei Dual-Inhibitoren auf die CC-Zelllinie JAR. Diese Beobachtungen validierten die Aktivität beider Inhibitor-Bestandteile der multiselektiven Fusionsmoleküle.

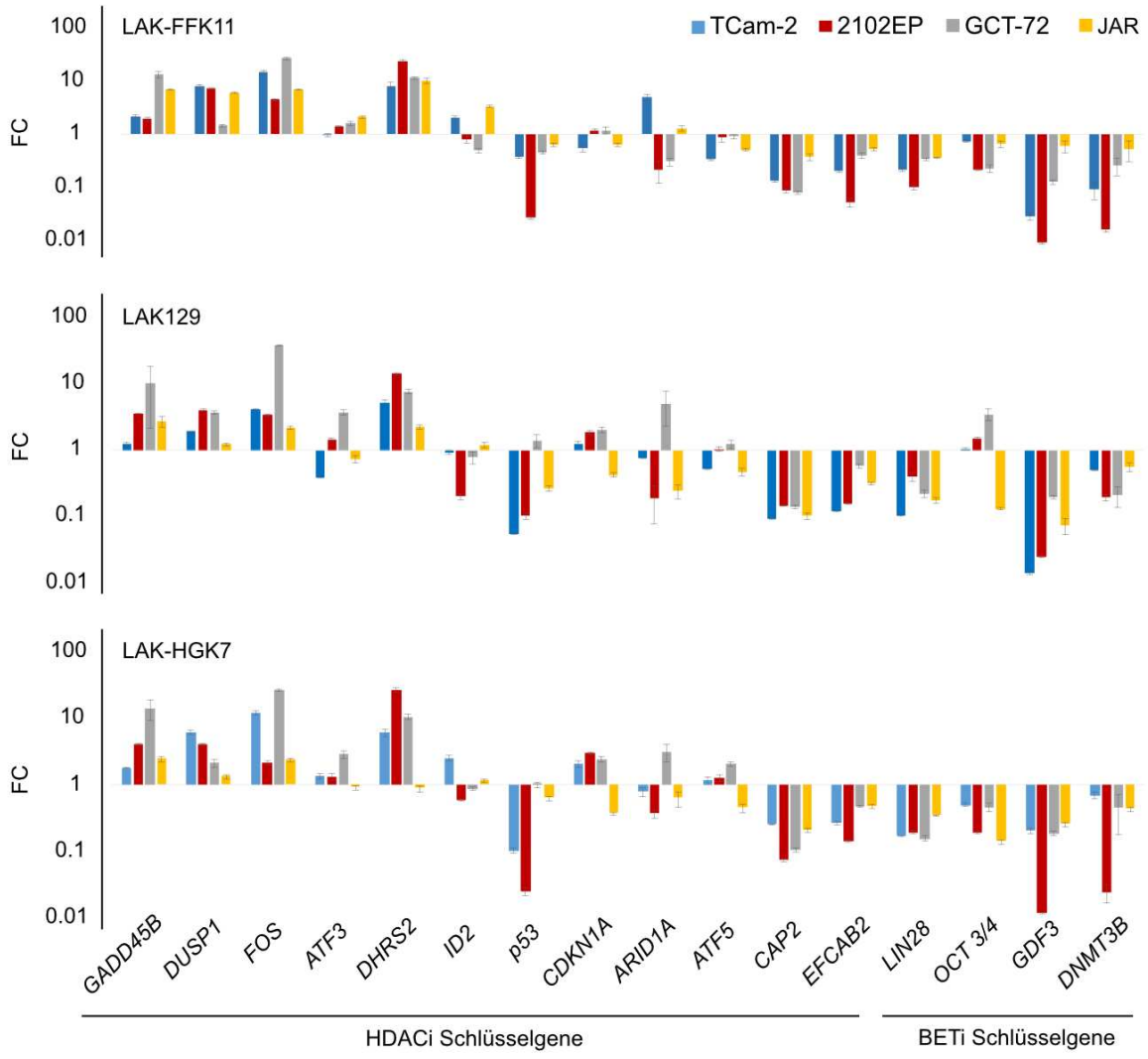


Abbildung 26: qRT-PCR Analysen der Schlüsselgene von HDACi und BETi nach HDAC-BET-Dual-Inhibitor-Behandlung in GCT-Zelllinien.

Dargestellt sind die durch die neuartigen HDAC-BET-Dual-Inhibitoren (LAK-FFK11, LAK129 und LAK-HGK7) induzierten Effekte auf die Transkription der GCT-Zelllinien TCam-2 (blau), 2102EP (rot), GCT-72 (grau) und JAR (gelb) nach 24 h Behandlung. Der $\log_{10}$ des FC der veränderten Genexpression ist mit Fehlerbalken illustriert.

Um ein tieferes Verständnis für die molekulare Wirkweise des Dual-Inhibitors LAK-FFK11 zu entwickeln, wurde die GCT-Zelllinie 2102EP nach 16 h Behandlung (LD_{50} 48 h) exemplarisch untersucht. Um die Auswirkungen der Veränderungen der epigenetischen Landschaft nachzuvollziehen, wurden mittels ATAC-Seq Veränderungen der Chromatinzugänglichkeit untersucht, und das Transkriptom wurde über RNA-Seq analysiert. Anhand eines PCA-Diagramms wurden die Unterschiede der DNA-Zugänglichkeit der LAK-FFK11 behandelten Zellen zur Lösemittelkontrolle (DMSO) und den untersuchten HDACi (Quisinostat, Romidepsin und LAK31) in 2102EP visualisiert (siehe Abbildung 27 A). Der Dual-Inhibitor (Stern) zeigte einen deutlichen Unterschied zu der DMSO-Kontrolle (schwarzer Punkt), und eine höhere

Übereinstimmung zu dem Cluster der HDACi (unterschiedlich farbige Dreiecke). Diese Darstellung validiert die Aktivität beider Inhibitor-Komponenten des Fusionsmoleküls LAK-FFK11. Betrachtet man die Anzahl der globalen Veränderungen der Chromatinzugänglichkeit nach Dual-Inhibitor-Behandlung, so lagen ca. doppelt so viele Regionen mit erhöhter Chromatinzugänglichkeit (FC ≥ 2; 12.756 Regionen) vor als DNA-Regionen mit verringerter Zugänglichkeit (FC ≤ 2; 6.531 Regionen) (siehe Abbildung 27 B). Diese Veränderungen waren ebenfalls, genau wie die durch HDACi induzierten Veränderungen, gleichmäßig über das gesamte Genom verteilt (siehe Abbildung 27 C). Die mit Hilfe von HOMER identifizierten TOP50-Motive des Dual-Inhibitors wiesen hohe Gemeinsamkeiten mit den untersuchten HDACi LAK31, Romidepsin und Quisinostat (24 gemeinsame Motive mit erhöhter und 33 gemeinsame mit verringerter Chromatinzugänglichkeit) in der GCT-Zelllinie 2102EP auf (siehe Abbildung 27 D). Herauszustellen ist, dass diese Übereinstimmung in den TOP10-Motiven noch deutlicher ausfiel (siehe in grün illustrierte Gen-Namen in Abbildung 27 D, vergleiche Abbildung 16).

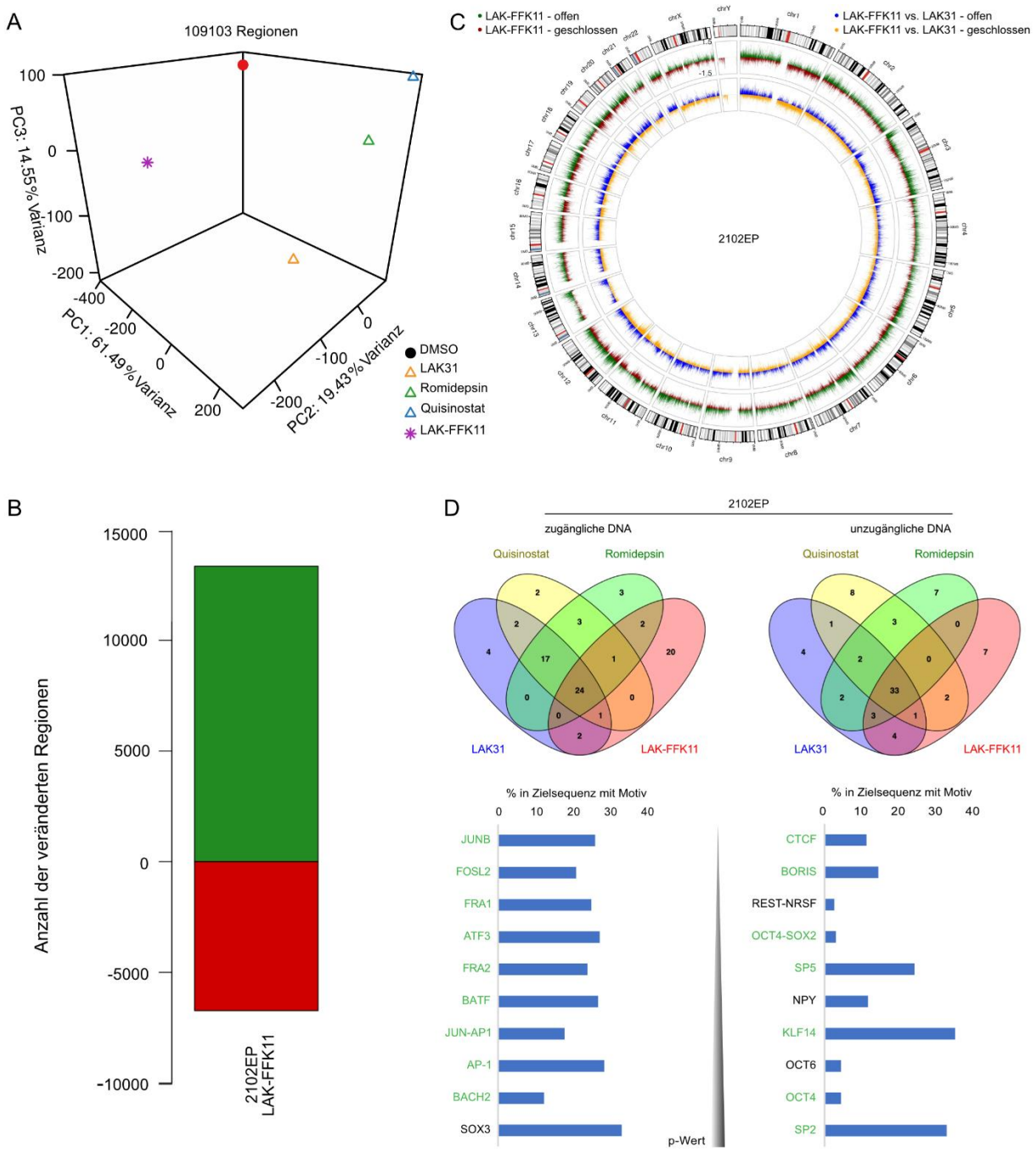


Abbildung 27: Auswertung der durch LAK-FFK11 ausgelösten Veränderungen der Chromatinzugänglichkeit von 2102EP Zellen.

A) Ein PCA-Diagramm stellt die globalen Veränderungen der Chromatinzugänglichkeit nach LAK-FFK11-Behandlung in Relation zur Lösemittelkontrolle DMSO (schwarzer Punkt) und den Auswirkungen der HDACi LAK31 (gelbes Dreieck), Romidepsin (grünes Dreieck) und Quisinostat (blaues Dreieck) dar. B) Balkendiagramm der signifikanten Veränderungen (geöffnetes Chromatin in grün: FC ≥ 2, Chromatin geschlossen in Rot: FC ≤ -2) der Chromatinzugänglichkeit nach LAK-FFK11-Behandlung. C) Circos-Diagramm der Änderungen der Chromatinzugänglichkeit nach HDAC-BET-Dual-Inhibitor Behandlung. Dargestellt sind die genomweiten signifikanten (Chromatin geöffnet: FC ≥ 2; Chromatin geschlossen: FC ≤ -2) Veränderungen der Chromatinzugänglichkeit nach LAK-FFK11-Behandlung von 2102EP (äußerster Ring, grün und rot) im Vergleich zu den durch den HDACi LAK31 induzierten Veränderungen (innerer Ring, blau und gelb). D) HOMER-Algorithmus-Analyse der Zugänglichkeitsveränderungen von Transkriptionsfaktoren in 2102EP nach LAK-FFK11-Behandlung. Die Abbildung zeigt links die Chromatinregionen mit erhöhter Zugänglichkeit und rechts die weniger zugänglichen

Chromatinregionen. (Oben) Venn-Diagramme der TOP50-Motive illustrieren die ähnliche Wirkweise des neuartigen HDAC-BET-Dual-Inhibitors (rot) zu den charakterisierten HDACi LAK31 (blau) zu den herkömmlichen HDACi Romidepsin (grün) und Quisinostat (gelb). (Unten) Balkendiagramme zeigen detailliert die stark ähnelnden Auswirkungen des Dual-Inhibitors zu den drei HDACi auf die TOP10-Bindungsmotive (überlappende Gene sind in grün illustriert). Dargestellt sind die Verteilungen der beeinflussten Regionen der Transkriptionsfaktoren in Prozent. Die TOP10-Motive sind nach Signifikanz des p-Werts geordnet.

Eine Analyse des Transkriptoms von 2102EP nach Behandlung mit dem potentesten Fusionsmolekül LAK-FFK11 wurde unter Verwendung von RNA-Seq durchgeführt (siehe Abbildung 28). Es wurde eine vergleichbare Anzahl von Genen nach 16 h Behandlung herauf- und herunterreguliert (FC $\pm \log_2$ (1,5) und p-Wert < 0,05; Heraufreguliert: 3.799 Gene; Herunterreguliert: 4.665 Gene, siehe Abbildung 28 A). Die Analysen der GO-Datenbank und STRING-Netzwerken wurden mit den signifikant veränderten Genen durchgeführt (FC > $|\log_2 4|$ und FDR korrigierter p-Wert < 0,05, siehe Abbildung 28 B und C). Es zeigten sich vergleichbare Muster zu dem zuvor untersuchten HDACi LAK31. So wurden einige der heraufregulierten Gene nach LAK-FFK11-Behandlung zur Codierung von Histonen und der Regulation der Differenzierung, wie beispielsweise der Neurogenese, zugeordnet. Die Analysen der Daten von LAK31 und LAK-FFK11 zeigten beide einen Anstieg der Transkription von neuronal assoziierten Genen. Herunterreguliert wurden vor allem Faktoren, die mit dem *SMAD*/*NODAL* Signalweg und Pluripotenz im Allgemeinen assoziiert sind (*NANOG, NODAL, LEFTY1/2* und *GDF3*, siehe Abbildung 28 B und C).

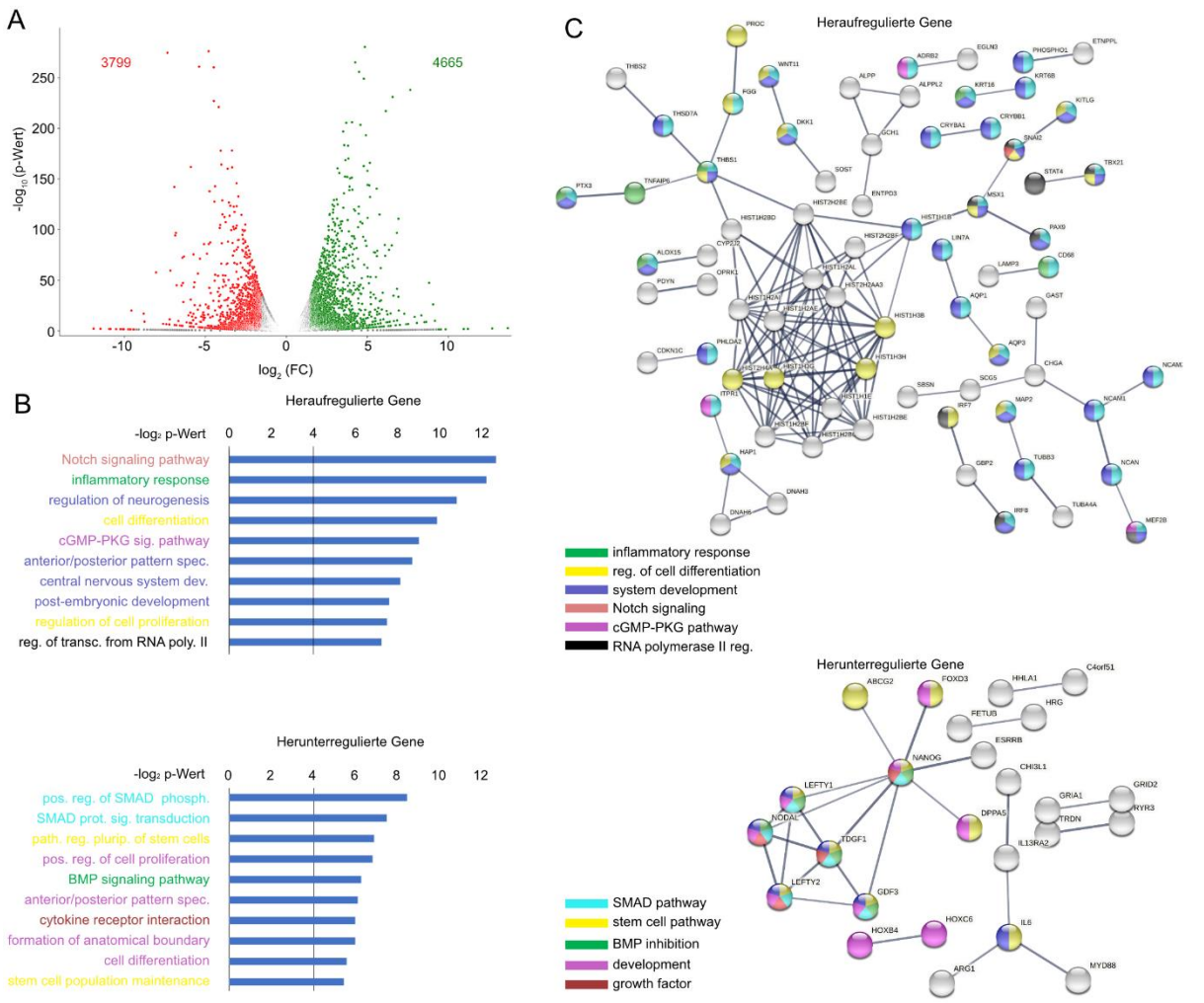


Abbildung 28: Auswertung der durch LAK-FFK11 ausgelösten Veränderungen des Transkriptoms von 2102EP-Zellen.

A) Vulcano Diagramm der durch RNA-Seq ermittelten Veränderungen der Transkriptionsrate nach 16 h LAK-FFK11-Behandlung im direkten Vergleich zur Lösemittelkontrolle DMSO in 2102EP-Zellen. Die Anzahl der signifikant beeinflussten Gene ist in den oberen Ecken des Diagramms angegeben. Dargestellt sind Veränderungen mit FC ≥ 2 in Grün (4665 Gene) und FC ≤ -2 in Rot (3799 Gene) gegen den negativen dekadischen Logarithmus des p-Werts. B) Balkendiagramme spiegeln die DAVID GO-Analyseergebnisse der herauf- (oben) und herunterregulierten Gene (unten) an. Dargestellt sind signifikante Analyseergebnisse gegen den -$\log_2$ p-Wert. Die Ergebnisse wurden farbcodiert. Die zugehörige Legende ist unten rechts aufgelistet. C) STRING-Netzwerkanalysen der herauf- (oben) und herunterregulierten Gene (unten) nach LAK-FFK11-Behandlung von 2102EP. Die Ergebnisse wurden farbcodiert. Die zugehörige Legende ist unten links aufgelistet.

Um einen Vergleich der Auswirkungen des HDACi LAK31 und dem Dual-Inhibitor LAK-FFK11 auf die GCT-Zelllinie 2102EP ziehen zu können, wurde in einem Folgeschritt eine Korrelation von ATAC- und RNA-Seq-Analysen der beiden Inhibitoren durchgeführt. Eine Pearson-Korrelation offenbarte hohe Ähnlichkeiten der Auswirkungen beider Inhibitoren auf die GCT-Zelllinie 2102EP nach 24 h Behandlung. Die Pearson-Korrelation ermittelte den r-Wert als Maß der Ähnlichkeit der untersuchten Proben. Ein r-Wert von 1 steht für identische Proben, wohingegen ein r-Wert von 0 keinerlei Überschneidungen nachweist. Sowohl in den Veränderungen der Chromatinzugänglichkeit (r = 0,868) als auch der des Transkriptoms (r = 0,876) sind hohe Ähnlichkeiten festzustellen (siehe Abbildung 29).

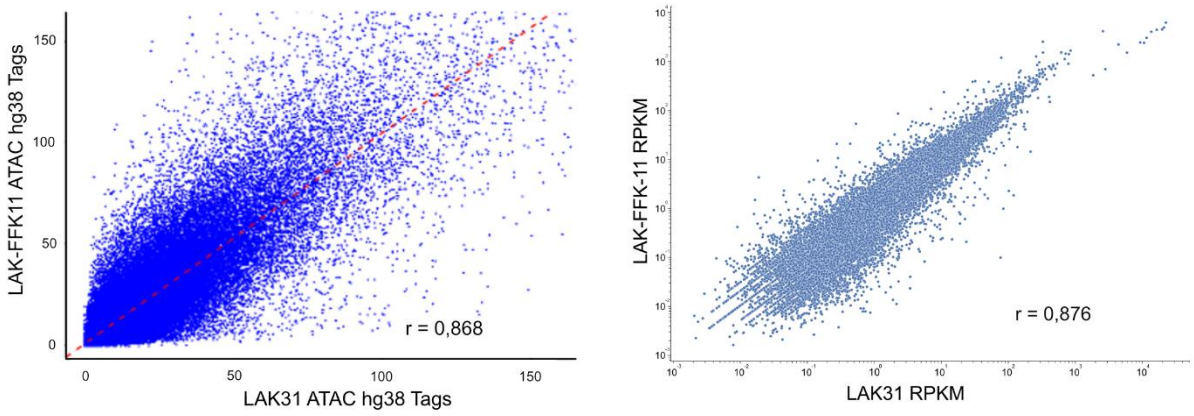


Abbildung 29: Korrelation der ATAC- und RNA-Seq Analysen von LAK31 und LAK-FFK11.
Dargestellt sind Pearson-Korrelationen der Auswirkungen von LAK31 und LAK-FFK11 auf die Chromatinzugänglichkeit (linkts) und das Transkriptom (rechts) von 2102EP nach 24 h Behandlung. Für die Auswirkungen auf die Chromatinzugänglichkeit wurde ein r-Wert von 0,868 ermittelt, und für die Auswirkungen auf das Transkriptom ein r-Wert von 0,876.

3.8. Dual-Inhibitor-Applikation nach Xenotransplantation

Um die Wirksamkeit des neuartigen Dual-Inhibitors LAK-FFK11 zu validieren, wurden *in vivo* Experimente mit der GCT-Zelllinie 2102EP und deren Cis-Platin-resistentem Klon 2102EP-R in Nacktmäusen durchgeführt. Xenotransplantationen von 1 x 10^7 Tumorzellen wurden in die Flanke von Nacktmäuse injiziert und das Wachstum der Tumoren wurde für zwei Wochen observiert, ehe alle zwei Tage eine subkutane Applikation von LAK-FFK11 (10 mg/kg durchgeführt wurde. Als Kontrollgruppe wurden Mäuse mit der Lösemittelkontrolle DMSO behandelt. Nach 21 Tagen wurden die Mäuse geopfert und die Tumoren vermessen und analysiert (siehe Abbildung 30 A und B). Die regelmäßige Vermessung des Tumorvolumens zeigte, dass der Dual-Inhibitor das Tumorwachstum in beiden Zelllinien (2102EP(-R)) im Vergleich zur Lösemittelkontrolle verringern konnte (siehe Abbildung 30 C und D). Ein gleichbleibendes Gewicht der Mäuse deutete auf eine gute Verträglichkeit der neuartigen Epi-Drug hin (siehe Abbildung 30 E und F). Die histologische Untersuchung mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung zeigte deutlich, dass die behandelten Tumorzellen ein Ungleichgewicht zwischen nuklearer- und Plasma-Fraktionen aufweisen, was auf Zell- und Kern-Pleomorphismus hindeutet. Außerdem konnten Spuren von Nekrose in den histologischen Analysen identifiziert werden (siehe Abbildung 30 G und H).

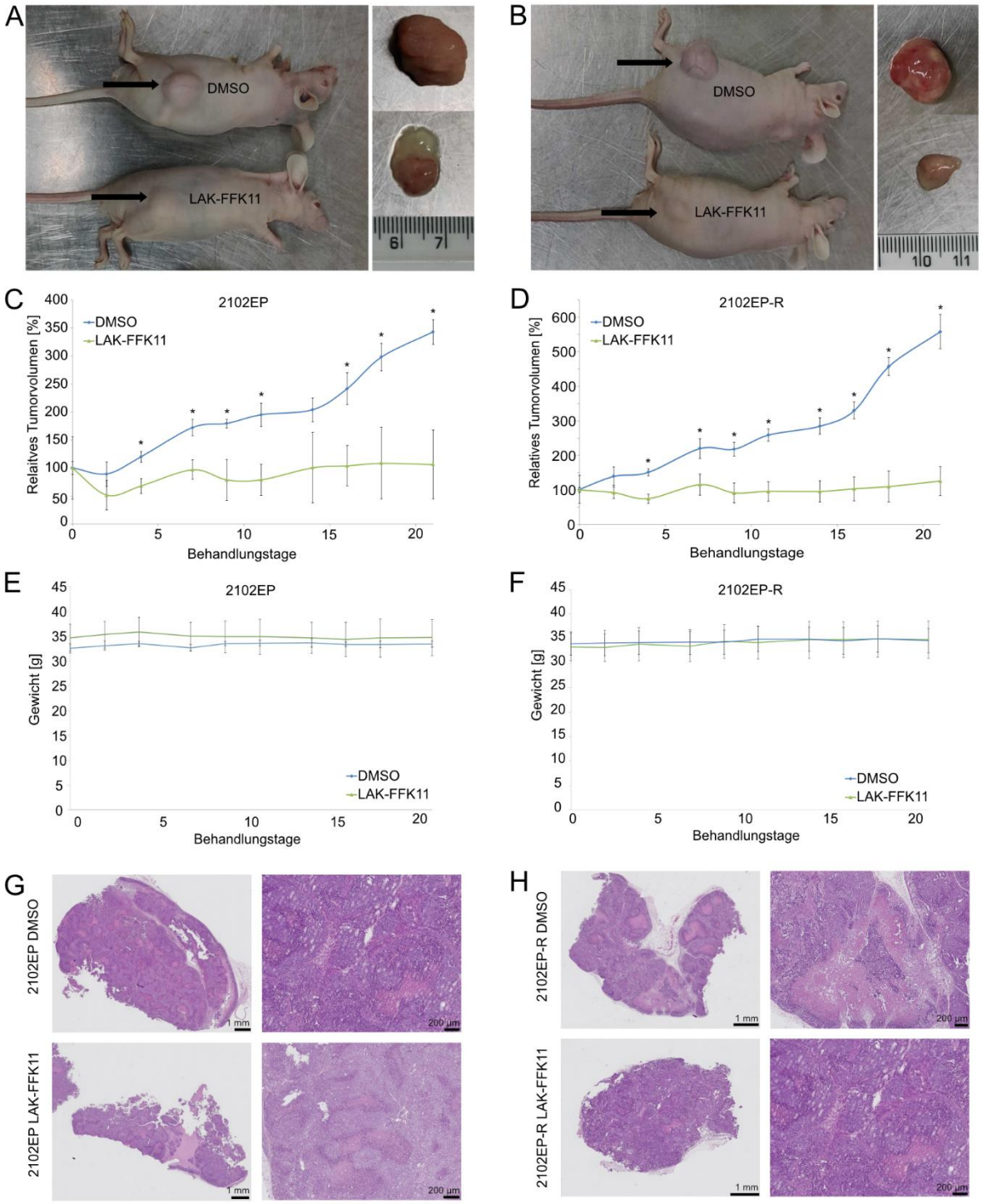


Abbildung 30: Behandlungseffekte des HDAC-BET-Dual-Inhibitor auf 2102EP(-R) *in vivo*.

