

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

**Entschlüsselung der molekularen und (epi)genetischen Mechanismen während
der Differenzierung von embryonalen Karzinomen zu Dottersacktumoren zur
Entwicklung alternativer Therapieansätze**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines „Doctor of Philosophy“ (PhD) in Medical Sciences
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Mara Kotthoff

2024

Widmung

Für meine Familie

Für Margit, Meik und Marc Kotthoff

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

Gezeichnet:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Daniel Nettersheim, Prof. Dr. rer. nat. Sebastian
Wesselborg

Zusammenfassung

Keimzelltumoren (GCT) betreffen vorwiegend junge Männer und werden mittels Orchiektomie, Chemotherapie und Bestrahlung behandelt. Während die Heilungsrate für GCT-Patienten insgesamt hoch ist, begründen aggressive Subtypen wie Dottersacktumoren (YST) den Großteil der GCT-bedingten Sterblichkeit. Rezidivierende GCT-Patienten entwickeln häufig therapieresistente YST-Komponenten, die möglicherweise auf einen Fluchtmechanismus infolge der Therapie zurückzuführen sind. Die molekularen Mechanismen, die dem Übergang von der Vorläuferstammzellpopulation, dem Embryonalkarzinom (EC), zu YST zugrunde liegen, sind jedoch weitgehend unerforscht. Ziel dieser Dissertation war somit die Identifizierung der Schlüsselfaktoren und Signalaktivitäten der YST-Entwicklung, die Etablierung eines neuartigen YST-Forschungsmodells zur Charakterisierung von YST-ähnlichen Zellen *in vitro* und *in vivo* sowie die Analyse der Mechanismen der Cisplatinresistenz in YST-ähnlichen Zellen. Das CRISPR/dCas9-SAM-System wurde verwendet um den YST-assoziierten Transkriptionsfaktor SOX17 in EC-Zellen zu induzieren. In Kombination mit der Aktivierung der WNT, TGF-beta und FGF-Signalwege führte dies zur Differenzierung der EC-Zellen in die YST-Linie. Mittels qRT-PCR-Analyse und Einzelzell-RNA-Sequenzierung wurde die Induktion von YST-assoziierten Markern wie *ANKRD1*, *APOA1*, *CST1*, *DUSP4*, *FOXA2*, *GATA6* und *GPC3* in fünf verschiedenen EC-Zelllinien beobachtet, während die Expression der Pluripotenzgene *NANOG*, *OCT3/4* und *SOX2* unterdrückt wurde. *In vivo* entstanden gemischte GCT mit YST-Anteil nach der Xenotransplantation von *in vitro* differenzierten YST-ähnlichen Zellen in Nacktmäuse. Eine Subgruppe der YST-ähnlichen Zellen wies bekannte Cisplatin-Resistenzfaktoren auf, was auf eine mögliche Rolle der Cisplatinresistenz-Entwicklung im Rahmen der YST-Entstehung hinweist. Zudem zeigten die YST-ähnlichen Zellen im Vergleich zu den parentalen Zellen eine verringerte Sensitivität gegenüber Cisplatin. Diese Studie entschlüsselte demnach die molekularen Prozesse der YST-Entwicklung aus EC-Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch die Induktion von SOX17 und die Aktivierung der WNT, TGF-beta und FGF-Signalwege. Die Identifizierung von Inhibitoren, die diese Signalwege beeinflussen, könnte das Auftreten aggressiver YST unter Behandlung möglicherweise verhindern. Die Ergebnisse legen nahe, dass die Entwicklung der Cisplatinresistenz mit der Entstehung von YST assoziiert sein könnte, was darauf hindeutet, dass die YST-Bildung einen Fluchtmechanismus von GCT darlegt.

Abstract

Germ cell tumors (GCT) predominantly affect young men and are typically treated with orchiectomy, cisplatin-based chemotherapy, and radiation. While the overall cure rate for GCT patients is overall high, aggressive subtypes like yolk-sac tumors (YST) pose a significant challenge, contributing to GCT-related mortality. Many relapsed GCT cases exhibit YST components, suggesting YST formation as a potential therapy escape mechanism. However, the molecular mechanisms underlying the transition from the precursor stem cell-like population, embryonal carcinoma (EC), to YST remain poorly understood. The aim of this dissertation was to identify the key factors and signalling activities lead to the dynamic differentiation from an EC to a YST cell fate, the establishment and validation of a novel YST research model for the characterization of YST-like cells *in vitro* and *in vivo*, and the analysis of the mechanisms of cisplatin resistance in YST-like cells in the context of malignant YST development. By utilizing the CRISPR/dCas9-SAM system, expression of the YST-associated transcription factor SOX17 in EC cells was induced, alongside coordinated activation of WNT, TGF-beta, and FGF signalling pathways, resulting in the differentiation of EC cells towards the YST lineage. Through qRT-PCR analysis and single-cell RNA sequencing, we observed the upregulation of YST-associated markers, including *ANKRD1*, *APOA1*, *CST1*, *DUSP4*, *FOXA2*, *GATA6*, and *GPC3*, across five distinct EC cell lines, while the expression of pluripotency-related genes *NANOG*, *OCT3/4*, and *SOX2* was repressed. Xenograft experiments in nude mice demonstrated that *in vitro* differentiated YST-like cells could give rise to mixed GCT containing YST components, validating their ability to form YST even *in vivo*. Furthermore, an induction of expression of known cisplatin resistance factors in a subset of YST-like cells was detected, suggesting a concurrent acquisition of cisplatin resistance during YST development. Indeed, the YST-like cells displayed reduced sensitivity to cisplatin treatment, as evidenced by diminished induction of apoptosis compared to their parental cells. In conclusion this study unravelled the molecular processes governing the differentiation of YST from EC *in vitro* and *in vivo*, through induction of SOX17 and stimulation of WNT, TGF-beta and FGF pathways. Moreover, identifying inhibitors targeting these pathways could potentially impede the emergence of aggressive YST during treatment. Furthermore, the findings suggest that the development of cisplatin resistance may coincide with the progression of YST, underscoring the role of YST formation as an escape mechanism in GCT.

Abkürzungsverzeichnis

% w/v	Gewichtprozent pro Volumen: 1 % = 1 g in 100 ml
% v/v	Volumenprozent pro Volumen 1 % = 1 ml in 100 ml
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
Bp	Basenpaar
c	Konzentration
CC	Chorionkarzinom
cm	Zentimeter
CT	Computer-Tomographie
d1 / d3	Tag 1 / Tag 3
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Embryonalkarzinom
EDTA	Ethylendiamintetraacetatsäure
FACS	Durchflusszytometrie
FBS	Fötales Rinderserum
FSC	Vorwärtsstreulicht
Fwd	forward <i>primer</i>
g	Gramm
GCNIS	Keimzellneoplasie <i>in situ</i>
GCT	Keimzelltumor
GOP	Gemcitabin Oxaliplatin Paclitaxel
h	Stunde
HDI	Human Development Index
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	Horseradish peroxidase / Meerrettichperoxidase
IHC	Immunhistochemie
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KHz	Kiloherz
KO	Knock-Out
l	Liter
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen
LB	Luria Bertani
LD50	Halbletale Dosis
LVP	Lentivirale Partikel
mM	Minimolar
M	Molar
mg	Milligramm
Min	Minuten
ml	Milliliter
MRT	Magnetresonanztomographie
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NSE	Nichtseminom
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PBS-T	Phosphat gepufferte Salzlösung mit 0,1 % Tween-20
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerytrin
PEB	Palbociclib Etoposid Bleomycin
PGC	Primordiale Keimzelle

PI	Propidium Iodid
PMS	N-Methylphenazinium-Methylsulfat
PSI	Pound-force per square
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-PCR
Rev	Revers <i>primer</i>
RIPA	Radioimmunpräzipitations-Assay-Puffer
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute
RR	relatives Risiko
RT	Reverse Transkriptase
SAC	Behandlungskombination aus: SOX17 / SOX17-Induktion, Activin-A, CHIRON
SACF	Behandlungskombination aus: SOX17 / SOX17-Induktion, Activin-A, CHIRON, FGF2, Heparin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese
SE	Seminom
Sek	Sekunde
SNP	Single nucleotide polymorphism
SSC	Seitwärtsstreulicht
STEED study	Servicemen's Testicular Tumor Environmental and Endocrine Determinants study
STR	Short tandem repeat
Tab.	Tabelle
TDS	Testikuläres Dysgenesie-Syndrom
TER	Teratom
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tm	Schmelztemperatur der Oligonukleotide
TNM	Tumor-Lymphknoten-Metastase
UMAP	Uniform Manifold Approximation and Projection
UV	Ultraviolett
V	Volt
WHO	World Health Organization
XTT	2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilid
YST	Dotterstammtumor
ZETT	Zentrum für Tierforschung und wissenschaftliche Tiernutzungsaufgaben
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Keimzellen und Keimzelltumoren	1
1.1.1	Die Gametogenese	1
1.1.2	Subtypisierung von Keimzelltumoren	2
1.1.3	Molekulare Besonderheiten und Plastizität der Keimzelltumoren-Typ-II	4
1.1.4	Modell zur Entwicklung von Dottersacktumoren	6
1.1.5	Demografie und Epidemiologie von Keimzelltumoren	14
1.1.6	Risikofaktoren von Keimzelltumoren	17
1.1.7	Aktuelle Diagnostik und Therapieoptionen zur Behandlung von GCT	19
1.2	Zielsetzung der Arbeit	22
2.	Material & Methoden	24
2.1	Aktenzeichen des Ethikvotums	24
2.2	Aktenzeichen für die Durchführung von Tierversuchen	24
2.3	Material	25
2.3.1	Chemikalien	25
2.3.2	Verbrauchsmaterialien	26
2.3.3	Kommerziell erhältliche Lösungen und Puffer	28
2.3.4	Enzyme	29
2.3.5	Zellkulturlösungen	29
2.3.6	Zusammensetzung der Zellkulturmedien	30
2.3.7	Pharmakologische Medikamente und rekombinante Proteine	30
2.3.8	Antibiotikallösungen und Substanzen für mikrobiologische Versuche	31
2.3.9	Oligonukleotide für die cDNA-Synthese	31
2.3.10	Genomische <i>Primer</i>	33
2.3.11	siRNA-Oligonukleotide	33
2.3.12	Plasmide	33
2.3.13	Primäre Antikörper	34
2.3.14	Sekundäre Antikörper	34
2.3.15	Kits und Assays	35
2.3.16	Laborgeräte	36
2.3.17	Software und Tools	38
2.3.18	Prokaryotenstämme	38
2.3.19	Humane Zelllinien	39
2.3.19.1	Keimzelltumor-Zelllinien	39
2.3.19.2	Leberkarzinom- und Nieren-Zelllinien	39
2.4	Methoden	40

2.4.1	Methoden in der Zellkultur	40
2.4.1.1	Authentifizierung der genutzten Zelllinien	40
2.4.1.2	Kultivierung, Vereinzellung und Passagieren von Zelllinien	40
2.4.1.3	Zellzahl-Bestimmung mittels Trypanblau-Färbung	41
2.4.1.4	Kryokonservierung von Zellen	41
2.4.1.5	Auftauen und Rekultivieren von Zellen	41
2.4.1.6	Transfektion humaner Zelllinien	42
2.4.1.7	Transduktion von humanen HEK293-T-Zellen zur Produktion von Lentiviren (Kalziumphosphatpräzipitation)	42
2.4.1.8	Erzeugung von Zelllinien mit integriertem <i>lentiMPHv2</i> -Aktivator-Helfer-Komplex	45
2.4.1.9	Infektion von <i>lentiMPHv2</i> ⁺ -EC-Zellen mit Lentiviren für die endogene (Über-)Expression von Differenzierungsfaktoren	45
2.4.1.10	Zellviabilitätsmessung mittels XTT-Assay	46
2.4.1.11	Durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptose-Induktion	47
2.4.1.12	Behandlung von Zellen mit rekombinanten Proteinen / pharmakologischen Inhibitoren	47
2.4.1.13	Differenzierung von EC-Zellen in ein YST-ähnliches Zellschicksal	48
2.4.2	Nukleinsäure-Analytik	49
2.4.2.1	DNA-Extraktion aus Zellen	49
2.4.2.2	Isolation von Plasmid-DNA nach Prinzip der alkalischen Lyse	51
2.4.2.3	Reinigung von Plasmid-DNA mittels steriler Ethanol-Präzipitation	52
2.4.2.4	Isolation von Plasmid-DNA (Maxi-prep)	52
2.4.2.5	RNA-Extraktion aus Zellen	53
2.4.2.6	RNA-Extraktion aus Geweben	53
2.4.2.7	Sanger-Sequenzierung (BMFZ)	54
2.4.2.8	DNA-Restriktion mittels Restriktionsenzymen	54
2.4.2.9	Quantifizierung mittels Agarose-Gelelektrophorese	54
2.4.2.10	Synthese von <i>complementary</i> DNA durch reverse Transkription	56
2.4.2.11	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion	56
2.4.2.12	Polymerasekettenreaktion	57
2.4.2.13	Erstellung einer Einzelzell-Bibliothek zur RNA-Sequenzierung von Einzelzellen	59
2.4.3	Protein-Analytik	60
2.4.3.1	Proteinextraktion aus Zellen	60
2.4.3.2	BCA-Assay zur Konzentrationsbestimmung von Proteinsuspensionen	60
2.4.3.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	60

2.4.3.4	Western Blot und Protein-Detektion durch Chemilumineszenz	61
2.4.3.5	<i>Stripping</i> von Western Blot-Membranen	62
2.4.3.6	Durchflusszytometrisches Quantifizieren und Sortieren von Zellen anhand des Oberflächenproteins CXCR4	63
2.4.4	Mikrobiologische Methoden	64
2.4.4.1	Produktion von Agarplatten und Bakterien-Wachstumsmedium	64
2.4.4.2	Klonierungsstrategie der <i>lentiSAMv2-FOXA2</i> - und <i>SOX17</i> -Konstrukte	64
2.4.4.3	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> TOP10 Bakterien	66
2.4.5	Histologische Methoden	67
2.4.5.1	Immunhistochemie	67
2.4.6	<i>In silico</i> -Methoden	68
2.4.6.1	Design und Herstellung von Oligonukleotiden für die cDNA-Synthese	68
2.4.6.2	Re-Analyse von <i>Microarray</i> -Daten	68
3.	Ergebnisse	69
4.	Diskussion und Schlussfolgerung	105
5.	Literaturverzeichnis	115

1. Einleitung

1.1 Keimzellen und Keimzelltumoren

1.1.1 Die Gametogenese

Die Gametogenese beschreibt die komplexe Entwicklung von Keimzellen, die zu der Bildung von Spermien bei Männern (Spermatogenese) oder Eizellen bei Frauen (Oogenese) führt (1). Der Ursprung der Keimzellen liegt in den primordialen Keimzellen (PGC, aus dem Englischen für *primordial germ cell*), die sich bereits in der zweiten Woche der Embryonalentwicklung nach der Befruchtung der Eizelle (Oogamie) entwickeln (2–4). Während die Zygote zur embryonalen Scheibe heranreift, wird in dem Epiblast durch die Aktivierung der BMP, NODAL, und WNT-Signalkaskaden durch das umliegende extraembryonale Gewebe der Beginn der Keimzellentwicklung in der posterioren Region initiiert (4–6). Zu Beginn der embryonalen Entwicklung exprimieren PGC die PGC-Markergene *DAZL*, *DDX4*, *KIT*, *NANOG*, *PRMD1* (*BLIMP1*), *POU5F* (*OCT3/4*) *SOX17* und *TFAP2C*, die die stammzellartige Pluripotenz der unreifen Keimzellen erhalten und eine somatische Differenzierung verhindern (4,5,7–21). Die PGC migrieren entlang von Morphogengradienten der Signalfaktoren und Chemokine BMP4/7, CXCL12, SCF und GDF9 in die Genitalleisten herein (2,4,22–26). In den Genitalleisten differenzieren sich die PGC insbesondere zu geschlechtsspezifischen Keimzellen – den späteren Spermatogonien bei Männern und den Oogonien bei Frauen. Die Abläufe der Keimzellentwicklung werden strikt durch epigenetische Modifikationen, wie DNA-Methylierungen, und die Aktivität von *microRNAs* reguliert (27,28).

Während der Pubertät junger Männer durchlaufen die Spermatogonien in den Hoden mehrere Mitose-Schritte während der Entwicklung zu Spermatozyten (29). Während dieses Entwicklungsprozesses exprimieren die Spermatogonien Markergene wie *DDX4* (*VASA*), *STRA8*, *BOULE* und *DAZL* (7,30). Die regulatorischen Funktionen von VASA-, STRA8-, BOULE- und DAZL-Proteinen erstrecken sich von den frühen Keimzellen bis zur Reifung von Spermien und gewährleisten während der unterschiedlichen Entwicklungsstadien die Kontinuität und Effizienz der Spermatogenese (7,30). Die fortlaufende Spermatogenese wird durch Hormone (FSH, LH und Testosteron) reguliert (29,31). Unter der präzisen Kontrolle der Proteine VASA, STRA8, BOULE und DAZL durchlaufen Spermatiden die meiotische Zellteilung und

reifen zu funktionsfähigen Spermien heran (32,33). Die reifen Spermien werden in den Nebenhoden des Mannes gelagert. In den Ovarien unterlaufen die Oogonien die Meiose I-Phase des Zellzyklus, wobei dieser Prozess bis zur Geschlechtsreife persistiert. Nach Eintritt der Pubertät in jungen Frauen werden Oogonien zu Oozyten, diese vollenden die zuvor unterbrochene Meiose-I-Phase und ruhen anschließend als reife, sekundäre Oozyten in den Ovarien. Die Meiose-II-Phase wird erst bei Befruchtung einer Eizelle abgeschlossen (34).