Makroskopische Aufnahmen der nach Xenotransplantation gewachsenen Tumoren von A) 2102EP und B) 2102EP-R nach 21 Tagen Behandlung mit LAK-FFK11 bzw. DMSO. Relatives Tumorwachstum über den Behandlungszeitraum zeigt eine Inhibition des Tumorwachstums durch LAK-FFK11-Behandlung in C) 2102EP und D) 2102EP-R. Die Messungen des Tumorvolumens wurden alle zwei Tage durchgeführt. Gleichbleibendes Gewicht der Mäuse mit sowohl E) 2102EP als auch F) 2102EP-R Tumoren weist auf eine gute Verträglichkeit der Substanzen (DMSO und LAK-FFK11) hin. Hämatoxylin-Eosin-Färbungen der entnommenen Tumoren nach DMSO und LAK-FFK11-Behandlung sind in G) (2102EP) und H) (2102EP-R) dargestellt.

4. Diskussion

Diese Studie beleuchtete das Potential von neuartigen Epi-Drugs als mögliche Therapieoption zur Behandlung unterschiedlicher urologischer Tumoren. Zu Beginn wurden insgesamt 33 neuartige HDAC- und BET-Mono-Inhibitoren auf ihre Potenz in der Verminderung der Zellviabilität von urologischen Tumorzelllinien (GCT, BCa, RCC und PCa) geprüft. Es wurden die jeweils drei wirksamsten Substanzen (BETi: ASK44, ASK58, ASK 62; HDACi: KSK64, LAK31, MPK409) identifiziert und für tiefergehende Analysen verwandt. Darüber hinaus wurden diese als Basis zur Synthese von neuartigen HDAC-BET-Dual-Inhibitoren (LAK-FFK11, LAK129, LAK-HGK7) genutzt. Der vielversprechende Dual-Inhibitor LAK-FFK11 konnte auch *in vivo* das Tumorwachstum von (Cis-Platin-resistenten) GCT mindern.

4.1. Wirksamkeit neuartiger Epi-Drugs in urologischen Malignitäten

In einem Initialscreening wurden 33 neuartige epigenetische Inhibitoren (HDACi und BETi) hinsichtlich ihre Potenz untersucht, die Zellviabilität von urologischen Tumorzelllinien zu reduzieren.

Nach 48 h Behandlung wiesen die potentesten HDACi (KSK64, LAK31 und MPK409) einen LD_{50}-Wert im niedrigen nanomolaren Bereich auf. Die höchste Aktivität zeigte sich in GCT-Zelllinien, vor allem in den EC-Zelllinien. Analysen des Zellzyklus und der Apoptose-Induktion mittels Durchflusszytometrie zeigten eine Zelllinien-spezifische Anhäufung der Tumorzellen entweder in der G1/G0-Phase oder der G2/M-Phase nach 24 h HDACi-Behandlung. Dieser Zellzyklusarrest ging in einer Vielzahl der untersuchten Tumorzelllinien mit einer Apoptose-Induktion einher. Vorherige Studien an HDACi berichteten in GCT-Zelllinien vor allem eine Akkumulation in der G2/M-Phase (192,193). Diese Diskrepanz zwischen den neuartigen und herkömmlichen HDACi könnte auf kleine Unterschiede in der Wirkweise hinweisen.

Die potentesten neuartigen BETi (ASK44, ASK58 und ASK62) zeigten eine Aktivität im niedrigen mikromolaren Bereich auf. Die Wirksamkeit der BETi beschränkte sich auf die GCT-Zelllinien, mit der höchsten Potenz in EC-Zelllinien. Andere urologische Tumoren (BCa, RCC und PCa) wurden weniger stark von den BETi beeinflusst. Dies zeigte sich sowohl für die neuartigen BETi (ASK44, ASK58 und ASK62), als auch für den herkömmlichen BETi JQ1 (siehe Abbildung 6 und Abbildung 8). Betrachtet man die durchflusszytometrischen Analysen, zeigt sich, dass die neuartigen BETi, ähnlich zu dem gut charakterisierten BETi JQ1, vorwiegend einen G1/G0-Phase-Zellzyklusarrest in den sensitiven Zelllinien induzierten. Sie weichen somit, im Gegensatz zu den HDACi, nicht von der Charakteristik des herkömmlichen

Inhibitors (JQ1) ab (158,193). Somit lassen sich nach den durchgeführten Viabilität-, Zellzyklus- und Apoptose-Analysen die neuartigen BETi als mögliche Therapieoption von GCT darstellen, wohingegen die HDACi neben sehr hoher Aktivität in GCT-Zelllinien auch vielversprechende Ergebnisse in einer Vielzahl der untersuchten BCa-, RCC und PCa-Zelllinien aufwiesen. Die HDACi konnten als potenzielle pan-urologische Inhibitoren charakterisiert werden.

Um eine möglichst realistische Aussage über die Auswirkungen der Epi-Drugs auf umliegende Normalzellen treffen zu können, wurden sieben Kontrollzelllinien mittels XTT-Zellviabilitätsassay analysiert. Einige der untersuchten Kontrollzellen (Fibroblasten und Keratinozyten) wiesen eine stark verminderte Sensitivität gegenüber den Epi-Drugs (HDACi und BETi) auf. Dies eröffnet ein mögliches therapeutisches Fenster für den kontrollierten Einsatz der Inhibitoren. Betrachtet man jedoch die Auswirkungen der Mono-Inhibitoren auf Immunzellen (T-Lymphozyten und Monozyten) und Endothelzellen, so zeigten sich diese ähnlich sensitiv wie die untersuchten Tumorzelllinien (siehe Abbildung 9). Diese Befunde könnten auf das Risiko des Auftretens möglicher Nebenwirkungen während therapeutischen Anwendungen hindeuten.

Die Analysen der Zellzyklusveränderungen und der Apoptose-Induktion bestätigten diese Annahme. Nach 24 h-Behandlung mit den HDACi induzierten diese zwar keine Apoptose, jedoch einen G2/M-Phase-Zellzyklusarrest in den untersuchten Fibroblasten (siehe Abbildung 10 und Abbildung 11). Es ist anzunehmen, dass die neuartigen HDACi in einem möglichen therapeutischen Einsatz ungewollte Nebenwirkungen in Normalzellen auslösen. Ein Vergleich mit der Literatur zeigt, dass der herkömmliche HDACi Romidepsin zwar von der FDA für die Behandlung von T-Zell-Lymphomen zugelassen ist, allerdings Nebenwirkungen, wie Kardiotoxizität zu beachten sind (221,222). Das Nebenwirkungsprofil der systemisch wirkenden Epi-Drugs näher zu charakterisieren und zu minimieren ist eine der Hauptaufgaben der Forschung an neuartigen Inhibitoren (122,223). Um die zugrundeliegende Wirkweise unserer potentesten HDAC- und BET-Mono-Inhibitoren näher aufzuschlüsseln, wurden molekularbiologische Methoden und Hochdurchsatzanalysen angewandt. Das Hauptaugenmerk der Hochdurchsatzanalysen lag auf dem potentesten und universell wirksamsten HDACi LAK31.

Initiale molekulare Analysen der drei potentesten HDACi (KSK64, LAK31 und MPK409) weisen ähnliche Auswirkungen auf die Expression der Schlüsselgene von GCT-Zelllinien nach Romidepsin-Behandlung auf wie der herkömmliche Inhibitor. In allen vier Zelllinien der untersuchten Tumorentitäten wurde eine Heraufregulation von Zellzyklus- und Apoptose-Regulatoren ausgelöst (*ATF3, DUSP1, FOS* und *GADD45B*) (192,218). Darüber hinaus wurde

das Onkogen *p53* herunterreguliert, was typisch für eine HDAC-Inhibition ist (224). Auffallend war die starke Heraufregulation von *DHRS2* nach HDACi-Behandlung in allen vier Tumorentitäten. Diese starke Induktion wurde bereits in vorherigen Studien unterschiedlicher HDACi (Romidepsin und Quisinostat) beobachtet. Unsere Studie unterstützt die Hypothese, dass eine *DRHS2*-Induktion ein allgemeiner Marker einer erfolgreichen HDAC-Inhibition in urologischen Tumoren ist (225). Diese Ergebnisse bestätigen die ähnliche Wirkweise der neuartigen HDACi zu dem bekannten HDACi Romidepsin.

Analog zu den Analysen der HDACi, wurden die Auswirkungen der neuartigen BETi (ASK44, ASK58 und ASK62) auf die Schlüsselgene von GCT-Zelllinien nach Behandlung mit dem BETi JQ1 untersucht (158). Es konnte eine Herunterregulation der Expression von *OCT3/4,* ein mit Pluripotenz assoziiertes Gen, ermittelt werden (226). Außerdem wurde der Ligand *GDF3* des Wachstumsfaktors TGF-β weniger stark transkribiert (227). Eine Heraufregulation von Genen, die mit der Stressantwort und dem Zellzyklus assoziiert sind (*ATF3* und *p57)*, konnte in drei der vier analysierten Zelllinien observiert werden (228,229). Die Analysen der durch JQ1 beeinflussten Schlüsselgenen deuten auf eine eindeutige Überschneidung der Wirkweise der neuartigen BETi mit dem herkömmlichen BETi JQ1 hin. Da die neuartigen BETi auf der Struktur von JQ1 aufbauen, wurden Ähnlichkeiten in der Wirkweise der ASK-Moleküle zu JQ1 erwartet. Zu den neuartigen BETi (ASK44, ASK58 und ASK62) ist festzuhalten, dass diese in *in vitro* Analysen ein ähnliches Wirkspektrum wie JQ1 aufwiesen und Analysen des Zellzyklus und der Expression von Schlüsselgenen ebenfalls auf eine ähnliche Wirkweise zu JQ1 hindeuten (158). Die BETi zeigen vor allem in GCT-Zelllinien ein hohes Potential mit geringen Auswirkungen auf Normalzelllinien (siehe Abbildung 7 und Abbildung 9). Die höchste Effizienz ist in EC-Zelllinien zu beobachten, welche auch für weiterführende Studien von größtem Interesse sind. Die innovativen BETi weisen in diesen Zelllinien einen vergleichbaren LD_{50}-Wert auf wie der herkömmliche und sehr wirksame Inhibitor JQ1 (158). Insgesamt sprechen jedoch neben den EC-Zelllinien nur einzelne Zelllinien der anderen urologischen Tumorentitäten auf die Behandlung mit BETi (JQ1 und ASK44, ASK58 und ASK62) an (siehe Abbildung 8). Somit haben diese Inhibitoren zukünftig ihr höchstes Potenzial als spezifische Therapieoption von EC.

Zusammenfassend zeigten die neuartigen HDACi und BETi eine hohe Übereinstimmung mit der Wirkweise herkömmlicher Epi-Drugs. Die beobachteten Effekte können somit als allgemein induzierte Effekte von Epi-Drugs in den untersuchten urologischen Tumorzelllinien angesehen werden.

Hochdurchsatzanalysen des Transkriptoms zeigten bereits 16 h nach LAK31-Behandlung einen Anstieg der Genexpression in allen vier untersuchten urologischen Tumorentitäten

(GCT: 2102EP, BCa; VM-CUB-1, RCC: Caki-1 und PCa: DU-145) (siehe Abbildung 19). Vorherige Studien der Arbeitsgruppe und andere Literatur zu HDACi sind im Einklang mit den Auswirkungen von LAK31 in urologischen Tumorzellen (225,230–235). Gemeinschaftlich, in allen untersuchten Tumorentitäten, heraufregulierte Gene waren assoziiert mit Funktionen des intra- und extrazellulären Membrantransport, dem Aufbau der extrazellulären Matrix, der Zell-Zell-Kommunikation und dem Übergang zwischen Membran und Zytoskelett (siehe Abbildung 18). Außerdem wurden durch LAK31-Behandlung in allen Tumorentitäten 14 Gene heraufreguliert, die an neuronaler Entwicklung und Differenzierung beteiligt sind (*CHRM4*, *DNAH2*, *DNER*, *DPYSL4*, *GIPR*, *GRIN1*, *LHX9*, *NCAM1*, *NDNF*, *NRXN2*, *NTRK1*, *NYAP1*, *PTGER3* und *SYP*). Derzeit geht man davon aus, dass einige Tumorentitäten eine neuronale Entwicklung des Tumormikromilieus induzieren, wodurch die Ausbreitung des Tumors begünstigt wird (zum Beispiel durch erhöhte Angiogenese) (236–238). Vor allem der Anstieg der Transkription der Tyrosinkinase *NTRK1* ist im Bereich der Urologie von hohem Interesse, da dieser eine neuronale Differenzierung einleiten kann. Falls es im Zuge der neuronalen Differenzierung zur Entwicklung einer neuro-ektodermalen Zellpopulation kommt, kann dies zu einer schlechteren Prognose für den Patienten führen. Bei GCT-Patienten wurde dieser Effekt bislang noch nicht beschrieben, allerdings sind Fälle von PCa-Patienten bekannt. Hierbei kann das Vorkommen von neuro-endokrinen Zelltypen durch Hormontherapie (ADT, aus dem Englischen „*androgen deprivation therapy*“) ausgelöst werden und zu einer erheblichen Verschlechterung der Prognose beitragen (239). qRT-PCRs nach LAK31-Behandlung konnten in drei der vier Tumorentitäten validieren, dass die Behandlung mit LAK31 zur erhöhten Expression von *NTRK1* führt (siehe Anhang 10 A). Um diesen ungewollten Nebeneffekt der Therapie umgehen zu können, müsste eine mögliche Kombinationstherapie mit einem Tyrosinkinase-Inhibitor in Zukunft näher untersucht werden. Als Randnotiz ist festzuhalten, dass der neuartige HDAC-BET-Dual-Inhibitor LAK-FFK11 zu keinem Anstieg der *NTRK1*-Expression führte. Dies könnte auf eine geringere Wahrscheinlichkeit hinweisen, dass die Behandlung mit dem Fusionsmolekül zu einer neuroendokrinen Differenzierung der Tumorzellen führt (siehe Anhang 10 B).

Zusätzlich zum Anstieg der *NTRK1*-Expression, stieg das Level von zwei weiteren Genen (*NCAM1* und *SYP*) an, die mit neuro-endokrinen Tumoren assoziiert sind (240,241). Schlussfolgernd könnte die Heraufregulation von neuronal-assoziierten Genen nach HDACi-Behandlung ein potenzielles Risiko für eine Therapie darstellen, falls diese zu einer Zellpopulation mit neuro-endokriner Identität führt. Diese Entdeckung verdeutlicht die Wichtigkeit der korrekten Dosierung von Epi-Drugs. Sie müssen in einer Konzentration eingesetzt werden, die zum einen hoch genug ist, um die Tumorzellen schnellstmöglich

abzutöten und eine neuro-endokrine Differenzierung zu unterbinden und zum anderen gering genug gewählt werden, um schwere Nebenwirkungen auf Normalzellen zu vermeiden.

Da die Anzahl der herunterregulierten Gene in allen Tumorentitäten deutlich geringer war, wurden nur sechs gemeinschaftliche Gene identifiziert (siehe Abbildung 18). Diese stehen in keinem bekannten Zusammenhang. Es ließ sich kein Netzwerk identifizieren, indem diese Faktoren gemeinschaftlich beteiligt sind.

Ein in der Literatur gezeigter, allgemeingültiger Effekt von HDACi ist die starke Auswirkung auf die Acetylierung von Histonen. Es wurde gezeigt, dass diverse HDACi hyperacetylierte Histone induzieren, welche mit einer erhöhten Chromatinzugänglichkeit assoziiert sind (230,242,243). Die Western Blots von urologischen Tumorzellen nach LAK31-Behandlung zeigen ebenfalls eine globale Erhöhung der Histon-H3-Acetylierung (siehe Abbildung 12). Aufgrund der zuvor gezeigten, ähnlichen Wirkweise von LAK31 zu herkömmlichen HDACi (Romidepsin, Quisinostat und Vorinostat) wurde erwartet, dass LAK31-Behandlung zu einem globalen Anstieg der Chromatinzugänglichkeit führt. Die ATAC-Seq-Analysen nach 24 h LAK31-Behandlung zeigten jedoch in Zelllinien aller vier untersuchten urologischen Tumorentitäten (GCT: 2102EP, BCa; VM-CUB-1, RCC: Caki-1 und PCa: DU-145) eine ausgewogene Verteilung von Regionen mit ansteigender und abnehmender Chromatinzugänglichkeit (siehe Abbildung 15 A). Um diese unerwarteten Ergebnisse besser einordnen zu können, wurden die Auswirkungen von bekannten HDACi (Romidepsin und Quisinostat) auf den Chromatinstatus in der GCT-Zelllinie 2102EP untersucht. Auch die etablierten HDACi zeigten eine ausgeglichene Verteilung von „geöffneten“ und „geschlossenen“ Regionen des Chromatins (siehe Abbildung 15B). Detailliert betrachtet, überwiegt in urologischen Tumoren die Anzahl der Regionen mit verringerter Chromatinzugänglichkeit über die Anzahl der Bereiche mit erhöhter Zugänglichkeit (Verhältnis DNA-Zugänglichkeit nach HDACi-Behandlung: LAK31: 2102EP: 0,91; VM-CUB-1: 0,59, Caki-1: 0,35, DU-145: 0,52; Romidepsin: 2102EP: 0,82; Quisinostat: 2102EP: 0,82) (siehe Abbildung 15). Die Ähnlichkeit der Effekte von LAK31, Romidepsin und Quisinostat validierten, dass die neuartigen Messungen der ATAC-Seq einen bisher unbekannten Mechanismus der HDACi in urologischen Malignitäten offenbarten. In Bezugnahme auf die Analysen wurden vorherige pan-Histon-H3-Acetylierungen-ChIP-Sequenzierungen (pan-H3Ac-ChIP-Seq) der Arbeitsgruppe analysiert. Hierbei wurde die GCT-Zelllinie TCam-2 mit dem HDACi Romidepsin behandelt. Es zeigte sich eine Abnahme der Histon-H3-Acetylierung in aktiven Regionen, codierenden Genbereichen und Promotoren, wohingegen ein globaler Anstieg der Acetylierung in den Regionen, die ± 5 Kilobasen von Promotoren und codierenden Genbereichen entfernt liegen, beobachtet wurde (225). Somit zeigten auch diese Analysen, dass HDACi in urologischen Malignitäten zwar eine globale Hyperacetylierung von Histonen

induzieren, diese aber nicht in allen Regionen gleich verteilt sind. Die erhöhte Acetylierung liegt vor allem in nicht kodierenden Bereichen vor (225). Dies könnte erklären, dass die Chromatinzugänglichkeit nach HDACi-Behandlung nicht wie bisher angenommen global ansteigt, sondern ein ausgewogenes Verhältnis von sich „öffnenden“ und sich „schließenden“ Regionen induziert wird. Im Rahmen dieses Projektes wurde lediglich ein Zeitpunkt der Behandlungsdauer (16 h nach Behandlung) untersucht. Um das gezeigte Phänomen näher aufzuschlüsseln ist es von Bedeutung eine Kinetik der Veränderungen der Chromatinzugänglichkeit zu etablieren. In zukünftigen Studien können groß angelegte Analysen (ATAC- und RNA-Seq) zu unterschiedlichen Behandlungszeitpunkten weitere Meilensteine zur Entschlüsselung dieses Effektes beitragen. Außerdem sollten die Analysen auf weitere Tumorzelllinien unterschiedlicher GCT-Entitäten oder allgemein anderer Tumoren ausgeweitet werden, um zu erforschen, ob es sich um ein allgemein gültiges Phänomen handelt. Zusammenfassend wurde in dieser Studie ein neuartiger Effekt der HDACi entdeckt und validiert, der möglicherweise auf einen bisher nicht entschlüsselten Wirkmechanismus der HDAC-Inhibition hindeutet. Neuartige (LAK31) und herkömmliche (Romidepsin und Quisinostat) HDACi induzieren in urologischen Malignitäten einen globalen Anstieg von hyperacetylierten Histonen (139,235,244). Bisher unbekannt ist jedoch, dass die hyperacetylierten Bereiche vor allem in nicht gencodierenden Bereichen und nicht in Promotorregionen vorliegen, womit die beobachtete Verringerung der Chromatinzugänglichkeit in codierenden Regionen und Promotorregionen erklärt werden kann.

Analysiert man einzelne Loki genauer, so zeigen sich Beispiele für Regionen mit erhöhter Chromatinzugänglichkeit, welche direkt mit einer verstärkten Expression auf RNA-Ebene korrelieren (siehe Abbildung 20). Nach HDACi-Behandlung der untersuchten Zelllinien der vier urologischen Malignitäten konnten drei Gene bzw. Regionen identifiziert werden, die in allen Tumorzelllinien sowohl in der Chromatinzugänglichkeit als auch in der Genexpression verändert vorlagen (siehe Abbildung 20 A-C). Eine erhöhte Chromatinzugänglichkeit im Bereich von *TEX14* korrelierte mit erhöhter Genexpression. *TEX14* ist in der Literatur als ein GCT-assoziiertes Gen beschrieben, welches an der Bildung von interzellulären Brücken während der Meiose und der Bindung des Kinetochors an die Mikrotubuli des Spindelapparates während der Mitose beteiligt ist (245–247). Vor allem in GCT ist die erhöhte Expression von *TEX14* von Interesse, da der *TEX14*-Lokus als GCT-Prädisposition kategorisiert wurde (248,249). *In vivo*-Studien zeigten, dass eine *TEX14-knockout*-Mutation in männlichen Mäusen und Schweinen zur Infertilität der Tiere führt (250,251). Eine durch HDACi-Behandlung induzierter Anstieg von *TEX14*-Expression könnte eine Grundlage für weiterführende Studien bieten. Betrachtet man in allen Tumorzelllinien gemeinschaftlich

herunterregulierte Gene (verminderte Chromatinzugänglichkeit und geringere Genexpression) nach LAK31-Behandlung, so sind *KIRREL* und *MARVELD* zu nennen. Beide Gene sind vom *„The Human Protein Atlas“* als prognostische Marker für eine schlechte Entwicklung für BCa-, RCC-, Gebärmutterhalskrebs- und Lungenkrebs-Patienten klassifiziert (siehe Abbildung 20 D) (252). In einer möglichen Therapieanwendung könnte die verminderte Chromatinzugänglichkeit der Gen-Loki gepaart mit herunterregulierter Genexpression von *KIRREL* und *MARVELD* zu einer Verbesserung der Prognose für RCC- und BCa-Patienten beitragen.

Insgesamt wurde in allen vier Tumorentitäten eine eindeutig erhöhte Genexpression nach 16 h LAK31-Behandlung nachgewiesen (Verhältnis von Genen mit erhöhter Expression zu Genen mit verminderter Expression: GCT: 2102EP: 6,09; BCa: VM-CUB-1: 2,93; RCC: Caki-1: PCa: 2,34; siehe Abbildung 17). Die Studie zeigt, dass eine HDACi-Behandlung, trotz global verminderter Chromatinzugänglichkeit, eine signifikante Heraufregulation der Genexpression induziert. Dies steht im Widerspruch zur, in der Literatur beschriebenen, direkten Korrelation von Heterochromatin und Herunterregulation der Genexpression (253,254). Die Interpretation unserer Ergebnisse ist, dass die HDACi-Behandlung in erster Linie zu einer bereichspezifischen Öffnung des Chromatins führt. Diese Öffnung induziert die Expression von Genen, die in einem *Feedback-Loop* Auswirkungen auf die epigenetische Landschaft der Tumorzellen hat. So wird zum einen eine Verminderung der Chromatinzugänglichkeit in nicht gencodierenden Regionen ausgelöst und zum anderen werden in zweiter Linie weitere epigenetische Modifikatoren beeinflusst. Diese können ebenfalls zur globalen Abnahme der Chromatinzugänglichkeit beitragen (siehe Abbildung 31) (255). Die Ergebnisse und die daraus resultierende Hypothese stellt die erste Studie dar, die das Paradigma der direkten Korrelation von HDACi induzierter ausschließlicher globaler Chromatinöffnung, resultierend in erhöhter Genexpression, in Frage stellt (189). Um die zugrundeliegenden Mechanismen näher untersuchen zu können und die Vielfalt, der durch HDACi ausgelösten Effekte besser verstehen zu können, müssen nachfolgende Experimente durchgeführt werden. Die Hypothese dieser Studie könnte einen Grundstein für ein tieferes Verständnis der molekularen Auswirkungen von HDACi legen und somit maßgeblich dazu beitragen, dass die Entwicklung neuer Therapieoptionen mit einem besseren Verständnis von Nebenwirkungsursachen vorangetrieben wird. Eine graphische Zusammenfassung der Auswirkungen neuartiger HDACi und HDAC-BET-Dual-Inhibitoren auf die Chromatinzugänglichkeit und das Transkriptom von GCT-Zellen ist in Abbildung 31 dargestellt.

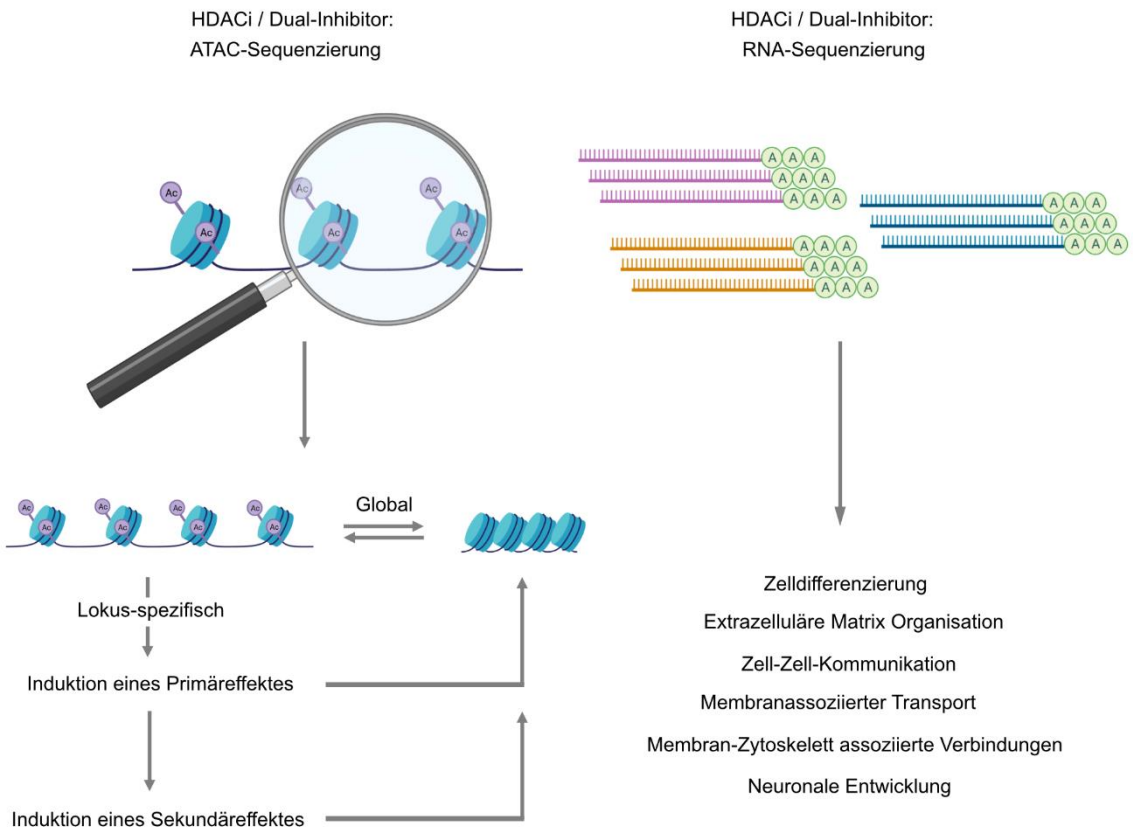


Abbildung 31: Graphische Zusammenfassung der Hypothese der Effekte des HDACi und des HDAC-BET-Dual-Inhibitors auf die Chromatinzugänglichkeit und das Transkriptoms von GCT-Zelllinien.

Links: Analyse des Chromatinstatus nach 16 h HDACi- und Dual-Inhibitor-Behandlung in GCT-Zellen. Lokus-spezifische Öffnung des Chromatins induzieren als Primäreffekt eine verstärkte Genexpression und es wird ein Sekundäreffekt ausgelöst. In Kombination führen diese zu einer gleichmäßigen Verteilung von erhöhter und verminderter Chromatinzugänglichkeit auf einer globalen Ebene.
Rechts: Die RNA-Sequenzierung zeigte einen Anstieg der Genexpression in allen untersuchten urologischen Tumorentitäten. Diese gemeinschaftlichen Gene sind assoziiert mit Zelldifferenzierung, der Organisation der extrazellulären Matrix, Zell-Zell-Kommunikation, membranassoziiertem Transport und der Verbindung der Membran und des Zytoskeletts. Außerdem wurde ein Netzwerk erkannt, dass mit der neuronalen Entwicklung in Verbindung gebracht wird.

4.2. Neuartige HDAC-BET-Dual-Inhibitoren in urologischen Malignitäten

Basierend auf den effizientesten Mono-Inhibitoren wurden drei HDAC-BET-Dual-Inhibitoren synthetisiert (siehe Abbildung 21). Es konnten drei neuartige Fusionsmoleküle etabliert werden. In dem ersten Dual-Inhibitor, LAK-FFK11, ersetzte die BETi-Domäne die CAP-Gruppe des HDACi, wohingegen in den beiden folgenden Fusionsmolekülen, LAK129 und LAK-HGK7, die BETi-Komponente an die CAP-Gruppe angehangen wurde. Die Synthese der neuartigen HDAC-BET-Dual-Inhibitoren wurde von Dr. Leandro Alves Avelar, aus dem von Prof. Dr. Thomas Kurz geleiteten Institut der pharmazeutischen und medizinischen Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, realisiert.

Zunächst wurde mittels Enzymassays und Western Blots die Wirksamkeit beider Inhibitor-Komponenten validiert. Es ergab sich eine hohe Affinität zu allen Enzymen der BRD-Familie (niedriger nanomolarer Bereich), als auch zu HDAC-Enzymen der Klasse I und IIB (hoher nanomolarer Bereich). Herauszustellen ist, dass LAK-FFK11 BRDs mit einer höheren Affinität bindet als der herkömmlich BETi JQ1. Dies deutet auf keinerlei sterische Hinderung der BETi-Komponente hin (siehe Tabelle 19 und Abbildung 22).

Nachdem die Wirksamkeit beider Inhibitor-Komponenten validiert wurde, konnten Zellviabilitätsassays in Tumorzelllinien urologischer Entitäten durchgeführt werden. Die Potenz der Fusionsmoleküle lag zwischen der Wirksamkeit ihrer Einzelbestandteile. So lagen LD_{50}-Werte nach 48 h Behandlung in GCT-Zelllinien in niedrigen mikromolaren Konzentrationen, die stärksten Auswirkungen konnten in EC-Zelllinien induziert werden (siehe Abbildung 23). Einige Zelllinien der BCa, RCC und PCa zeigten sich ebenfalls sensitiv gegenüber den Fusionsmolekülen (siehe Abbildung 24). Diese Sensitivität einiger BCa-, RCC- und PCa-Zelllinien basiert wahrscheinlich auf der aktiven HDACi-Komponente der HDAC-BET-Dual-Inhibitoren, da die BET-Mono-Inhibitoren nahezu keinen Effekt auf diese Entitäten ausübten. Betrachtet man jedoch wir Wirksamkeit auf alle Tumorentitäten, so deckten die Dual-Inhibitoren vorwiegend das Wirkspektrum der neuartigen BETi ab (siehe Abbildung 6 und Abbildung 23). Ähnlich wie die wirksamsten Mono-Inhibitoren (LAK31 und ASK44) zeigte auch der Dual-Inhibitor LAK-FFK11 lediglich einen additiven Effekt in Kombination mit Cis-Platin-Behandlung in Cis-Platin-resistenten GCT-Zelllinien (siehe Abbildung 7 und Abbildung 24). Die Abwesenheit eines synergistischen Effektes bedeutet jedoch nicht, dass die neuartigen Epi-Drugs in Zukunft nicht mit Cis-Platin kombiniert, werden können. Es konnte lediglich keine Re-Sensitivierung der resistenten Tumorzellen nachgewiesen werden.

Die Analysen der Dual-Inhibitoren zeigten geringere Auswirkungen auf alle Kontrollzelllinien. Einige (Fibroblasten, Keratinozyten, T-Lymphozyten) wiesen keine Beeinträchtigung der Zellviabilität nach Behandlung mit allen drei Dual-Inhibitoren auf, wohingegen andere Zelltypen

(Endothelzellen und Monozyten) lediglich Sensitivität gegenüber einzelner Dual-Inhibitoren zeigten. Diese erhöhte Resistenz der Kontrollzelllinien deutet auf ein geringeres Nebenwirkungsprofil der Fusionsmoleküle hin. Im direkten Vergleich zu den HDACi zeigte sich eine erhöhte Resistenz der Kontrollzellen gegenüber der Dual-Inhibitoren, welche auf eine verbesserte Verträglichkeit der Fusionsmoleküle hindeutet (siehe Abbildung 8 und Abbildung 23).

Die Behandlung mit Dual-Inhibitoren induzierte keine Beeinflussung des Zellzyklus der Kontrollzelllinie. Außerdem führte die Dual-Inhibitor-Behandlung neben der Apoptose-Induktion vor allem zu einem G1/G0-Phase-Zellzyklusarrest in den GCT-Zelllinien (siehe Abbildung 25). Diese Charakteristik ähnelt stark dem Verhalten der BETi, welche ebenfalls ihre höchste Wirksamkeit in den GCT-Zelllinien aufweisen und hier vorwiegend einen G1/G0-Phase-Zellzyklusarrest induzieren. Ein Nachteil der Fusionsmoleküle im Vergleich zu den HDACi ist die hohe Resistenz der Tumorzelllinien anderer urologischer Tumoren (BC, RCC und PCa). Die geringen Effekte in BCa-Zelllinien waren zudem unerwartet, da in vorherigen Studien eine Kombinationsbehandlung mit dem HDACi Romidepsin und dem BETi JQ1 einen synergistischen Effekt darbot (176). Als Hypothese für eine geringere Wirksamkeit der Dual-Inhibitoren sind die neuartigen Bestandteile der Fusionsmoleküle anzuführen. Vor allem der BETi-Bestandteil zeigte auch als Mono-Inhibitor nur geringe Effekte in den BCa-Zelllinien.

Um den Wirkmechanismus der Fusionsmoleküle zu analysieren wurden molekularbiologische Analysen durchgeführt. Mittels qRT-PCR Analysen konnten die Auswirkungen der neuartigen HDAC-BET-Dual-Inhibitoren auf etablierte Schlüsselgene von HDACi und BETi in GCT-Zelllinien aller Entitäten (SE: TCam-2, EC: 2102EP, YST: GCT72 und CC: JAR) 24 h nach Behandlung validiert werden. Alle drei multiselektiven Moleküle wiesen Eigenschaften der Mono-Inhibitoren auf. So wurde die Expression der Schlüsselgene der HDAC-Inhibition, eine Heraufregulation von Zellzyklus- und Apoptose-Regulatoren wie *DUSP1* und *FOS* identifiziert, während simultan eine Herunterregulation der Onkogens *p53* stattfand (224). Ein klares Indiz für die aktive HDACi-Komponente der Fusionsmoleküle ist die beobachtete Induktion der Genexpression des HDACi-Markers, *DHRS2*, nach Behandlung mit allen drei Dual-Inhibitoren. Die Analyse der BETi-Schlüsselgene nach Dual-Inhibitor-Einsatz zeigten ein vergleichbares Bild zu den Mono-Inhibitoren. Die Herunterregulation von *LIN28, GDF3* und *OCT3/4* in allen untersuchten GCT-Zelllinien weist auf eine starke Aktivität der BETi-Komponente aller drei Dual-Inhibitoren hin (siehe Abbildung 19 B und D mit Abbildung 26). Betrachtet man alle vier untersuchten Tumorzelllinien, so induzierte LAK-FFK11 die stärksten Effekte auf die Expression der analysierten Schlüsselgene. Die Studie konnte die angestrebte Wirkweise der drei Fusionsmoleküle anhand von Auswirkungen auf die Expression von Schlüsselgenen validieren.

Über die Zellviabilitätsassays, durchflusszytometrische Messungen und die molekularen Analysen (qRT-PCR, Enzymassays und Western Blot) konnte LAK-FFK11 als der wirksamste HDAC-BET-Dual-Inhibitor in urologischen Malignitäten identifiziert werden. Dieser wurde in Hochdurchsatzverfahren (ATAC- und RNA-Seq) näher charakterisiert und mit den Effekten des HDACi LAK31 verglichen (siehe Abbildung 27 und Abbildung 28).

Die Analyse der Veränderungen der Chromatinzugänglichkeit von 2102EP 16 h nach Behandlung mit LAK-FFK11 zeigte eine Zunahme der Chromatinzugänglichkeit auf globaler Ebene. Nachdem HDACi-Behandlung eine gleichmäßige Verteilung von sich schließenden und sich öffnenden Regionen induzierte, wurde davon ausgegangen, dass der Dual-Inhibition zu einer ähnlichen Verteilung von Eu- und Heterochromatin führt. Der aktuelle Forschungsstand weist unterschiedliche Befunde für die Auswirkungen von BETi auf die Chromatinzugänglichkeit auf. Diese scheinen je nach Inhibitor und nach Zellentität stark zu variieren. In der Literatur ist eine reduzierte Chromatinzugänglichkeit als Auswirkungen von BETi in Magenkrebs beschrieben (220). Eine andere Studie gibt einen Anstieg von Euchromatin in Makrophagen nach BETi-Behandlung an (256). Die neuartige Methode der ATAC-Seq wird in den nächsten Jahren ein klares Bild über die entitätsspezifischen Auswirkungen von Epi-Drugs auf die Chromatinzugänglichkeit geben. Zum jetzigen Forschungsstand ist es jedoch nicht möglich eine eindeutige Erklärung für die beobachteten Unterschiede der Chromatinzugänglichkeit nach HDACi- und Dual-Inhibitor-Behandlung zu definieren. Eine mögliche Erklärung liefert die in Kapitel 4.1 dargestellte Hypothese eines *Feedback-Loops*. Dieser könnte durch die zusätzliche BETi-Komponente des Fusionsmoleküls beeinflusst oder unterbunden werden, was den beobachteten globalen Anstieg von Euchromatin erklären könnte. Um dieses Phänomen näher zu erforschen, ist es dringend notwendig eine Kinetik-Studie der Chromatinzugfänglichkeit nach HDAC-BET-Dual-Inhibitor-Behandlung durchzuführen. Eine Ausweitung der Untersuchungen auf weitere Tumorentitäten könnte die gesammelten Erkenntnisse entweder als allgemeiner Effekt von HDAC-BET-Dual-Inhibition validieren, oder sie als Sonderfall der GCT herausstellen. Ein Vergleich, zwischen den über den HOMER-Algorithmus identifizierten, am stärksten beeinflussten Genregionen, von LAK31 und LAK-FFK11 zeigt eine hohe Übereinstimmung auf (siehe Abbildung 27 D). Somit konnte bewiesen werden, dass die globalen Unterschiede der beiden Inhibitoren keine Auswirkungen auf die veränderten Schlüsselregionen haben.

Bei der Analyse der Veränderungen des Transkriptoms von 2102EP nach 16 h Behandlung mit LAK-FFK11 konnte eine gleichmäßige Verteilung von heraufregulierten Genen (4665 Gene) und herunterregulierten Genen (3799 Gene) nachgewiesen werden (siehe Abbildung 28 A). Dieses Gleichgewicht könnte auf einem antagonistischen Effekt der beiden Inhibitor-Komponenten basieren. Es ist beschrieben, dass HDACi eine erhöhte Genexpression

induzieren (257), und auch die neuartigen HDACi induzierten einen globalen Anstieg der Genexpression (siehe Abbildung 17). BETi sind im Allgemeinen nicht dafür bekannt starke Auswirkungen auf die Genexpression auszuüben. Einige Studien zeigen, dass BETi die Expression von Onkogenen und Pluripotenzgenen inhibieren (158,258). Ähnliches konnte diese Studie für die neuartigen BETi nachweisen (siehe Abbildung 19 D). Diese Herunterregulation von Transkriptionsfaktoren könnte zu einer verringerten Expression von weiteren Genen führen, was eine Erklärung für die Balance zwischen herauf- und herunterregulierten Genen nach LAK-FFK11-Behandlung liefern könnte.

Analysiert man die Gene mit signifikant veränderter Expression, so zeigt sich ein Anstieg der Genexpression von Genen, die mit dem *Notch*-Signalweg, der Entzündungsreaktion und Zelldifferenzierung assoziiert sind. Herauszustellen ist, dass ähnlich wie bei LAK31 einige Gene beeinflusst werden, die an der neuronalen Differenzierung beteiligt sind (vergleiche Abbildung 18 und Abbildung 28 B und C). Dies verdeutlich die zuvor erwähnte Bedeutung diese Entwicklung näher zu charakterisieren, um ausschließen zu können, dass adverse Effekte induziert werden. Eine starke Expression des *Notch*-Signalwegs ist, abhängig von der Krebsentität, als Tumor-fördernd oder Tumor-unterbindend beschrieben (259). Es konnte gezeigt werden, dass eine Reaktivierung des *Notch*-Signalweges einen antitumoralen Effekt in BCa induziert (260). Eine durch LAK-FFK11 induzierte starke Expression könnte auch in anderen urologischen Malignitäten einen negativen Effekt auf die Tumorzellen ausüben. Neben dem *Notch*-Signalweg, wurde auch ein Anstieg von Genen beobachtet, die mit dem *cGMP / PKG*-Signalweg assoziiert sind (siehe Abbildung 28 B und C). Die Literatur beschreibt die Rolle dieses Signalweges in der Reduktion von Tumorwachstum (261,262). Eine Reaktivierung des *cGMP / PKG*-Signalweges in RCC-Zellen induzierte eine Abnahme der Proliferation von Tumorzellen, die mit einer Apoptose-Induktion einher ging (263). Auf der Seite der herunterregulierten Gene nach Dual-Inhibitor-Behandlung befanden sich Wachstumsfaktoren, Faktoren zum Erhalt von Stammzellen und Gene, die mit dem *BMP*-Signalweg assoziiert sind (siehe Abbildung 28 B und C). Der *BMP*-Signalweg nimmt in bivalente Rolle in unterschiedlichen Tumorentitäten ein. Zum einen liegt er in Krebsentitäten wie Brustkrebs verstärkt exprimiert vor, ein Verlust von *BMP* kann jedoch gleichzeitig Metastasenbildung begünstigen (264,265). Im Bereich der GCT, konnten Nettersheim *et al.* beweisen, dass eine Inhibition des *BMP*-Signalweges maßgeblich an der Reprogrammierung einer SE-Zelllinie zu einer EC-Zelllinie nach Xenotransplantation beiträgt (27,266). Fustino *et al.* postulieren ebenfalls, dass die Aktivität des *BMP*-Signalweges eine Auswirkung auf GCT-Tumorentwicklung haben kann und eine Inhibition dieses Signalweges ein aussichtsreiches Therapieziel darstellt (267). Somit könnte die, durch LAK-FFK11 induzierte, Herunterregulation von Genen, die mit dem *BMP*-Signalweg assoziiert sind, ein Grund für die Wirksamkeit des

Dual-Inhibitors in GCT-Zelllinien darstellen. Neben dem *BMP*-Signalweg ist auch der *NANOG*-Signalweg nach Dual-Inhibitor-Behandlung reprimiert (siehe Abbildung 28 B und C). Der Pluripotenz-Transkriptionsfaktor *NANOG* wurde als Schlüssel-Onkogen in diversen Tumorentitäten, einschließlich GCT und anderer urologischer Malignitäten, beschrieben (268–272). Die beobachtete Herunterregulation des *NANOG*-Signalweges durch das Fusionsmoleküle charakterisiert ein wesentliches Ziel des HDAC-BET-Dual-Inhibitors in der GCT-Zelllinie 2102EP.

Die Pearson-Korrelation der Ergebnisse der Hochdurchsatzanalysen vom HDACi LAK31 und dem Dual-Inhibitor LAK-FFK11 ermittelte eine hohe Übereinstimmung der induzierten Effekte auf die Chromatinzugänglichkeit und das Transkriptom von GCT-Zellen (siehe Abbildung 29). Diese Gegenüberstellung validiert die Ähnlichkeit der charakterisieren molekularen Effekte der beiden Epi-Drugs in 2102EP.

Ausgehend von den vielversprechenden Analysen (effektiv gegen GCT-Zelllinien und geringe Auswirkungen auf Kontrollzellen) von LAK-FFK11 wurde die Effizienz des Dual-Inhibitors nach Xenotransplantation auf 2102EP und den Cis-Platin-resistenten Klon 2102EP-R untersucht. Die Analyse der Xenotransplantationen zeigte eindeutig einen Effekt des Dual-Inhibitors auf das Tumorwachstum von 2102EP(-R) *in vivo* über einen Zeitraum von drei Wochen. Die Ergebnisse illustrierten keine oder nur eine sehr geringe Zunahme des Tumorvolumens der behandelten Tiere, wohingegen die Tumoren der Lösemittelkontrollgruppe gleichmäßig wuchsen. Diese erfolgreichen *in vivo*-Behandlungen wiesen ebenfalls ein gleichbleibendes Gewicht der Tiere und keine äußerlichen Auffälligkeiten über den gesamten Behandlungszeitraum auf. Die Xenotransplantationen können somit einen vielversprechenden ersten Ausblick auf die mögliche Anwendung der Fusionsmoleküle in der *in vivo*-Behandlung von (Cis-Platin-resistenten) GCT bieten (siehe Abbildung 30). Eine Literaturrecherche zum Vergleich der Potenz unseres neuartigen Dual-Inhibitor LAK-FFK11 mit anderen Fusionsmolekülen, konnte keine *in vivo*-Analysen anderer HDAC-BET-Fusionsmoleküle identifizieren. Unseres Wissens nach stellen die durchgeführten Xenotransplantationen zum jetzigen Zeitpunkt die ersten erfolgreichen *in vivo*-Behandlungen von GCT mit einem HDAC-BET-Dual-Inhibitor dar. Im Januar 2023 wurde eine Studie eines HDAC-BET-Dual-Inhibitors veröffentlicht, in der vielversprechende Effekte des Fusionsmoleküls nach Xenotransplantation von Brustkrebszellen beschrieben wurden (273). Der direkte Vergleich mit anderen publizierten HDAC-BET-Dual-Inhibitoren ist bisher nur mit *in vitro*-Daten möglich. Zhang *et al.* gelang es einen HDAC-BET-Dual-Inhibitor auf seine Wirksamkeit in der Behandlung von Tumorzellen des duktalen Pankreas Adenokarzinoms zu charakterisieren. Im direkten Vergleich zeigten Affinitätsanalysen, dass unser neuartiges Fusionsmolekül LAK-FFK11 einerseits eine höhere Affinität zu BRDs und zu HDACs aufweist, andererseits eine

geringere Toxizität in Kontrollzelllinien induziert als bisherige Fusionsmoleküle (274,275). Die Wirksamkeit und gute Verträglichkeit von LAK-FFK11 *in vivo* bestätigt diese Befunde.

Um einen weitergehenden Überblick über mögliche Problematiken und eventuelle Nebenwirkungen in der Therapie zu erlangen, wurde eine *in silico*-Datenbank-Analyse durchgeführt. Die ADMET-Vorhersage (aus dem Englischen *„absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity“*) berechnete für LAK-FFK11 eine wirksame Absorption, eine schnelle Verteilung und tolerierbare Auswirkungen auf den Stoffwechsel (203). Es wurde jedoch auch ein schneller Abbau und eventuell Lebertoxizität vorhergesagt. Diese negativen Effekte konnten wir über den untersuchten Zeitraum unserer Xenotransplantationen nicht beobachten (siehe Abbildung 30, die gesamte ADMET-Analyse ist in Anhang 11 beigefügt). Dennoch gilt es für zukünftige Analysen diese berechneten Prognosen näher im Auge zu behalten und sicherzustellen, dass keine schweren Nebenwirkungen auftreten. In vorhergehenden Studien konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass der BETi JQ1 mit 49 % eine sehr gute orale Bioverfügbarkeit aufweist (176). Da die neuartigen BETi und Fusionsmoleküle auf dem in der Studie analysierten JQ1 basieren, lässt sich die Hypothese formulieren, dass auch die neuartigen Epi-Drugs eine gute orale Bioverfügbarkeit aufweisen. Dieser Punkt wäre für eine mögliche Anwendung der Epi-Drugs als Therapiealternative von enormem Vorteil und sollte deshalb in kommenden Experimenten analysiert werden.

In dieser Studie gelang es neuartige epigenetische Inhibitoren hinsichtlich ihrer Potenz in urologischen Malignitäten zu charakterisieren und diese in einem Folgeschritt zu multiselektiven HDAC-BET-Dual-Inhibitoren zu verschmelzen. Molekularbiologisch konnte gezeigt werden, dass die analysierten neuartigen Epi-Drugs einen vergleichbaren Einfluss auf Schlüsselgene bereits charakterisierter Epi-Drugs ausüben. Somit konnte die Anwendung der neuartigen Inhibitoren die Zellzyklusregulation von Tumorzellen stören und infolgedessen eine Apoptose-Induktion auslösen. Basierend auf den wirksamsten Mono-Inhibitoren wurden HDAC-BET-Dual-Inhibitoren synthetisiert. Die multiselektiven Dual-Inhibitoren targetieren sowohl die HDAC- und BET-Enzymklassen mit hoher Affinität. Das wirksamste Fusionsmolekül LAK-FFK11 wies vielversprechende Erfolge in der Behandlung von (Cis-Platin-resistenten) GCT-Tumorzellen nach Xenotransplantation auf (siehe Abbildung 32).

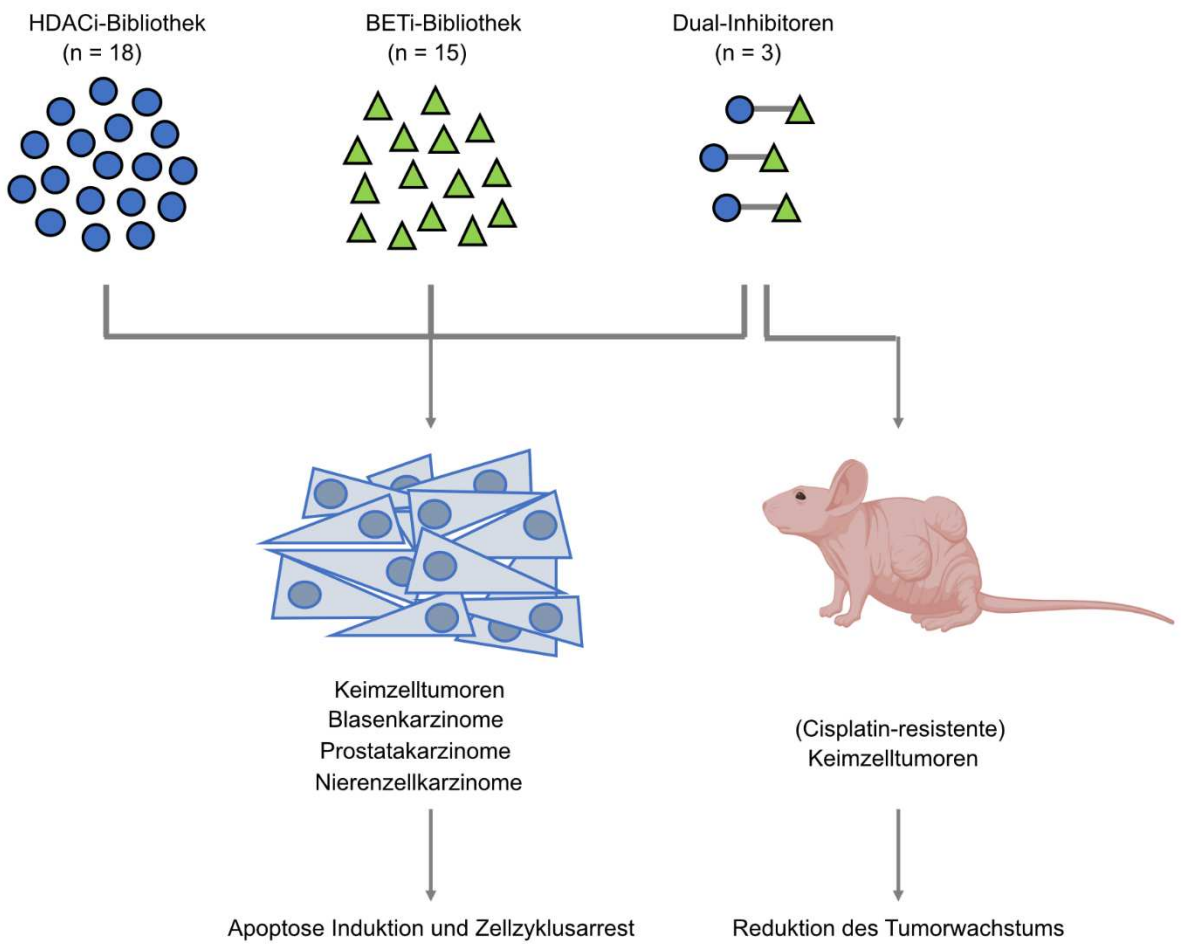


Abbildung 32: Neuartige epigenetische Inhibitoren lösen Apoptose und Zellzyklusarrest in urologischen Malignitäten aus. HDAC-BET-Dual-Inhibitoren zeigen vielversprechende Effekte in (Cis-Platin-resistenten) GCT-Zellen nach Xenotransplantation.

4.3. Ausblick

Die Ergebnisse dieser Studie können eine Grundlage für zukünftige Forschung im Bereich der epigenetischen Inhibition als mögliche Therapieoption von urologischen Malignitäten bieten. Vor allem im Bereich der KZT konnten die neuartigen Epi-Drugs eine hohe Wirksamkeit demonstrieren. Als Ziel der Studie stand die erfolgreiche Synthese von multiselektiven HDAC-BET-Dual-Inhibitoren. Das potenteste Fusionsmolekül zeigte hohe Wirksamkeit in der Behandlung von KZT-Zellen *in vitro* und *in vivo*. In Zukunft müssen weitere Studien zeigen, wie effektiv unterschiedliche Tumorentiäten mit dem HDAC-BET-Dual-Inhibitor behandelt werden können. Neben unterschiedlichen Krebsarten wäre es auch von großer Bedeutung das Fusionsmolekül in unterschiedlichen Konzentrationen einzusetzen, um eine ideale Wirkungsdosis zu ermitteln und mögliche adverse Effekte auf Normalzellen besser einschätzen zu können. Es gelang uns den Grundstein für weiteführende Studien mit den neuartigen HDAC-BET-Dual-Inhibitoren zu legen.

Betrachtet man zugrundeliegende molekulare Wirkweise der neuartigen Epi-Drugs, so konnte in dieser Studie ein neuer Wirkmechanismus der HDACi beleuchtet werden. Unter Verwendung der Hochdurchsatzmethode der ATAC-Seq gelang es uns nachzuweisen, dass es nach HDACi- und Dual-Inhibitor-Behandlung von Zelllinien urologischer Malignitäten zu einem globalen Gleichgewicht zwischen Eu- und Heterochromatin kommt. Diese Entdeckung widerspricht dem bisherigen Verständnis der Wirkweise von HDACi und kann maßgeblich dazu beitragen HDACi-Wirkweisen besser zu verstehen und in letzter Konsequenz dabei helfen neuartige HDACi zu optimieren. Um die Tragweite der Analysen einschätzen zu können, soll in zukünftigen Studien eine Kinetik der Veränderungen der Chromatinzugänglichkeit über unterschiedliche Zeiträume nach Inhibitor-Behandlung ermittelt werden. Wenn dies die Ergebnisse dieser Studie verifiziert, so sollten Zelllinien weiterer Malignitäten unterschiedlichster Entitäten untersucht werden, um zu identifizieren, ob es sich um ein Phänomen von urologischen Tumoren handelt, oder ein allgemeingültiger Effekt ist.