1.1.2 Subtypisierung von Keimzelltumoren

Keimzelltumoren (GCT, aus dem Englischen für *germ cell tumor*) sind solide Tumoren in Form von Neoplasien, die aus entarteten Keimzellen entstehen (35). Der Primarius manifestiert sich häufig in den Gonaden, besonders im metastasierten Zustand können GCT jedoch auch außerhalb der Gonaden in den Geweben entlang der Körpermittellinie auftreten (35,36). Ein einzigartiges Merkmal von GCT liegt in der Fähigkeit, Gewebe verschiedener Keimblätter (Endo-, Meso- und Ektoderm) auszubilden, was zu einer großen histologischen und molekularen Vielfalt der einzelnen Subtypen führt (35,37).

Oosterhuis et al. klassifizierten fünf unterschiedliche GCT-Subtypen nach selektierten Kriterien, die die Lokalisation des Tumors, das Patientenalter, die Ursprungszelle und die chromosomalen / genomischen Eigenschaften berücksichtigen (37,38). Die Klassifikationsmerkmale wurden von der *World Health Organization* (WHO) für die Einstufung von GCT adaptiert (37–40). Dabei betrifft der Typ-I-GCT überwiegend Neugeborene und Kinder bis zu einem Alter von 15 Jahren und äußert sich in Form von präpubertären Teratomen (TER) und Dottersacktumoren (YST, aus dem Englischen für *yolk-sac tumor*) (35). Die kindlichen GCT treten hauptsächlich bei Mädchen auf, wobei eine erhöhte Inzidenz in den ersten beiden Lebensjahren sowie in der Altersgruppe von 6 bis 9 Jahren besteht (37). Die Typ-II-GCT sind die häufigste solide Tumorerkrankung bei Männern im Alter von 14 bis 44 Jahren, zudem machen sie mit 95 % den größten Teil der dokumentierten GCT-Patientenfälle aus (35,36). Typ-II-GCT werden in Seminome (SE) und Nicht-Seminome (NSE) stratifiziert (Abb. 1) (35). NSE umfassen die stammzellartigen Embryonalkarzinome (EC, aus dem Englischen von *embryonal carcinoma*), die in Gewebe aller drei Keimblätter (in Form

eines TER) oder in extraembryonales Gewebe in Form von Chorionkarzinomen (CC, aus dem Englischen für *choriocarcinoma*) und adulten YST differenzieren können (Abb. 1) (35).

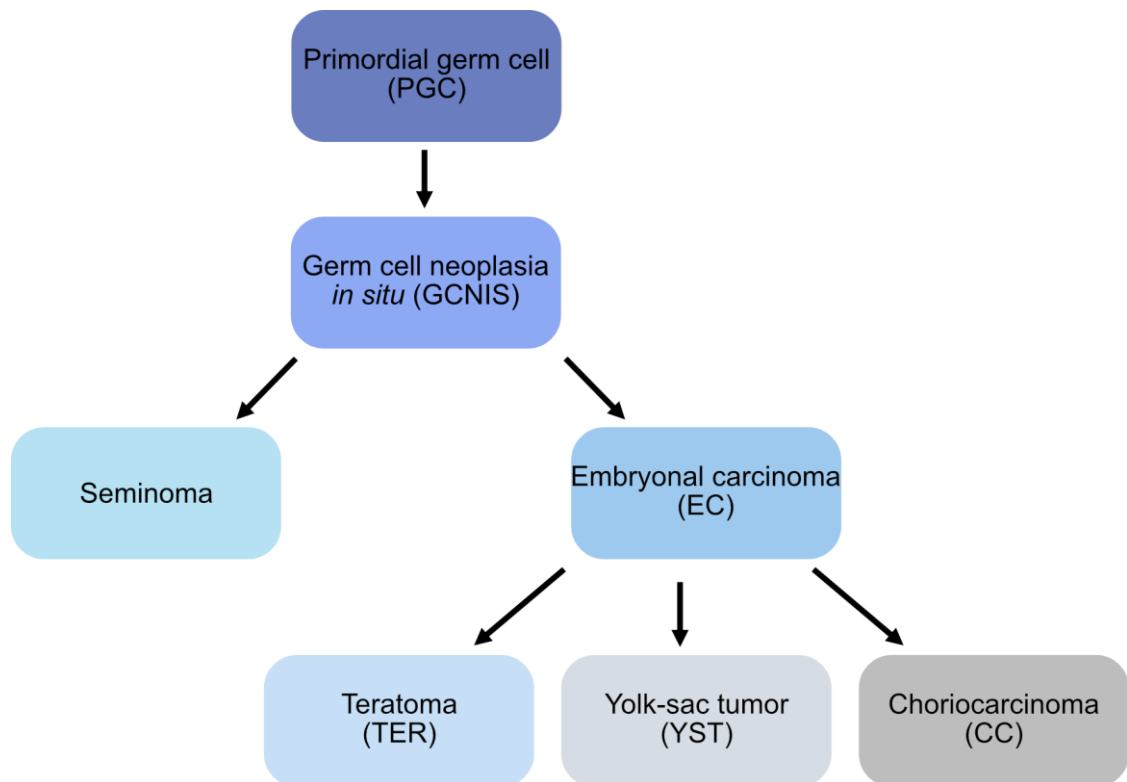


Abbildung 1: Modell der Pathogenese der Typ II-GCT-Subtypen. Defekte PGC bilden eine Gewebeneubildung *in situ* (GCNIS) aus, welche in SE (Seminoma) und NSE stratifiziert wird. NSE beinhalten das stammzellartige EC, welches in Teratome (TER), Dottersacktumoren (YST) und Chorionkarzinome (CC) differenzieren kann.

Typ-III-GCT sind spermatozytäre Tumoren, die sich typischerweise bei älteren Männern entwickeln. Typ-IV-GCT manifestiert sich hingegen in Form von dermoiden Zysten am Eierstock, während Typ-V-GCT als Blasenmole in der Plazenta auftreten. Die Subtypen-V und VI der GCT treten ausschließlich bei Frauen im gebärfähigen Alter auf. Neben der Klassifizierung von Oosterhuis et al. unterscheidet die WHO die GCT-Subtypen derzeit insbesondere anhand ihrer zellulären Entstehungsläsion in zwei Gruppen (37,38,41,42). Die WHO kategorisiert die GCT-Typ-II, die sich durch die Entwicklung aus einer anfänglich gutartigen, nicht-invasiven Gewebeneubildung namens *germ cell neoplasia in situ* (GCNIS) auszeichnen (41). Neben histologischen Merkmalen und genetischer Charakterisierung betrifft diese Gruppe vor allem Personen im Alter von 15 bis 35 Jahren (41–43). Die zweite Gruppierung von GCT, umfasst Typ-I-GCT und Typ-III-GCT nach der WHO-Definition, entwickelt sich unabhängig von der GCNIS und betrifft Neugeborene, präpubertäre Kinder und ältere

Männer (41–43). Aufgrund der noch nicht vollständig erforschten molekularbiologischen Eigenschaften und Prozesse der einzelnen GCT-Subgruppen erfolgt eine stetige Aktualisierung der Klassifizierungen und Nomenklatur durch die WHO.

1.1.3 Molekulare Besonderheiten und Plastizität der Typ-II Keimzelltumoren

Die Pathogenese von Typ-II-GCT wird auf die ursprüngliche Entartung und Fehlentwicklung von PGC zurückgeführt, die möglicherweise bereits während der embryonalen Entwicklung auftreten könnte (35,44). Diese fehlerhaften PGC führen zu der Entwicklung einer GCNIS als benigne Vorläuferläsion (37,44,45). Genetische Aberrationen sowie die Signaltransduktion in der Mikroumwelt zusammen mit epigenetischen Modifikationen können durch verschiedene Umwelteinflüsse verursacht werden. Dazu gehören individuelle Lebensstilfaktoren, Ernährungsgewohnheiten, Chemikalien, Toxine, Stress und Medikamente. Diese Faktoren werden als potenzielle Auslöser für die maligne Entartung der neoplastischen Zellen beschrieben (27,35,36,46,47). Während der Transformation der GCNIS zu einem soliden, invasiven Tumor wird häufig eine Amplifikation im Bereich des kurzen Chromosomenarms des zwölften Chromosoms („12p-*gain*“) beobachtet (48–50). Diese chromosomale Veränderung wird als Isochromosom (i(12p)) beschrieben (51). Einige, der auf Chromosom 12 codierten Gene, die möglicherweise an der GCT-Entstehung beteiligt sind, sind Gene wie *GDF3*, *DPPA3* / *STELLA*, *SOX5*, *PHC2* und *ATF7IP*, sowie Proto-Onkogene wie *NANOG*, *CCND2* und *KRAS* (52).

Generell werden GCNIS-Zellen als die intermediäre Stufe zwischen einer arretierten, transformierten PGC während der Embryogenese und den malignen GCT-Zellen beschrieben (45). Die aus der GCNIS resultierenden Tumorzellen werden anhand ihrer Histologie, ihrer Transkriptome und Proteome in SE und NSE unterschieden (35). SE weisen eine latente Pluripotenz auf und ähneln den ursprünglichen PGC hinsichtlich ihrer Morphologie, der epigenetischen Prägungen sowie der Genexpression (35). Die dauerhafte Expression von Pluripotenzfaktoren wie *OCT3/4*, *NANOG*, *LIN28* und *SOX17* in SE-Zellen betont ihre molekularbiologische Ähnlichkeit zu den PGC (35,45). Ein wesentlicher Unterschied zwischen den molekularbiologischen Eigenschaften von

SE- und EC-Zellen besteht darin, dass EC-Zellen hauptsächlich SOX2 anstelle von SOX17 exprimieren (53). Beide Transkriptionsfaktoren (SOX2 und SOX17) bilden einen Transkriptionskomplex mit OCT3/4 und binden an ein sehr ähnliches, stark konserviertes DNA-Bindemotiv der Zielgene (54). SOX2 und SOX17 regulieren folglich ähnliche Zielgene wie *DPPA4*, *LIN28A*, *NANOG*, *OTX2*, *PIM1/2*, *PRDM14*, *TDGF1* und *TRIM71* (54,55). Der SOX2 / OCT3/4-Transkriptionskomplex reguliert Pluripotenz-erhaltende Gene wie *NANOG*, *GDF3*, *LEFTY2* und *SALL4*, die essenziell für die Selbsterneuerung und Erhaltung der Stammzellpopulation sind, während die Funktion des SOX17 / OCT3/4-Komplexes in der Keimzell- und Endoderm-Differenzierung liegt (55,56). Anhand der Unterschiede in der Molekularbiologie von SE- und EC-Zellen, beleuchtet eine Studie von Nettersheim et al. die bemerkenswerte Plastizität der GCT-Pathogenese (57). Dabei zeigten ursprünglich SOX17⁺ SE-Zellen nach der Xenotransplantation in Nacktmausflanken eine Induktion des Transkriptionsfaktors SOX2 bei gleichzeitiger Repression von SOX17 (57). Diese Veränderung der Genregulation erfolgte aufgrund der Inhibition des BMP-Signalwegs (induziert durch die Signalaktivitäten der Tumormikroumwelt *in vivo*) und führte zu einer Reprogrammierung der SE-Zellen in Richtung des pluripotenten EC-Zellschicksals (37,57–59). Zusätzlich wurde in *in vitro*-Experimenten von Irie et al. durch die CRISPR/Cas9-vermittelte SOX17-Defizienz (*knock Out*, KO) eine reprimierte Expression von Keimzell- und Pluripotenzgenen wie *NANOS3*, *TFAP2C*, *DND1*, *UTF1*, *KLF4*, *OCT4* und *NANOG*, in den gleichen SE-Zellen beobachtet (60). *In vitro* wurde somit keine Rettung durch die Heraufregulation des redundanten SOX2-Transkriptionsfaktors veranlasst (60). Diese Erkenntnisse implizieren, dass externe Einflüsse und Faktoren wie die Aktivität des BMP-Signalwegs, die genregulatorische Dynamik der Tumorzellen beeinflussen und einen maßgeblichen Einfluss auf die Determinierung des Zellschicksals in arretierten und fehlentwickelten PGC haben.

In einer weiterführenden Studie untersuchten Nettersheim et al. die Funktion von SOX2 während der Determinierung des Zellschicksals in GCT-Zellen im Detail (56). Hierfür wurde SOX2 mittels des CRISPR/Cas9-Systems in SE-Zellen deletiert und die modifizierten Zellen wurden in die Flanken von Nacktmäusen xenotransplantiert (56). Auf Grund der SOX2-Deletion erhielten die modifizierten SE-Zellen trotz der Mikroumweltsignale *in vivo* das SE-Zellschicksal inklusive der charakteristischen SOX17-Expression aufrecht und transformierten sich nicht in EC-ähnliche Zellen. In den isolierten Tumorproben aus den Xenotransplantaten wurden jedoch okkulte,

differenzierte YST-ähnliche Subpopulationen identifiziert, die sich durch die für YST charakteristische Expression des Pionierfaktors *FOXA2* und weiteren YST-assoziierten Markergenen wie *AFP*, *ALB*, *APOA1/2*, *DKK1* und *GPC3* auszeichneten (56). Durch das zusätzliche Ausschalten des YST-assoziierten Faktors *FOXA2* waren die betreffenden SE-Zellen (*SOX2*⁻ und *FOXA2*⁻) nicht in der Lage in NSE-ähnliche Zellen zu differenzieren. Nettersheim et al. postulierten daher, dass *FOXA2* ein Schlüsselfaktor der YST-Entwicklung sein könnte (56). In weiterführenden Studien wurden sowohl *FOXA2* als auch *SOX17* als wichtige Faktoren der YST-Entstehung postuliert und hochspezifische YST-Biomarker identifiziert, und validierten somit die Beobachtungen von Nettersheim et al. (61–63). Die Summe und die Kombinationen chromosomaler und genomischer Eigenschaften, die Aktivitäten von Transkriptions- und Differenzierungsfaktoren wie *SOX2*, *SOX17* und *FOXA2*, sowie die Signalaktivität der Tumormikroumwelt sind demnach maßgebliche Schlüsselemente bei der Entwicklung von Typ-II-GCT-. Diese Ergebnisse betonen die Komplexität und Plastizität der Signalprozesse der GCT-Differenzierung.

Generell basierten die bisherigen Forschungsarbeiten zur GCT-Entwicklung hauptsächlich auf humanen *in vitro*-Zellkultur- und *in vivo*-Mausmodellen. Ergänzend werden *ex vivo*-Studien an Gewebeproben von Patienten durchgeführt, um ein tieferes Verständnis der Pathogenese von GCT zu erlangen.

1.1.4 Modell zur Entwicklung von Dottersacktumoren

GCT werden wie bereits beschrieben neben der Orchiektomie mittels Cisplatin-basierter Chemotherapie und Strahlentherapie behandelt (64,65). Die Therapie führt bei ca. 90 % der GCT-Patienten zu einer Heilung, dennoch entwickeln 10 bis 15 % der Patienten ein Rezidiv mit steigender Cisplatinresistenz (37,66). Eine herausfordernde klinische Behandlungssituation ergibt sich bei Patienten, die von dem besonders aggressiven YST-Subtyp betroffen sind. Rezidivierende Tumoren entwickeln häufig therapierefraktäre YST-Komponenten, was darauf hinweist, dass die Ausbildung eines YST möglicherweise einen Fluchtmechanismus für GCT unter der Standard-Therapie darstellt. Da es derzeit an spezifischen Therapiealternativen für (resistente) YST-Patienten mangelt, ist das Auftreten von YST-Komponenten mit einer ungünstigen Überlebensprognose assoziiert und für einen hohen Anteil der GCT-assoziierten

Todesfälle verantwortlich (37,66). Die molekularen und (epi)genetischen Mechanismen, die zu einer YST-Entwicklung aus EC führen, wurden bisher geringfügig erforscht. Wie im vorherigen Abschnitt (Kap. 1.1.3) bereits thematisiert, wurde die *in vivo*-Reprogrammierung von SE-Zellen (anhand der Modell-Zelllinie TCam-2) in ein NSE-Zellschicksal (EC) durch Hemmung des BMP-Signalwegs ausgelöst (67). Innerhalb dieser Transformation wurde die Umstellung von der Expression des für SE typischen Transkriptionsfaktors SOX17 (SE-Zellschicksal) zu dem Pluripotenzfaktor SOX2 (EC-Zellschicksal) als entscheidender Prozess identifiziert (67). Nach der Xenotransplantation in Nacktmäuse waren TCam-2-Zellen, in denen SOX2 stillgelegt wurde, nicht mehr in der Lage sich in ein EC zu reprogrammieren, sondern differenzierten sich stattdessen in YST-ähnliche Gewebe (56). Weitere Analysen zeigten, dass FOXA2, ein Pionier- und Differenzierungsfaktor, ein essentieller Schlüsselfaktor der YST-ähnlichen Differenzierung sein könnte, da FOXA2 mit typischen YST-assoziierten Faktoren wie AFP, APOA1, ALB und HAND1 interagiert (56).

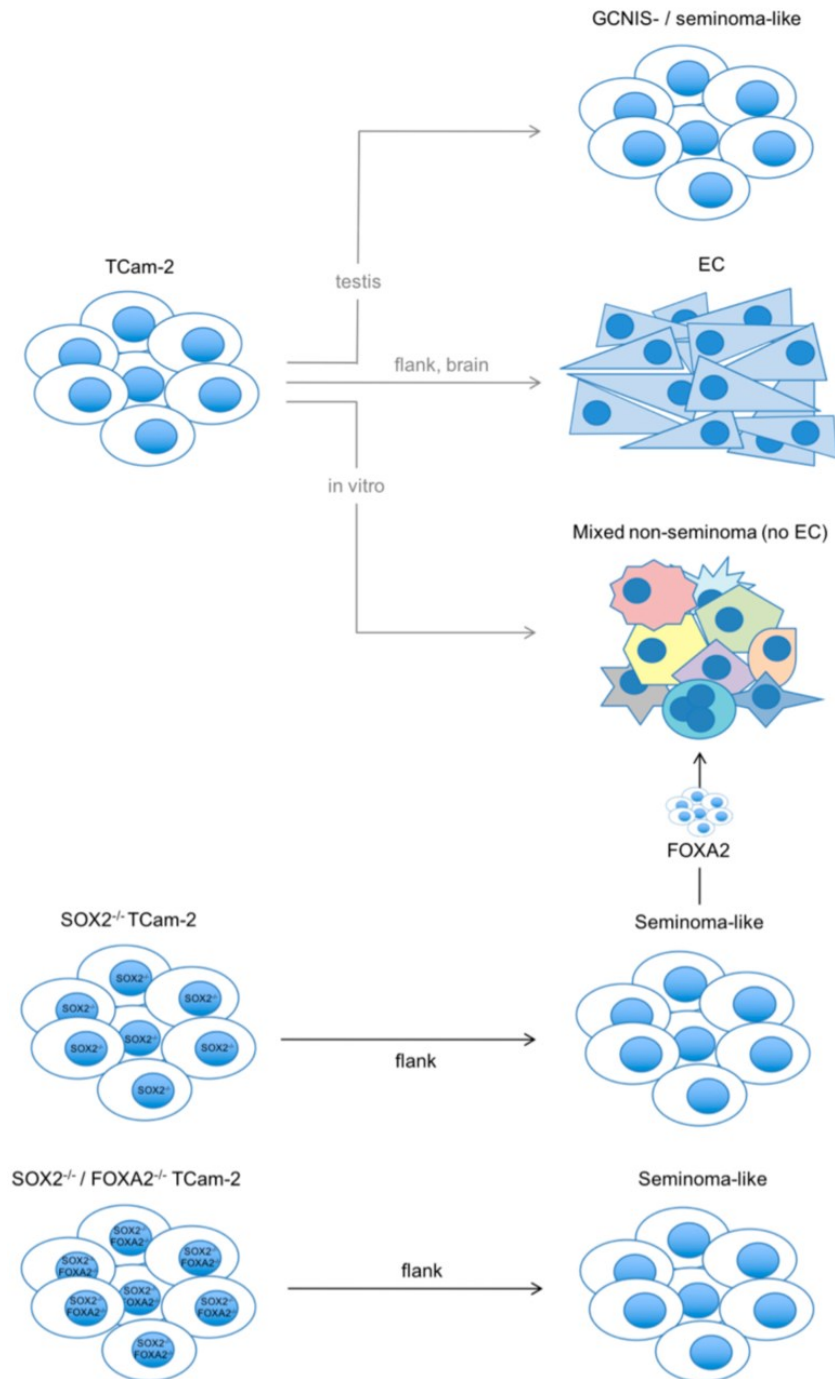


Abbildung 2: Modell der Transformationen von SE-Zellen (TCam-2) in EC- / NSE-Zellschicksale unter Regulation von SOX2 und FOXA2 *in vitro* / *in vivo*. TCam-2-Zellen (SE) reprogrammieren nach der Xenotransplantation in die somatische Mikroumgebung in die Mausflanke / -gehirn in die Richtung des EC-Zellschicksals durch den Einfluss von SOX2. Außerdem können TCam-2-Zellen mit FGF4-haltigem Medium *in vitro* zur Ausbildung eines gemischten, NSE-Phänotyps (*no EC*) induziert werden. SOX2^{-/-}-TCam-2-Zellen verbleiben *in vivo* vorerst in einem SE-Zellschicksal, jedoch wird eine YST-ähnliche Differenzierung durch FOXA2 vermittelt. TCam-2-Zellen in denen sowohl SOX2 als auch FOXA2 ausgeschaltet wurden, verbleiben *in vivo* im SE-Zellschicksal und differenzieren nicht in EC- / YST-ähnliche Subpopulationen. Abbildung aus Nettersheim et al. (68) basierend auf (56).

In darauf aufbauenden Studien konnten der Pionierfaktor- und Differenzierungsfaktor FOXA2 und der endodermale Differenzierungsfaktor SOX17 in GCT-Patienten mit (okkulten) YST-Komponenten, als Schlüsselfaktoren der YST-Entwicklung aus EC identifiziert werden (Abb. 2) (61). Dabei scheinen FOXA2 und SOX17 die Expression von YST-spezifischen Genen zu induzieren (*AFP*, *ANKRD1/6*, *APOA1/A2/B*, *CST1*, *GATA3/4/6* und *GPC3*) (61). Die Heraufregulation dieser YST-assoziierten Gene wurde von einer Herabregulation von Pluripotenz- / EC- / PGC-assoziierten Faktoren (*NANOG*, *POU5F*, *KFL4*, *BCAT1*, *DNMT3B* und *DPPA48*) begleitet (69). Zudem zeigen YST im Vergleich zu EC eine ausgeprägte Aktivität der BMP-, FGF-, MAPK- und WNT-Signalwege im Vergleich zu den EC (Abb. 3) (61).

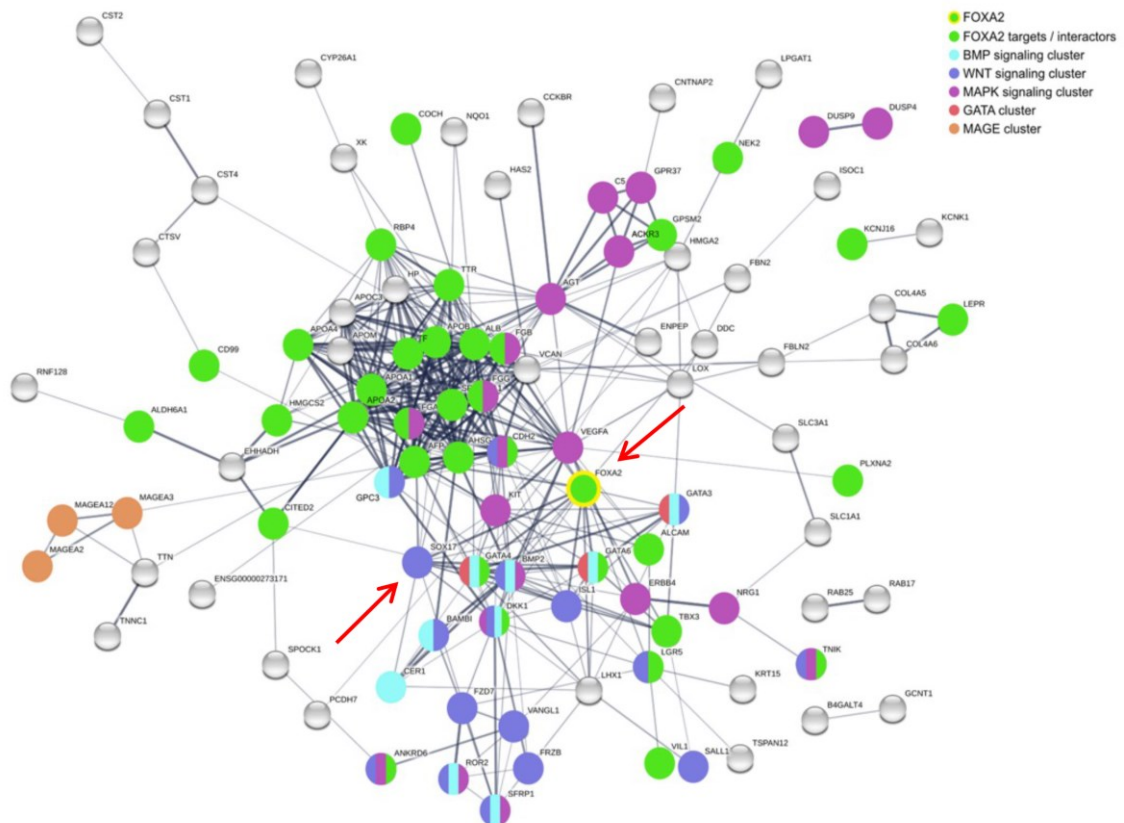


Abbildung 3: STRING-basierte Interaktionsvorhersage von Genen, die in YST im Vergleich zu EC heraufreguliert sind. Die möglichen Schlüsselfaktoren FOXA2 und SOX17 sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet. FOXA2-Zielgene sind grün hervorgehoben. Gene, die zu den BMP-, WNT- und MAPK-Signalkaskaden gehören, sowie Gene, die zu den GATA oder MAGEA-Faktoren gehören, sind ebenfalls in YST im Vergleich zu EC heraufreguliert und sind, wie in der Legende angegeben, farblich gekennzeichnet. Abbildung aus Wruck et al. modifiziert (61).

Neben der molekularen Funktion im Verlauf der YST-Entwicklung wurde FOXA2 durch Immunhistochemie (IHC) von > 300 GCT-Gewebeproben mit YST-Anteil als sensitiver und hochspezifischer neuartiger pathologischer Biomarker für YST etabliert (Abb. 4) (61).

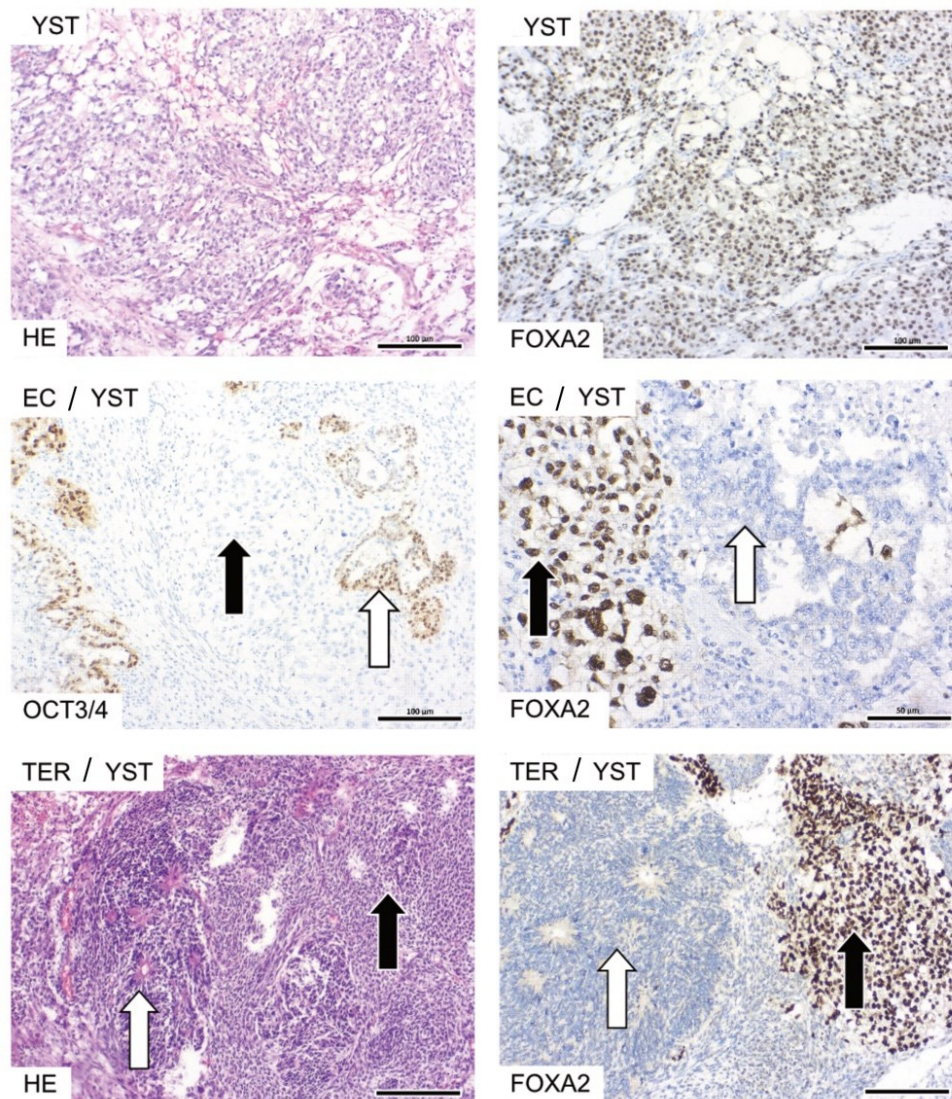


Abbildung 4: Exemplarische HE-Gewebefärbung und IHC-Färbung gegen den YST-Marker FOXA2 und den Pluripotenzmarker OCT3/4 von GCT-Gewebeproben mit YST-Komponente. Die schwarzen Pfeile markieren die YST-Komponenten und die weißen Pfeile markieren die NSE-Komponente (hier: EC oder Teratom (TER)). Diese Abbildung wurde modifiziert aus Wruck et al. (61).

In der Untersuchung von Wruck et al. zu den DNA-Methylierungsprofilen in YST im Vergleich zu EC wurden hauptsächlich epigenetische Veränderungen festgestellt, die mit der Unterdrückung von Pluripotenz- und Keimzell-assoziierten Genen, wie *DPPA4*, *BCAT1* und *NANOG*, in Verbindung stehen könnten (61). Demnach korrelierte der Methylierungsstatus der identifizierten Pluripotenz- und Keimzell-assoziierten Gene

mit der unterdrückten Genexpression der entsprechenden Gene (Abb. 5 A). Gleichzeitig wurden microRNAs identifiziert, deren Expression in YST-Geweben im Vergleich zu EC-Geweben hoch- oder herunterreguliert ist (Abb. 5 B). Durch die reziproke Korrelation der identifizierten YST-assoziierten microRNAs mit der Genexpression der YST-assoziierten Markergene konnten microRNAs identifiziert werden, die potenziell als regulatorische Elemente während der YST-Differenzierung fungieren könnten (Abb. 5 B / C). Insbesondere wurde die microRNA-1246 identifiziert, die einige YST-Markergene als Zielsequenz aufweist (*BMP2*, *GATA6*, *FOXA2*, *SOX17*; Abb. 5 B / C) (61).

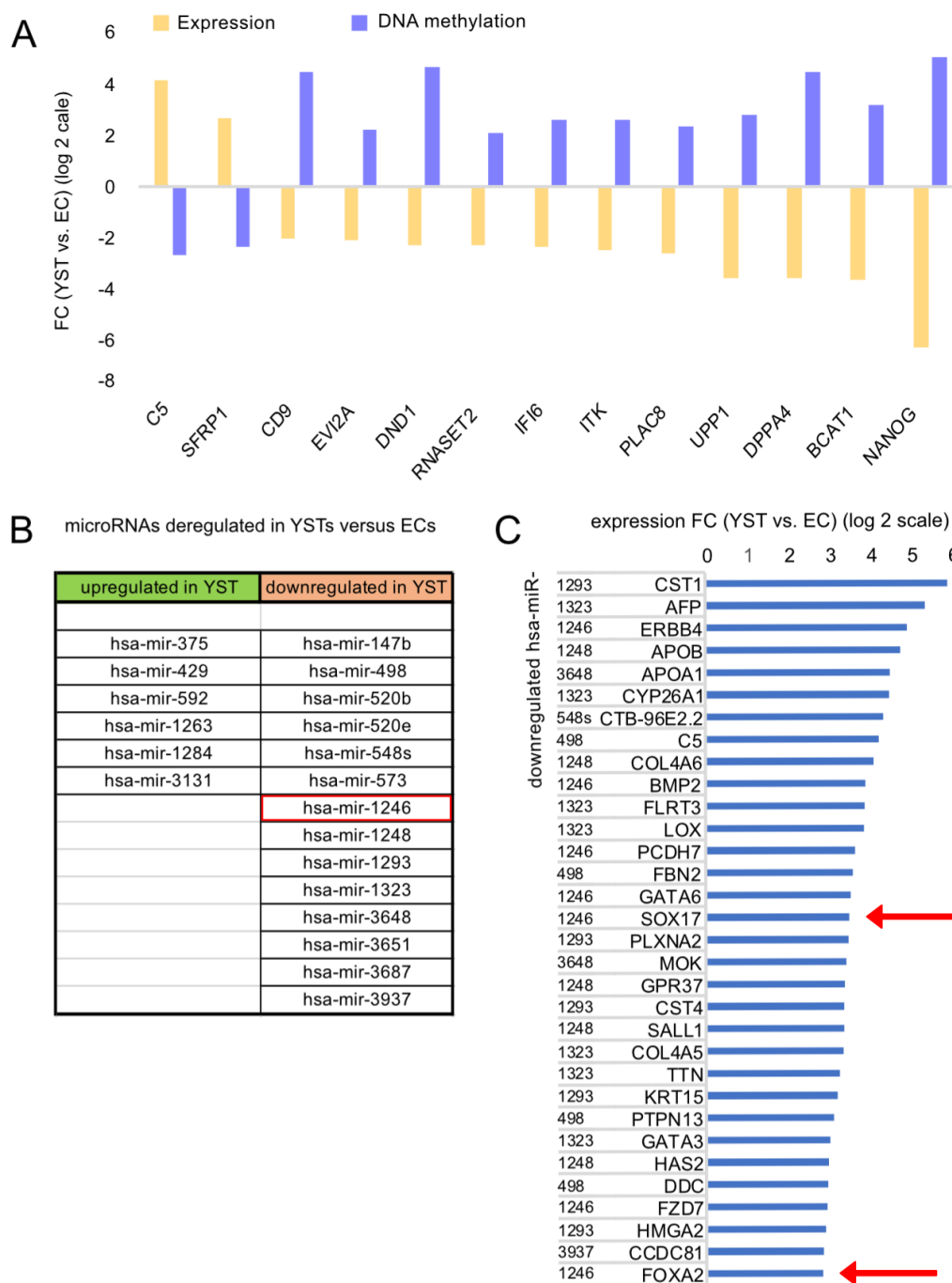


Abbildung 5: Komparative Untersuchung der epigenetischen und microRNA-vermittelten Regulatoren der YST-Differenzierung aus EC. A: Gene, die in YST verglichen mit EC dereguliert sind und eine umgekehrte Korrelation zur DNA-Methylierung aufweisen ($FC \geq 4$). B: Identifikation deregulierter microRNAs in YST im Vergleich zu EC. In rot markiert ist die microRNA-1246 (*hsa-mir-1246*) als möglicher Regulator von YST-Schlüsselfaktoren markiert. C: Wasserfalldiagramme der Expressionsdynamik der möglichen YST-assoziierten Zielgene der angegebenen microRNAs ($FC \geq 4$). Mit roten Pfeilen markiert sind die Pionier- und Differenzierungsfaktoren *FOXA2* und *SOX17* als mögliche Schlüsselfaktoren der YST-Differenzierung unter Angabe der möglicherweise repressiv wirkenden microRNA-1246 angezeigt. Die Abbildung wurde modifiziert aus Wruck et al. (61).