Zusammenfassend konnte in dieser Studie eine wichtige Grundlage für die Entschlüsselung der Wirkmechanismen (neuartiger) Epi-Drugs gelegt werden. Besonders die erstmals synthetisieren und enorm wirksamen Fusionsmoleküle stellen eine Innovation im Bereich der epigenetischen Inhibition dar, die nach detaillierterer Erforschung eine Anwendung in der Behandlung von Patienten mit Cis-Platin-resistenten Tumoren finden könnte.

Literaturverzeichnis

1. Rajpert-De Meyts E, McGlynn KA, Okamoto K, Jewett MAS, Bokemeyer C. Testicular germ cell tumours. The Lancet. 2016.

2. Cheng L, Albers P, Berney DM, Feldman DR, Daugaard G, Gilligan T, et al. Testicular cancer. Nature Reviews Disease Primers. 2018.

3. Kobayashi T, Zhang H, Tang WWC, Irie N, Withey S, Klisch D, et al. Principles of early human development and germ cell program from conserved model systems. Nature [Internet]. 2017 Jun 15 [cited 2023 Sep 12];546(7658):416–20. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28607482/

4. Mäkelä JA, Koskenniemi JJ, Virtanen HE, Toppari J. Testis Development. Endocr Rev [Internet]. 2019 May 10 [cited 2023 Sep 12];40(4):857–905. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30590466/

5. Ghimire S, Mantziou V, Moris N, Martinez Arias A. Human gastrulation: The embryo and its models. Dev Biol. 2021 Jun 1;474:100–8.

6. Shahbazi MN. Mechanisms of human embryo development: from cell fate to tissue shape and back. Development [Internet]. 2020 Jul 7 [cited 2023 Sep 12];147(14). Available from: /pmc/articles/PMC7375473/

7. Magnúsdóttir E, Azim Surani M. How to make a primordial germ cell. Development [Internet]. 2014 Jan 15 [cited 2023 Sep 12];141(2):245–52. Available from: https://dx.doi.org/10.1242/dev.098269

8. 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 [Internet]. 2008 Jun 15 [cited 2023 Sep 12];22(12):1617–35. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18559478/

9. Arnold SJ, Robertson EJ. Making a commitment: cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo. Nat Rev Mol Cell Biol 2009 102 [Internet]. 2009 Jan 8 [cited 2023 Sep 12];10(2):91–103. Available from: https://www.nature.com/articles/nrm2618

10. Molyneaux KA, Zinszner H, Kunwar PS, Schaible K, Stebler J, Sunshine MJ, et al. The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. Development [Internet]. 2003 Sep [cited 2023 Sep 12];130(18):4279–86. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12900445/

11. 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 [Internet]. 2005 Jul 14 [cited 2023 Sep 12];436(7048):207–13. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15937476/

12. Bai X, Zhao C, Qu X, Zhang Z, Tao W, Zhou L, et al. Characterization of nanog in Nile tilapia (Oreochromis niloticus) and its spatiotemporal expression patterns during embryonic and gonadal development. Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol. 2022 Apr 1;259:110718.

13. Saitou M, Yamaji M. Primordial Germ Cells in Mice. Cold Spring Harb Perspect Biol [Internet]. 2012 Nov [cited 2023 Sep 12];4(11). Available from: /pmc/articles/PMC3536339/

14. Lin Y, Page DC. Dazl deficiency leads to embryonic arrest of germ cell development in XY C57BL/6 mice. Dev Biol. 2005 Dec 15;288(2):309–16.

15. Rothstein M, Simoes-Costa M. Heterodimerization of TFAP2 pioneer factors drives epigenomic remodeling during neural crest specification. Genome Res [Internet]. 2020 [cited 2023 Sep 12];30(1):35–48. Available from: /pmc/articles/PMC6961570/

16. 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 [Internet]. 1995 May [cited 2023 Sep 12];121(5):1487–96. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7789278/

17. Reik W, Azim Surani M. Germline and Pluripotent Stem Cells. Cold Spring Harb Perspect Biol [Internet]. 2015 Nov 1 [cited 2023 Sep 18];7(11). Available from: /pmc/articles/PMC4632666/

18. Ferguson-Smith AC. Genomic imprinting: the emergence of an epigenetic paradigm. Nat Rev Genet 2011 128 [Internet]. 2011 Jul 18 [cited 2023 Sep 18];12(8):565–75. Available from: https://www.nature.com/articles/nrg3032

19. Wear HM, McPike MJ, Watanabe KH. From primordial germ cells to primordial follicles: a review and visual representation of early ovarian development in mice. J Ovarian Res [Internet]. 2016 Jun 21 [cited 2023 Sep 18];9(1). Available from: /pmc/articles/PMC4915180/

20. Lobo J, Gillis AJM, Jerónimo C, Henrique R, Looijenga LHJ. Human Germ Cell Tumors are Developmental Cancers: Impact of Epigenetics on Pathobiology and Clinic. Int J Mol Sci [Internet]. 2019 [cited 2023 Sep 18];20(2). Available from: /pmc/articles/PMC6359418/

21. Dieckmann KP, Pichlmeier U. Clinical epidemiology of testicular germ cell tumors. World J Urol [Internet]. 2004 [cited 2023 Sep 18];22(1):2–14. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15034740/

22. 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 [Internet]. 2013 Apr 3 [cited 2023 Sep 18];32(7):938–53. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23474895/

23. Campolo F, Gori M, Favaro R, Nicolis S, Pellegrini M, Botti F, et al. Essential Role of Sox2 for the Establishment and Maintenance of the Germ Cell Line. Stem Cells [Internet]. 2013 Jul 1 [cited 2023 Sep 18];31(7):1408–21. Available from: https://dx.doi.org/10.1002/stem.1392

24. 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 [Internet]. 2020 Mar 15 [cited 2023 Sep 18];146(6):1592–605. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31583686/

25. Nettersheim D, Jostes S, Schneider S, Schorle H. Elucidating human male germ cell development by studying germ cell cancer. Reproduction. 2016;

26. 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 [Internet]. 2015 Jan 15 [cited 2023 Sep 18];160(1–2):253–68. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25543152/

27. 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 [Internet]. 2016 Jul 7 [cited 2023 Sep 18];7(30):47095. Available from: /pmc/articles/PMC5216926/

28. De Jong J, Stoop H, Gillis AJM, Van Gurp RJHLM, Van De Geijn GJM, De Boer M, et al. Differential expression of SOX17 and SOX2 in germ cells and stem cells has biological and clinical implications. J Pathol. 2008 May;215(1):21–30.

29. Gayer FA, Henkel M, Luft J, Reichardt SD, Fichtner A, Legler TJ, et al. The Subtype Identity of Testicular Cancer Cells Determines Their Immunostimulatory Activity in a Coculture Model. Cancers (Basel) [Internet]. 2023 May 1 [cited 2023 Sep 18];15(9). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37174085/

30. 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 408 [Internet]. 2008 Jul 11 [cited 2023 Sep 18];40(8):1016–22. Available from: https://www.nature.com/articles/ng.186

31. 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 2010 182 [Internet]. 2010 Dec 23 [cited 2023 Sep 18];18(2):120–7. Available from: https://www.nature.com/articles/nsmb.2000

32. Skakkebæk NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. Hum Reprod [Internet]. 2001 [cited 2023 Sep 18];16(5):972–8. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11331648/

33. Akre O, Richiardi L. Does a testicular dysgenesis syndrome exist? Hum Reprod [Internet]. 2009 [cited 2023 Sep 18];24(9):2053–60. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19443456/

34. Tenny S, Hoffman MR. Relative Risk. StatPearls [Internet]. 2023 Mar 27 [cited 2023 Sep 18]; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430824/

35. 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 Part A [Internet]. 1997 Feb 1 [cited 2023 Sep 18];33(2):244–52. Available from: http://www.ejcancer.com/article/S0959804996004595/fulltext

36. Hoshi S, Bilim V, Hoshi K, Sasagawa I, Otake K, Chiba D, et al. Familial testicular germ cell tumors in two brothers. IJU Case Reports [Internet]. 2020 May 1 [cited 2023 Sep 18];3(3):100–2. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/iju5.12156

37. 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 Aug 1;68(2):283–9.

38. Kratz CP, Mai PL, Greene MH. Familial Testicular Germ Cell Tumors. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab [Internet]. 2010 Jun [cited 2023 Sep 18];24(3):503. Available from: /pmc/articles/PMC2939736/

39. 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 [Internet]. 2013 Jan 1 [cited 2023 Sep 18];98(1):20–6. Available from: https://adc.bmj.com/content/98/1/20

40. Chan E, Wayne C, Nasr A. Ideal timing of orchiopexy: A systematic review. Pediatr Surg Int [Internet]. 2014 Jan 15 [cited 2023 Sep 18];30(1):87–97. Available from: https://link.springer.com/article/10.1007/s00383-013-3429-y

41. 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. Cancer [Internet]. 2010 Oct 1 [cited 2023 Sep 18];116(19):4520–32. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cncr.25231

42. Leblanc L, Lagrange F, Lecoanet P, Marçon B, Eschwege P, Hubert J. Testicular microlithiasis and testicular tumor: a review of the literature. Basic Clin Androl [Internet]. 2018 Jul 9 [cited 2023 Sep 18];28(1). Available from: /pmc/articles/PMC6036676/

43. 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 der Medizin [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2023 Sep 18];37(1):68–73. Available from: http://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/s-0034-1398852

44. Williams LA, Pankratz N, Lane J, Krailo M, Roesler M, Richardson M, et al. Klinefelter syndrome in males with germ cell tumors: A report from the Children's Oncology Group. Cancer [Internet]. 2018 Oct 10 [cited 2024 Jan 20];124(19):3900. Available from: /pmc/articles/PMC6241518/

45. Bonouvrie K, Van Der Werff Ten Bosch J, Van Den Akker M. Klinefelter syndrome and germ cell tumors: review of the literature. Int J Pediatr Endocrinol [Internet]. 2020 [cited 2024 Jan 20];2020:18. Available from: http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.TheCreativeCommonsPublicDomainDedicationwaiver

46. Fukawa T, Kanayama HO. Current knowledge of risk factors for testicular germ cell tumors. Int J Urol [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2023 Sep 18];25(4):337–44. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/iju.13519

47. Kilic I, Idrees MT. The 2022 World Health Organization classification of germ cell tumors and updates of American Joint Committee for Cancer tumor staging classification. Diagnostic Histopathol. 2023 Jun 1;29(6):259–68.

48. Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Buck Louis GM, Toppari J, Andersson AM, Eisenberg ML, et al. Male reproductive disorders and fertility trends: Influences of environment and genetic susceptibility. Physiol Rev. 2015;

49. Oldenburg J, Berney DM, Bokemeyer C, Climent MA, Daugaard G, Gietema JA, et al. Testicular seminoma and non-seminoma: ESMO-EURACAN Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up 5 behalf of the ESMO Guidelines Committee. 2022 [cited 2024 Jan 20];15. Available from: https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.01.002

50. Oosterhuis JW, Looijenga LHJ. Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. Nature Reviews Cancer. 2005.

51. Oosterhuis JW, Looijenga LHJ. Human germ cell tumours from a developmental perspective. Nat Rev Cancer. 2019 Sep;19(9):522–37.

52. Kocarnik JM, Compton K, Dean FE, Fu W, Gaw BL, Harvey JD, et al. Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life Years for 29 Cancer Groups From 2010 to 2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. JAMA Oncol [Internet]. 2022 [cited 2023 Sep 12];8(3):420–44. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34967848/

53. 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;

54. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. Int J Cancer [Internet]. 2021 Aug 15 [cited 2023 Sep 18];149(4):778–89. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ijc.33588

55. 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 Nov 1;76(5):615–23.

56. Siddiqui BA, Zhang M, Pisters LL, Tu SM. Systemic therapy for primary and extragonadal germ cell tumors: prognosis and nuances of treatment. Transl Androl Urol [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2023 Sep 18];9(Suppl 1):S56. Available from: /pmc/articles/PMC6995840/

57. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. CA Cancer J Clin [Internet]. 2018 Jan [cited 2023 Sep 18];68(1):7–30. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29313949/

58. 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 [Internet]. 2006 Jun 15 [cited 2023 Sep 18];118(12):3099–111. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ijc.21747

59. Trabert B, Chen J, Devesa SS, Bray F, Mcglynn KA. International patterns and trends in testicular cancer incidence, overall and by histologic subtype, 1973-2007. Andrology [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2022 Mar 7];3(1):4. Available from: /pmc/articles/PMC4410839/

60. Leitlinienprogramm Onkologie A. S3-Leitlinie Keimzelltumoren des Hodens | Enhanced Reader [Internet]. AWMF-Registernummer:043/0490L. 2020. p. 227. Available from: https://www.leit-linienprogramm-onkologie.de/leitlinien/hodentumoren

61. Hartl D, Leboulleux S, Hadoux J, Berdelou A, Breuskin I, Guerlain J, et al. TNM Classification. Surg Thyroid Parathyr Gland [Internet]. 2023 Feb 13 [cited 2023 Sep 18];440–6. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553187/

62. Mead GM. International Germ Cell Consensus Classification: a prognostic factor-based staging system for metastatic germ cell cancers. International Germ Cell Cancer Collaborative Group. https://doi.org/101200/JCO1997152594. 2016 Sep 21;15(2):594–603.

63. Hecht SM. Bleomycin: New perspectives on the mechanism of action. J Nat Prod [Internet]. 2000 [cited 2023 Sep 25];63(1):158–68. Available from: https://pubs.acs.org/sharingguidelines

64. Hay J, Shahzeidi S, Laurent G. Mechanisms of bleomycin-induced lung damage. Arch Toxicol [Internet]. 1991 Feb [cited 2023 Sep 25];65(2):81–94. Available from: https://link.springer.com/article/10.1007/BF02034932

65. Baldwin EL, Osheroff N. Etoposide, topoisomerase II and cancer. Curr Med Chem Anticancer Agents [Internet]. 2005 Jul [cited 2023 Sep 25];5(4):363–72. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16101488/

66. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. Oncogene 2003 2247 [Internet]. 2003 Oct 23 [cited 2023 Sep 25];22(47):7265–79. Available from: https://www.nature.com/articles/1206933

67. 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 [Internet]. 2005 Dec [cited 2023 Sep 25];16(12):1915–20. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16126737/

68. De Wit R, Fizazi K. Controversies in the management of clinical stage I testis cancer. J Clin Oncol [Internet]. 2006 Dec 10 [cited 2023 Sep 25];24(35):5482–92. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17158533/

69. Heidenreich A, Albers P, Hartmann M, Kliesch S, Köhrmann KU, 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 [Internet]. 2003 May 1 [cited 2023 Sep 25];169(5):1710–4. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12686815/

70. Heidenreich A, Paffenholz P, Nestler T, Pfister D, Daneshmand S. Role of primary retroperitoneal lymph node dissection in stage I and low-volume metastatic germ cell tumors. Curr Opin Urol [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2023 Sep 25];30(2):251–7. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31972635/

71. Aparicio J, Maroto P, García del Muro X, Sánchez-Muñoz A, Gumà J, Margelí M, et al. Prognostic factors for relapse in stage I seminoma: a new nomogram derived from three consecutive, risk-adapted studies from the Spanish Germ Cell Cancer Group (SGCCG). Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol [Internet]. 2014 Nov 1 [cited 2023 Sep 25];25(11):2173–8. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25210015/

72. Aparicio J, Maroto P, García Del Muro X, 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 [Internet]. 2011 Dec 10 [cited 2023 Sep 25];29(35):4677–81. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22042940/

73. Heinzelbecker J, Schmidt S, Lackner J, Busch J, Bokemeyer C, Classen J, et al. Therapy of clinical stage IIA and IIB seminoma: a systematic review. World J Urol [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2023 Sep 25];40(12):2829–41. Available from: https://link.springer.com/article/10.1007/s00345-021-03873-5

74. Weissbach L, Bussar-Maatz R, Flechtner H, Pichlmeier U, Hartmann M, Keller L. RPLND or primary chemotherapy in clinical stage IIA/B nonseminomatous germ cell tumors? Results of a prospective multicenter trial including quality of life assessment. Eur Urol [Internet]. 2000 [cited 2023 Sep 25];37(5):582–94. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10765098/

75. 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 [Internet]. 2007 May [cited 2023 Sep 25];18(5):917–24. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17351252/

76. 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. Br J Cancer 1998 786 [Internet]. 1998 [cited 2023 Sep 25];78(6):828–32. Available from: https://www.nature.com/articles/bjc1998587

77. Rashdan S, Einhorn LH. Salvage therapy for patients with germ cell tumor. J Oncol Pract. 2016 May 1;12(5):437–43.

78. Kurobe M, Kawai K, Oikawa T, Ichioka D, Kandori S, Takaoka E ichirou, et al. Paclitaxel, ifosfamide, and cisplatin (TIP) as salvage and consolidation chemotherapy for advanced

germ cell tumor. J Cancer Res Clin Oncol [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2023 Sep 25];141(1):127. Available from: /pmc/articles/PMC4282876/

79. Feldman DR, Hu J, Dorff TB, Patil S, Alstine LJ Van, Momen L, et al. Phase II trial of paclitaxel, ifosfamide, and cisplatin (TIP) for previously untreated patients (pts) with intermediate- or poor-risk germ cell tumors (GCT). https://doi.org/101200/jco2013316_suppl336. 2013 Feb 20;31(6_suppl):336–336.

80. Lorch A, Rick O, Wündisch T, Hartmann JT, Bokemeyer C, Beyer J. High dose chemotherapy as salvage treatment for unresectable late relapse germ cell tumors. J Urol [Internet]. 2010 Jul [cited 2023 Sep 25];184(1):168–73. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20483152/

81. 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 [Internet]. 2014 Jan 1 [cited 2023 Sep 25];110(1):256. Available from: /pmc/articles/PMC3887279/

82. Shrem NS, Wood L, Hamilton RJ, Kuhathaas K, Czaykowski P, Roberts M, et al. Testicular cancer survivorship: Long-term toxicity and management. Can Urol Assoc J [Internet]. 2022 Aug 1 [cited 2023 Sep 25];16(8):257. Available from: /pmc/articles/PMC9343164/

83. 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 [Internet]. 2007 Apr 4 [cited 2023 Sep 25];99(7):533–44. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17405998/

84. Ross A, Bhasin S. Hypogonadism: Its Prevalence and Diagnosis. Urol Clin North Am. 2016 May 1;43(2):163–76.

85. Moody JA, Ahmed K, Yap T, Minhas S, Shabbir M. Fertility managment in testicular cancer: the need to establish a standardized and evidence-based patient-centric pathway. BJU Int [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2023 Sep 25];123(1):160–72. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29920910/

86. World Health Organization. World cancer report: cancer research for cancer prevention. International Agency for Research on Cancer. 2020.

87. Wang L, Lu B, He M, Wang Y, Wang Z, Du L. Prostate Cancer Incidence and Mortality: Global Status and Temporal Trends in 89 Countries From 2000 to 2019. Front Public Heal [Internet]. 2022 Feb 16 [cited 2023 Sep 27];10:811044. Available from: /pmc/articles/PMC8888523/

88. Scott E, Mamawala M, Epstein JI, Landis P, Wolf S, Trock, et al. Intermediate and longer-term outcomes from a prospective active-surveillance program for favorable-risk prostate cancer. Tosoian JJ, Mamawala M, Epstein JI, Landis P, Wolf S, Trock BJ, Carter HB.J Clin Oncol. 2015 Oct 20;33(30):3379-85. [Epub 2015 Aug 31]. doi: 10.1200/JCO.2015.62.5764. Urol Oncol Semin Orig Investig. 2017 Mar 1;35(3):121–2.

89. Sturge J, Caley MP, Waxman J. Bone metastasis in prostate cancer: emerging therapeutic strategies. Nat Rev Clin Oncol [Internet]. 2011 [cited 2023 Jul 4];8(6):357–68. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21556025/

90. Koo KC, Park SU, Kim KH, Rha KH, Hong SJ, Yang SC, et al. Prognostic impacts of metastatic site and pain on progression to castrate resistance and mortality in patients with metastatic prostate cancer. Yonsei Med J. 2015;

91. Zhang Y, Rumgay H, Li M, Yu H, Pan H, Ni J. The global landscape of bladder cancer

incidence and mortality in 2020 and projections to 2040. J Glob Health [Internet]. 2023 Sep 15 [cited 2023 Sep 27];13:04109. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37712386/

92. Von Der Maase H, Sengelov L, Roberts JT, Ricci S, Dogliotti L, Oliver T, et al. Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer. J Clin Oncol. 2005;

93. Von Der Maase H, Sengelov L, Roberts JT, Ricci S, Dogliotti L, Oliver T, et al. Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer. J Clin Oncol. 2005 Sep 21;23(21):4602–8.

94. Padala SA, Barsouk A, Thandra KC, Saginala K, Mohammed A, Vakiti A, et al. Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. World J Oncol [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2023 Sep 27];11(3):79. Available from: /pmc/articles/PMC7239575/

95. Makhov P, Joshi S, Ghatalia P, Kutikov A, Uzzo RG, Kolenko VM. Resistance to Systemic Therapies in Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Mechanisms and Management Strategies. Mol Cancer Ther [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2023 Sep 27];17(7):1355–64. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29967214/

96. Galluzzi L, Vitale I, Michels J, Brenner C, Szabadkai G, Harel-Bellan A, et al. Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. Cell Death Dis [Internet]. 2014 May 29 [cited 2023 Sep 27];5(5). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24874729/

97. Vega-Stromberg T. Chemotherapy-induced secondary malignancies. J Infus Nurs [Internet]. 2003 Nov [cited 2023 Sep 27];26(6):353–61. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14624175/

98. Cheng Y, He C, Wang M, Ma X, Mo F, Yang S, et al. Targeting epigenetic regulators for cancer therapy: Mechanisms and advances in clinical trials. Signal Transduct Target Ther. 2019;

99. Deichmann U. Epigenetics: The origins and evolution of a fashionable topic. Dev Biol. 2016 Aug 1;416(1):249–54.

100. Van Speybroeck L. From Epigenesis to Epigenetics. Ann N Y Acad Sci [Internet]. 2002 Dec 1 [cited 2023 Oct 3];981(1):61–81. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04912.x

101. Holliday R. The Inheritance of Epigenetic Defects. Science (80-) [Internet]. 1987 [cited 2023 Oct 3];238(4824):163–70. Available from: https://www.science.org/doi/10.1126/science.3310230

102. Holliday R. Epigenetics: A historical overview. Epigenetics [Internet]. 2006 [cited 2023 Oct 3];1(2):76–80. Available from: http://www.landesbioscience.com/journals/epigenetics/abstract.php?id=2762

103. Gibney ER, Nolan CM. Epigenetics and gene expression. Hered 2010 1051 [Internet]. 2010 May 12 [cited 2023 Oct 3];105(1):4–13. Available from: https://www.nature.com/articles/hdy201054

104. Waterland RA. Epigenetic mechanisms and gastrointestinal development. J Pediatr [Internet]. 2006 Nov 1 [cited 2023 Oct 3];149(5 SUPPL.):S137–42. Available from: http://www.jpeds.com/article/S002234760600624X/fulltext

105. Wu CT, Morris JR. Genes, Genetics, and Epigenetics: A Correspondence. Science (80-

) [Internet]. 2001 Aug 10 [cited 2023 Oct 3];293(5532):1103–5. Available from: https://www.science.org/doi/10.1126/science.293.5532.1103

106. Miranda TB, Jones PA. DNA methylation: The nuts and bolts of repression. J Cell Physiol [Internet]. 2007 Nov 1 [cited 2023 Oct 3];213(2):384–90. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcp.21224

107. Yang X, Han H, DeCarvalho DD, Lay FD, Jones PA, Liang G. Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer. Cancer Cell [Internet]. 2014 Oct 13 [cited 2023 Oct 3];26(4):577–90. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25263941/

108. Audia JE, Campbell RM. Histone Modifications and Cancer. Cold Spring Harb Perspect Biol [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2023 Oct 3];8(4):a019521. Available from: http://cshperspectives.cshlp.org/content/8/4/a019521.full

109. Zhang Y, Sun Z, Jia J, Du T, Zhang N, Tang Y, et al. Overview of Histone Modification. Adv Exp Med Biol [Internet]. 2021 [cited 2023 Oct 3];1283:1–16. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-15-8104-5_1

110. Lyko F. The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. Nat Rev Genet [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2023 Oct 3];19(2):81–92. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29033456/

111. Biswas S, Rao CM. Epigenetic tools (The Writers, The Readers and The Erasers) and their implications in cancer therapy. Eur J Pharmacol [Internet]. 2018 Oct 15 [cited 2023 Oct 3];837:8–24. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30125562/

112. Rajendran P, Johnson G, Li L, Chen YS, Dashwood M, Nguyen N, et al. Acetylation of CCAR2 Establishes a BET/BRD9 Acetyl Switch in Response to Combined Deacetylase and Bromodomain Inhibition. Cancer Res [Internet]. 2019;79(5):918–27. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30643017

113. Lu D. Epigenetic modification enzymes: catalytic mechanisms and inhibitors. Acta Pharm Sin B. 2013 May 1;3(3):141–9.

114. Gregoretti I V., Lee YM, Goodson H V. Molecular Evolution of the Histone Deacetylase Family: Functional Implications of Phylogenetic Analysis. J Mol Biol. 2004 Apr 16;338(1):17–31.

115. Khan N, Jeffers M, Kumar S, Hackett C, Boldog F, Khramtsov N, et al. Determination of the class and isoform selectivity of small-molecule histone deacetylase inhibitors. Biochem J [Internet]. 2008 Jan 15 [cited 2023 Oct 3];409(2):581–9. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17868033/

116. Taniguchi Y. The bromodomain and extra-terminal domain (BET) family: Functional anatomy of BET paralogous proteins. International Journal of Molecular Sciences. 2016.

117. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. Nat Biotechnol 2010 2810 [Internet]. 2010 Oct 13 [cited 2023 Oct 3];28(10):1057–68. Available from: https://www.nature.com/articles/nbt.1685

118. Malik K, Brown KW. Epigenetic gene deregulation in cancer. Br J Cancer 2000 8312 [Internet]. 2000 Dec 5 [cited 2023 Oct 3];83(12):1583–8. Available from: https://www.nature.com/articles/6691549

119. Buljubašić R, Buljubašić M, Bojanac AK, Ulamec M, Vlahović M, Ježek D, et al. Epigenetics and testicular germ cell tumors. Gene. 2018 Jun 30;661:22–33.

120. Cheng Y, He C, Wang M, Ma X, Mo F, Yang S, et al. Targeting epigenetic regulators for

cancer therapy: mechanisms and advances in clinical trials. Signal Transduct Target Ther 2019 41 [Internet]. 2019 Dec 17 [cited 2023 Oct 3];4(1):1–39. Available from: https://www.nature.com/articles/s41392-019-0095-0

121. Abdelaziz N, Therachiyil L, Sadida HQ, Ali AM, Khan OS, Singh M, et al. Epigenetic inhibitors and their role in cancer therapy. Int Rev Cell Mol Biol. 2023 Jan 1;380:211–51.

122. Cardoso AR, Lobo J, Miranda-Gonçalves V, Henrique R, Jerónimo C. Epigenetic alterations as therapeutic targets in Testicular Germ Cell Tumours : current and future application of “epidrugs.” Epigenetics [Internet]. 2021 [cited 2023 Oct 3];16(4):353–72. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32749176/

123. Ganesan A, Arimondo PB, Rots MG, Jeronimo C, Berdasco M. The timeline of epigenetic drug discovery: From reality to dreams. Clinical Epigenetics. 2019.

124. Baylin SB, Jones PA. Epigenetic Determinants of Cancer. Cold Spring Harb Perspect Biol [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2023 Oct 3];8(9). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27194046/

125. Šorm F, Pískala A, Čihák A, Veselý J. 5-Azacytidine, a new, highly effective cancerostatic. Experientia [Internet]. 1964 Apr 1 [cited 2023 Oct 3];20(4):202–3. Available from: https://link.springer.com/article/10.1007/BF02135399

126. Diesch J, Zwick A, Garz AK, Palau A, Buschbeck M, Götze KS. A clinical-molecular update on azanucleoside-based therapy for the treatment of hematologic cancers. Clin Epigenetics [Internet]. 2016 Jun 21 [cited 2023 Oct 3];8(1). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27330573/

127. Christman JK. 5-Azacytidine and 5-aza-2’-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. Oncogene [Internet]. 2002 Aug 12 [cited 2023 Oct 3];21(35):5483–95. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12154409/

128. Jones PA, Taylor SM. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. Cell [Internet]. 1980 May 1 [cited 2023 Oct 3];20(1):85–93. Available from: http://www.cell.com/article/0092867480902378/fulltext

129. Jones PA, Taylor SM, Wilson VL. Inhibition of DNA methylation by 5-azacytidine. Recent Results Cancer Res [Internet]. 1983 [cited 2023 Oct 3];84:202–11. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6189159/

130. 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 [Internet]. 1984 [cited 2023 Oct 3];81(22):6993–7. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6209710/

131. 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 [Internet]. 1971 [cited 2023 Oct 3];68(2):378. Available from: /pmc/articles/PMC388942/?report=abstract

132. Reuben RC, Wife RI, 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 [Internet]. 1976 [cited 2023 Oct 3];73(3):862–6. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1062798/

133. Andreeff M, Stone R, Michaeli J, Young C, Tong W, Sogoloff H, et al. Hexamethylene bisacetamide in myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia: a phase

II clinical trial with a differentiation- inducing agent. Blood [Internet]. 1992 Nov 15 [cited 2023 Oct 3];80(10):2604–9. Available from: https://dx.doi.org/10.1182/blood.V80.10.2604.2604

134. 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 [Internet]. 1998 Mar 17 [cited 2023 Oct 3];95(6):3003–7. Available from: https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.95.6.3003

135. Marks PA. Discovery and development of SAHA as an anticancer agent. Oncogene [Internet]. 2007 Feb 26 [cited 2023 Oct 3];26(9):1351–6. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17322921/

136. Yoshidas M, Kijima M, Akita M, Beppu T. Potent and Specific Inhibition of Mammalian Histone Deacetylase Both in Vivo and in Vitro by Trichostatin A*. 1990;265(28):17174–9.

137. Bose P, Dai Y, Grant S. Histone deacetylase inhibitor (HDACI) mechanisms of action: emerging insights. Pharmacol Ther [Internet]. 2014 [cited 2023 Oct 3];143(3):323. Available from: /pmc/articles/PMC4117710/

138. Kim HJ, Bae SC. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. Am J Transl Res [Internet]. 2011 [cited 2023 Oct 3];3(2):166. Available from: /pmc/articles/PMC3056563/

139. Vandermolen KM, McCulloch W, Pearce CJ, Oberlies NH. Romidepsin (Istodax®, NSC 630176, FR901228, FK228, Depsipeptide): A Natural Product Recently Approved for Cutaneous T-cell Lymphoma. J Antibiot (Tokyo) [Internet]. 2011 Aug [cited 2023 Oct 3];64(8):525. Available from: /pmc/articles/PMC3163831/

140. Bertino EM, Otterson GA. Romidepsin: a novel histone deacetylase inhibitor for cancer. Expert Opin Investig Drugs [Internet]. 2011 Aug [cited 2023 Oct 3];20(8):1151–8. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21699444/

141. Valdez BC, Brammer JE, Li Y, Murray D, Liu Y, Hosing C, et al. Romidepsin targets multiple survival signaling pathways in malignant T cells. Blood Cancer J. 2015;

142. 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 Review of Anticancer Therapy. 2010.

143. Eleutherakis-Papaiakovou E, Kanellias N, Kastritis E, Gavriatopoulou M, Terpos E, Dimopoulos MA. Efficacy of Panobinostat for the Treatment of Multiple Myeloma. J Oncol [Internet]. 2020 [cited 2023 Oct 3];2020. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32411240/

144. O'Connor OA, Horwitz S, Masszi T, Van Hoof A, Brown P, Doorduijn J, et al. Belinostat in Patients With Relapsed or Refractory Peripheral T-Cell Lymphoma: Results of the Pivotal Phase II BELIEF (CLN-19) Study. J Clin Oncol [Internet]. 2015 Aug 10 [cited 2023 Oct 3];33(23):2492–9. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26101246/

145. 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 Aug 1;18(8):501–7.

146. Farooqi AA, Fayyaz S, Poltronieri P, Calin G, Mallardo M. Epigenetic deregulation in cancer: Enzyme players and non-coding RNAs. Semin Cancer Biol. 2022 Aug 1;83:197–207.

147. Grayson AR, Walsh EM, Cameron MJ, Godec J, Ashworth T, Ambrose JM, et al. MYC,

a downstream target of BRD-NUT, is necessary and sufficient for the blockade of differentiation in NUT midline carcinoma. Oncogene 2014 3313 [Internet]. 2013 Apr 22 [cited 2023 Oct 3];33(13):1736–42. Available from: https://www.nature.com/articles/onc2013126

148. Donati B, Lorenzini E, Ciarrocchi A. BRD4 and Cancer: Going beyond transcriptional regulation. Mol Cancer [Internet]. 2018 Nov 22 [cited 2023 Oct 3];17(1):1–13. Available from: https://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-018-0915-9

149. Yin M, Guo Y, Hu R, Cai WL, Li Y, Pei S, et al. Potent BRD4 inhibitor suppresses cancer cell-macrophage interaction. Nat Commun 2020 111 [Internet]. 2020 Apr 14 [cited 2023 Oct 3];11(1):1–14. Available from: https://www.nature.com/articles/s41467-020-15290-0

150. 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 [Internet]. 2011 Sep 16 [cited 2023 Oct 3];146(6):904–17. Available from: http://www.cell.com/article/S0092867411009433/fulltext

151. Coude MM, Braun T, Berrou J, Dupont M, Bertrand S, Masse A, et al. BET inhibitor OTX015 targets BRD2 and BRD4 and decreases c-MYC in acute leukemia cells. Oncotarget [Internet]. 2015;6(19):17698–712. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25989842

152. Filippakopoulos P, Qi J, Picaud S, Shen Y, Smith WB, Fedorov O, et al. Selective inhibition of BET bromodomains. Nature [Internet]. 2010;468(7327):1067–73. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20871596

153. Oing C, Skowron MA, Bokemeyer C, Nettersheim D. Epigenetic treatment combinations to effectively target cisplatin-resistant germ cell tumors: past, present, and future considerations. Andrology [Internet]. 2019;7(4):487–97. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30924611

154. Anighoro A, Bajorath J, Rastelli G. Polypharmacology: challenges and opportunities in drug discovery. J Med Chem [Internet]. 2014 Oct 9 [cited 2022 Jul 11];57(19):7874–87. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24946140/

155. Gabay M, Li Y, Felsher DW. MYC Activation Is a Hallmark of Cancer Initiation and Maintenance. Cold Spring Harb Perspect Med [Internet]. 2014 [cited 2023 Oct 3];4(6). Available from: /pmc/articles/PMC4031954/

156. Wen N, Guo B, Zheng H, Xu L, Liang H, Wang Q, et al. Bromodomain inhibitor jq1 induces cell cycle arrest and apoptosis of glioma stem cells through the VEGF/PI3K/AKT signaling pathway. Int J Oncol [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2023 Oct 3];55(4):879–95. Available from: http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2019.4863/abstract

157. Baker EK, Taylor S, Gupte A, Sharp PP, Walia M, Walsh NC, et al. BET inhibitors induce apoptosis through a MYC independent mechanism and synergise with CDK inhibitors to kill osteosarcoma cells. Sci Reports 2015 51 [Internet]. 2015 May 6 [cited 2023 Oct 3];5(1):1–14. Available from: https://www.nature.com/articles/srep10120

158. 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;

159. Wu X, Liu D, Tao D, Xiang W, Xiao X, Wang M, et al. BRD4 regulates EZH2 transcription through upregulation of C-MYC and represents a novel therapeutic target in bladder cancer. Mol Cancer Ther [Internet]. 2016 May 1 [cited 2023 Oct 3];15(5):1029–42.

Available from: https://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0750

160. Zeng F, Jiang G, Wu X, Liu D, Gao X, Xie F, et al. Inhibition of BRD4 Suppresses Cell Proliferation and Induces Apoptosis in Renal Cell Carcinoma. Cell Physiol Biochem [Internet]. 2017 [cited 2023 Oct 3];41:1947. Available from: www.karger.com/cpbwww.karger.com/cpb

161. Asangani IA, Dommeti VL, Wang X, Malik R, Cieslik M, Yang R, et al. Therapeutic targeting of BET bromodomain proteins in castration-resistant prostate cancer. Nature [Internet]. 2014;510(7504):278–82. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24759320

162. Riveiro ME, Astorgues-Xerri L, Vazquez R, Frapolli R, Kwee I, Rinaldi A, et al. OTX015 (MK-8628), a novel BET inhibitor, exhibits antitumor activity in non-small cell and small cell lung cancer models harboring different oncogenic mutations. Oncotarget [Internet]. 2016;7(51):84675–87. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27835869

163. 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 [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2023 Oct 3];55(3):397–405. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26341814/

164. Li DR, Zhang H, Peek E, Wang S, Du L, Li G, et al. Synergy of Histone-Deacetylase Inhibitor AR-42 with Cisplatin in Bladder Cancer. J Urol. 2015;194(2):547–55.

165. Deb AA, Wilson SS, Rove KO, Kumar B, Koul S, Lim DD, et al. Potentiation of mitomycin C tumoricidal activity for transitional cell carcinoma by histone deacetylase inhibitors in vitro. J Urol. 2011;

166. Rathkopf D, Wong BY, Ross RW, Anand A, Tanaka E, Woo MM, et al. A phase I study of oral panobinostat alone and in combination with docetaxel in patients with castration-resistant prostate cancer. Cancer Chemother Pharmacol. 2010;

167. Shen L, Ciesielski M, Ramakrishnan S, Miles KM, Ellis L, Sotomayor P, et al. Class I Histone deacetylase inhibitor entinostat suppresses regulatory T cells and enhances immunotherapies in renal and prostate cancer models. PLoS One. 2012;

168. Rozati S, Cheng PF, Widmer DS, Fujii K, Levesque MP, Dummer R. Romidepsin and Azacitidine Synergize in their Epigenetic Modulatory Effects to Induce Apoptosis in CTCL. Clin Cancer Res [Internet]. 2016;22(8):2020–31. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26660520

169. Liu PY, Sokolowski N, Guo ST, Siddiqi F, Atmadibrata B, Telfer TJ, et al. The BET bromodomain inhibitor exerts the most potent synergistic anticancer effects with quinone-containing compounds and anti-microtubule drugs. Oncotarget [Internet]. 2016 Nov 29;7(48):79217–32. Available from: https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.12640

170. Mao F, Li J, Luo Q, Wang R, Kong Y, Carlock C, et al. Plk1 Inhibition Enhances the Efficacy of BET Epigenetic Reader Blockade in Castration-Resistant Prostate Cancer. Mol Cancer Ther [Internet]. 2018;17(7):1554–65. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29716963

171. 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 [Internet]. 2015;6(25):21507–21. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26087189

172. Badamchi-Zadeh A, Moynihan KD, Larocca RA, Aid M, Provine NM, Iampietro MJ, et al. Combined HDAC and BET Inhibition Enhances Melanoma Vaccine Immunogenicity and Efficacy. J Immunol [Internet]. 2018;201(9):2744–52. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30249811

173. Adeegbe DO, Liu Y, Lizotte PH, Kamihara Y, Aref AR, Almonte C, et al. Synergistic Immunostimulatory Effects and Therapeutic Benefit of Combined Histone Deacetylase and Bromodomain Inhibition in Non-Small Cell Lung Cancer. Cancer Discov [Internet]. 2017;7(8):852–67. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28408401

174. Mazur PK, Herner A, Mello SS, Wirth M, Hausmann S, Sanchez-Rivera FJ, et al. Combined inhibition of BET family proteins and histone deacetylases as a potential epigenetics-based therapy for pancreatic ductal adenocarcinoma. Nat Med [Internet]. 2015;21(10):1163–71. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26390243

175. Zhao L, Okhovat JP, Hong EK, Kim YH, Wood GS. Preclinical Studies Support Combined Inhibition of BET Family Proteins and Histone Deacetylases as Epigenetic Therapy for Cutaneous T-Cell Lymphoma. Neoplasia [Internet]. 2019;21(1):82–92. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30529073

176. Holscher AS, Schulz WA, Pinkerneil M, Niegisch G, Hoffmann MJ. Combined inhibition of BET proteins and class I HDACs synergistically induces apoptosis in urothelial carcinoma cell lines. Clin Epigenetics [Internet]. 2018;10:1. Available from: internal-pdf://228.31.66.182/Combined inhibition of BET proteins and Class.pdf

177. Lopez JS, Banerji U. Combine and conquer: challenges for targeted therapy combinations in early phase trials. Nat Rev Clin Oncol [Internet]. 2017 [cited 2023 Oct 3];14(1):57. Available from: /pmc/articles/PMC6135233/

178. Roy R, Ria T, RoyMahaPatra D, Sk UH. Single Inhibitors versus Dual Inhibitors: Role of HDAC in Cancer. ACS omega [Internet]. 2023 May 16 [cited 2023 Oct 8];8(19):16532–44. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37214715/

179. Steinemann G, Dittmer A, Schmidt J, Josuttis D, Fahling M, Biersack B, et al. Antitumor and antiangiogenic activity of the novel chimeric inhibitor animacroxam in testicular germ cell cancer. Mol Oncol [Internet]. 2019;13(12):2679–96. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31583820

180. M. O'Boyle N, J. Meegan M. Designed Multiple Ligands for Cancer Therapy. Curr Med Chem. 2011;

181. Hesham HM, Lasheen DS, Abouzid KAM. Chimeric HDAC inhibitors: Comprehensive review on the HDAC-based strategies developed to combat cancer. Med Res Rev [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2023 Oct 8];38(6):2058–109. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29733427/

182. Kalin JH, Wu M, Gomez A V, Song Y, Das J, Hayward D, et al. Targeting the CoREST complex with dual histone deacetylase and demethylase inhibitors. Nat Commun [Internet]. 2018 Dec 4;9(1):53. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29302039

183. Laugesen A, Helin K. Chromatin repressive complexes in stem cells, development, and cancer. Cell Stem Cell [Internet]. 2014 Jun 5 [cited 2023 Aug 20];14(6):735–51. Available from: http://www.cell.com/article/S1934590914001933/fulltext

184. Seshacharyulu P, Ponnusamy MP, Haridas D, Jain M, Ganti AK, Batra SK. Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. Expert Opinion on Therapeutic Targets. 2012.

185. Grandis JR, Sok JC. Signaling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy. Pharmacology and Therapeutics. 2004.

186. Zhang L, Zhang Y, Mehta A, Boufraqech M, Davis S, Wang J, et al. Dual inhibition of HDAC and EGFR signaling with CUDC-101 induces potent suppression of tumor growth and metastasis in anaplastic thyroid cancer. Oncotarget [Internet]. 2015;6(11):9073–85. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25940539

187. Zang J, Liang X, Huang Y, Jia Y, Li X, Xu W, et al. Discovery of Novel Pazopanib-Based HDAC and VEGFR Dual Inhibitors Targeting Cancer Epigenetics and Angiogenesis Simultaneously. J Med Chem [Internet]. 2018;61(12):5304–22. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29787262

188. Dong H, Yin H, Zhao C, Cao J, Xu W, Zhang Y. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel Osimertinib-Based HDAC and EGFR Dual Inhibitors. Molecules [Internet]. 2019;24(13). Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31261881

189. Burmeister A, Stephan A, Alves Avelar LA, Müller MR, Seiwert A, Höfmann S, et al. Establishment and Evaluation of Dual HDAC/BET Inhibitors as Therapeutic Options for Germ Cell Tumors and Other Urological Malignancies. Mol Cancer Ther [Internet]. 2022 Nov 1 [cited 2023 Aug 20];21(11):1674–88. Available from: https://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-22-0207

190. 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;

191. 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;

192. 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(46).

193. Jostes S, Nettersheim D, Schorle H. Epigenetic drugs and their molecular targets in testicular germ cell tumours. Nat Rev Urol 2019 164 [Internet]. 2019 Feb 14 [cited 2022 Mar 7];16(4):245–59. Available from: https://www.nature.com/articles/s41585-019-0154-x

194. Boffetta P, Kaldor JM. Secondary malignancies following cancer chemotherapy. Acta Oncol [Internet]. 1994 [cited 2023 Nov 12];33(6):591–8. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7946433/

195. Kuijk E, Kranenburg O, Cuppen E, Van Hoeck A. Common anti-cancer therapies induce somatic mutations in stem cells of healthy tissue. Nat Commun 2022 131 [Internet]. 2022 Oct 7 [cited 2023 Nov 12];13(1):1–10. Available from: https://www.nature.com/articles/s41467-022-33663-5

196. Dohle GR. Male infertility in cancer patients: Review of the literature. Int J Urol [Internet]. 2010 Apr 1 [cited 2024 Jan 20];17(4):327–31. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1442-2042.2010.02484.x

197. Marek L, Hamacher A, Hansen FK, Kuna K, Gohlke H, Kassack MU, et al. Histone deacetylase (HDAC) inhibitors with a novel connecting unit linker region reveal a selectivity profile for HDAC4 and HDAC5 with improved activity against chemoresistant cancer cells. J Med Chem. 2013;

198. Pflieger M, Sönnichsen M, Horstick-Muche N, Yang J, Schliehe-Diecks J, Schöler A, et

al. Oxa analogues of nexturastat A demonstrate improved HDAC6 selectivity and superior anti-leukaemia activity. ChemMedChem. 2021;1–7.

199. Pflieger M, Hamacher A, Öz T, Horstick-Muche N, Boesen B, Schrenk C, et al. Novel α,β-unsaturated hydroxamic acid derivatives overcome cisplatin resistance. Bioorganic Med Chem. 2019;27(19):115036.

200. Alves LA, Schrenk C, Melf S, Hamacher A, Hansen FK, Schliehe-diecks J, et al. Synergistic induction of apoptosis in resistant head and neck carcinoma and leukemia by alkoxyamide-based histone deacetylase inhibitors. Eur J Med Chem. 2021;211.

201. Asfaha Y, Schrenk C, Alves Avelar LA, Lange F, Wang C, Bandolik JJ, et al. Novel alkoxyamide-based histone deacetylase inhibitors reverse cisplatin resistance in chemoresistant cancer cells. Bioorganic Med Chem. 2020;28(1):115108.

202. Stenzel K, Hamacher A, Hansen FK, Gertzen CGW, Senger J, Marquardt V, et al. Alkoxyurea-Based Histone Deacetylase Inhibitors Increase Cisplatin Potency in Chemoresistant Cancer Cell Lines. J Med Chem. 2017;60(13):5334–48.

203. Dong J, Wang NN, Yao ZJ, Zhang L, Cheng Y, Ouyang D, et al. ADMETlab: a platform for systematic ADMET evaluation based on a comprehensively collected ADMET database. J Cheminform [Internet]. 2018 [cited 2022 Jul 11];10(1). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29943074/

204. Rozen S, Skaletsky HJ. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S, editors. Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, NJ; 2000. p. 356–86.

205. 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 Jan;38(Database issue):D792-9.

206. Birney E, Andrews TD, Bevan P, Caccamo M, Chen Y, Clarke L, et al. An Overview of Ensembl. Genome Res [Internet]. 2004 May [cited 2023 Aug 12];14(5):925. Available from: /pmc/articles/PMC479121/

207. Goldman MJ, Craft B, Hastie M, Repečka K, McDade F, Kamath A, et al. Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform. Nature Biotechnology. 2020.

208. Heberle H, Meirelles VG, da Silva FR, Telles GP, Minghim R. InteractiVenn: A web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. BMC Bioinformatics. 2015;

209. 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;

210. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nat Protoc. 2009;

211. Heinz S, Benner C, Spann N, Bertolino E, Lin YC, Laslo P, et al. Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. Mol Cell [Internet]. 2010 May 28 [cited 2022 Jul 11];38(4):576–89. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20513432/

212. Yu Y, Ouyang Y, Yao W. shinyCircos: an R/Shiny application for interactive creation of Circos plot. Bioinformatics [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2021 Nov 12];34(7):1229–31. Available from: https://academic.oup.com/bioinformatics/article/34/7/1229/4657077

213. Gerst R, Olzer MH¨. PCAGO: An interactive web service to analyze RNA-Seq data with

principal component analysis. [cited 2021 Nov 12]; Available from: https://doi.org/10.1101/433078

214. Hunter JD. Matplotlib: A 2D Graphics Environment. Comput Sci Eng. 2007;9(3):90–5.

215. Waskom ML. seaborn: statistical data visualization. J Open Source Softw [Internet]. 2021 Apr 6 [cited 2021 Nov 12];6(60):3021. Available from: https://joss.theoj.org/papers/10.21105/joss.03021

216. Koopman G, Reutelingsperger CPM, Kuijten GAM, Keehnen RMJ, Pals ST, Van Oers MHJ. Annexin V for Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on B Cells Undergoing Apoptosis. Blood. 1994 Sep 1;84(5):1415–20.

217. McLendon R, Friedman A, Bigner D, Van Meir EG, Brat DJ, Mastrogianakis GM, et al. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. Nat 2008 4557216 [Internet]. 2008 Sep 4 [cited 2024 Jan 20];455(7216):1061–8. Available from: https://www.nature.com/articles/nature07385

218. Pinkerneil M, Hoffmann MJ, Deenen R, Köhrer K, Arent T, Schulz WA, et al. Inhibition of class I histone deacetylases 1 and 2 promotes urothelial carcinoma cell death by various mechanisms. Mol Cancer Ther. 2016;

219. Uhlen M, Oksvold P, Fagerberg L, Lundberg E, Jonasson K, Forsberg M, et al. Towards a knowledge-based Human Protein Atlas. Nat Biotechnol 2010 2812 [Internet]. 2010 Dec 7 [cited 2023 Nov 26];28(12):1248–50. Available from: https://www.nature.com/articles/nbt1210-1248

220. Zhou S, Zhang S, Wang L, Huang S, Yuan Y, Yang J, et al. BET protein inhibitor JQ1 downregulates chromatin accessibility and suppresses metastasis of gastric cancer via inactivating RUNX2/NID1 signaling. Oncogenesis [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2022 Jul 11];9(3). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32157097/

221. Rivers ZT, Oostra DR, Westholder JS, Vercellotti GM. Romidepsin-associated cardiac toxicity and ECG changes: A case report and review of the literature. J Oncol Pharm Pract [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2023 Nov 18];24(1):56–62. Available from: https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1078155216673229

222. Du J, Han X, Lin S, Qiu C, Zhu L, Huang Z, et al. Efficacy and Treatment-Related Adverse Events of Romidepsin in PTCL Clinical Studies: A Systematic Review and Meta-Analysis. Front Med. 2021 Nov 5;8:732727.

223. Kelly TK, De Carvalho DD, Jones PA. Epigenetic Modifications as Therapeutic Targets. Nat Biotechnol [Internet]. 2010 Oct [cited 2023 Nov 18];28(10):1069. Available from: /pmc/articles/PMC3022972/

224. Juan LJ, Shia WJ, Chen MH, Yang WM, Seto E, Lin YS, et al. Histone deacetylases specifically down-regulate p53-dependent gene activation. J Biol Chem [Internet]. 2000 Jul 7 [cited 2023 Nov 27];275(27):20436–43. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10777477/

225. 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;

226. Pan GJ, Chang ZYI, Schöler HR, Pei D. Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. Cell Res 2002 125 [Internet]. 2002 [cited 2023 Nov 18];12(5):321–9. Available from: https://www.nature.com/articles/7290134

227. Levine AJ, Brivanlou AH. GDF3, a BMP inhibitor, regulates cell fate in stem cells and early embryos. Development [Internet]. 2006 Jan [cited 2023 Nov 18];133(2):209–16.

Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16339188/

228. Hai T, Wolfgang CD, Marsee DK, Allen AE, Sivaprasad U. ATF3 and Stress Responses. Gene Expr [Internet]. 1999 [cited 2023 Nov 26];7(4-5–6):321. Available from: /pmc/articles/PMC6174666/

229. Rossi MN, Antonangeli F. Cellular Response upon Stress: P57 Contribution to the Final Outcome. Mediators Inflamm. 2015;2015.

230. Mariesa Slaughter AJ, Shanle EK, Khan A, Rothbart SB, Strahl BD, Davis Correspondence IJ, et al. In Brief HDAC inhibition results in widespread alteration of the histone acetylation landscape and BRD4 targeting to gene bodies. 2021 [cited 2021 Nov 13]; Available from: https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108638

231. Wang Z, Zang C, Cui K, Schones DE, Barski A, Peng W, et al. Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes. Cell [Internet]. 2009 Sep 4 [cited 2021 Nov 13];138(5):1019. Available from: /pmc/articles/PMC2750862/

232. 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;

233. Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. Oncogene [Internet]. 2007;26(37):5541–52. Available from: https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210620

234. Ruscetti M, Dadashian EL, Guo W, Quach B, Mulholland DJ, Park JW, et al. HDAC inhibition impedes epithelial-mesenchymal plasticity and suppresses metastatic, castration-resistant prostate cancer. Oncogene [Internet]. 2016;35(29):3781–95. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26640144

235. Chueh AC, Tse JWT, Tögel L, Mariadason JM. Mechanisms of Histone Deacetylase Inhibitor-Regulated Gene Expression in Cancer Cells. Antioxid Redox Signal [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2021 Dec 1];23(1):66. Available from: /pmc/articles/PMC4492771/

236. Silverman DA, Martinez VK, Dougherty PM, Myers JN, Calin GA, Amit M. Cancer-associated neurogenesis and nerve-cancer crosstalk. Cancer Res [Internet]. 2021 Mar 3 [cited 2023 Nov 27];81(6):1431. Available from: /pmc/articles/PMC7969424/

237. Zhu Y, Zhang G, Yang Y, Cui L, Jia S, Shi Y, et al. Perineural invasion in early-stage cervical cancer and its relevance following surgery. Oncol Lett [Internet]. 2018 May 1 [cited 2023 Nov 27];15(5):6555–61. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29755594/

238. Kinugasa T, Mizobe T, Shiraiwa S, Akagi Y, Shirouzu K. Perineural Invasion Is a Prognostic Factor and Treatment Indicator in Patients with Rectal Cancer Undergoing Curative Surgery: 2000-2011 Data from a Single-center Study. Anticancer Res [Internet]. 2017 Jul 1 [cited 2023 Nov 27];37(7):3961–8. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28668901/

239. Conteduca V, Oromendia C, Eng KW, Bareja R, Sigouros M, Molina A, et al. Clinical features of neuroendocrine prostate cancer. Eur J Cancer. 2019;

240. Tanigawa M, Nakayama M, Taira T, Hattori S, Mihara Y, Kondo R, et al. Insulinoma-associated protein 1 (INSM1) is a useful marker for pancreatic neuroendocrine tumor. Med Mol Morphol [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2023 Nov 26];51(1):32–40. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28849340/

241. Kashiwagi K, Ishii J, Sakaeda M, Arimasu Y, Shimoyamada H, Sato H, et al. Differences

of molecular expression mechanisms among neural cell adhesion molecule 1, synaptophysin, and chromogranin A in lung cancer cells. Pathol Int [Internet]. 2012 Apr 1 [cited 2023 Nov 26];62(4):232–45. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1440-1827.2011.02781.x

242. Eckschlager T, Plch J, Stiborova M, Hrabeta J. Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs. International Journal of Molecular Sciences. 2017.