Daher könnte die Expression von *FOXA2* durch die microRNA-1246 in EC-Geweben unterdrückt werden, da diese in diesen Geweben vorhanden ist, während die

microRNA-1246 in YST-Gewebe nicht exprimiert wird und somit keine Repression der YST-assoziierten Gene bewirkt (Abb. 5 C, Abb. 6). Die Induktion von Pionier- und Differenzierungsfaktoren, die Aktivierung differenzierungsfördernder Signalwege, posttranslationale Modifikationen und die Unterdrückung des Pluripotenz-Netzwerks scheinen daher weitere entscheidende Schritte für die Entwicklung von YST zu sein (Abb. 6) (61).

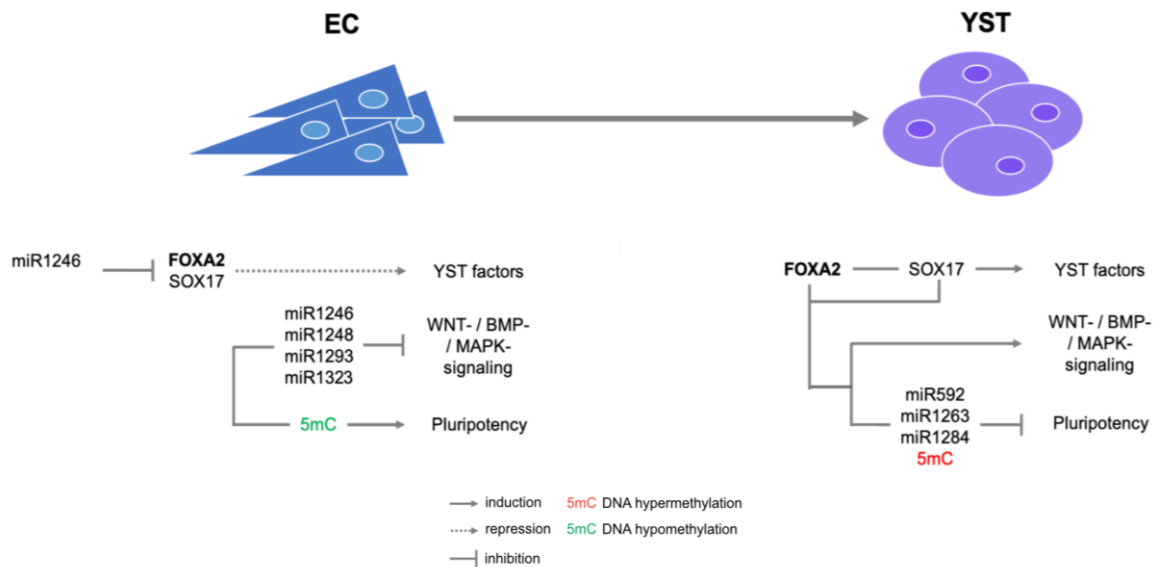


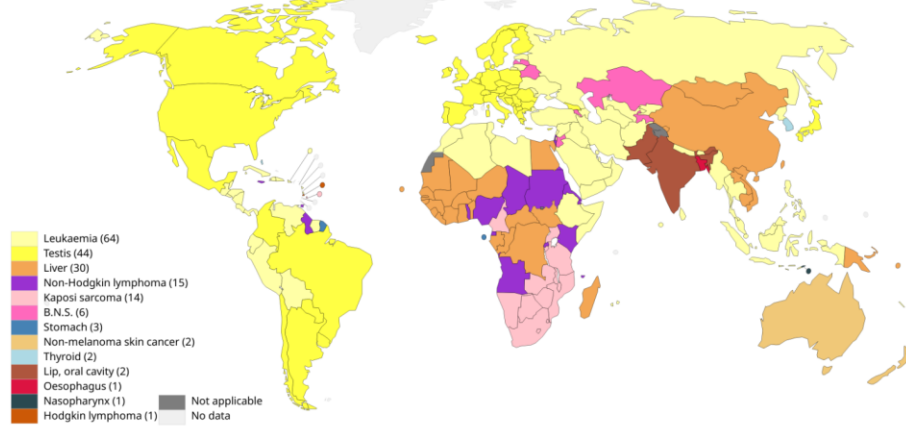
Abbildung 6: Modell der molekularen Prozesse während der Differenzierung von EC- zu YST-Zellen. In EC-Zellen werden die YST-Schlüsselfaktoren FOXA2 und SOX17 durch die inhibitorische Wirkung der microRNA-1246 (miR1246) blockiert. Dadurch wird die YST-assoziierte Differenzierung verhindert. Weitere microRNAs (miR1248, miR1293, miR1323) inhibieren differenzierungsfördernde Signalwege (WNT / BMP / MAPK *signaling*). Durch die generell geringe DNA-Methylierung in EC-Zellen (DNA *hypomethylation* (5mC in grün)) sind die betroffenen Gene zugänglich für die Transkription und die Aufrechterhaltung der Pluripotenz wird gefördert. In YST induzieren FOXA2 und SOX17 die Expression von YST-Faktoren, aktivieren die differenzierungsfördernden Signalwege (WNT / BMP / MAPK *signaling*) und fördern die Stilllegung der Pluripotenz mittels posttranslationaler Modifikationen wie der verstärkten DNA-Methylierung von Pluripotenz- und Keimzellgenen (DNA *hypermethylation*, betroffene Gene sind nicht zugänglich für die Transkription und die betroffenen Gene werden nicht exprimiert (5 mC in rot)). Zusätzlich wirken inhibitorischen microRNAs (*miR592*, *miR1263*, *miR1284*) auf die Pluripotenz- und Keimzellgene und verhindern deren Expression. Die Abbildung wurde modifiziert aus Wruck et al. (69).

1.1.5 Demografie und Epidemiologie von Keimzelltumoren

GCT weisen im Vergleich zu anderen Tumorentitäten eine niedrige Prävalenz auf und zählen mit einem Anteil von etwa 1 bis 2 % aller malignen Krebserkrankungen zu den sogenannten „seltenen Erkrankungen“ (36,70,71). In bestimmten Altersgruppen, insbesondere bei jungen Erwachsenen, treten GCT generell häufiger auf und machen in diesen Kohorten einen bedeutenden Anteil der Tumorerkrankungen aus. Innerhalb dieser demographischen Gruppe sind Hodentumoren besonders prominent, wobei testikuläre GCT einen Anteil von über 90 % an der Gesamtheit der diagnostizierten Hodentumoren ausmachen (36,70–73). In 60 % der Fälle treten GCT als reine SE auf, wobei eine zunehmende Tendenz des relativen Anteils von SE innerhalb der gestellten GCT-Diagnosen beobachtet wird (74). Die folgenden Daten analysieren die am häufigsten betroffene Patientengruppe von GCT im Alter von 0 bis 44 Jahren. Leukämiediagnosen sind die häufigste Krebserkrankung bei jungen Männern weltweit, wobei Hodentumoren bereits den zweiten Platz in der Rangfolge innerhalb dieser demographischen Gruppe einnehmen (Abb. 7 A). Das Auftreten von Hodentumoren zeigt eine Korrelation mit dem Entwicklungsstand der jeweiligen Länder, gemessen am sogenannten *Human Developmental Index* (HDI) (Abb. 7 B). Betrachtet man die geschätzten Inzidenzen aller Krebserkrankungen weltweit, machen Hodentumoren, basierend auf den Daten der WHO, in Männern von 0 bis 44 Jahren 5,6 % der Fälle aus (Abb. 7 C). Die geografische Verteilung der Hodentumor-Patienten zeigt erneut, dass besonders Länder mit einem höheren Entwicklungsstand, insbesondere in Asien und Europa, von dieser Krebsentität betroffen sind (Abb. 7 D) (73,75). Aufgrund der hohen klinischen Heilungsraten weisen Hodentumoren im Vergleich zu anderen Krebserkrankungen weltweit eine niedrige Mortalitätsrate von 1,5 % auf (Abb. 7 E). Die Mortalitätsrate scheint reziprok mit dem HDI des jeweiligen Landes zu korrelieren, da weniger Todesfälle im Zusammenhang mit Hodentumoren in hoch entwickelten Ländern verzeichnet werden (Abb. 7 B / F). Innerhalb Europas weisen die östlichen Länder eine höhere Mortalitätsrate auf als die nordischen und westlichen Länder Europas (Abb. 7 F), was möglicherweise auf Unterschiede in der allgemeinen Ausstattung und Fortschrittlichkeit der medizinischen Versorgungseinrichtungen zurückzuführen ist.

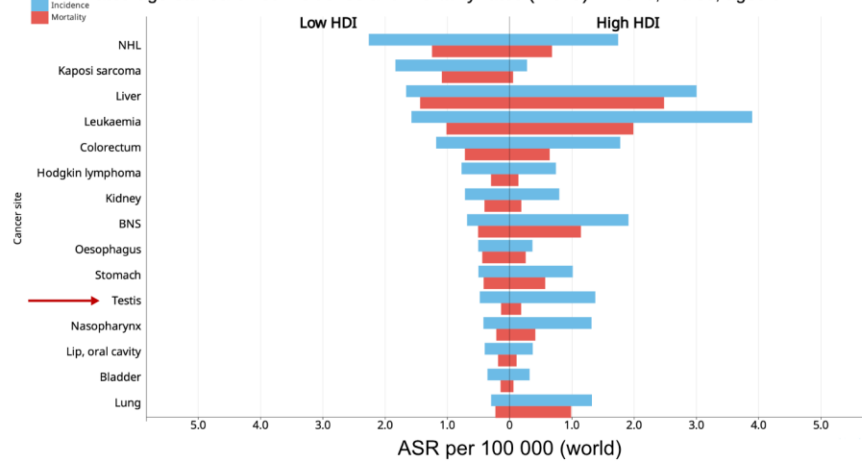
A

Top cancer per country, estimated age-standardized incidence rates (World) in 2020, males, ages 0-44



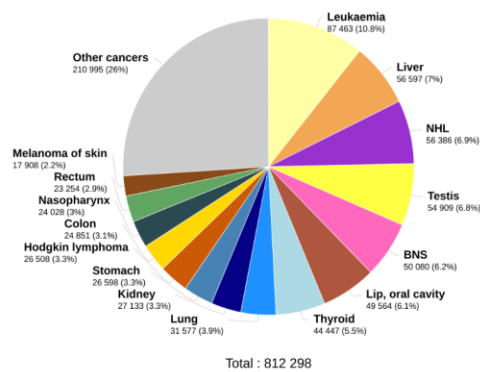
B

Estimated age-standardized incidence and mortality rates (World) in 2020, males, ages 0-44



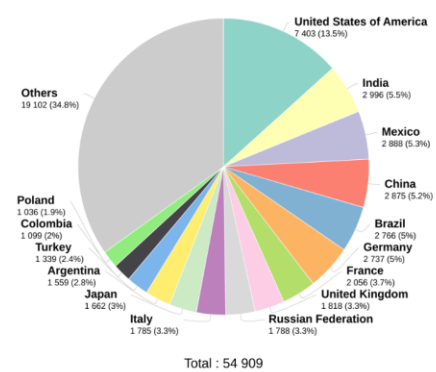
C

Estimated number of new cases in 2020, World, males, ages 0-44



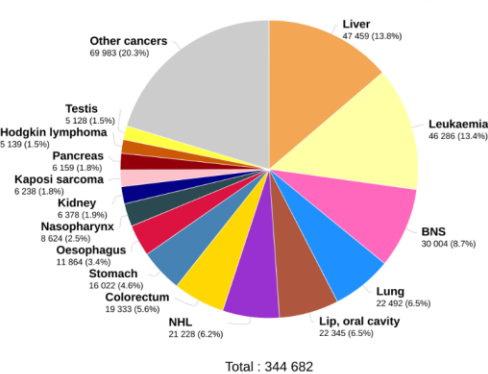
D

Estimated number of new cases in 2020, testis, males, ages 0-44



E

Estimated number of deaths in 2020, World, males, ages 0-44



F

Estimated number of deaths in 2020, testis, males, ages 0-44

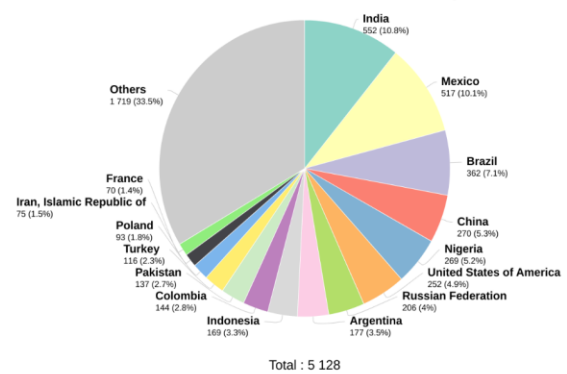


Abbildung 7: Demographische Verteilung von Krebs im Alter von 0 bis 44 Jahren unter besonderer Betrachtung von Hodentumoren. A: Hodenkrebs als prominente Tumorerkrankung bei männlichen Jugendlichen und Erwachsenen. Darstellung der meistdiagnostizierten Krebserkrankungen bei Männern zwischen 0 bis 44 Jahren weltweit mittels Farbkodierung. Die Darstellung wurde anhand der geschätzten Inzidenzen aus dem Jahr 2020 mittels der altersstandardisierten-Inzidenz-Methode generiert. B: Auflistung der Krebsentitäten mit den höchsten altersstandardisierten Inzidenz- und Mortalitätsraten unter Betrachtung des HDI bei Männern weltweit (Altersgruppe 0 bis 44 Jahren). C: Schätzung neuer Krebserkrankungen bei Männern zwischen 0 bis 44 Jahren im Jahr 2020 weltweit. D: Geographische Verteilung von neuen Hodentumorerkrankungen bei Männern zwischen 0 bis 44 Jahren im Jahr 2020 weltweit. E: Schätzung der Gesamtheit an Krebs-assoziierten Todesfällen bei Männern zwischen 0 bis 44 Jahren im Jahr 2020 weltweit. D: Geographische Verteilung von neuen Hodentumor-assoziierten Todesfällen bei Männern zwischen 0 bis 44 Jahren im Jahr 2020 weltweit. Abbildungen A bis F wurden mittels des *Tools Cancer Today* auf der *Globocan Website* generiert (<https://gco.iarc.fr/today/home>, Stand: 08.01.2024).

Die demographische Verteilung von Hodentumoren variiert in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren, darunter das Alter der Betroffenen, das Geschlecht und der Lebensraum der untersuchten Populationen. Die Inzidenz von Hodentumoren zeigte in den letzten 50 Jahren eine kontinuierliche Steigerung, insbesondere in Europa und weiteren westlich orientierten Industrieländern (35,76,77). Dieser Anstieg könnte auf den Lebensstil der Betroffenen, auf Umwelteinflüsse, die Ernährung, die Exposition gegenüber Industriechemikalien, aber auch genetische Komponenten zurückzuführen sein (78–80). Trotz dieses Trends deutet die aktuelle Stabilisierung der Inzidenz in Ländern mit sehr hohem HDI darauf hin, dass eine Senkung der Inzidenzraten in Europa innerhalb der nächsten 20 Jahre prognostiziert werden könnte (Abb. 8 A / B) (72,81). Es ist anzumerken, dass in Ländern, in denen in den kommenden Dekaden bedeutende Fortschritte in der Industrialisierung erwartet werden (wie zum Beispiel Teile Afrikas, Ozeaniens, Asiens und Lateinamerikas), die Inzidenzen von Hodenkrebs voraussichtlich stärker ansteigen werden (Abb. 8 A / B).

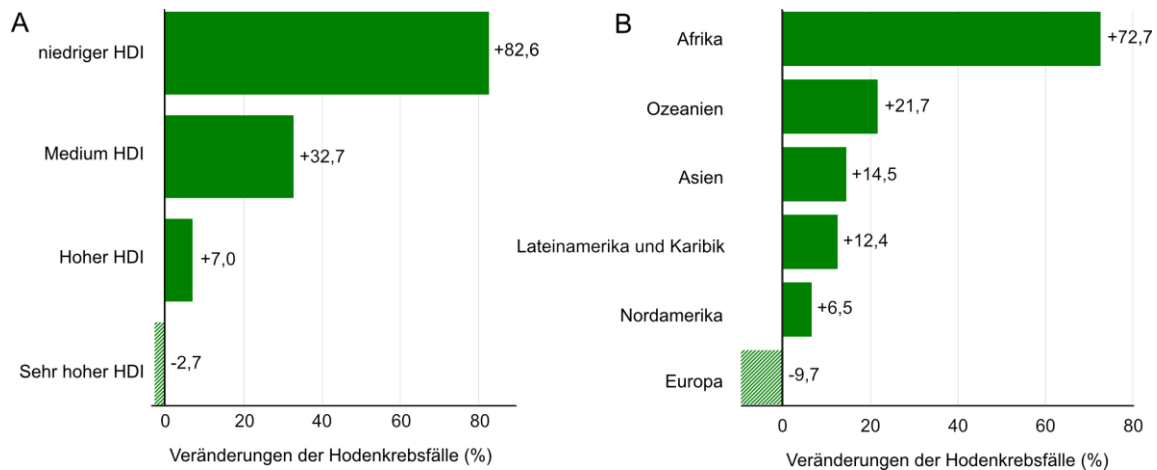


Abbildung 8: Prognosen über die Veränderungen der Inzidenzraten für Hodenkrebs. A: Geschätzte Entwicklung der Hodenkrebs-assoziierten Inzidenzen kategorisiert nach niedrigem bis sehr hohem HDI. B: Geschätzte Entwicklung der Hodenkrebs-assoziierten Inzidenzen kategorisiert nach Kontinenten. Abbildungen A und B wurden mittels des *Tools Cancer Today* auf der *Globocan* Website generiert (<https://gco.iarc.fr/today/home>, Stand: 08.01.2024).

1.1.6 Risikofaktoren von Keimzelltumoren

Die Ätiologie von GCT weist, unabhängig von der spezifischen Klassifikation der Subtypen, eine komplexe Verbindung zu genetischen, umweltbedingten und persönlichen Einflüssen auf, die jedoch noch nicht vollständig erforscht und bestätigt sind (82). Das Auftreten des Klinefelter-Syndroms oder des Down-Syndroms kann aufgrund einer chromosomalen Amplifikation mit einem gesteigerten Risiko für GCT korrelieren. Ebenso zeigen Männer mit genetischer Familienprädisposition für Hodenkrebs oder GCT entsprechend eine erhöhtes Erkrankungsrisiko(83,84). Systematische, epidemiologische Untersuchungen haben festgestellt, dass das GCT-Erkrankungsrisiko bei Söhnen von an GCT erkrankten Vätern zweifach erhöht ist, während die Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung eines GCT bei Brüdern von GCT-Patienten sogar vierfach erhöht vorliegt (85). Wenn mehrere Familienmitglieder an einer GCT-Erkrankung leiden, besteht für die anderen Familienmitglieder ein erhöhtes relatives Risiko (RR), ebenfalls an GCT zu erkranken. Das RR einer GCT-Erkrankung beträgt in diesem Fall 17%. Wenn jedoch ein Zwilling erkrankt ist, steigt das relative Risiko des anderen Zwillings ebenfalls zu erkranken auf 20 % (85). Durch genomweite Assoziationsstudien wurden 19 Genloci (SNPs) identifiziert, die mit der GCT-Entwicklung in Verbindung stehen könnten (86). Gegenwärtig wird ein polygenes

Pathogenese-Modell vermutet, bei dem die Erkrankungswahrscheinlichkeit durch die Beteiligung mehrerer Gene mit geringer Penetranz stimuliert werden könnte (87).

Bei Patienten mit einer vorherigen unilateralen GCT-Erkrankung beträgt das Risiko eines Rezidivs, das als Zweitumor im bisher gesunden Hoden auftreten kann, 2,5 % (82,88,89). Abnormale Hodenentwicklungen, wie beispielsweise Hodenhochstand (Kryptorchismus), erhöhen das Risiko für die Entwicklung von GCT um 2,9 % (90–93). Eine frühzeitige Orchidopexie (operative Fixierung des Hodens im Skrotum) kann das Risiko für die GCT-Entwicklung reduzieren, jedoch wurden bei 5 bis 10 % der Patienten mit testikulären Krankheiten und einer Historie mit Kryptorchismus oder ähnlichen Fehlentwicklungen eine GCT-Erkrankung nachgewiesen (90–92,94–97). Die Sub- / Infertilität, die häufig in Folge von unbehandeltem Kryptorchismus auftritt, wird oftmals mit einem signifikant erhöhten Entstehungsrisiko für GCT verknüpft (92,98–102). Pränatale, perinatal und postnatale Umwelt- und Lebensstilfaktoren, insbesondere die Exposition gegenüber bestimmten (Industrie-)Chemikalien und Pestiziden, können das Risiko der Entstehung von GCT ebenfalls fördern (78,103,104). Zusätzlich gelten das Alter des Mannes, sowie der Entwicklungsstand im Kontext der hormonellen Biologie des jeweiligen Mannes (Testosteronlevel), ebenfalls als entscheidende Faktoren für das Erkrankungsrisiko für GCT. Die Erkrankungswahrscheinlichkeit steigt nach der Pubertät an, erreicht den Höhepunkt im Alter zwischen 20 und 30 Jahren und sinkt anschließend mit zunehmendem Alter wieder ab (vgl. Kap. 1.1.5).

Außerdem wurde die Hypothese formuliert, dass Veränderungen des IGF-Signalwegs mit dem GCT-Erkrankungsrisiko in Verbindung stehen könnten (105). Diese Annahme basiert auf bisherigen Studien, die eine Korrelation zwischen einer erhöhten Körpergröße bei Erwachsenen (> 195 cm) und einem gesteigerten Risiko für das Auftreten von GCT beschrieben (106–111). Bisher konnten jedoch neben den epidemiologischen Beobachtungen keine molekularbiologischen Beweise erbracht werden. Die STEED-Studie hingegen konnte ein erhöhtes Risiko bei männlichen SE-Patienten mit erhöhter Körpergröße bestätigen (112). Die genannten Risikofaktoren, die sowohl ätiologischen und epidemiologischen Ursprungs sind, werden in der Hypothese des testikulären Dysgenese-Syndroms (TDS) zusammengefasst (113). Das TDS beschreibt folglich die GCT-Entstehung in Assoziation mit dem Auftreten unterschiedlicher Reproduktionsstörungen (Anatomische Fehlentwicklungen des Hodens, Defekte in der Spermatogenese, Keimzellfehlentwicklungen und

histopathologische Gewebsveränderungen) (113). Trotz des umfassenden Konzepts bleibt die Evidenzlage für diese Theorie umstritten und unterliegt kontroversen Diskussionen (114). Somit erfordert die vollständige Klärung der aufgeführten Risikofaktoren weiterführende Forschungsbemühungen.

1.1.7 Aktuelle Diagnostik und Therapieoptionen zur Behandlung von Keimzelltumoren

Die Diagnose von GCT des Hodens erfordert eine umfassende diagnostische Vorgehensweise gemäß den Empfehlungen der S3-Leitlinie und umfasst eine gründliche Anamnese sowie die Untersuchung des Körpers mittels bildgebender Verfahren, der Überprüfung von Tumor-assoziierten Serummarkern (Alpha-Fetoprotein (AFP), Beta-humanes Choriongonadotropin (bHCG) und Laktatdehydrogenase (LDH)) bis hin zur operativen Diagnostik mit histopathologischer Befundung (115–117). Die bildgebende Diagnostik empfiehlt die Sonographie des betroffenen Hodens sowie des kontralateralen Hodens (118). Für die Suche nach Metastasen sind die Computertomographie (CT) / Magnetresonanztomographie (MRT) des Thorax und Abdomens in der S3-Leitlinie aufgeführt (115,117,119). Die histopathologische Untersuchung des entnommenen Gewebes nach einer Operation ist neben der Bestätigung der Diagnose auch für die finale Identifikation des GCT-Subtyps essenziell (119).

Die Behandlung von GCT erfolgt anschließend durch eine Kombination aus chirurgischen Eingriffen, Chemotherapie und in einigen Fällen einer Strahlentherapie. Die S3-Leitlinie zur Behandlung von GCT gibt detaillierte Empfehlungen für die Diagnose und das Management der einzelnen GCT-Subtypen an (115,120). Vor Therapiebeginn wird den Patienten gemäß der S3-Richtlinie eine Kryokonservierung von Spermien zum Fertilitätserhalt angeboten, da die betroffenen Patienten während oder nach der Therapiephase oft an Sub- / oder Infertilität leiden (121). Lediglich 25 % der GCT-Patienten weisen eine nicht beeinträchtigte Ejakulatqualität nach der Therapie auf (121–123). In der Regel werden GCT primär mit der Orchiektomie (Entfernung des betroffenen Hodens) behandelt, um den Tumor zu entfernen (115). GCT werden mittels der TNM-Klassifizierung (Primärtumor (T), Lymphknotenbefall (N), Metastasen (M)) systematisch in Stadien gemäß des Ausbreitungsgrads eingeteilt

(115). Je nach dem Stadium der Erkrankung und dem Risiko für einen Rückfall kann darauffolgend eine Chemotherapie mit Carboplatin oder einer Kombination beispielsweise aus Cisplatin, Etoposid und Bleomycin (PEB) angeordnet werden (115). Die genaue Behandlungsstrategie hängt von verschiedenen Faktoren einschließlich des Stadiums der Erkrankung, des Subtyps des Tumors und der individuellen Gesundheitsmerkmale des Patienten ab.

Die Anwendung von Chemotherapie und Strahlentherapie kann bei den meisten Patienten langanhaltende gesundheitliche Langzeitschäden hervorrufen, darunter Fertilitätseinschränkungen, Libidoverlust, Hypogonadismus (unzureichende Testosteron-Produktion) sowie psychopathologische Konsequenzen, Lungenfibrosen und kardiovaskuläre Probleme (124–132). Zudem besteht das Risiko durch verbleibende, überlebende Tumorzellen zu rezidivieren oder einen Zweittumor einer anderen Entität als Folge der Therapie auszubilden (127,129,133,134). Um diesen Langzeitschäden entgegenzuwirken, werden strukturierte Langzeitnachsorgeprogramme bezüglich der Früherkennung von Zweittumoren oder anderen Langzeiteffekten ausgearbeitet (115).

Trotz der fortschrittlichen Klassifizierungssysteme und der individuellen Anpassung der möglichen Behandlungsmethoden und -kombinationen für GCT existieren nach wie vor Limitationen. Ungefähr 3 bis 5 % der GCT-Patienten erleiden nach diversen Behandlungszyklen, einschließlich einer Rettungs-Hochdosis-Chemotherapie (*Salvage*-Therapie), erneute therapieresistente, besonders aggressive Rezidive. In den meisten Fällen führen die Rezidive zum Tod der Patienten. Einige Patienten entwickeln Resistenzmechanismen gegenüber den angewendeten Therapeutika, was ein begrenztes Therapieansprechen bis hin zum Therapieversagen mit sich führt und sich dementsprechend negativ auf die entsprechende Überlebensprognose der betroffenen Patienten auswirkt. Durch die Monotherapie mit den Zytostatika Etoposid, Temozolamid oder Ifosfamid konnten bisher Remissionsraten rezidivierter GCT von 10 bis 20 % erreicht werden. Im Vordergrund der Behandlung refraktärer GCT stehen Mono- oder Zweifachtherapie-Ansätze mit Gemcitabin, Oxaliplatin und Paclitaxel, bei denen je nach Kombinationsschema Remissionsraten von 4 bis 46 % verzeichnet wurden (135–137). Diese Therapieform konnte durch die Dreifachkombination von Gemcitabin, Oxaliplatin und Paclitaxel (GOP) verbessert werden und scheint trotz mehrfach auftretender Rezidive bei 10 bis 15 % der Patienten ein langfristiges

Überleben zu ermöglichen (138,139). In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche spezifische, pharmakologische Substanzen in Patienten mit therapieresistenten GCT-Metastasen untersucht. Die Resultate der Medikamentenstudien zeigten jedoch nur begrenzte Erfolge hinsichtlich der tumorspezifischen Effektivität. Der Multikinase-Hemmer Sunitinib zeigte in zwei Phase-II-Studien eine gewisse Wirksamkeit, wobei Stabilisierungsraten von 13 bis 50 % in den untersuchten Fällen verzeichnet wurden (140,141). Die Überlebensrate nach 12 Monaten betrug lediglich 10 % (141). Dementsprechend gilt es weitere Substanzen zu testen, um ein valides alternatives Behandlungsschema für die Zukunft ausarbeiten zu können.

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Die Transformation von EC- in Richtung des YST-Zellschicksals, verbunden mit der Entwicklung einer Cisplatinresistenz, ist verantwortlich für die hohe Mortalitätsrate bei YST-Patienten und stellt aufgrund fehlender Therapieoptionen eine besonders anspruchsvolle klinische Herausforderung dar. Angesichts der aggressiven und hoch malignen Natur von YST ist die gezielte Erforschung spezifischer Behandlungsmethoden und die Weiterentwicklung diagnostischer Ansätze von fundamentaler Bedeutung. Trotz des dringenden klinischen Bedarfs sind die molekularen Mechanismen, die die Reprogrammierung von EC zu YST regulieren, sowie die Prozesse, die zu einer Resistenz gegenüber Cisplatin führen, noch weitgehend unerforscht.

In vorausgegangenen Untersuchungen zu der Biologie von YST wurde postuliert, dass der Pionierfaktor FOXA2 und der endodermale Differenzierungsfaktor SOX17 zentrale Rollen bei der Entwicklung von YST bei GCT-Patienten mit (okkulten) YST-Komponenten einnehmen könnte (61). Es wird angenommen, dass FOXA2 und SOX17 die YST-Entwicklung initiieren und die Expression von YST-spezifischen Genen wie *AFP*, *ANKRD1 / 6*, *APOA1 / A2 / B*, *CST1*, *GATA3 / 4 / 6* und *GPC3* induzieren (61). Die Heraufregulation dieser YST-assoziierten Gene geht mit einer Herunterregulation von Pluripotenz-, Keimzell- und EC-spezifischen Genen wie *NANOG*, *POU5F*, *KFL4*, *BCAT1*, *DNMT3B* und *DPPA4* einher (61). Darüber hinaus zeigen YST im Vergleich zu EC eine erhöhte Signalaktivität in den BMP-, MAPK- und WNT-Signalwegen (61). Die Unterdrückung des Pluripotenznetzwerks in EC-Zellen, kombiniert mit der Aktivierung der differenzierungsfördernden Signalwege (BMP, MAPK und WNT) scheinen demnach entscheidende Prozesse der YST-Differenzierung zu sein.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die komplexen molekularen Mechanismen im Detail zu entschlüsseln, die die Entwicklung von YST vorantreiben, um ein tieferes Verständnis der Erkrankung zu erlangen. Durch die Identifizierung von Entwicklungsstadien während der YST-ähnlichen Differenzierung sollen die Grundlage für potenzielle therapeutische Interventionsmöglichkeiten geschaffen werden um die Entstehung von YST aus EC zu verhindern. In dieser Dissertation sollen außerdem die molekularen Eigenschaften und zellulären Prozesse untersucht werden, die mit der aggressiven Tumorbilogie von YST und der Entwicklung von Therapieresistenz assoziiert sind.

Das übergeordnete Ziel besteht darin, neue therapeutische Optionen für eine individualisierte Patientenbehandlung zu erforschen und Faktoren zu identifizieren, die präzisere Prognosen über den Krankheitsverlauf ermöglichen können. Auf diese Weise könnte die Ausbildung von Therapieresistenz-Mechanismen und die daraus resultierende assoziierte Mortalität auf Grund von Therapieversagen in YST-Patienten künftig reduziert und die klinische Versorgung der Patienten verbessert werden.

Während des Promotionsprojekts sollen die folgenden dezidierten Ziele untersucht werden:

- I. Identifikation der molekularen Mechanismen, die eine Differenzierung von EC-Zellen in das YST-Zellschicksal induzieren und regulieren.
- II. Analyse der Mechanismen der Cisplatinresistenz in YST-ähnlichen Zellen als Koinzidenz der malignen YST-Entwicklung.

2. Material & Methoden

2.1 Aktenzeichen des Ethikvotums

Die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (HHU-D) hat keine ethischen Bedenken gegen die Verwendung von GCT-Zelllinien für *in vitro*-Experimente erhoben (2019-783 an Daniel Nettersheim). Die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der HHU-D hat keine ethischen Bedenken gegenüber der Verwendung von GCT-Zelllinien für die durchgeführten *in vitro*-Experimente erhoben (2019-783 an Daniel Nettersheim).

2.2 Aktenzeichen für die Durchführung von Tierversuchen

Der Tierversuchsantrag mit der Nummer 81-02.04.2018.A350 (an Daniel Nettersheim) wurde vom *Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen* (LANUV) bewilligt die Nutzung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Mäuse und ermöglichte die bedenkenlose Durchführung der Mausxenograft-Experimente im *Zentrum für Tierforschung und wissenschaftliche Tiernutzungsaufgaben* (ZETT) an der HHU-D.

2.3 Material

2.3.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller	Sitz
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich / Merck KGaA	Taufkirchen, Deutschland
Acrylamid 30 % (37 %:1) Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Sigma-Aldrich / Merck KGaA	Taufkirchen, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS) (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈)	Sigma Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
BSA (Bovine Serum Albumin)	PAN-Biotech GmbH	Aidenbach, Deutschland
Chloroform	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Cisplatin	NeoCorp GmbH	Holzkirchen, Germany
cOmplete ULTRA Tablets, Mini, EASYpack	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, Deutschland
EDTA solution pH 8,0 (0,5 M)	PanReac AppliChem/ITW Reagents	Darmstadt, Deutschland
Essigsäure (100 % Eisessig)	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Ethanol 96 % und 70 % (denaturiert)	VWR Chemicals	Darmstadt, Deutschland
Ethanol absolut	VWR Chemicals	Darmstadt, Deutschland
Methanol	VWR Chemicals	Darmstadt, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
N-Methylphenazinium Methylsulfat (PMS)	Sigma-Aldrich / Merck KGaA	Taufkirchen, Deutschland
Natriumacetat (C ₂ H ₃ NaO ₂)	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS) (C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S)	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Phenol/Chloriform/Isoamylalkohol, RotiPhenol (PCI)	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Ponceau S	Carl Roth GmbH + Co. KG	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 (H ₂ O)	Sigma-Aldrich / Merck KGaA	Taufkirchen, Deutschland
Salzsäure 1,5 %, 0,5 M	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
SYBR-Safe, DNA-Färbemittel	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland

Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich / Merck KGaA	Taufkirchen, Deutschland
Tris (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	VWR Chemicals	Darmstadt, Deutschland
Tween-20 Surfact-Amps	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
XTT Natriumsalz (C ₂₂ H ₁₇ N ₇ O ₁₃ S ₂ Na)	Neofroxx	Einhausen, Deutschland

Tabelle 1: Allgemeine Chemikalien.