243. Brinkmann H, Dahler AL, Popa C, Serewko MM, Parsons PG, Gabrielli BG, et al. Histone Hyperacetylation Induced by Histone Deacetylase Inhibitors Is Not Sufficient to Cause Growth Inhibition in Human Dermal Fibroblasts. J Biol Chem [Internet]. 2001 Jun 22 [cited 2023 Nov 18];276(25):22491–9. Available from: http://www.jbc.org/article/S0021925820785315/fulltext

244. Carol H, Gorlick R, Kolb EA, Morton CL, Manesh DM, Keir ST, et al. Initial Testing (Stage 1) of the histone deacetylase inhibitor, quisinostat (JNJ-26481585), by the Pediatric Preclinical Testing Program. Pediatr Blood Cancer [Internet]. 2014 [cited 2023 Nov 26];61(2):245. Available from: /pmc/articles/PMC4225045/

245. Wang PJ, McCarrey JR, Yang F, Page DC. An abundance of X-linked genes expressed in spermatogonia. Nat Genet. 2001;

246. Mondal G, Ohashi A, Yang L, Rowley M, Couch FJ. Tex14, a Plk1-Regulated Protein, Is Required for Kinetochore-Microtubule Attachment and Regulation of the Spindle Assembly Checkpoint. Mol Cell. 2012;

247. Kim HJ, Yoon J, Matsuura A, Na JH, Lee WK, Kim H, et al. Structural and biochemical insights into the role of testis-expressed gene 14 (TEX14) in forming the stable intercellular bridges of germ cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;

248. Ruark E, Seal S, McDonald H, Zhang F, Elliot A, Lau K, et al. Identification of nine new susceptibility loci for testicular cancer, including variants near DAZL and PRDM14. Nat Genet. 2013;45(6):686–9.

249. Pyle LC, Nathanson KL. Genetic changes associated with testicular cancer susceptibility. Seminars in Oncology. 2016.

250. Greenbaum MP, Yan W, Wu MH, Lin YN, Agno JE, Sharma M, et al. TEX14 is essential for intercellular bridges and fertility in male mice. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2006 Mar 28 [cited 2023 Nov 26];103(13):4982–7. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16549803/

251. Sironen A, Uimari P, Venhoranta H, Andersson M, Vilkki J. An exonic insertion within Tex14 gene causes spermatogenic arrest in pigs. BMC Genomics [Internet]. 2011 Dec 2 [cited 2023 Nov 26];12. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22136159/

252. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Tissue-based map of the human proteome. Science (80-). 2015;

253. Li W, Sun Z. Mechanism of Action for HDAC Inhibitors—Insights from Omics Approaches. Int J Mol Sci [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2023 Nov 26];20(7). Available from: /pmc/articles/PMC6480157/

254. Cusack M, King HW, Spingardi P, Kessler BM, Klose RJ, Kriaucionis S. Distinct contributions of DNA methylation and histone acetylation to the genomic occupancy of transcription factors. Genome Res [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2023 Nov 26];30(10):1393–406. Available from: /pmc/articles/PMC7605266/

255. 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 Dec;14(1):5.

256. Hoffner O'Connor M, Berglind A, Kennedy Ng MM, Keith BP, Lynch ZJ, Schaner MR, et al. BET Protein Inhibition Regulates Macrophage Chromatin Accessibility and Microbiota-Dependent Colitis. Front Immunol [Internet]. 2022 Mar 24 [cited 2023 Nov 27];13. Available from: /pmc/articles/PMC8988134/

257. Chen HP, Zhao YT, Zhao TC. Histone Deacetylases and Mechanisms of Regulation of Gene Expression (Histone deacetylases in cancer). Crit Rev Oncog [Internet]. 2015 [cited 2023 Nov 27];20(1–2):35. Available from: /pmc/articles/PMC4809735/

258. Crump NT, Ballabio E, Godfrey L, Thorne R, Repapi E, Kerry J, et al. BET inhibition disrupts transcription but retains enhancer-promoter contact. Nat Commun 2021 121 [Internet]. 2021 Jan 11 [cited 2023 Nov 27];12(1):1–15. Available from: https://www.nature.com/articles/s41467-020-20400-z

259. Zhou B, Lin W, Long Y, Yang Y, Zhang H, Wu K, et al. Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics. Signal Transduct Target Ther 2022 71 [Internet]. 2022 Mar 24 [cited 2023 Nov 28];7(1):1–33. Available from: https://www.nature.com/articles/s41392-022-00934-y

260. Rampias T, Vgenopoulou P, Avgeris M, Polyzos A, Stravodimos K, Valavanis C, et al. A new tumor suppressor role for the Notch pathway in bladder cancer. Nat Med 2014 2010 [Internet]. 2014 Sep 7 [cited 2023 Nov 28];20(10):1199–205. Available from: https://www.nature.com/articles/nm.3678

261. Tuttle TR, Mierzwa ML, Wells SI, Fox SR, Ben-Jonathan N. The cyclic GMP/protein kinase G pathway as a therapeutic target in head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Lett [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2023 Nov 28];370(2):279. Available from: /pmc/articles/PMC4711273/

262. Browning DD, Kwon IK, Wang R. cGMP-dependent protein kinases as potential targets for colon cancer prevention and treatment. Future Med Chem [Internet]. 2010 Jan [cited 2023 Nov 28];2(1):65–80. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21426046/

263. Ren Y, Zheng J, Yao X, Weng G, Wu L. Essential role of the cGMP/PKG signaling pathway in regulating the proliferation and survival of human renal carcinoma cells. Int J Mol Med [Internet]. 2014 Nov 1 [cited 2023 Nov 28];34(5):1430–8. Available from: http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2014.1925/abstract

264. Ehata S, Miyazono K. Bone Morphogenetic Protein Signaling in Cancer; Some Topics in the Recent 10 Years. Front Cell Dev Biol [Internet]. 2022 May 25 [cited 2023 Nov 28];10. Available from: /pmc/articles/PMC9174896/

265. Owens P, Pickup MW, Novitskiy S V., Giltnane JM, Gorska AE, Hopkins CR, et al. Inhibition of BMP signaling suppresses metastasis in mammary cancer. Oncogene 2015 3419 [Internet]. 2014 Jul 7 [cited 2023 Nov 28];34(19):2437–49. Available from: https://www.nature.com/articles/onc2014189

266. 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 [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2021 Dec 20];11(7). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26226633/

267. Fustino N, Rakheja D, Ateek CS, Neumann JC, Amatruda JF. BMP Signaling Activity Distinguishes Histologic Subsets of Pediatric Germ Cell Tumors. Int J Androl [Internet]. 2011 Aug [cited 2023 Nov 28];34(4 0 2):e218. Available from:

/pmc/articles/PMC4129369/

268. Jeter CR, Yang T, Wang J, Chao HP, Tang DG. NANOG in cancer stem cells and tumor development: An update and outstanding questions. Stem Cells [Internet]. 2015 Aug 1 [cited 2023 Nov 28];33(8):2381. Available from: /pmc/articles/PMC4509798/

269. Lu X, Mazur SJ, Lin T, Appella E, Xu Y. The pluripotency factor nanog promotes breast cancer tumorigenesis and metastasis. Oncogene 2014 3320 [Internet]. 2013 Jun 17 [cited 2023 Nov 28];33(20):2655–64. Available from: https://www.nature.com/articles/onc2013209

270. Hart AH, Hartley L, Parker K, Ibrahim M, Looijenga LHJ, Pauchnik M, et al. The pluripotency homeobox gene NANOG is expressed in human germ cell tumors. Cancer [Internet]. 2005 Nov 15 [cited 2023 Nov 28];104(10):2092–8. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16206293/

271. Grubelnik G, Boštjančič E, Pavlič A, Kos M, Zidar N. NANOG expression in human development and cancerogenesis. Exp Biol Med [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2023 Nov 28];245(5):456. Available from: /pmc/articles/PMC7082888/

272. Khairul Anuar M, Veerakumarasivam A, Choy CS, Atmadini M, Mpath A, Ghani Mbbs FA, et al. Immunohistochemical expression of NANOG in urothelial carcinoma of the bladder.

273. Huang Y, Liu N, Pan Z, Li Z, Sheng C. BET-HDAC Dual Inhibitors for Combinational Treatment of Breast Cancer and Concurrent Candidiasis. J Med Chem [Internet]. 2023 Jan 26 [cited 2023 Nov 26];66(2):1239–53. Available from: https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jmedchem.2c01191

274. Ren Q, Gao W. Current status in the discovery of dual BET/HDAC inhibitors. Bioorg Med Chem Lett. 2021 Apr 15;38:127829.

275. Zhang X, Zegar T, Weiser T, Hamdan FH, Berger BT, Lucas R, et al. Characterization of a dual BET/HDAC inhibitor for treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. Int J Cancer. 2020;

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Demographische Verteilung der Hodenkrebsinzidenz. 7
Abbildung 2: Mutationslast von epigenetischen Regulatoren in GCT, BCa, RCC und PCa. 23
Abbildung 3: Relative Expression von HDAC- und BET-Enzymen in urologischen Zelllinien und Kontrollzelllinien. 56
Abbildung 4: Relative Zellviabilität von GCT-, BCa-, RCC- und PCa-Zelllinien nach Behandlung mit neuartigen Epi-Drugs. 58
Abbildung 5: Charakterisierung der jeweils drei potentesten neuartigen HDACi und BETi. 59
Abbildung 6: Toxizitätsscreening der neuartigen HDACi und BETi in Zelllinien von Keimzelltumoren. 61
Abbildung 7: XTT-Zellviabilitätsassay in Cis-Platin-resistenten GCT-Zelllinien nach Kombinationsbehandlung mit HDACi (LAK31) / BETi (ASK44) und Cis-Platin über 48 h. 62
Abbildung 8: Toxizitätsscreening der neuartigen HDACi und BETi in Zelllinien urologischer Malignitäten. 63
Abbildung 9: Toxizitätsscreening der neuartigen HDACi und BETi in Kontrollzelllinien unterschiedlicher Herkunft. 64
Abbildung 10: Durchflusszytometrische Analysen der Apoptose-Induktion 24 h nach Epi-Drugs-Behandlung. 65
Abbildung 11: Durchflusszytometrische Analysen des Zellzyklus 24 h nach Epi-Drugs-Behandlung. . 66
Abbildung 12: Western Blots zum Nachweis der ansteigenden Histon-H3-Acetylierung nach HDACi-Behandlung. 67
Abbildung 13: ATAC-Seq-Analyse nach HDACi-Behandlungen von vier repräsentativen Zelllinien unterschiedlicher urologischer Malignitäten. 69
Abbildung 14: Circos-Diagramme der Änderungen der Chromatinzugänglichkeit nach HDACi-Behandlung. 70
Abbildung 15: Balkendiagramme der signifikanten Veränderungen (geöffnetes Chromatin in Grün: FC ≥ 2, Chromatin geschlossen in Rot: FC ≤ -2) der Chromatinzugänglichkeit nach HDACi-Behandlung. 71
Abbildung 16: HOMER-Algorithmus-Analyse der Zugänglichkeitsveränderungen von Transkriptionsfaktoren in 2102EP nach HDACi-Behandlung. 72
Abbildung 17: Globale Veränderungen der Transkriptionsrate nach LAK31-Behandlung in urologischen Malignitäten. 74
Abbildung 18: GO-Analyse und Venn-Diagramme von gemeinschaftlich herauf- und herunterregulierter Gene nach LAK31-Behandlung in urologischen Malignitäten. 75
Abbildung 19: RNA-Seq Analyse STRING Netzwerkanalyse und qRT-PCR von Schlüsselgenen. 77
Abbildung 20: Korrelation der ATAC- und RNA-Seq-Analysen nach LAK31-Behandlung in urologischen Malignitäten. 79
Abbildung 21: Strukturformel der neuartigen HDAC-BET-Dual-Inhibitoren. 80
Abbildung 22: Western Blot-Nachweise der ansteigenden Histon-3-Acetylierung 16 h nach Behandlung mit Dualinhibitoren. 82

Abbildung 23: Toxizitätsscreening der neuartigen HDAC-BET-Dual-Inhibitoren in Zelllinien von GCT, BCa, RCC und PCa, sowie Normalzellen (Fibroblasten, Keratinozyten, Endothelzellen, T-Lymphozyten und Monozyten). 84
Abbildung 24: XTT-Zellviabilitätsassay in Cis-Platin-resistenten GCT-Zelllinien nach Kombinationsbehandlung mit dem Dual-Inhibitor LAK-FFK11 mit Cis-Platin über 48 h. 85
Abbildung 25: Durchflusszytometrische Analysen der Apoptose-Induktion und des Zellzyklus 24 h nach HDAC-BET-Dual-Inhibitor-Behandlung. 87
Abbildung 26: qRT-PCR Analysen der Schlüsselgene von HDACi und BETi nach HDAC-BET-Dual-Inhibitor-Behandlung in GCT-Zelllinien. 88
Abbildung 27: Auswertung der durch LAK-FFK11 ausgelösten Veränderungen der Chromatinzugänglichkeit von 2102EP Zellen. 90
Abbildung 28: Auswertung der durch LAK-FFK11 ausgelösten Veränderungen des Transkriptoms von 2102EP-Zellen. 92
Abbildung 29: Korrelation der ATAC- und RNA-Seq Analysen von LAK31 und LAK-FFK11. 93
Abbildung 30: Behandlungseffekte des HDAC-BET-Dual-Inhibitor auf 2102EP(-R) *in vivo*. 95
Abbildung 31: Graphische Zusammenfassung der Hypothese der Effekte des HDACi und des HDAC-BET-Dual-Inhibitors auf die Chromatinzugänglichkeit und das Transkriptoms von GCT-Zelllinien. 103
Abbildung 32: Neuartige epigenetische Inhibitoren lösen Apoptose und Zellzyklusarrest in urologischen Malignitäten aus. HDAC-BET-Dual-Inhibitoren zeigen vielversprechende Effekte in (Cis-Platin-resistenten) GCT-Zellen nach Xenotransplantation. 110

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung der GCT nach TNM 9
Tabelle 2: GCT-Prognosen Klassifizierung nach IGCCCG. 11
Tabelle 3: Auflistung aller genutzten menschlichen Zelllinien, ihrer Herkunft, der Klassifizierung und Spezifizierung. 27
Tabelle 4: Liste der im Western Blot verwendeten Antikörper und ihrer Hersteller. 28
Tabelle 5: Liste der in der qRT-PCR genutzten Oligonukleotide. 29
Tabelle 6: Auflistung der epigenetischen Inhibitoren (HDACi, BETi und HDAC-BET-Dual-Inhibitoren), ihrer Hersteller und der berechneten Selektivitäten gegen HDAC- bzw. BET-Enzymklassen. 31
Tabelle 7: Liste der in der Arbeit verwendeten Substanzen und deren Hersteller. 34
Tabelle 8: Liste der in der Arbeit verwendeten Materialien und deren Hersteller. 36
Tabelle 9: Liste der gebrauchsfertigen Puffer und ihrer Hersteller. 38
Tabelle 10: Auflistung der genutzten Assays und Kits und ihrer Hersteller. 38
Tabelle 11: Auflistung der verwendeten Software, Online-Tools und ihrer Hersteller. 39
Tabelle 12: Liste der in der Arbeit verwendeten Geräte und ihrer Hersteller. 41
Tabelle 13: Auflistung der Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel Polyacrylamid Gels. 45
Tabelle 14: Auflistung eines Reaktionsansatzes und Parameter der cDNA-Synthese. 47
Tabelle 15: Reaktionsansatz und Programdetails der cDNA-Synthese. 48
Tabelle 16: Medienzusammensetzung der Kulturmedien unterschiedlicher Keimzelltumorzelllinien. 50
Tabelle 17: Kultivierungsbedingungen der analysierten Zelllinien anderer urologischer Entitäten. 50
Tabelle 18: Kultivierungsbedingungen der analysierten Kontrollzelllinien. 51
Tabelle 19: Ein Enzymassay des HDAC-BET-Dual-Inhibitors LAK-FFK11 ermittelt IC_{50}-Werte gegen HDAC- und BET-Enzyme. 81

Abkürzungsverzeichnis

% v/v	Volumenprozent
% w/v	Gewichtprozent
-R	Cis-Platin-resistenter Klon
∞	unendlich
Ac	Acetylierung
ADMET	*absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity*
ADT	Hormontherapie (aus dem Englischen „*androgen deprivation therapy*“)
ATAC-Seq	*Assay für Transposase-Accessible Chromatin Sequencing*
BCa	Harnblasenkarzinomen
BEP	Bleomycin, Etoposid, Cis-Platin
bp	Basenpaare
BRD	Bromodomäne
BRDT	BRD *testis-specific protein*
BET	Bromodomain of Extra-Terminal motif
BETi	BET-Inhibitor
CC	Chorionkarzinom
ChIP-Seq	*Chromatin ImmunoPrecipitation DNA-Sequencing*
CI5*plus*	*cancer incidence in 5 Continents*
DNMTi	DNA-Methyltransferase-Inhibitor
EC	Embryonalkarzinom
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration
Epi-Drug	epigenetische Inhibitoren
FBS	Fetales Kälberserum
FC	Vielfaches, *fold change*

FDA	*Food and Drug Administration*
GCNIS	*germ cell neoplasia in situ*
GCT	*germ cell tumor,* Keimzelltumoren
Gy	Gray
h	Stunde(n)
HDAC	Histondeacetylasen
HMBA	Hexamethylamin-Bisacetamid
i	Inhibitor
IGCCCG	*international germ cell cancer cooperative group*
log	Logarithmus
min	Minuten
NSE	Nicht-Seminome
Pei	Cis-Platin, Etoposid und Ifosfamid
P/S	Penicillin/ Streptomycin
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBS-T	PBS versetzt mit 0,1 % (v/v) Tween
PCa	Prostatakrazinom
PCA	*principal component analysis*
PGC	*primordial germ cell*
Plk1	*Polo-like kinase 1*-Inhibitor
PS	Phosphatidylserine
PTM	posttranslationalen Modifikationen
qRT-PCR	quantitative *Real-Time* Polymerasen-Kettenreaktion
RCC	Nierenzellkarzinom
RLA	retroperitoneale Lymphknotenektomie
RNA-Seq	RNA-Sequenzierung

RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SE	Seminome
STRING	*search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*
UICC	*union internationale contre le cancer*
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TE	Teratome
WHO	*World Health Organization*
YST	Dottersacktumoren

Anhang

Anhang 1: Auflistung der eingesetzten Zelllinien, ihre Herkunft, Klassifizierung, Spezifizierung, Kultivierung und vom wem sie zur Verfügung gestellt wurden.

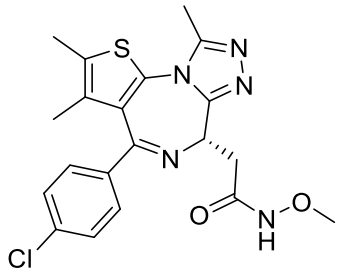
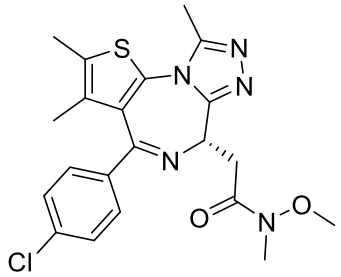
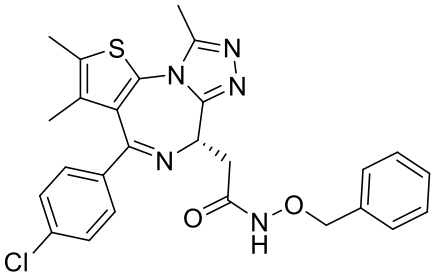
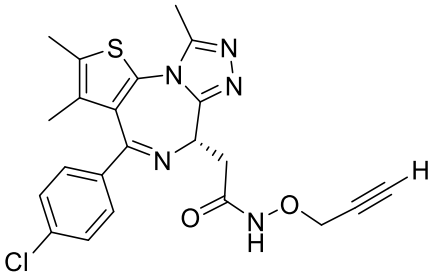
Zell-linie	Herkunft	Klassifizierung	Spezifizierung	Kultivierung		Zur Verfügung gestellt von
1411H	Keimzell-tumoren	Nicht-Seminom	Dottersack-tumor	DMEM (61965-026, Gibco), 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 200 mM L-Glutamine	37°C, 7.5%, 0.05% Trypsin-EDTA (25300-054, Gibco)	Dr. Matthew Murray, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom
2102EP			Emybronal Karzinom	DMEM (31966-021, Gibco), 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 200 mM L-Glutamine	37°C, 7.5%, 0.05% Trypsin-EDTA (25300-054, Gibco)	Dr. Christoph Oing, University Hospital Eppendorf, Hamburg, Germany
2102EP-R				DMEM (31966-021, Gibco), 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 200 mM L-Glutamine	37°C, 7.5%, 0.05% Trypsin-EDTA (25300-054, Gibco)	Dr. Christoph Oing, University Hospital Eppendorf, Hamburg, Germany
786-O	Niere	-	Nierenzell-Adenokarzinom	RPMI 1640 (31870-025, Gibco), 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 200 mM L-Glutamine	37°C, 5%, 0.25% Trypsin-EDTA (25200-056, Gibco)	PD Dr. med Isabella Syring-Schmandke, Urology & Paedriatic Urology, University Hospital Bonn, Bonn, Germany
ACHN		-	Nierenzell-Adenokarzinom	DMEM (31966-021, Gibco), 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 200 mM L-Glutamine	37°C, 5%, 0.25% Trypsin-EDTA (25200-056, Gibco)	PD Dr. med Isabella Syring-Schmandke, Urology & Paedriatic Urology, University Hospital Bonn, Bonn, Germany
Caki-1		-	Metastase eines Adeno-karzinoms	DMEM (31966-021, Gibco), 10% FCS (heat-inactivated), 1% Penicillin/Streptomycin	37°C, 5%, 0.25% Trypsin-EDTA (25200-056, Gibco)	DSMZ (#ACC 731), Braunschweig, Germany
DU-145	Prostata	-	Metastasierte Läsion des Zentral-nervensystems	RPMI 1640 (31870-025, Gibco), 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 200 mM L-Glutamine	37°C, 5%, 0.25% Trypsin-EDTA (25200-056, Gibco)	DSMZ (#ACC 261), Braunschweig, Germany
GCT-72	Keimzell-tumoren	Nicht-Seminom	Dottersack-tumor	DMEM (31966-021, Gibco), 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 200 mM L-Glutamine	37°C, 7.5%, 0.05% Trypsin-EDTA (25300-054, Gibco)	Dr. Thomas Müller, University Clinic for Internal Medicine IV, Hematology/Oncology, Medical Faculty of Martin Luther University Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Germany
HaCaT	Haut	Kontrolle	Keratinozzyten	DMEM (31966-021, Gibco), 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin	37°C, 7.5%, 0.05% Trypsin-EDTA (25300-054, Gibco)	Dr. P. Boukamp, Institute for Environmental Medicine, IUF, Düsseldorf, Germany
HUVEC	Nabelschnurvene		Endothelzellen	Endothelial Cell Growth Medium 2 (C-22011, Promocell), Supplements (C-39216)	37°C, 7.5%, 0.05% Trypsin-EDTA (25300-054, Gibco)	Prof. Dr. Gerhard Fritz, Institute of Toxicology, Medical Faculty, Heinrich Heine University
JAR	Keimzell-tumoren	Nicht-Seminom	Chorion-karzinom	DMEM (31966-021, Gibco), 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 200 mM L-Glutamine	37°C, 7.5%, 0.05% Trypsin-EDTA (25300-054, Gibco)	ATCC, #HTB-144
JEG-3				DMEM (31966-021, Gibco), 10% FCS, 1%	37°C, 7.5%, 0.05% Trypsin-	ATCC, #HTB-36

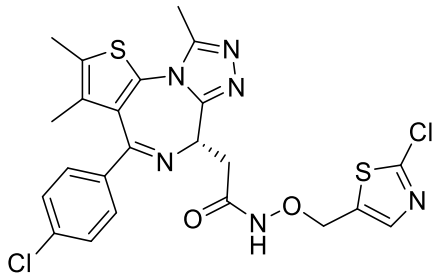
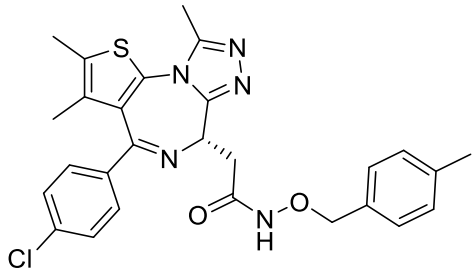
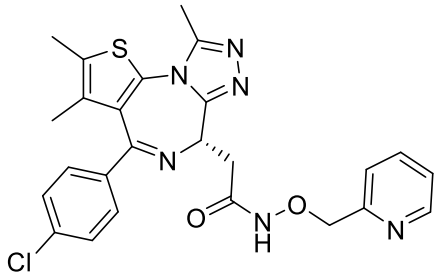
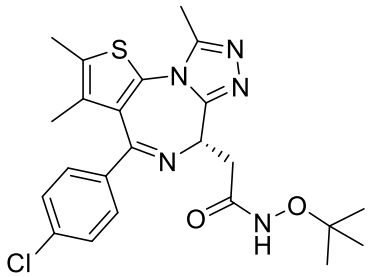
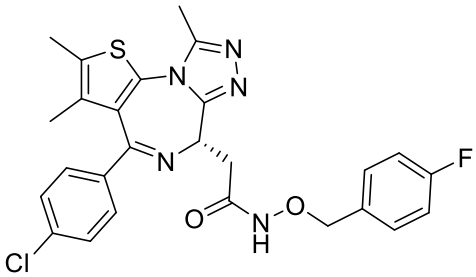
				Penicillin/Streptomycin, 200 mM L-Glutamine	EDTA (25300-054, Gibco)	
JEG-3-R				DMEM (31966-021, Gibco), 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 200 mM L-Glutamine	37°C, 7.5%, 0.05% Trypsin-EDTA (25300-054, Gibco)	Dr. Michal Mego, National Cancer Institute Comenius University, Bratislava, Slovakia
JURKAT	Peripheres Blut	Kontrolle	T-Lymphozyten	RPMI 1640 (31870-025, Gibco), 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 200 mM L-Glutamine	Keine	Prof. Dr. Rüdiger Sorg, Institute for Transplantation Diagnostics and Cell Therapeutics, Faculty of Medicine, Heinrich-Heine-University, Düsseldorf, Germany
LNCaP	Prostata	-	Lymphknotenkarzinom	RPMI 1640 (31870-025, Gibco), 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 200 mM L-Glutamine	37°C, 5%, 0.25% Trypsin-EDTA (25200-056, Gibco)	DSMZ (#ACC 256), Braunschweig, Germany
MPAF	Haut	Kontrolle	Fibroblasten	DMEM (31966-021, Gibco), 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 200 mM L-Glutamine, 1x Non-essential amino acids, 100 nM β-Mercaptoethanol	37°C, 7.5%, 0.05% Trypsin-EDTA (25300-054, Gibco)	Dr. Michael Peitz, Life & Brain, Department of Reconstructive Neurobiology, Bonn, Germany
NCCIT	Keimzell-tumoren	Nicht-Seminom	Emybronal Karzinom	DMEM (31966-021, Gibco), 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 200 mM L-Glutamine	37°C, 7.5%, 0.05% Trypsin-EDTA (25300-054, Gibco)	Dr. Christoph Oing, University Hospital Eppendorf, Hamburg, Germany
NCCIT-R				DMEM (31966-021, Gibco), 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 200 mM L-Glutamine	37°C, 7.5%, 0.05% Trypsin-EDTA (25300-054, Gibco)	Dr. Christoph Oing, University Hospital Eppendorf, Hamburg, Germany
NT2/D1				DMEM (31966-021, Gibco), 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 200 mM L-Glutamine	37°C, 7.5%, 0.05% Trypsin-EDTA (25300-054, Gibco)	Dr. Christoph Oing, University Hospital Eppendorf, Hamburg, Germany
NT2/D1-R				DMEM (31966-021, Gibco), 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 200 mM L-Glutamine	37°C, 7.5%, 0.05% Trypsin-EDTA (25300-054, Gibco)	Dr. Christoph Oing, University Hospital Eppendorf, Hamburg, Germany
PC-3	Prostata	-	Knochenmark-metastasen	RPMI 1640 (31870-025, Gibco), 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 200 mM L-Glutamine	37°C, 5%, 0.25% Trypsin-EDTA (25200-056, Gibco)	DSMZ (#ACC 465), Braunschweig, Germany
RT-112	Blase	-	Übergangs-zellkarzinom	DMEM (31966-021, Gibco), 10% FCS (heat-inactivated), 1% Penicillin/Streptomycin	37°C, 5%, 0.25% Trypsin-EDTA (25200-056, Gibco)	Dr. J Fogh, New York, USA; Prof. Dr. Schmitz-Dräger & Dr. M. A Knowles, ICRF, Leeds, United Kingdom
SCaBER		-	Plattenepithel-karzinom	DMEM (31966-021, Gibco), 10% FCS (heat-inactivated), 1% Penicillin/Streptomycin	37°C, 5%, 0.25% Trypsin-EDTA (25200-056, Gibco)	Dr. J Fogh, New York, USA; Prof. Dr. Schmitz-Dräger & Dr. M. A Knowles, ICRF, Leeds, United Kingdom
TCam-2	Keimzell-tumoren	Seminom	Seminom	RPMI 1640 (31870-025, Gibco), 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 200 mM L-Glutamine	37°C, 7.5%, 0.05% Trypsin-EDTA (25300-054, Gibco)	Dr Janet Shipley, Institute of Cancer Research, Sutton, United Kingdom
TCam-2-R				RPMI 1640 (31870-025, Gibco), 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 200 mM L-Glutamine	37°C, 7.5%, 0.05% Trypsin-EDTA (25300-054, Gibco)	Dr. Michal Mego, National Cancer Institute Comenius University, Bratislava, Slovakia