2.3.2 Verbrauchsmaterialien

Substanz	Hersteller	Sitz
24-Well-Platte	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
48-Well-Platte	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
6-Well-Platte	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
96-Well-Platte	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Becherglas (50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 800 ml)	Schott AG	Mainz, Deutschland
Cell Strainer (40 µM)	Corning, VWR Chemicals	Darmstadt, Deutschland
CryoTube Vials (1000 µl, 1800 µl)	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Enghals-Erlenmeyerkolben (250 ml, 1000 ml)	Schott AG	Mainz, Deutschland
Eppendorf Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Erlenmeyerkolben (200 ml)	Schott AG	Mainz, Deutschland
Filter-Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Framestar 384 Well Skirted PCR Plate	4titude, Brooks Life Sciences	Griesheim, Deutschland
Glasfalsche (50 ml, 250 ml, 1000 ml, 2000 ml)	Schott AG	Mainz, Deutschland
Immobilon-P Membran	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Injektionskanülen, Microlance 3	BD	Heidelberg, Deutschland
Natron-Kalk-Glas-Pasteurpipetten	Brand	Wertheim, Deutschland
Omnifix-F Spritze (1 ml)	B.Braun	Melsungen, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße, 8er Kette (Multiply µStrip Pro)	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Petrischale unbeschichtet (10 cm)	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Nerbe	Winsen/Luhe, Deutschland
Polystyrene Röhrchen (5 ml)	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Röhrchen (14 ml, runder Boden, Zwei-Positionen-Belüftungsstopfen)	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland

Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Spritzen Injek F	B.Braun	Melsungen, Deutschland
Sterile Pipetten 5 ml/ 10 ml/ 25 ml	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Whatman Gel Blot Paper	GE Healthcare	Solingen, Deutschland
Zell-Zählkammern für TC20-Zellzähler	Bio-Rad Laboratories GmbH	Feldkirchen, Deutschland
Zellkultur-Flaschen (T25, T75)	CELLSTAR/Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Zellkultur-Schale (100 / 20 mm)	Bio-Rad Laboratories GmbH	Feldkirchen, Deutschland

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

2.3.3 Kommerziell erhältliche Lösungen und Puffer

Substanz	Hersteller	Sitz
Chemiluminescent Substrate SuperSignal™ West Pico PLUS	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Clarity Western ECL-Substrate	Bio-Rad Laboratories GmbH	Feldkirchen, Deutschland
Eosin Y Solution Alcoholic	Sigma Aldrich Chemie GmbH	Feldkirchen, Deutschland
H ₂ O	Sigma Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Hematoxylin solution acc. to Gill 2	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
MACSQuant Running Buffer	Miltenyi Biotech	Bergisch Gladbach, Deutschland
MACSQuant/MACSima Storage Solution	Miltenyi Biotech	Bergisch Gladbach, Deutschland
Matrigel Matrix Basement Membrane	Corning GmbH	Kaiserslautern, Deutschland
Page Ruler Prestained Protein Ladder (gelagert bei -20°C)	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
PBS (10x)	Sigma-Aldrich/ Merck KGaA	Taufkirchen, Deutschland
Pierce Bovine Serum Albumin Standard Ampules, 2 mg/mL	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Ponceau S Solution	Sigma Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Purple DNA loading Dye 6x	New England Biolabs	Frankfurt am Main, Deutschland
Qiazol	QIAGEN GmbH	Hilden, Deutschland
RIPA Buffer (10x)	Cell Signaling Technology	Frankfurt am Main, Deutschland
Roti-Load (4x)	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese 50x TAE-Puffer	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
TE (1x) pH 8.8 Low EDTA buffer	PanReac Application	Darmstadt, Deutschland
Tris / Glycine / SDS Puffer (10x)	Bio-Rad Laboratories GmbH	Feldkirchen, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland

Tabelle 3: Gebrauchsfertige Lösungen und Puffer.

2.3.4 Enzyme

Enzym	Hersteller	Sitz	Katalognr.
Esp3I	New England Biolabs	Frankfurt am Main, Deutschland	R0734L
Proteinkinase K	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland	P4850
RNase-A	QIAGEN GmbH	Hilden, Deutschland	19101
T4 DNA Ligase	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland	15224-041

Tabelle 4: Verwendete Enzyme.

2.3.5 Zellkulturlösungen

Substanz	Hersteller	Sitz
Advanced DMEM (1x), +D-Glucose, +110 mg/L Natriumpyruvat, +Nicht-essenzielle Aminosäuren	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
B27-Supplement	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
DMEM (1x) GlutaMAX-I™, -- Pyruvat, +4,5 g/l D-Glucose	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
DMEM (1x) GlutaMAX-I™, +Pyruvat, +4,5 g/l D-Glucose	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
DMEM/F-12 GlutaMAX™, +Pyruvat, +4,5 g/l D-Glucose	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
DMSO	Sigma Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Fetales Kälberserum (FBS)	Biochrom / Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
KnockOut Serum Replacement	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
L-Glutamin (100x)	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100x)	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Minisart Syringe Filter (0,2 µM, 0,45 µM)	Satorius	Göttingen, Deutschland
N2-Supplement	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Neurobasal-A	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
RPMI 1640 (1x)	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Trypanblau 0,4 %	Sigma Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Trypsin-EDTA 0,05 % Phenolrot	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland

Tabelle 5: Verwendete Zellkulturlösungen.

2.3.6 Zusammensetzung der Zellkulturmedien

Zelllinie	Medium	Zusätze
1411H 2102EP NT2/D1	DMEM (1X) GlutaMAX-I, + Pyruvat, +4,5g/l D-Glucose	10 % FBS, 50 U/ml P/S, 200 nM L-Glutamin
GCT72 HepG2 NCCIT TCam-2	RPMI 1640 (1X)	10 % FBS, 50 U/ml P/S, 200 nM L-Glutamin
GCT27	DMEM (1X) GlutaMAX-I, + Pyruvat, +4,5g/l D-Glucose	10 % FBS, 25 U/ml P/S, 200 nM L-Glutamin
HEK293-T	DMEM (1X) GlutaMAX-I, + Pyruvat, +4,5g/l D-Glucose	10 % FBS, 25 U/ml P/S, 200 nM L-Glutamin, 1 % NEAA
833KE	DMEM (1x) GlutaMAX-I	10 % FBS, 50 U/ml P/S, 200 nM L-Glutamin

Tabelle 6: Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien für die Kultivierung von Zellen.

2.3.7 Pharmakologische Medikamente und rekombinante Proteine

Substanz	Hersteller	Sitz	Katalognr.
Activin-A	STEMCELL Technologies Germany GmbH	Köln, Deutschland	78001.2
BMP2	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland	PHC7146
BMP4	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland	PHC9534
CHIR99021 (CHIRON)	Sigma Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland	SML1046
DKK1	R&D Systems, Inc.	Minneapolis, USA	5439-DK
FGF2	R&D Systems, Inc.	Minneapolis, USA	3718-FB
Heparin-Natrium-Salz	Biotechnie Tocris	Minneapolis, USA	2812
LIF	R&D Systems, Inc.	Minneapolis, USA	7734-LF/CF
Noggin (NOG)	Antibodies-online GmbH	Aachen, Deutschland	ABIN2018291
SCH772984	Selleck Chemicals GmbH	Köln, Deutschland	S7101
WNT3a	R&D Systems, Inc.	Minneapolis, USA	5036-WN/CF
WNT5a	Abcam plc.	Cambridge, UK	ab204627
XAV-939	Selleck Chemicals GmbH	Köln, Deutschland	S1180

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten pharmakologischen Inhibitoren und rekombinanten Proteine.

2.3.8 Antibiotikallösungen und Substanzen für mikrobiologische Versuche

Substanz	Hersteller	Sitz	Katalognr.
Ampicillin-Natriumsalz	Sigma Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland	A9518
Chloramphenicol	Sigma Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland	C0378
Difco Luria Broth Base, Miller	BD	Heidelberg, Deutschland	11778902
Difco Trockenkulturmedien: Luria Agar Base, Miller	BD	Heidelberg, Deutschland	11748862
Kanamycin-Sulfat	SERVA Electrophoresis GmbH	Heidelberg, Deutschland	26899.03
S.O.C. Medium	Invitrogen / Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland	15544034

Tabelle 8: Verwendete Antibiotikallösungen und weitere Substanzen und Lösungen für die Kultivierung von Prokaryoten.

2.3.9 Oligonukleotide für die cDNA-Synthese

Gen	Sequenz (5' à 3')	Tm [°C]	Zyklen
<i>ACTB</i>	FW: CCATCATGAAGTGTGACGTGG REV: GTCCGCCTAGAAGCATTTGCG	60	45
<i>AFP</i>	FW: GTGGTCAGTTTGCAGCATTG REV: GCAGAGGAGATGTGCTGGAT	60	45
<i>ANKRD1</i>	FW: AGTAGAGGAAGTGGTCACTGG REV: TGTTTCTCGCTTTTCCACTGTT	60	45
<i>APOA1</i>	FW: CCCAGTTGTCAAGGAGCTTT REV: TGGATGTGCTCAAAGACAGC	60	45
<i>BCL</i>	FW: CCTGTGGATGACTGAGTACCTG REV: CAGAGGCCGCATGCTGGG	60	45
<i>BCLXL</i>	FW: TAAACTGGGGTCGCATTGTG REV: AGGTAAGTGGCCATCCAAGC	60	45
<i>BIRC5</i>	FW: AGGACCACCGCATCTCTACAT REV: AAGTCTGGCTCGTTCTCAGTG	60	45
<i>CST1</i>	FW: ACTTGGACACCTGTGCCTTC. REV: TTGACACCTGGATTTCACCA	60	45
<i>CTR1</i>	FW: GGGGATGAGCTATATGGACTCC REV: TCACCAAACCGGAAAACAGTAG	60	45
<i>CXCR4</i>	FW: ACGCCACCAACAGTCAGAG REV: AGTCGGGAATAGTCAGCAGGA	60	45
<i>CXCR7</i>	FW: TCTGCATCTCTTCGACTACTCA REV: GTAGAGCAGGACGCTTTTGT	60	45
<i>DUSP4</i>	FW: GGCGGCTATGAGAGGTTTTCC REV: TGGTCGTGTAGTGGGGTCC	60	45

<i>ERBB2</i>	FW: CCAGCTGGCTCTCACA CTG REV: AGCCCTTACACATCGGAGA AC	60	45
<i>ERCC2</i>	FW: GTCGATGGGAAATGCCACAG REV: GTCATCCAGGTTGTAGATGCC	60	45
<i>FOXA2</i>	FW: CTCTCTCACTTGTCTCGATCC REV: CATGCCTGGCAGCTTGG	60	45
<i>GAPDH</i>	FW: TGCCAAATATGATGACATCAAGAA REV: GAGTGGGTGTCGCTGTTG	60	45
<i>GATA6</i>	FW: CTGCGGGCTCTACAGCAAG REV: GTTGGCACAGGACAATCCAAG	60	45
<i>GPC3</i>	FW: ATTGGCAAGTTATGTGCCCAT REV: TTCGGCTGGATAAGGTTTCTT	60	45
<i>GSR</i>	FW: TTCCAGAATACCAACGTCAAAGG REV: GTTTTCGGCCAGCAGCTATTG	60	45
<i>GSTP1</i>	FW: CCCTACACCGTGGTCTATTTCC REV: CAGGAGGCTTTGAGTGAGC	60	45
<i>MLH1</i>	FW: CTCTTCATCAACCATCGTCTGG REV: GCAAATAGGCTGCATACACTGTT	60	45
<i>MRP2</i>	FW: CCCTGCTGTTTCGATATACCAATC REV: TCGAGAGAATCCAGAATAGGGAC	60	45
<i>MSH2</i>	FW: AGGCATCCAAGGAGAATGATTG REV: GGAATCCACATACCCAACTCCAA	60	45
<i>NANOG</i>	FW: ATGGAGGAGGGAAGAGGAGA REV: GATTTGTGGGCCTGAAGAAA	60	45
<i>OCT3/4 (POU5F1)</i>	FW: GGGAGATTGATAACTGGTGTGTT REV: GTGTATATCCCAGGGTGATCCTC	60	45
<i>POLH</i>	FW: CTGGCACAAGTTCGTGAGTC REV: GCAACAAGTCTGCCGAGATAG	60	45
<i>POLK</i>	FW: GCCATGCCAGGATTTATTGCT REV: GCTTCATCAAGACTCATGGCC	60	45
<i>REV1</i>	FW: GATGGAGGAAGCGAGCTGAAA REV: CCTTCTGCATAGCAGCATCTG	60	45
<i>REV3L</i>	FW: GTGGATGCTGTAGCTGCTGAT REV: ATGGCCTGTAGACCAGGGTTT	60	45
<i>SOX2</i>	FW: ATGCACCGCTACGACGRGA REV: CTTTTCGACCCCTCCCAT	60	45
<i>SOX17</i>	FW: GATGCGGGATACGCCAGTGAC REV: GCTCTGCCTCCTCCACGAAG	60	45

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma Aldrich Chemicals GmbH produziert. Die Schmelztemperatur (T_m) der verwendeten Oligonukleotide beträgt 60 °C.

2.3.10 Genomische *Primer*

Substanz	Hersteller	Sequenz (5'→3')	T _m [°C]
CMV-Forward	Sigma-Aldrich Chemicals GmbH	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG	76,9
hU6-Forward	Sigma-Aldrich Chemicals GmbH	GAGGGCCTATTTCCCATGATT	64,9
LR50 (3' <i>Primer</i>)	OriGene Technologies, Inc.	CAGAGGTTGATTATCGATAAG	48,5
V2 (5' <i>Primer</i>)	OriGene Technologies, Inc.	AGAGCTCGTTTAGTGAA	42

Tabelle 10: Auflistung der verwendeten genomischen *Primer* mit Angabe der Schmelztemperatur (T_m).

2.3.11 siRNA-Oligonukleotide

Substanz	Hersteller	Sitz	Katalognr.
siRNA <i>FOXA2</i>	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Heidelberg, Deutschland	Sc-35569
Allstars negative control siRNA AF488	QIAGEN GmbH	Hilden, Deutschland	1027292

Tabelle 11: Verwendete siRNA-Oligonukleotide.

2.3.12 Plasmide

Substanz	Hersteller	Sitz	Katalognr.
<i>FOXA2</i> (NM_021784)-pLenti-C-mGFP-P2A-Puro (PS100093)	Origene Technologies, Inc.	Rockville, MD, USA	RC204066L4
<i>HNF-3b</i> -CRISPR/Cas9 KO	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Heidelberg, Deutschland	Sc-400210
lentiMPHv2	Addgene	Watertown, MA, USA	89308
lentiSAMv2	Addgene	Watertown, MA, USA	92062
pLV-mCherry	Addgene	Watertown, MA, USA	36084
pMD2.G	Addgene	Watertown, MA, USA	12259
psPAX2	Addgene	Watertown, MA, USA	12260

Tabelle 12: Kommerziell erhältliche und innerhalb dieser Arbeit verwendete Plasmid-DNA-Produkte.

2.3.13 Primäre Antikörper

Zielprotein	Hersteller	Katalognr.	Verdünnung	Applikation
Annexin V-FITC	Miltenyi Biotec	130-093-060	1:40	FACS
b-Actin	Sigma-Aldrich Chemicals GmbH	A5441	1:30000	WB
CD184*PE (CXCR4)	Miltenyi Biotec	130-117-504	1:100	FACS
FOXA2	Sigma-Aldrich Chemicals GmbH	WH0003170M1-100UG	1:2000	WB
FOXA2	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific	MA5-15542	1:500	IHC
OCT3/4	DAKO	IR09261-2	RTU	IHC
SALL4	CellMarque	385M	1:100	IHC
SOX2	CellMarque	371R	RTU	IHC
SOX17	R&D Systems	AF1924-SP	1:1000	WB
Vinculin	Sigma-Aldrich Chemicals GmbH	05-386	1:5000	WB

Tabelle 13: Verwendete Primärantikörper. Die Verwendung der Antikörper erfolgte gemäß den angegebenen Verdünnungen für die Western Blot (WB) -Analysen, die Immunhistochemie (IHC) und die Durchflusszytometrie (FACS).

2.3.14 Sekundäre Antikörper

Substanz	Hersteller	Katalognr.	Verdünnung	Applikation
Anti-Maus-HRP	DAKO	P0260	1:1000	WB
Anti-Hase-HRP	DAKO	P0448	1:2000	WB
Anti-Ziege-HRP	DAKO	P0449	1:1000	WB

Tabelle 14: Verwendete sekundäre Peroxidase (HRP) -gekoppelte Antikörper. Die Antikörper wurden für die Western Blot (WB) -Analyse verwendet.

2.3.15 Kits und Assays

Substanz	Hersteller	Sitz
10x PCR Puffer (+15 mM MgCl ₂)	QIAGEN GmbH	Hilden, Deutschland
Chromium Single Cell 3' NextGEM Reagent Kit v3.1	10X Genomics	Pleasanton, CA, USA
dNTP-Mix	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
FuGene HD Transfection Reagent	Promega GmbH	Walldorf, Deutschland
Gene ruler 100 Bp	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Gene ruler 100 Bp PLUS	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Hot Start Taq Polymerase	QIAGEN GmbH	Hilden, Deutschland
Lipofectamin 2000	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Luna universal qPCR Master Mix	New England BioLabs	Ipswich, MA, USA
Mamima H Minus Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Oligo(dT)18-Primer	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
OneShot TOP10 chemisch kompetente <i>E.coli</i>	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Page Ruler prestained protein ladder	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Pierce Proteintransfectionreagent	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Plasmid Maxi Kit (25)	QIAGEN GmbH	Hilden, Deutschland
Polybrene Infektions-/ Transfektionsreagenz	Sigma Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
ProFection Mammalian Transfection System	Promega GmbH	Walldorf, Deutschland
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
RNeasy Mini Kit	QIAGEN GmbH	Hilden, Deutschland
RT Buffer 5x	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
SuperSignal HRP Substrate	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
TA Cloning Kit	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland

Tabelle 15: Verwendete Kits, Assays und verbrauchsfertige Lösungen.