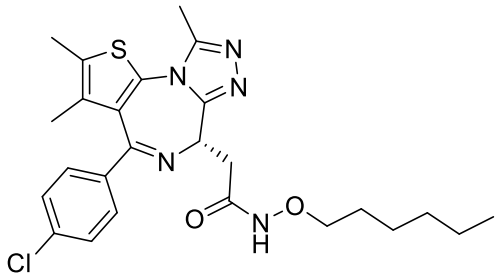
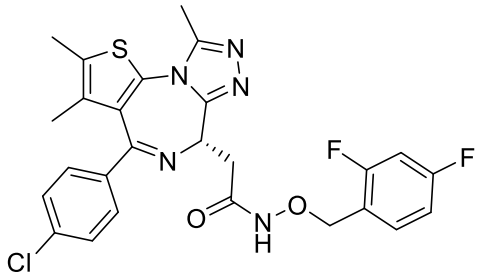
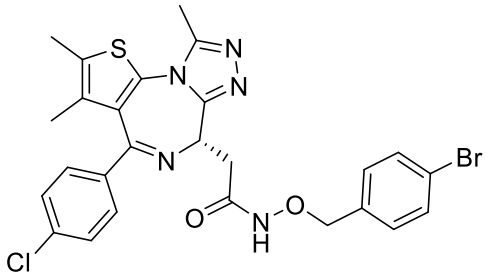
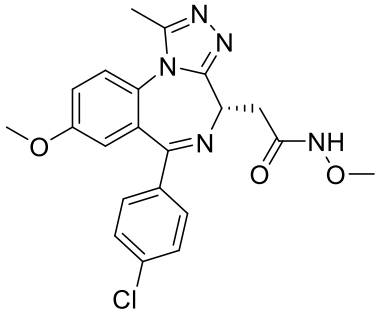
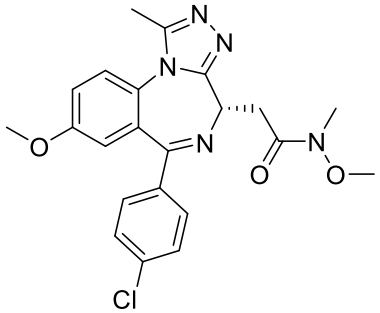
THP-1	Peripheres Blut	Kontrolle	Monozyten	RPMI 1640 (31870-025, Gibco), 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 200 mM L-Glutamine	Keine	Merck, #88081201
HVHF2	Vorhaut		Fibroblasten	DMEM (31966-021, Gibco), 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin	37°C, 7.5%, 0.05% Trypsin-EDTA (25300-054, Gibco)	Clinic for Dermatology, UKD, Düsseldorf, Germany
VM-CUB-1	Blase	-	Übergangszell-karzinom	DMEM (31966-021, Gibco), 10% FCS (heat-inactivated), 1% Penicillin/Streptomycin	37°C, 5%, 0.25% Trypsin-EDTA (25200-056, Gibco)	DSMZ (#ACC 400), Brauchnschweig, Germany

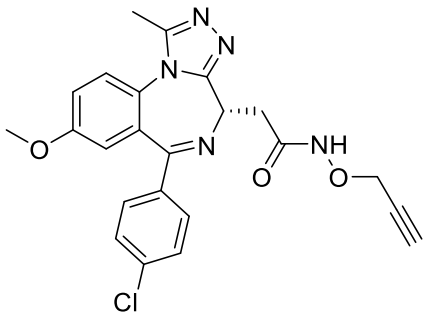
Anhang 2: Auflistung der Strukturformeln aller neuartiger BETi.

Die neuartigen BETi wurden vom Prof. Dr. Kurz (Institut für pharmazeutische und medizinische Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

ASK24	
ASK25	
ASK26	
ASK27	

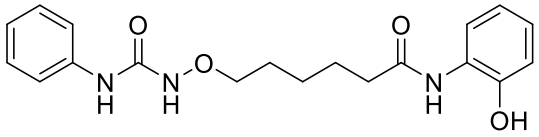
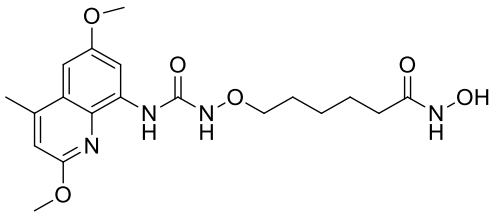
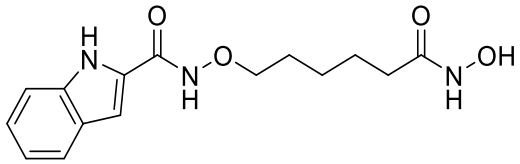
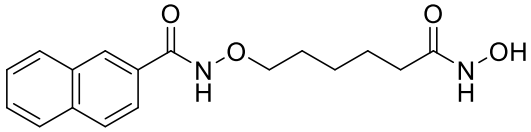
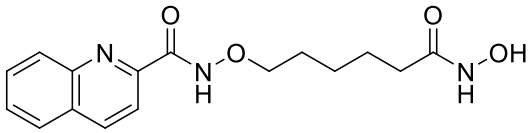
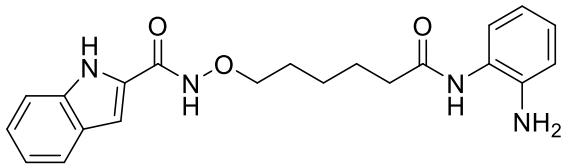
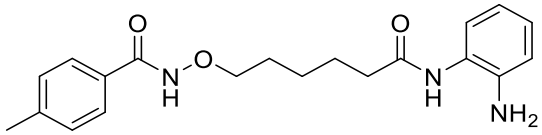
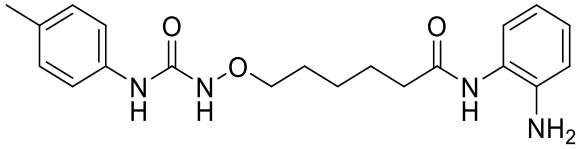
ASK43	
ASK44	
ASK53	
ASK54	
ASK58	

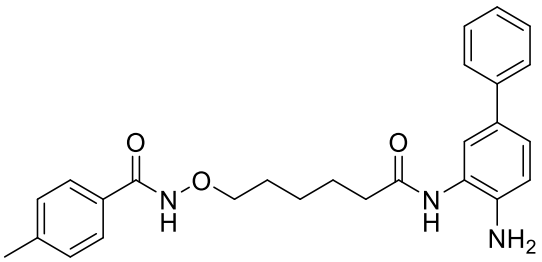
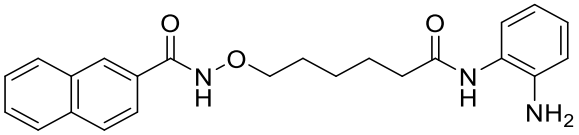
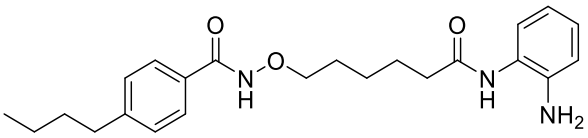
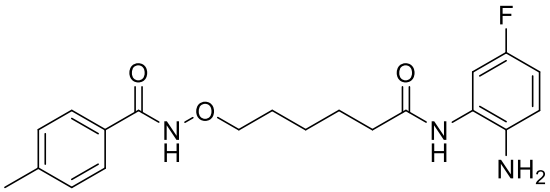
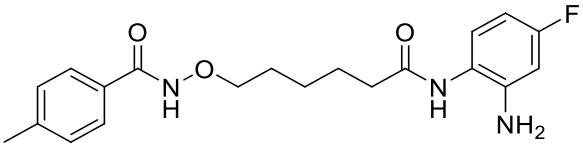
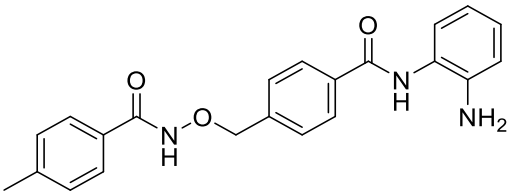
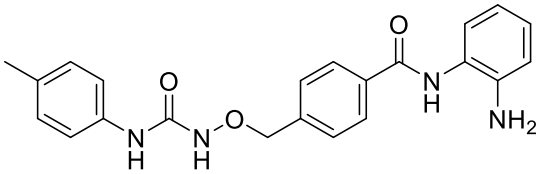
ASK59	
ASK61	
ASK62	
PWK43	
PWK44	

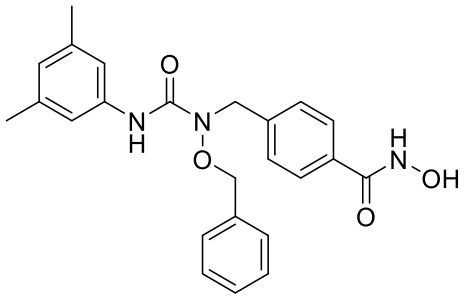
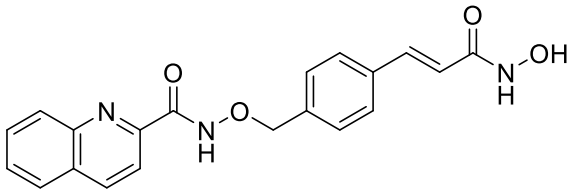
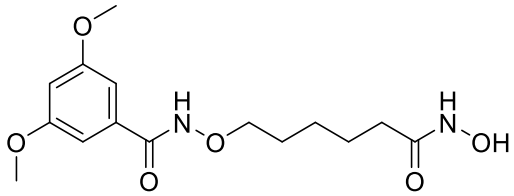
PWK45	

Anhang 3: Auflistung der Strukturformeln aller neuartiger HDACi.

Die neuartigen HDACi wurden vom Prof. Dr. Kurz (Institut für pharmazeutische und medizinische Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

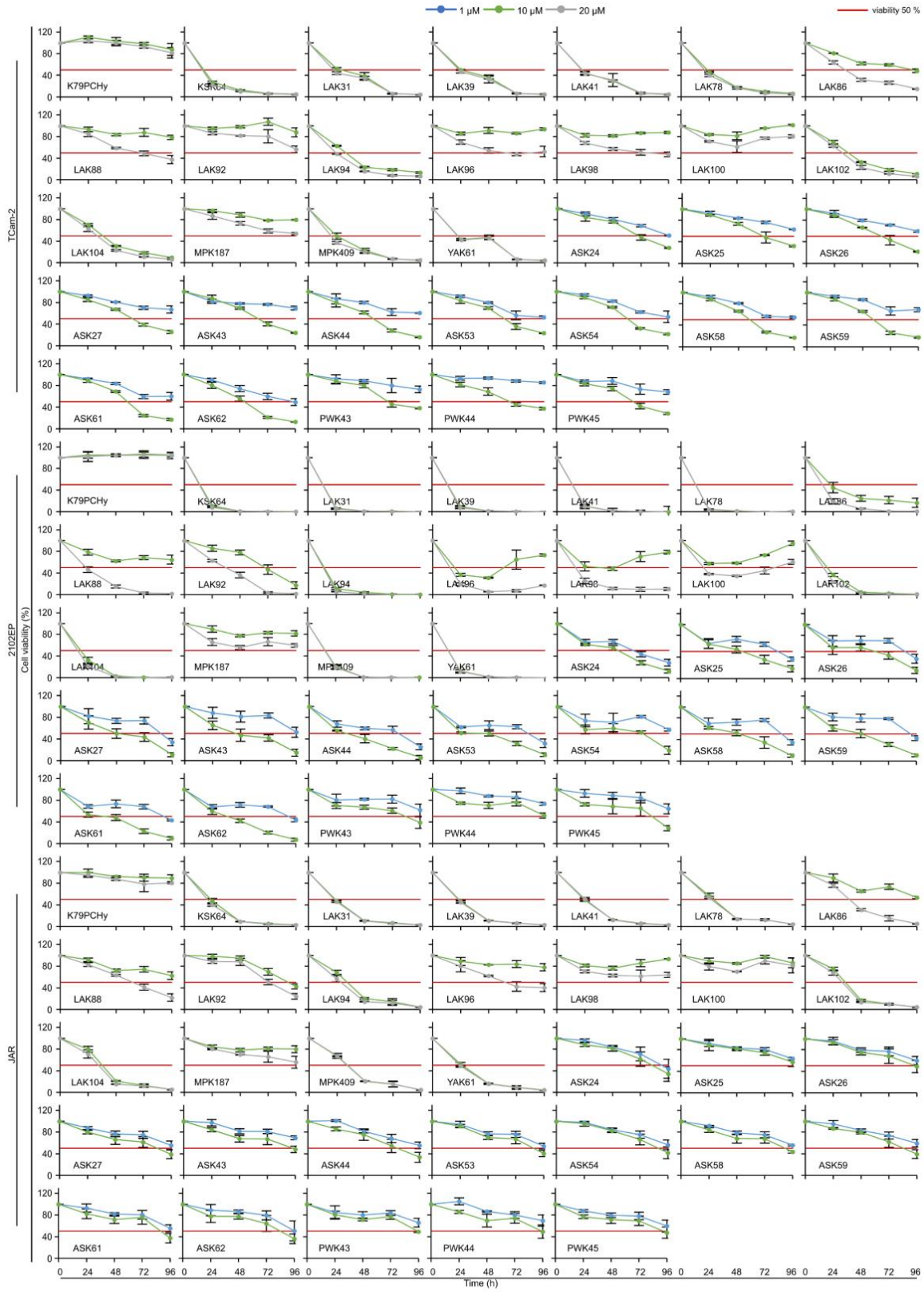
K79PCHy	
KSK64	
LAK31	
LAK39	
LAK41	
LAK78	
LAK86	
LAK88	

LAK92	
LAK94	
LAK96	
LAK98	
LAK100	
LAK102	
LAK104	

MPK187	
MPK409	
YAK61	

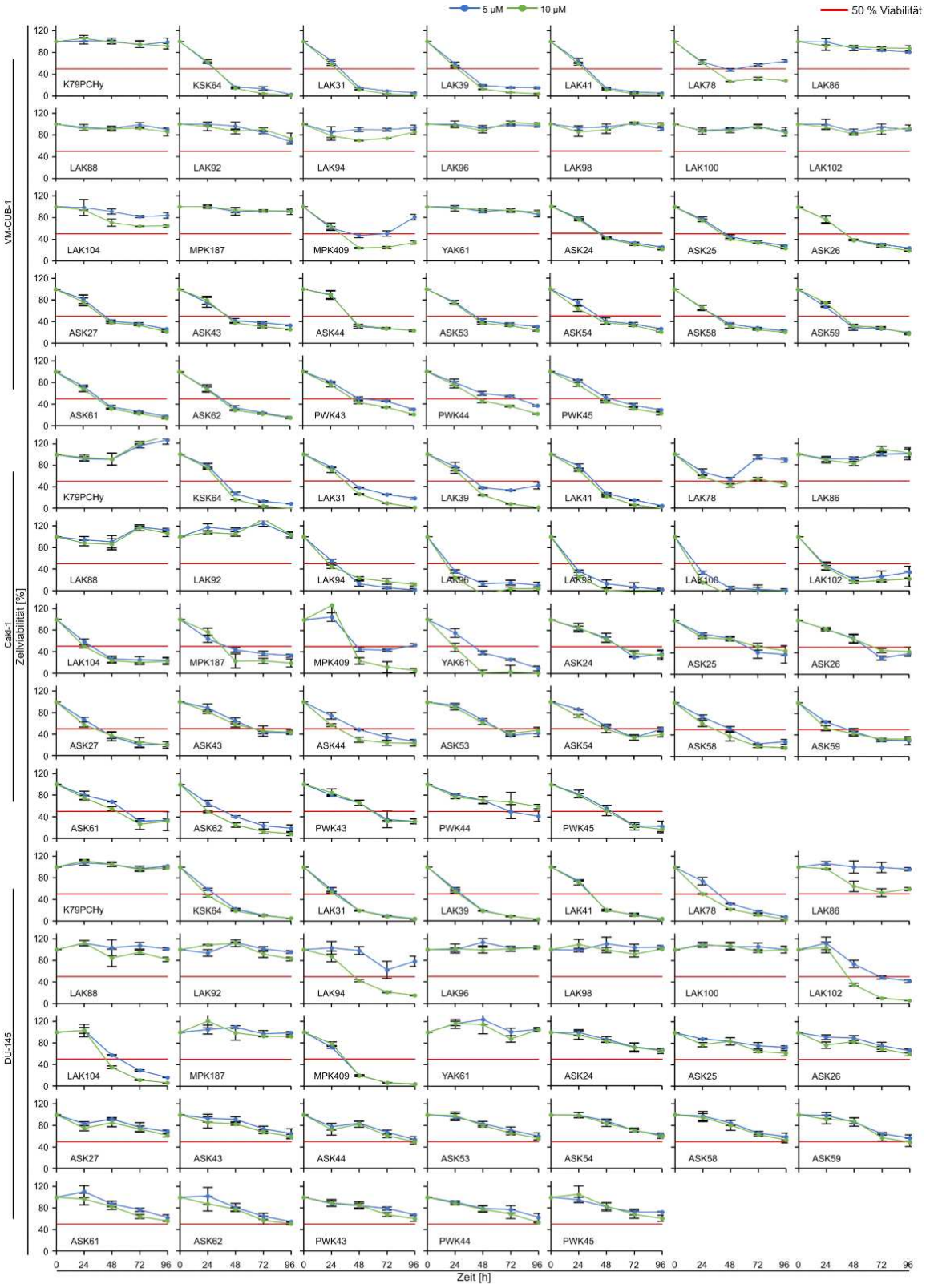
Anhang 4: Initialscreening mittels Zellviabilitätsasssay der 33 neuartigen Epi-Drugs in drei GCT-Zelllinien.

Untersucht wurden drei Konzentrationen der HDACi und BETi (1 µM in Blau, 10 µM in Grün, 20 µM in Grau) in den GCT-Zelllinien TCam-2, 2102EP und JAR über einen Zeitraum von 96 h. Der rote Balken entspricht 50 % Zellviabilität.



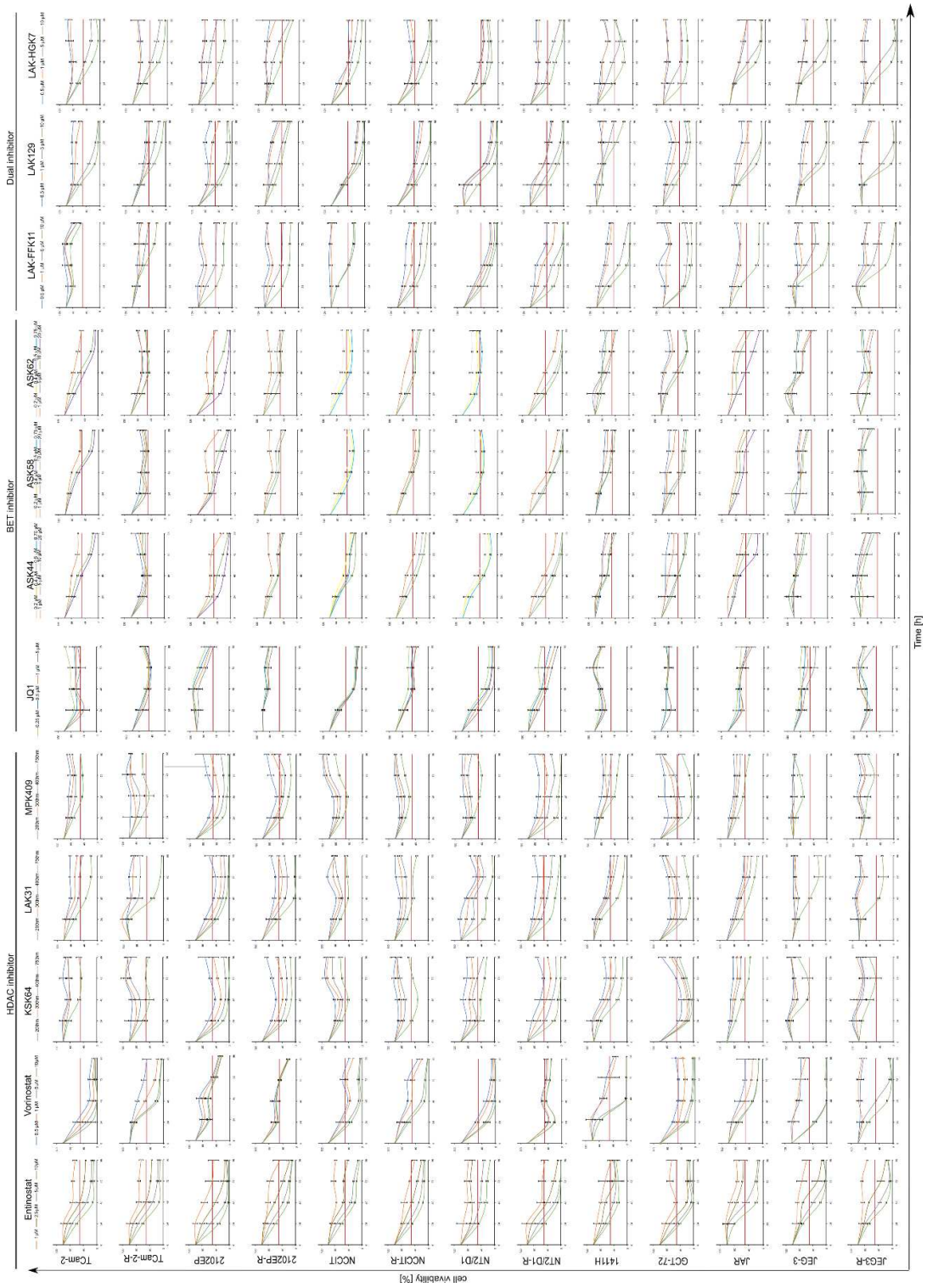
Anhang 5: Initialscreening mittels Zellviabilitätsasssay der 33 neuartigen Epi-Drugs in Zelllinien urologischer Malignitäten.

Untersucht wurden zwei Konzentrationen der HDACi und BETi (5 µM in Blau, 10 µM in Grün) in Zelllinien uroligscher Malignitäten (BCa: VM-CUB-1, RCC: Caki-1, PCa: DU-145) über einen Zeitraum von 96 h. Der rote Balken entspricht 50 % Zellviabilität.



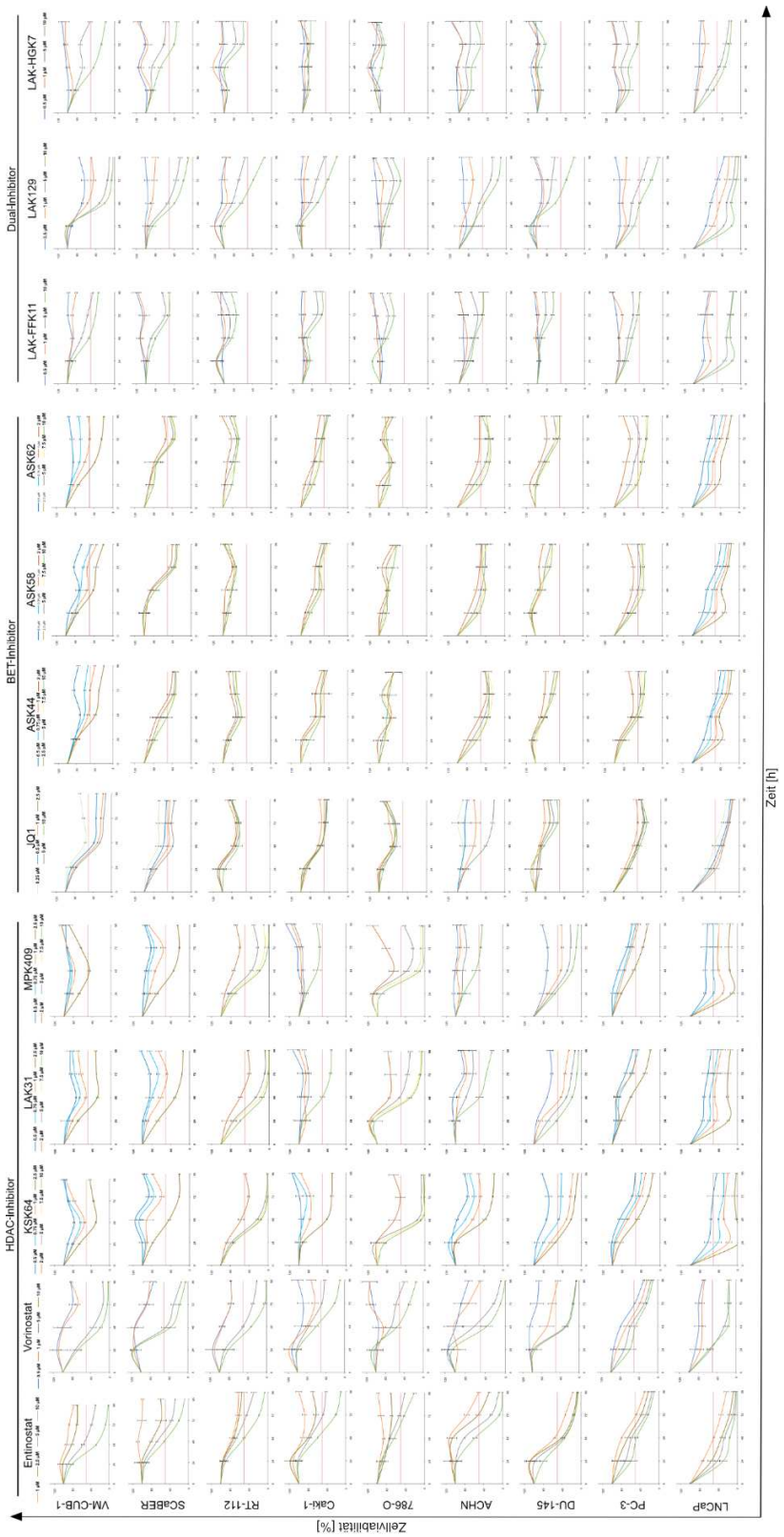
Anhang 6: XTT-Zellviabilität-Analysen der neuartigen HDACi, BETi und HDAC-BET-Dual-Inhibitor in GCT-Zelllinien.

Dargestellt sind die Auswirkungen der neuartigen Inhibitoren (HDACi: KSK64, LAK31, MPK409; BETi: ASK44, ASK58, ASK62) im Vergleich zu herkömmlichen Inhibitoren (HDACi: Entinostat, Vorinostat; BETi: JQ1), sowie die Auswirkungen der HDAC-BET-Dual-Inhibitoren (LAK-FFK11, LAK129, LAK-HGK7) auf GCT-Zelllinien über einen Zeitraum von 96 h. Der rote Balken entspricht 50 % Zellviabilität.