2.3.16 Laborgeräte

Gerät	Hersteller	Sitz
0,5 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl Pipetten	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
10X Chromium Controller	10X Genomics	Pleasanton, CA, USA
Automatischer Zellzähler TC20	Bio-Rad Laboratories GmbH	Feldkirchen, Deutschland
Agarose-Gelelektrophorese-kammern EASY-CAST Model#B1A	Owl Scientific, Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Bunsenbrenner Labogaz 206	Camping Gaz GmbH	Hungen-Inheiden, Deutschland
C1000 Touch Thermal Cycler CFX384™ Real-Time System	Bio-Rad Laboratories GmbH	München, Deutschland
Chemidoc Imaging System	Bio-Rad Laboratories GmbH	Feldkirchen, Deutschland
Feinwaage AG285	Mettler Toledo	Gießen, Deutschland
Gyratory rocker SSL3	Stuart, BioCote, Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
HulaMixer	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
iMark Microplate Reader	Bio-Rad Laboratories GmbH	Feldkirchen, Deutschland
Kühlzentrifuge Allegra 21R Centrifuge	Beckman Coulter	Brea, CA, USA
Microprocessor pH Meter	WTW	Weilheim, Deutschland
Mikrowelle	Küppersbusch	Gelsenkirchen, Deutschland
Mikroskop: ECLIPSE Ts2, TE2000-S, Inverted routine microscope	Nikon Instruments	Düsseldorf, Deutschland
Mini-PROTEAN Tetra Cell (mit Kammer, Deckel) Elektrodenzubehör und Kompanion Laufmodul)	Bio-Rad Laboratories GmbH	München, Deutschland
MoFlo XDP Zellsortierer	Beckman Coulter GmbH	Krefeld, Deutschland
Multipette E3	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Nanodrop2000/2000c Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Thermo Fisher Scientific	Scherwerte, Deutschland
Power Supply	Biometra	Göttingen, Deutschland
PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH	Feldkirchen, Deutschland
Roller 6 BASUC	IKA-Labortechnik	Staufen, Deutschland
Rollschüttler RS-TR 05	Phonix Instrument, Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland

S1000 Thermal Cycler S	Bio-Rad Laboratories GmbH	Feldkirchen, Deutschland
Sterilbank Scanlaf Mars	LMS Consult GmbH & Co. KG	Brigachtal, Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Tischabzug SCALA	Waldner	Wangen im Allgäu, Deutschland
Tischzentrifuge Mini Spin	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge Z 216 M	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Trans-Blot Turbo Transfer System	Bio-Rad Laboratories GmbH	Feldkirchen, Deutschland
UV-Geldetektionsgerät	INTAS	Göttingen, Deutschland
Vortex Mixer VF2	IKA-Labortechnik	Staufen, Deutschland
Wasserbad	Köttermann GmbH	Uetze, Deutschland
Zentrifuge Allegra 25R	Beckman Coulter GmbH	Krefeld, Deutschland
Zentrifuge 5810	Eppendorf	Hamburg, Deutschland

Tabelle 16: Verwendete Laborgerätschaften.

2.3.17 Software und Tools

Softwarename	Hersteller / Internetseite	Sitz
cBioportal v5.3.17	Memorial Sloan Kettering Cancer Center, https://www.cbioportal.org/	New York, NY, USA
CFX Maestro Software 2.3	Bio-Rad Laboratories GmbH	Feldkirchen, Deutschland
MACSQuantify V 2.11	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
Mendeley	Mendeley Ltd.	London, UK
Microplate Manager 6	Bio-Rad Laboratories GmbH	Feldkirchen, Deutschland
Microsoft Word 2019	Microsoft Deutschland GmbH	Köln, Deutschland
Microsoft Excel 2019	Microsoft Deutschland GmbH	Köln, Deutschland
MPM6	Bio-Rad Laboratories GmbH	Feldkirchen, Deutschland
NanoDrop 2000 V1.6	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
NIS Elements Software	Nikon Instruments	Düsseldorf, Deutschland
STRING protein data base	STRING Consortium 2023, https://www.string-db.org/	USA
Summit V.5.4.0.	Beckman Coulter GmbH	Krefeld, Deutschland
UCSC XenaBrowser	https://xenabrowser.net/transcripts/	Santa Cruz, CA, USA
Primer3Plus	EMBL, https://www.primer3plus.com/index.html	Heidelberg, Deutschland
PrimerBank	Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Richard B. Simches Research, Center https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/	Boston, MA, USA
Affinity designer 2	Serif (Europe) Ltd.	Nottingham, UK

Tabelle 17: Für die Datenerhebung und -verarbeitung genutzte Softwares und Online-Tools.

2.3.18 Prokaryotenstämme

Substanz	Hersteller	Sitz
OneShot™ TOP10 chemisch kompetente <i>E. coli</i>	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland

Tabelle 18: Verwendete Prokaryotenstämme.

2.3.19 Humane Zelllinien

2.3.19.1 Keimzelltumor-Zelllinien

Zelllinie	Entität	Ursprung	Geschlecht, Alter	RRID	Herkunft
1411H	EC / YST	Hodentumor, Abdomenmetastase	M, 17	CVCL_2268	4
2102EP	EC	Hodentumor	M, 23	CVCL_C522	1
833KE	EC	Hodentumor, Abdomenmetastase	M, 19	CVCL_2292	Sigma Aldrich Chemicals GmbH
GCT27	EC	Hodentumor	M, k.A.	CVCL_A344	5
GCT72	YST	Hodentumor	M, k.A.	CVCL_A349	2
NCCIT	EC	Hodentumor	M, 24	CVCL_1451	1
NT2/D1	EC	Hodentumor, Lungenmetastase	M, 22	CVCL_3407	1
TCam-2	SE	Hodentumor	M, 35	CVCL_T012	3

Tabelle 19: Verwendete GCT-Zelllinien. Alle Embryonalkarzinom (EC), Dottersacktumor (YST) und Seminom (SE) -Zelllinien wurden aus männlichen (M) Spendern gewonnen. Zu Zelllinie GCT27 und GCT72 gibt es keine Angaben (k.A.) zum Alter des Spenders. Die Zelllinien wurden zur Verfügung gestellt von: 1 Dr. Christoph Oing (Zentrum für Onkologie, Hämatologie, Knochenmarktransplantation mit Abteilung für Pneumologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Deutschland), 2 Dr. Thomas Müller, (Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Deutschland), 3 Dr. Janet Shipley (Division of Molecular Pathology, The Institute of Cancer Research, London, United Kingdom), 4 Dr. Matthew Murray (Department of Paediatric Haematology and Oncology, Cambridge University Hospitals, United Kingdom). 5. Prof. Dr. Francesc Viñals Canals (Catalan Institute of Oncology).

2.3.19.2 Leberkarzinom- und Nieren-Zelllinien

Zelllinie	Entität	Ursprung	Geschlecht, Alter	RRID	Herkunft
HepG2	Leber	Hepatozelluläres Karzinom	M, 15	CVCL_0027	6
HEK293-T	Niere	Subklon der parentalen Zelllinie HEK293, embryonale Niere	Embryo	CVC_0063	7

Tabelle 20: Leberkarzinom- und Nieren-Zelllinien. Die Zelllinie HepG2 wurde aus einem männlichen (M) Spender gewonnen. Die Zelllinien wurden zur Verfügung gestellt von: 6 Dr. Michelé Hoffmann (Urologisches Forschungslabor, Klinik für Urologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, Düsseldorf, Deutschland) 7 Prof. Dr. Hubert Schorle (Abteilung für Molekularpathologische Diagnostik, Universitätsklinikum Bonn, Bonn, Deutschland).

2.4 Methoden

2.4.1 Methoden in der Zellkultur

2.4.1.1 Authentifizierung der genutzten Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden regelmäßig mittels Analysen zu repetitiven Mikrosatelliten-Sequenzen der nicht-kodierenden DNA (STR, aus dem Englischen für *short tandem repeats*) auf genetische Alterationen überprüft. Die DNA-Isolation erfolgte wie in Kap. 2.4.2.1 beschrieben, die nachfolgende Analyse wurden in Kooperation mit dem Institut für Gerichtsmedizin, Universitätsklinikum Düsseldorf, erstellt.

2.4.1.2 Kultivierung, Vereinzelung und Passagieren von Zelllinien

Die Zelllinien 1411H, 2102EP, 833KE, HEK293-T, GCT72, NCCIT, NT2/D1 und TCam-2 wurden bei 37 °C und 7.5 % CO₂ und die Zelllinien HepG2 und GCT27 bei 37 °C und 5 % CO₂ in T25- oder T75-Zellkulturflaschen in dem in Kap. 2.3.6 beschriebenen Medium steril kultiviert. Die Zellen wurden alle drei bis vier Tage bei einer Konfluenz zwischen 80 und 90 % passagiert. Für das Umsetzen der allesamt adhärent wachsenden Zellen wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und die Zellen durch die Inkubation in einer Trypsin-Lösung (0,05 %, 3 bis 5 Min, 37 °C) abgelöst. Die Vereinzelungsreaktion wurde durch Zugabe von FBS-supplementiertem Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde daraufhin abgestimmt auf die zu vorige Zelldichte und das Wachstumsverhalten zwischen 1:3 und 1:30 mit entsprechendem frischem Medium verdünnt und in einer neuen T25- / T75-Zellkulturflasche ausgesät und zur weiteren Kultivierung im Inkubator inkubiert.

Die YST-Zelllinie GCT72 beinhaltet einen geringen murinen Fibroblasten-Anteil (1 bis 5 %) in der Standardkultur, der wöchentlich zusätzlich verdünnt wird. Dafür erfolgt ein zusätzlicher Inkubationsschritt in der Trypsin-Lösung für 30 bis 50 Sek vor der Umsetzung der GCT72-Zellen. Die Dissoziation wird unter dem Mikroskop beobachtet und die Reaktion umgehend nach Ablösen der murinen Fibroblasten mit FBS-haltigem Medium gestoppt. Anschließend erfolgt das Passagieren der GCT72-Zellen wie zuvor beschrieben.

Für die Gesamtheit der durchgeführten Versuche wurden ausschließlich Zellen verwendet, deren Zellkulturüberstände regelmäßig innerhalb der Laborroutine von technischen Assistentinnen des urologischen Forschungslabors auf Kontaminationen durch *Mycoplasmen* mittels standardisierter PCR-basierter Methode getestet wurden.

2.4.1.3 Zellzahl-Bestimmung mittels Trypanblau-Färbung

Für die äquivalente Aussaat von Zellen für die Versuchsdurchführung wurde die Zellsuspension nach Abstoppen der Dissoziierungs-Reaktion in einem Verhältnis von 1:1 mit Trypanblau vermischt und mit dem automatisierten Zellzähler TC20 vermessen. Neben der allgemeinen Zellzählung wurde bei jeder Zählung die Zahl der lebenden Zellen und die Zellviabilität ermittelt.

2.4.1.4 Kryokonservierung von Zellen

Die Kryokonservierung der Zellkulturen diene der Langzeitlagerung. Hierfür wurden die Zellen, nachdem sie in Einzelzell-Suspension vorlagen, mittels Zentrifugation pelletiert (99 x g, 5 Min). Der Überstand wurde entfernt und die Zellen wurden in 500 µl Kryomedium (FBS + 10 % DMSO) pro einzufrierendem Aliquot resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die Röhrchen wurden umgehend auf Eis gestellt und zeitnah bei -80 °C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.4.1.5 Auftauen und Rekultivieren von Zellen

Für die Rekultivierung von kryokonservierten Zellen wurde ein Röhrchen mit einer Kryokultur durch die Zugabe von der Zelllinie entsprechendem Medium aufgetaut und die Zellsuspension in eine mit 15 ml Medium gefüllte T75-Zellkulturflasche überführt. Nach dem Waschen der Zellen mit PBS wurde das Medium gewechselt und ab einer Konfluenz von 80 bis 90 % wurden die Zellen entsprechend Kap. 2.4.1.2 passagiert und kultiviert.

2.4.1.6 Transfektion humaner Zelllinien

Die Transfektion von humanen Zelllinien wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels der Transfektionsreagenzien *Lipofectamin* oder *FuGene HD* durchgeführt. Für die Infektion in einer 6-Well-Platte wurden jeweils $1,0 \times 10^5$ Zellen in Standard-Zellkulturmedium je Vertiefung ausgesät. Am Tag der Transfektion wurde das Medium zu dem Zellkulturmedium ohne Antibiotikum gewechselt. Das Transfektionsgemisch wurde aus Zellkulturmedium ohne Zusätze (95 μ l), der einzuschleusenden Nukleinsäure (5 μ l) und dem jeweiligen Transfektionsreagent (5 μ l) zusammengemischt und für 20 Min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wurden 100 μ l des Transfektionsmediums mäanderförmig unter die Oberfläche des Mediums gegeben. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag wurde das Medium zu dem Standard-Zellkulturmedium gewechselt.

2.4.1.7 Transduktion von humanen HEK293-T-Zellen zur Produktion von Lentiviren (Kalziumphosphat-präzipitation)

Für die Produktion von rekombinanten, replikationsdefizienten Lentiviren in eukaryotischen HEK293-T-Zellen wurde das Prinzip der Kalziumphosphatpräzipitation mittels des *Profection - Mammalian Transfection System*-Kits verwendet. Für die Transfektion der HEK293-T-Zellen wurden zwei Medien mit unterschiedlicher FBS-Konzentration hergestellt (Tab. 21, Tab. 22).

Advanced medium 2 %	
Substanz	Volumen [ml]
Advanced DMEM (1x) Reduced Serum Medium [+] D-Glukose [+] Nicht-essenzielle Aminosäuren [+] 110 mg/ml Natriumpyruvat	50
FBS	1
Penicillin / Streptomycin	0,5
L-Glutamin (100x)	0,5

Tabelle 21: Zusammensetzung des *advanced medium 2 %* für die Produktion von Lentiviren in HEK293-T-Zellen.

Advanced medium 5 %	
Substanz	Volumen [ml]
Advanced DMEM (1x) Reduced Serum Medium [+] D-Glukose [+] Nicht-essenzielle Aminosäuren [+] 110 mg/ml Natriumpyruvat	50
FBS	2,5
Penicillin / Streptomycin	0,5
L-Glutamin (100x)	0,5

Tabelle 22: Zusammensetzung des *advanced medium* 5% für die Produktion von Lentiviren in HEK293-T-Zellen.

Am Vortag der Transfektion wurden Zellkulturschalen (10 cm) mit Poly-L-Lysin beschichtet. Dafür wurden die Zellkulturschalen mit Poly-L-Lysin befüllt, für 30 Min bei 37 °C im Inkubator inkubiert und anschließend mit 10 ml PBS gewaschen. Nach dem Beschichten wurden $7,0 \times 10^6$ HEK293-T-Zellen in 10 ml Standard-Zellkulturmedium (vgl. Kap. 2.3.6) auf die Zellkulturschalen als *Monolayer* ausplattiert. Am Folgetag wurde die in die Zielzellen einzuschleusende, virale DNA mit der im Kit bereitgestellten Kalziumchlorid-Lösung vermischt, dann tröpfchenweise in das Reaktionsröhrchen mit dem HEPES-Puffer unter fortlaufendem Vortexen transferiert und bei Raumtemperatur für 15 Min inkubiert (Tab. 23). Durch die Vermischung der Substanzen bildet sich Kalziumphosphat, welches mit der zu übertragenden DNA bindet. Während der Inkubation wird das Medium der HEK293-T-Zellen durch 5 ml des vorgewärmten *advanced medium* 2 % (Tab. 21) ersetzt. Für eine erhöhte Transfektionseffizienz wurde *Chloroquine* in einem Verhältnis von 1:1000 zu dem Medium der Zielzellen vor Hinzufügen der Kalzium-Phosphat-DNA-Lösung hinzugefügt. Der Kalziumphosphat-DNA-Transfektionskomplex wurde tröpfchenweise auf die Zielzellen gegeben.

Reaktionsröhrchen 1	
Substanz	Menge / Volumen
2 M CaCl ₂	61,5 µl
psPax2	9,25 µg
pMD2.G	9,25 µg
Zielgen-Plasmid	18,5 µg
H ₂ O	Ad 600 µl
Reaktionsröhrchen 2	
Substanz	Menge / Volumen
HEPES 2x	600 µl

Tabelle 23: Zusammensetzung eines Transfektionsansatzes für die Herstellung von Lentiviren in HEK293-T-Zellen.

Die Zellen wurden nach Zuführen des Transfektions-Komplexes für 5 h bei 7,5 % CO₂ und 37 °C im Inkubator inkubiert. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel mit 10 ml

advanced medium 5 % (Tab. 22). Am zweiten Tag erfolgte erneut ein Mediumwechsel mit 7 ml *advanced medium 5 %* (Tab. 22). Ab Tag drei des Protokolls wurde der Virus-beinhaltende Zellkulturüberstand in einem 50 ml Plastikröhrchen gesammelt, mit zugfester Verschlussfolie (*Parafilm*) verschlossen und bei 4 °C gelagert. Am vierten Tag wurde der Zellkulturüberstand erneut gesammelt und dem Aliquot des Vortages zugeführt. Die Virussuspension wurde filtriert (0,45 µM) um Zelldebris zu entfernen und anschließend in 500 µl-Aliquots bei -80 °C bis zur Verwendung eingefroren.