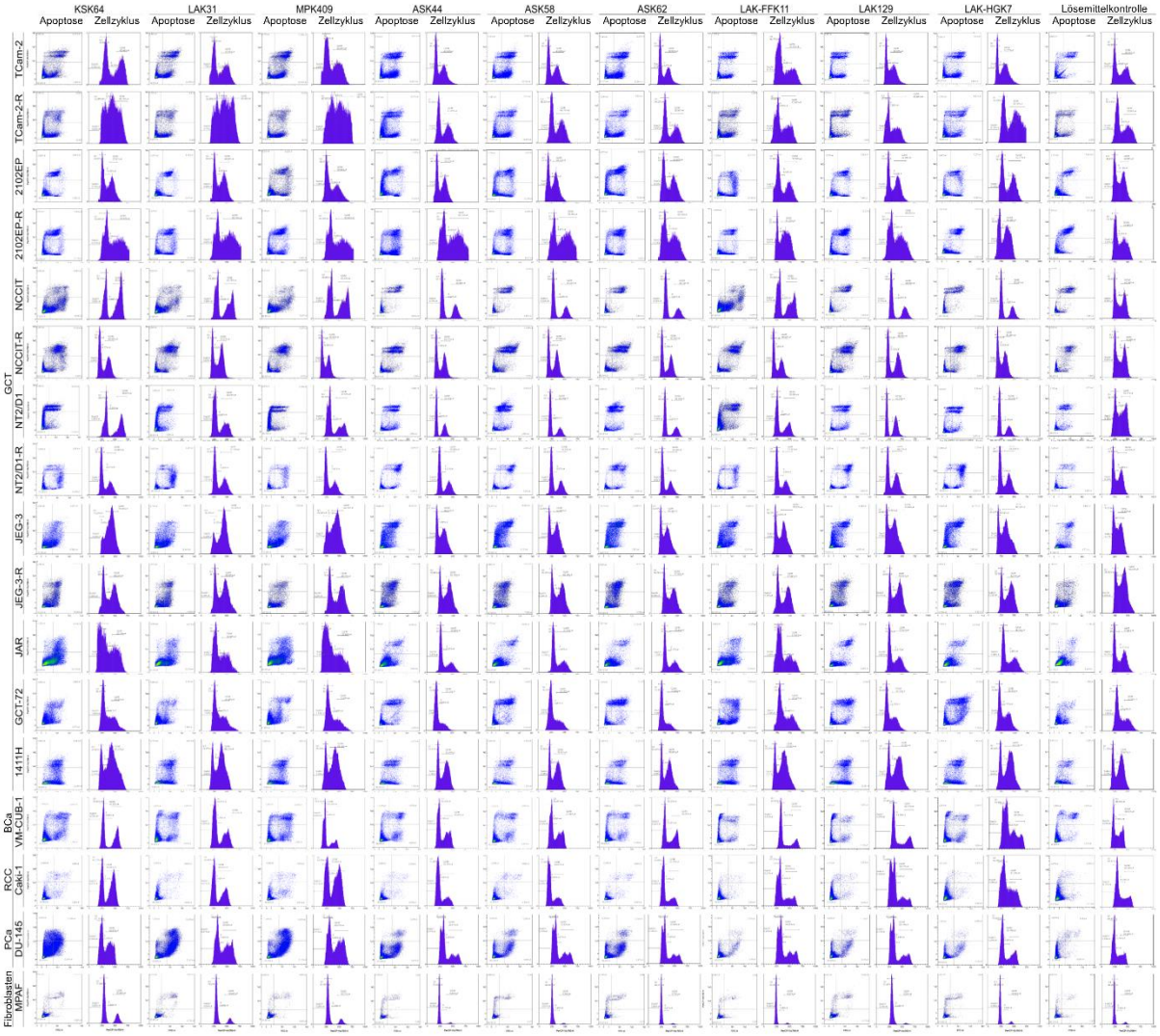
Anhang 7: XTT-Zellviabilität-Analysen der neuartigen HDACi, BETi und HDAC-BET-Dual-Inhibitor in Zelllinien urologischer Malignitäten.

Dargestellt sind die Auswirkungen der neuartigen Inhibitoren (HDACi: KSK64, LAK31, MPK409; BETi: ASK44, ASK58, ASK62) im Vergleich zu herkömmlichen Inhibitoren (HDACi: Entinostat, Vorinostat; BETi: JQ1), sowie die Auswirkungen der HDAC-BET-Dual-Inhibitoren (LAK-FFK11, LAK129, LAK-HGK7) auf Zelllinien verschiedener urologischer Malignitäten (BCa, RCC und PCa) über 96 h Behandlung. Der rote Balken entspricht 50 % Zellviabilität.



Anhang 8: Histogramme der durchflusszytometrischen Analysen nach 24 h-Epi-Drug-Behandlung.

Untersucht wurden die Auswirkungen der neuartigen Epi-Drugs (HDACi: KSK64, LAK31, MPK409; BETi: ASK44, ASK58, ASK62; Dual-Inhibitoren: LAK-FFK11, LAK129, LAK-HGK7) auf Zelllinien unterschiedlicher urologischer Malignitäten (GCT, BCa, RCC und PCa) und auf Fibroblasten. Analysiert wurden die Apoptose-Induktion und die Veränderungen des Zellzyklus im Vergleich zur Lösemittelkontrolle (DMSO) 24 h nach Behandlung.

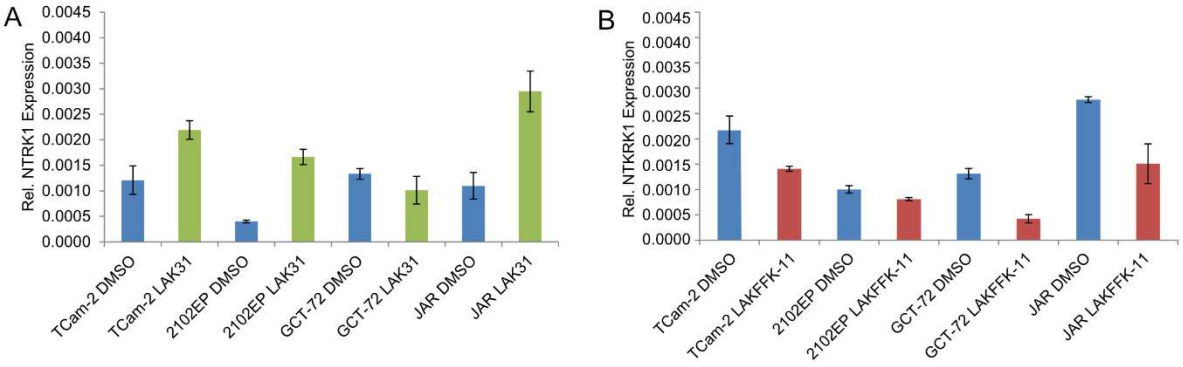


Anhang 9: Die Resultate der Hochdurchsatzanalysen in der GEO-Datenbank sind öffentlich zugänglich.

ATAC-Seq-Rohdaten	RNA-Seq-Rohdaten
GSE190022	GSE191184

Anhang 10: Expression von NTRK1 nach LAK31-Behandlung und LAK-FFK11-Behandlung in GCT-Zelllinien.

Dargestellt sind die über qRT-PCR ermittelten relativen Expressionslevel von *NTRK1* nach 24h A) LAK31-Behandlung und B) LAK-FFK11-Behandlung im Vergleich zur Lösemittelkontrolle DMSO.



Anhang 11: Ergebnisse der ADMET-Analyse von LAK-FFK11.

ADMET ist eine *in silico*-Analyse, die eingesetzt wird, um Verträglichkeit und Wirksamkeit von Inhibitoren zu berechnen.

ADMETlab 2.0

Cc1sc2c(c1C)C(c1ccc(Cl)cc1)=NC(CC(=O)NOCCCCCC(O)=NO)c1nnc(C)n1-2

1. Physicochemical Property

Property	Value	Comment
Molecular Weight	544.17	Contain hydrogen atoms. Optimal:100~600
Volume	515.227	Van der Waals volume
Density	1.056	Density = MW / Volume
nHA	10	Number of hydrogen bond acceptors. Optimal:0~12
nHD	3	Number of hydrogen bond donors. Optimal:0~7
nRot	11	Number of rotatable bonds. Optimal:0~11
nRing	4	Number of rings. Optimal:0~6
MaxRing	13	Number of atoms in the biggest ring. Optimal:0~18
nHet	12	Number of heteroatoms. Optimal:1~15
fChar	0	Formal charge. Optimal:-4 ~4
nRig	23	Number of rigid bonds. Optimal:0~30
Flexibility	0.478	Flexibility = nRot /nRig
Stereo Centers	1	Optimal: ≤2
TPSA	134.22	Topological Polar Surface Area. Optimal:0~140
logS	-4.242	Log of the aqueous solubility. Optimal: -4~0.5 log mol/L
logP	3.184	Log of the octanol/water partition coefficient. Optimal: 0~3
logD	2.509	logP at physiological pH 7.4. Optimal: 1~3

2. Medicinal Chemistry

Property	Value	Decision	Comment
QED	0.106	•	■ A measure of drug-likeness based on the concept of desirability; ■ Attractive: > 0.67; unattractive: 0.49~0.67; too complex: < 0.34
SAscore	3.797	•	■ Synthetic accessibility score is designed to estimate ease of synthesis of drug-like molecules. ■ SAscore ≥6, difficult to synthesize; SAscore <6, easy to synthesize
Fsp3	0.4	•	■ The number of sp3 hybridized carbons / total carbon count, correlating with melting point and solubility. ■ Fsp^3 ≥0.42 is considered a suitable value.
MCE-18	76.429	•	■ MCE-18 stands for medicinal chemistry evolution. ■ MCE-18≥45 is considered a suitable value.
NPscore	-0.98	-	■ Natural product-likeness score. ■ This score is typically in the range from -5 to 5. The higher the score is, the higher the probability is that the molecule is a NP.
Lipinski Rule	Accepted	•	■ MW ≤500; logP ≤5; Hacc ≤10; Hdon ≤5 ■ If two properties are out of range, a poor absorption or permeability is possible, one is acceptable.
Pfizer Rule	Accepted	•	logP > 3; TPSA < 75 Compounds with a high log P (>3) and low TPSA (<75) are likely to be toxic.
GSK Rule	Rejected	•	■ MW ≤400; logP ≤4 ■ Compounds satisfying the GSK rule may have a more favorable ADMET profile
Golden Triangle	Rejected	•	■ 200 ≤MW ≤50; -2 ≤logD ≤5 ■ Compounds satisfying the Golden Triangle rule may have a more favorable ADMET profile.
PAINS	0 alerts	-	Pan Assay Interference Compounds, frequent hitters, Alpha-screen artifacts and reactive compound.
ALARM NMR	1 alerts	-	Thiol reactive compounds.
BMS	1 alerts	-	Undesirable, reactive compounds.
Chelator Rule	0 alerts	-	Chelating compounds.

3. Absorption

Property	Value	Decision	Comment
Caco-2 Permeability	-4.766	•	Optimal: higher than -5.15 Log unit
MDCK Permeability	3e-05	•	■ low permeability: < 2 ×10^{-6} cm/s ■ medium permeability: 2~20 ×10^{-6} cm/s ■ high passive permeability: > 20 ×10^{-6} cm/s
Pgp-inhibitor	0.001	•	■ Category 1: Inhibitor; Category 0: Non-inhibitor; ■ The output value is the probability of being Pgp-inhibitor
Pgp-substrate	0.9	•	■ Category 1: substrate; Category 0: Non-substrate; ■ The output value is the probability of being Pgp-substrate
HIA	0.005	•	■ Human Intestinal Absorption ■ Category 1: HIA+(HIA < 30%); Category 0: HIA-(HIA < 30%); The output value is the probability of being HIA+
$F_{20\%}$	0.003	•	■ 20% Bioavailability ■ Category 1: $F_{20\%}$+ (bioavailability < 20%); Category 0: $F_{20\%}$- (bioavailability ≥20%); The output value is the probability of being $F_{20\%}$+

Page 1

$F_{30\%}$	0.004	•	■ 30% Bioavailability ■ Category 1: $F_{30\%}$+ (bioavailability < 30%); Category 0: $F_{30\%}$- (bioavailability ≥30%); The output value is the probability of being $F_{30\%}$+

4. Distribution

Property	Value	Decision	Comment
PPB	88.33%	•	■ Plasma Protein Binding ■ Optimal: < 90%. Drugs with high protein-bound may have a low therapeutic index.
VD	1.121	•	■ Volume Distribution ■ Optimal: 0.04-20L/kg
BBB Penetration	0.831	•	■ Blood-Brain Barrier Penetration ■ Category 1: BBB+; Category 0: BBB-; The output value is the probability of being BBB+
Fu	8.995%	•	■ The fraction unbound in plasms ■ Low: <5%; Middle: 5~20%; High: > 20%

5. Metabolism

Property	Value	Comment
CYP1A2 inhibitor	0.104	■ Category 1: Inhibitor; Category 0: Non-inhibitor; ■ The output value is the probability of being inhibitor.
CYP1A2 substrate	0.553	■ Category 1: Substrate; Category 0: Non-substrate; ■ The output value is the probability of being substrate.
CYP2C19 inhibitor	0.125	■ Category 1: Inhibitor; Category 0: Non-inhibitor; ■ The output value is the probability of being inhibitor.
CYP2C19 substrate	0.394	■ Category 1: Substrate; Category 0: Non-substrate; ■ The output value is the probability of being substrate.
CYP2C9 inhibitor	0.434	■ Category 1: Inhibitor; Category 0: Non-inhibitor; ■ The output value is the probability of being inhibitor.
CYP2C9 substrate	0.532	■ Category 1: Substrate; Category 0: Non-substrate; ■ The output value is the probability of being substrate.
CYP2D6 inhibitor	0.009	■ Category 1: Inhibitor; Category 0: Non-inhibitor; ■ The output value is the probability of being inhibitor.
CYP2D6 substrate	0.036	■ Category 1: Substrate; Category 0: Non-substrate; ■ The output value is the probability of being substrate.
CYP3A4 inhibitor	0.287	■ Category 1: Inhibitor; Category 0: Non-inhibitor; ■ The output value is the probability of being inhibitor.
CYP3A4 substrate	0.951	■ Category 1: Substrate; Category 0: Non-substrate; ■ The output value is the probability of being substrate.

Page 2

6. Excretion

Property	Value	Decision	Comment
CL	0.928	•	■ Clearance ■ High: >15 mL/min/kg; moderate: 5-15 mL/min/kg; low: <5 mL/min/kg
$T_{1/2}$	0.201	-	■ Category 1: long half-life ; Category 0: short half-life; ■ long half-life: >3h; short half-life: <3h ■ The output value is the probability of having long half-life.

7. Toxicity

Property	Value	Decision	Comment
hERG Blockers	0.254	•	■ Category 1: active; Category 0: inactive; ■ The output value is the probability of being active.
H-HT	0.983	•	■ Human Hepatotoxicity ■ Category 1: H-HT positive(+); Category 0: H-HT negative(-); ■ The output value is the probability of being toxic.
DILI	0.956	•	■ Drug Induced Liver Injury. ■ Category 1: drugs with a high risk of DILI; Category 0: drugs with no risk of DILI. The output value is the probability of being toxic.
AMES Toxicity	0.577	•	■ Category 1: Ames positive(+); Category 0: Ames negative(-); ■ The output value is the probability of being toxic.
Rat Oral Acute Toxicity	0.395	•	■ Category 0: low-toxicity; Category 1: high-toxicity; ■ The output value is the probability of being highly toxic.
FDAMDD	0.975	•	■ Maximum Recommended Daily Dose ■ Category 1: FDAMDD (+); Category 0: FDAMDD (-) ■ The output value is the probability of being positive.
Skin Sensitization	0.273	•	■ Category 1: Sensitizer; Category 0: Non-sensitizer; ■ The output value is the probability of being sensitizer.
Carcinogenicity	0.904	•	■ Category 1: carcinogens; Category 0: non-carcinogens; ■ The output value is the probability of being toxic.
Eye Corrosion	0.003	•	■ Category 1: corrosives ; Category 0: noncorrosives ■ The output value is the probability of being corrosives.
Eye Irritation	0.009	•	■ Category 1: irritants ; Category 0: nonirritants ■ The output value is the probability of being irritants.

Page 3

Page 4

Respiratory Toxicity	0.954	●	■ Category 1: respiratory toxicants; Category 0: respiratory nontoxicants ■ The output value is the probability of being toxic.

8. Environmental toxicity

Property	Value	Comment
Bioconcentration Factors	0.603	■ Bioconcentration factors are used for considering secondary poisoning potential and assessing risks to human health via the food chain. ■ The unit is -log10[mg/L)(1000*MW)]
IGC_{50}	3.851	■ Tetrahymena pyriformis 50 percent growth inhibition concentration ■ The unit is -log10[mg/L)(1000*MW)]
$LC_{50}FM$	4.559	■ 96-hour fathead minnow 50 percent lethal concentration ■ The unit is -log10[mg/L)(1000*MW)]
$LC_{50}DM$	5.201	■ 48-hour daphnia magna 50 percent lethal concentration ■ The unit is -log10[mg/L)(1000*MW)]

9. Tox21 pathway

Property	Value	Decision	Comment
NR-AR	0.015	●	■ Androgen receptor ■ Category 1: actives ; Category 0: inactives; ■ The output value is the probability of being active.
NR-AR-LBD	0.003	●	■ Androgen receptor ligand-binding domain ■ Category 1: actives ; Category 0: inactives; ■ The output value is the probability of being active.
NR-AhR	0.618	●	■ Aryl hydrocarbon receptor ■ Category 1: actives ; Category 0: inactives; ■ The output value is the probability of being active.
NR-Aromatase	0.004	●	■ Category 1: actives ; Category 0: inactives; ■ The output value is the probability of being active.
NR-ER	0.114	●	■ Estrogen receptor ■ Category 1: actives ; Category 0: inactives; ■ The output value is the probability of being active.
NR-ER-LBD	0.008	●	■ Estrogen receptor ligand-binding domain ■ Category 1: actives ; Category 0: inactives; ■ The output value is the probability of being active.
NR-PPAR-gamma	0.033	●	■ Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ■ Category 1: actives ; Category 0: inactives; ■ The output value is the probability of being active.
SR-ARE	0.399	●	■ Antioxidant response element ■ Category 1: actives ; Category 0: inactives; ■ The output value is the probability of being active.
SR-ATAD5	0.012	●	■ ATPase family AAA domain-containing protein 5 ■ Category 1: actives ; Category 0: inactives; ■ The output value is the probability of being active.

Page 5

SR-HSE	0.003	●	■ Heat shock factor response element ■ Category 1: actives ; Category 0: inactives; ■ The output value is the probability of being active.
SR-MMP	0.342	●	■ Mitochondrial membrane potential ■ Category 1: actives ; Category 0: inactives; ■ The output value is the probability of being active.
SR-p53	0.333	●	■ Category 1: actives ; Category 0: inactives; ■ The output value is the probability of being active.

10. Toxicophore Rules

Property	Value	Comment
Acute Toxicity Rule	0 alerts	■ 20 substructures ■ acute toxicity during oral administration
Genotoxic Carcinogenicity Rule	2 alerts	■ 117 substructures ■ carcinogenicity or mutagenicity
NonGenotoxic Carcinogenicity Rule	1 alerts	■ 23 substructures ■ carcinogenicity through nongenotoxic mechanisms
Skin Sensitization Rule	0 alerts	■ 155 substructures ■ skin irritation
Aquatic Toxicity Rule	1 alerts	■ 99 substructures ■ toxicity to liquid(water)
NonBiodegradable Rule	1 alerts	■ 19 substructures ■ non-biodegradable
SureChEMBL Rule	1 alerts	■ 164 substructures ■ MedChem unfriendly status

Page 6

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Daniel Nettersheim bedanken. Lieber Daniel, du warst in vielerlei Hinsicht genau der richtige Doktorvater für mich. Deine strukturierte und vorausschauende Arbeitsweise hat mir nicht nur einen klaren Projektplan mit realistischen Zielen ermöglicht, mir aber zeitgleich auch genügend Freiraum gegeben, um eigene Ideen einzubringen. Du warst immer erreichbar um meine Ergebnisse, Fragen und Misserfolge zu besprechen und gemeinsam eine Lösung auszuarbeiten. In jedem dieser Gespräche merkte man dir deine Faszination und Begeisterung für die Wissenschaft an. Das motivierte mich ungemein und bestärkte mich dabei tiefer in die Forschung an Keimzelltumoren einzusteigen. Auch der menschliche Aspekt kam bei dir nie zu kurz, was mir in meiner Laborzeit und auch darüber hinaus, immer das Gefühl gab Teil einer Gruppe zu sein, die gemeinsam an einem Strang zieht. Vielen Dank für alles!

Ein besonderer Dank geht auch an Prof. Dr. Lutz Schmitt, der sich bereit erklärt hat meine Dissertation als Mentor zu betreuen. Vielen Dank, dass Sie sich die Zeit genommen haben und mir als Biochemiker eine Promotion in der medizinischen Forschung ermöglicht haben.

Ich möchte Prof. Dr. Thomas Kurz und Dr. Alvarez für eine produktive Zusammenarbeit danken, die die Grundlage für meine Forschung darstellte.

Des Weiteren danke ich der Forschungskommission Düsseldorf und der Brigitte und Dr. Konstanze Wegener-Stiftung für die finanzielle Förderung meines Promotionsprojektes.

Nun zum Laborteam der UroOnkoligschen Forschung. Liebe Maggi, du hast es ermöglicht, dass ich mich als Wissenschaftler enorm weiterentwickeln konnte, ohne mich jemals aus den Augen zu verlieren. Wann immer ich eine Frage hatte oder mal nicht weiterkam, warst du sofort mit Rat und Tat an meiner Seite. Du hast die korrekte Arbeitsweise einer Forscherin nicht nur in der Theorie gepredigt, sondern auch jeden Tag vorgelebt. Mit deiner Leidenschaft für die Wissenschaft hast du mich ab dem ersten Tag angesteckt und motiviert. Ein richtiges Vorbild eben! Auch unsere zahlreichen privaten Gespräche habe ich sehr genossen, ob es nun um den nächsten Urlaub oder einen neuen Kinofilm ging. Ich hätte mir keine bessere Betreuerin für meine Promotion wünschen können, vielen vielen Dank!

Liebe Anna, auch dir möchte ich für deine gelebte Professionalität danken. Egal wie oft ich vergessen habe die richtigen Zellen zu bestellen, oder sich die Pläne mal wieder änderten, du hast immer alles versucht, damit ich trotzdem viele Versuche rechtzeitig starten konnte. Dein strukturiertes Arbeiten hindert dich aber nicht daran uns Studis praktische Tipps zu vermitteln. Du bist involviert in die Forschung und interessierst dich nicht nur für die Projekte der

Studierenden, sondern auch für die Menschen hinter den Daten. Das ist nicht selbstverständlich! Danke, dass du immer ein offenes Ohr hattest und nie die Geduld verloren hast.

Nun zum Team-Epi-Drug. Liebe Melli, liebe Alexa, ihr wart, ohne es vorher zu Wissen, die Menschen, die sich am meisten mit mir Herumschlagen mussten. Melli ich will dir von Herzen danken, dass du mich in meinem ersten Jahr so herzlich empfangen hast und mich unter deine Fittiche genommen hast. Keine Frage war zu dumm, keine Wissenslücke zu peinlich, du warst für mich da und hast mir dabei nie ein schlechtes Gefühl gegeben. Durch unsere verwandten Projekte durften wir viele Versuche gemeinsam bestreiten und du warst eben oft diejenige, die den Weg ebnen musste. Ich konnte mich immer auf dich verlassen, ob am Wochenende bei XTT-Arbeiten, als mentale Stütze bei Mausversuchen oder als Kuchenfee, die anstrengende Labortage mit einer Leckerei mehr als nur erträglich macht. Du bist die Gründerin des Team Epi-Drugs und deshalb auch immer die erste Ansprechpartnerin für alles. Ich danke dir für die gemeinsamen Laborjahre und freue mich auf viele weitere als Freunde. Alexa, du musstest als Masterandin an meiner Seite arbeiten und mich sogar als eine Art Betreuer dulden – absurd! So furchtbar war ich aber anscheinend nicht, denn du hast dich dafür entschieden deine Promotion bei Daniel zu schreiben. Obwohl ich es dir wohl nie verzeihen kann, dass du der Epigenetik den Rücken zugewandt hast, muss ich dir auch dafür dankbar sein, dass du trotz deines neuen Projektes, noch mit mir gesprochen hast. Du hast einen maßgeblichen Anteil an unserem gemeinsamen Paper, dass ich so sicherlich nicht ohne dich auf die Beine gestellt bekommen hätte. Durch die Trennung unserer Themengebiete fundierte unsere Zusammenarbeit während deiner Dissertation vor allem auf unserem ähnlichen Verständnis von Humor und Musik und dem ständigen Drahtseilakt zwischen Fortschritt und Verzweiflung. Du hast bei unseren gemeinsamen Kaffeepausen durch deine herzliche und zugleich trockene Art für viel Freude gesorgt. Auch wenn sich mit mir das Kapitel Epi-Drugs schließt, so bin ich mir sicher, dass ich zwei sehr wichtige Freundinnen behalten werde!

Liebe Mara, auch dich durfte ich über die gesamte Zeit meiner Promotion begleiten. Ich muss gestehen, dass ich zu Beginn etwas überfordert war, da du auf den ersten Blick so ziemlich das genau Gegenteil zu mir darstellst. Aber nach kurzer Eingewöhnung habe ich festgestellt, dass wir viele Ansichten teilen, auch wenn wir dies ganz anders ausdrücken. Du hast mir mehr als nur einmal gezeigt, dass man Probleme auch ganz anders lösen kann. Dein Frohsinn und deine Unbeschwertheit haben mich oft zum Lachen oder Kopfschütteln gebracht, manchmal auch beides gleichzeitig. Vielen Dank, dass du den Laboralltag gründlich aufgerüttelt und wesentlich spaßiger gestaltet hast.

Auch allen Masterstudierenden und Medis möchte ich herzlich danken. Ich hatte viel Freude daran euch dabei zu unterstützen den Labor-Dschungel zu erkunden. Eure Begeisterungsfähigkeit hat mich oft von Neuem motiviert und angespornt. Und auch kritische Fragen haben mir dabei geholfen Sachverhalte zu hinterfragen und Wissenslücken zu schließen. Jede/r von euch hat sich hervorragend in die AG integriert und trotzdem frischen Wind reingebracht. Vielen Dank, dass ich euch alle kennenlernen durfte.

Ich möchte meiner Familie und meinen Freunden danken. Ihr habt mir immer zugehört, auch wenn ich viel von Dingen erzählt habe, die euch entweder wenig interessieren, oder unter denen ihr euch Garnichts vorstellen könnt. Vor allem in der Zeit des Schreibens des Manuskripts und der Thesis wart ihr für mich da, wenn ich eine Auszeit brauchte oder etwas Unterstützung benötigte. Vielen Dank, dass es euch gibt. Ein besonderer Dank geht an meine Mama, Herbert, Ari und meinem Papa für das Korrekturlesen der Veröffentlichungen und dieser Arbeit. Ich möchte an dieser Stelle auch meine Dankbarkeit für die Unterstützung meiner Eltern über das gesamte Studium hinweg zum Ausdruck bringen, ohne euch wäre das alles nicht möglich gewesen.

Zuletzt möchte ich Lea danken. Ich kann nicht in Worte fassen, wie dankbar ich dir bin. Nicht nur für die unzählige Korrektur lesen und Ratschläge geben, sondern vor allem fürs immer wieder Auffangen und Motivieren. Es tut gut jemanden an seiner Seite zu wissen, der zum einen nachvollziehen kann, wie viel Kraft so eine Promotion kosten kann, aber andererseits die Begeisterung an der Wissenschaft teilt. Du bereicherst jeden Moment in meinem Leben und ich bin unglaublich froh, dass ich diese wunderschöne und intensive Zeit der Doktorarbeit mit dir an meiner Seite bestreiten durfte. Auf zu neuen, gemeinsamen Abenteuern!