2.4.1.8 Erzeugung von Zelllinien mit integriertem *lentiMPHv2*-Aktivator-Helfer-Komplex

Die Herstellung lentiviraler *lentiMPHv2*-Partikel erfolgte in HEK293-T-Zellen unter Verwendung des Hüllprotein-exprimierenden Plasmids *pMD2.G*, des Verpackungsplasmids *psPAX2* und des *lentiMPHv2*-Plasmids, das für den MS2-P65-HSF1-Aktivator-Helfer-Komplex mit einer 2A-Hygro-Resistenzkassette (EF1a-MS2-p65-HSF1-2A-Hygro-WPRE) kodiert (vgl. Kap. 2.3.12). Zu Beginn wurden $1,0 \times 10^5$ Zellen pro 6-Well-Vertiefung ausgesät. Unmittelbar vor der Infektion wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt und mit dem Transfektionsreagent *Polybrene* (1:1000) versetzt. Zur Erzeugung der *lentiMPHv2*⁺-Klone wurden die Zellen mit 450 µl *lentiMPHv2*-Lentiviruspartikel-Suspension infiziert und für vier Tage expandiert. Um die *lentiMPHv2*⁺-Zellen von Wildtyp-Zellen zu unterscheiden wurde die mittransferierte Hygromycin-Resistenzkassette adressiert indem Hygromycin (250 µg/ml) für die Selektion eingesetzt wurde. Nach der Selektion der *lentiMPHv2*⁺-Zellen wurden die Zellen expandiert und als Kryokulturen bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert. Für sämtliche nachfolgenden Experimente wurden die *lentiMPHv2*⁺-Zelllinien verwendet.

2.4.1.9 Infektion von *lentiMPHv2*⁺-EC-Zellen mit Lentiviren für die endogene (Über-)Expression von Differenzierungsfaktoren

Die Produktion von Lentiviruspartikeln (LVP) wurde in HEK293-T-Zellen durchgeführt, wobei das Hüllprotein-exprimierende Plasmid *pMD2.G*, das Verpackungsplasmid *psPAX2* und das *lentiMPHv2*-Plasmid verwendet wurden (vgl. Kap. 2.3.12). Nach Aussaat und Adhäsion der Zielzellen wurde frisches Zellkulturmedium inklusive *Polybrene* (1:1000) durch einen Mediumwechsel appliziert. Anschließend wurden 450 µl der LVP-Suspension gleichmäßig unter die Oberfläche des frischen Mediums pipettiert und durch sanftes Schwenken der Petrischale homogen verteilt. Nach einer Inkubation von etwa 20 h bei 37 °C im Brutschrank wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Zellkulturmedium versorgt.

2.4.1.10 Zellviabilitätsmessung mittels XTT-Assay

Um die Wirkung von Medikamenten auf die Zellviabilität zu erfassen, wurden XTT-Zellviabilitätsmessungen durchgeführt. Innerhalb des Versuchs wird das XTT Tetrazolium-Salz (2,3- Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilid) mittels mitochondrialer Dehydrogenasen von vitalen Zellen zu Formazan-Salz reduziert. Durch die Reduktion entsteht ein Farbumschlag von gelb zu orange welcher photometrisch vermessen werden kann.

Für die XTT-Assays wurden jeweils 3000 Zellen pro 96-Well-Vertiefung in 50 µl Medium ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen in fünf verschiedenen Konzentrationen eines Medikaments und zusätzlich mit der Lösemittelkontrolle in der höchsten eingesetzten Konzentration des Medikaments in Quadruplikaten behandelt. Die Behandlungen erfolgten durch das Zuführen von 50 µl der Medikamentenlösung in doppelter Konzentration in die bereits mit 50 µl Medium befüllten Vertiefungen der 96-Well-Platte, um die final geforderte Endkonzentration zu erreichen. Um eine Wirkungskurve erstellen zu können wurde die Zellviabilität nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h der Behandlung ermittelt. Vier Stunden vor jedem Messzeitpunkt wurden 50 µl der 1 mg / ml XTT-Lösung (gelöst in RPMI 1640 und versetzt mit 1:100 PMS (1,25 mM)) zu den behandelten Wells des jeweiligen Zeitpunkts gegeben. Nach der vierstündigen Inkubationszeit wurde die Platte geschüttelt und bei der Messwellenlänge von 450 nm und der Referenzwellenlänge 655 nm im *iMark Microplate Reader* vermessen.

Für die Verarbeitung der Messwerte wurde der gemessene Referenzwert (655 nm) eines Wells von dem Messwert (450 nm) subtrahiert und eine Normalisierung jedes Messpunkts eines zuvor behandelten Wells gegen den Mittelwert des Messwerts der Lösemittelkontrolle durchgeführt.

Für die Berechnung der Konzentration der halbletalen Dosis (LD50) wurde die *Software GraphPad-Prism V8* verwendet.

2.4.1.11 Durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptose-Induktion

Die Bestimmung der Apoptose-Induktion von Zellen erfolgte durch die Färbungen mit Annexin V und Propidium-Iodid (PI) an dem *MACS Quant Analyzer 10*. Durch die Induktion von Apoptose werden die für gewöhnlich auf der Innenseite der Plasmamembran lokalisierten, anionischen Phospholipide (Phosphatidylserin) nach außen gestülpt. Annexin V bindet mit einer hohen Affinität an die nach außen gewendeten Phosphatidylserin-Membrankomponenten und ermöglicht somit die durchflusszytometrische Detektion und Quantifizierung von apoptotischen Zellen mittels eines gekoppelten Fluoreszenz-Farbstoffes. Bereits nekrotische Zellen weisen eine beschädigte Plasmamembran auf durch die der DNA-interkalierende Farbstoff PI in den Zellkern gelangen kann und dort spezifisch an die DNA bindet. Durch die Doppelfärbung mit Annexin-V und PI können viable (Annexin V⁻ / PI⁻), früh apoptotische (Annexin V⁺ / PI⁻), spät apoptotische (Annexin V⁺ / PI⁺) und ebenfalls nekrotische (Annexin V⁻ / PI⁺) Zellen unterschieden werden. Für die Bestimmung der Apoptose wurden jeweils 55.000 Einzelzellen pro Probe vermessen.

2.4.1.12 Behandlung von Zellen mit rekombinanten Proteinen / pharmakologischen Inhibitoren

Zur Behandlung von Zellen über einen Zeitraum von vier Tagen mit rekombinanten Proteinen oder Inhibitoren erfolgte die Aussaat von 50.000 Zellen in 6-Well-Platten, die mit Standardkulturmedium befüllt wurden (jeweils n = 3). Die Zugabe der entsprechenden rekombinanten Proteine oder Inhibitoren erfolgte gemäß den aufgeführten Angaben (Tab. 24). Während des Behandlungszeitraums wurde das Behandlungsmedium täglich erneuert.

Für die Behandlung von Zellen über einen Zeitraum von acht Tagen mit rekombinanten Proteinen oder Inhibitoren erfolgte die Aussaat von 4237 Zellen in jede Vertiefung der 6-Well-Platten in je 2 ml Medium (jeweils n = 3 Wells pro Kondition). Die Applikation der rekombinanten Proteine oder Inhibitoren erfolgte gemäß dem in Tab. 24 angegebenen Behandlungsschema. Das Medium wurde alle zwei Tage während der Versuchsdauer von acht Tagen gewechselt.

Substanz	Applikationskonzentration
Activin-A	100 ng/ml
BMP2	75 ng/ml
BMP4	75 ng/ml
CHRION	3 µM
DKK1	500 ng/ml
SCH772984	100 nM
XAV-393	4 µM
NOG	500 ng/ml
WNT3a	100 ng/ml
WNT5a	100 ng/ml
FGF2	25 ng/ml
hLIF	10 ng/ml
Heparin-Natrium-Salz	1 µg/ml

Tabelle 24: Behandlungsschema der rekombinanten Proteine und Inhibitoren.

2.4.1.13 Differenzierung von EC-Zellen in ein YST-ähnliches Zellschicksal

Für die Differenzierungsexperimente in denen EC-Zellen in ein YST-ähnliches Zellschicksal reprogrammiert wurden, wurden jeweils $2,5 \times 10^4$ vereinzelte Zellen auf eine 10 cm Zellkulturschale in 6 ml Medium ausgesät. Die Etablierungsarbeiten umfassten Behandlungen in verschiedenen Medien mit unterschiedlichen Zusätzen, verschiedene Behandlungsabständen, -dauern und -reihenfolgen, um die effektivste Kombination zu ermitteln. Jede Differenzierung wurde zusammen mit einer adäquat behandelten Lösungsmittelkontrolle durchgeführt. Am ersten Tag des etablierten Differenzierungsprotokolls wurde die Induktion der SOX17-Expression mittels des viral eingeschleusten CRISPR/dCas9-SAM-Systems veranlasst. Am darauffolgenden Tag erfolgte ein Mediumwechsel zu dem YST-Differenzierungsmedium, bestehend aus dem Standard-Zellkulturmedium der jeweiligen Zelllinie, ergänzt mit 100 ng/ml Activin-A, 3 µM CHIRON, 1 µg/ml Heparin und 25 ng/ml FGF2. Die Anwendung des YST-Differenzierungsmediums wurde insgesamt dreimal im Abstand von 48 h erneuert. Am achten Tag wurden die Zellen als YST-ähnlich klassifiziert. Während der gesamten Versuchsdauer wurden die morphologischen Eigenschaften der Kontrollzellen und der differenzierenden Zellen kontinuierlich beobachtet und verglichen. Für die Dokumentation der morphologischen Zellveränderungen wurden mikroskopische Aufnahmen mit dem 10-fachen Vergrößerungsobjektiv des Hellfeldmikroskops aufgenommen.

2.4.2 Nukleinsäure-Analytik

2.4.2.1 DNA-Extraktion aus Zellen

Die Isolation von Desribonukleinsäure (DNA, aus dem Englischen für *desoxyribonucleic acid*) aus Zellen erfolgte durch die Extraktion mittels Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (PCI). Die Zellen wurden mittels Trypsin-Lösung (vgl. Kap. 2.4.1.2) geerntet und mittels Zentrifugation pelletiert (99 x g, 5 Min). Das Zellpellet wurde mit PBS gewaschen und anschließend in 300 µl DNA-Lyse-Puffer mit 12,5 µl Proteinase K und 40 µl 10 % SDS resuspendiert (Tab. 25).

Stocklösung	Endkonzentration	Volumen [ml]
NaCl (5 M)	0,1 M	2
Tris-HCl (1 M, pH 8)	0,01 M	1
EDTA (0,5 M, pH 8)	0,025 M	5
SDS (10% (w/v))	0,5 % (v/v)	5
H ₂ O, Sigma-Aldrich	Ad 100 ml	87

Tabelle 25: Zusammensetzung von 100 ml des verwendeten DNA-Lysepuffers.

Die Proben wurden 30 bis 60 Min bei 45 °C bei 600 rpm auf dem Thermoblockschüttler vollständig lysiert. Jede Probe wurde anschließend mit 360 µl PCI versetzt und für 10 Min auf dem *HulaMixer* vermischt, um die Proteine aus der nukleinsäurehaltigen Lösung zu entfernen. Als nächstes wurden die Proben für 10 Min bei 4 °C und 9000 x g zentrifugiert, um die Probe in die verschiedenen Phasen aufzutrennen. Die aquatische, nukleinsäurehaltige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß separiert und das abgenommene Volumen bestimmt. Zu jeder Probe wurde 1/10 des ermittelten Volumens 3 M Natriumacetat (pH 5.2) und das dreifache Volumen 100 % Ethanol gemischt. Die Probe wurde invertiert bis die DNA sichtbar präzipitierte. Die Suspension wurde anschließend für 5 Min bei Raumtemperatur mit 13.000 x g sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde zweimal mit jeweils 1 ml 70 % Ethanol gewaschen. Je nach Größe der Pellets wurden anschließend 35 µl bis 200 µl TE-Puffer (2.3.3) zugeführt. Die DNA wurde 1 h bei 55 °C und 600 rpm auf dem Thermoblockschüttler gelöst. Die Konzentration- und -Reinheitsbestimmung der DNA-Lösung erfolgte mittels *NanoDrop2000*.

Durch die Spektrophotometrie bei den Wellenlängen von 230 nm, 260 nm und 280 nm wurde die Absorption der Nukleinsäuren gemessen, und mithilfe der dedizierten *NanoDrop2000 V1.6 Software* wurden die Verhältnisse der absorbierten

Lichtintensitäten berechnet. Das Verhältnis von 260 nm zu 280 nm dient als Indikator für Proteinverunreinigungen, wobei optimale Werte im Bereich von 1,8 bis 2,0 liegen sollten. Die Kalkulation des Verhältnisses von 260 nm zu 230 nm gibt Aufschluss über mögliche Verunreinigungen durch Kohlenhydrate, Salze und Phenole, wobei ein Wert von $\geq 2,0$ als erstrebenswert betrachtet wird. Die DNA-Proben wurden bei einer Temperatur von 4 °C gelagert.

2.4.2.2 Isolation von Plasmid-DNA nach Prinzip der alkalischen Lyse

Die Extraktion von Plasmid-DNA aus transformierten *E. coli* TOP10 Bakterien erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Zuerst wurden 1,5 ml der transformierten Bakteriensuspension für eine Min bei 13.000 x g pelletiert und der Überstand wurde verworfen. Das DNA-Pellet wurde in 300 µl Puffer P1 durch Vortexen gelöst, die RNase-A des Puffers diente der Degradation von RNA aus der Probe (Tab. 26). Zunächst wurde die Probe mit 300 µl Puffer P2 versetzt und mehrfach invertiert, bis die Lösung klar wurde. Durch Puffer P2 wurden die Proteine der Probe mittels des Detergens SDS und NaOH durch alkalische Verseifung lysiert (Tab. 26). Danach wurden 300 µl des säurehaltigen Puffer P3 zugeführt und die Suspension kraftvoll vermischt. Durch Puffer P3 wurde die intakte, frei gesetzte Plasmid-DNA aus der basischen Umgebung neutralisiert und verblieb somit löslich (Tab. 26).

Puffer	Zusammensetzung
P1 (Lagerung bei Raumtemperatur)	50 mM Glucose
	25 mM Tris-HCl pH 8.0
	10 mM EDTA
	100 µg/ml RNase A
P2 (Lagerung bei Raumtemperatur)	200 mM NaOH
	1 % SDS
P3 (100 ml, Lagerung bei 4°C)	60 ml 5 M KAc
	28,5 ml H ₂ O
	11,5 ml CH ₃ COOH

Tabelle 26: Zusammensetzung und Lagerungsbedingungen der verwendeten Puffer für die alkalische Lyse von Plasmid-DNA.

Die zuvor zerstückelte chromosomale DNA konnte nicht renaturieren und wurde durch Zentrifugation (10 Min 14.000 x g) pelletiert. Der Plasmid-DNA-enthaltene Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mittels 0,7 Vol. Isopropanol vermischt, mehrfach invertiert, um die Plasmid-DNA zu fällen und bei 13.000 x g für 10 Min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Durch die Zugabe von 300 µl 70 % Ethanol wurde das DNA-Pellet gewaschen, anschließend für 2 Min bei 13.000 x g zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen. Das Pellet wurde in 50 µl TE-Puffer resuspendiert.

2.4.2.3 Reinigung von Plasmid-DNA mittels steriler Ethanol-Präzipitation

Die in Bakterien vermehrte Plasmid-DNA wurde mittels Ethanol-Präzipitation von möglichen Kontaminationen gereinigt. Dafür werden alle benötigten Lösungen mittels Sterilfilter (0,2 µM) filtriert. Zuerst wurden 100 µl der negativ geladenen Plasmid-DNA mittels 3 M NaCl (1/10 $\cong$ 10 µl) in einem leicht sauren Milieu (pH 5.2) protoniert und somit neutralisiert. Durch die Zugabe von 300 µl 100 % Ethanol wurde die DNA in eine polare, alkoholische Umgebung gebracht, um durch die Verringerung der Löslichkeit die Präzipitation der DNA zu erreichen. Die DNA-Lösung wurde für 30 Min bei -80 °C inkubiert und anschließend 15 Min bei 13.000 x g und 4 °C gefällt. Durch dreifaches Waschen der Proben mit jeweils 1 ml 70 % Ethanol wurde die DNA gereinigt. Dafür wurde das DNA-Pellet nach jeder Ethanol-Zugabe bei 4 °C für 5 Min bei 12.000 x g zentrifugiert. Das DNA-Präzipitat wurde in 100 TE-Puffer wieder resuspendiert.

2.4.2.4 Isolation von Plasmid-DNA (Maxi-prep)

Zur Plasmid-DNA-Isolation wurden *E. coli* TOP10-Bakterien verwendet, die zuvor mit einem rekombinanten Plasmid transformiert wurden. Die Bakterien wurden auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum selektioniert und in 3 ml LB-Medium mit derselben Antibiotikaselektion, wie in Tab. 8 skizziert, inkubiert. Die gezüchtete Übernachtskultur von transformierten *E. coli* TOP10-Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 4 °C für 20 Min bei 6000 x g sedimentiert. Die Isolation der Plasmid-DNA wurde gemäß den Anweisungen des *QIAGEN Maxi-Prep Kits* durchgeführt. Die Vermessung der Konzentration der isolierten DNA erfolgte mit dem *Nanodrop200*. Die Integrität der isolierten Plasmid-DNA wurde durch Agarosegel-Elektrophorese bestätigt. Die isolierte Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert, um ihre Stabilität für weitere Analysen und Experimente zu gewährleisten.

2.4.2.5 RNA-Extraktion aus Zellen

Die Isolation von Ribonukleinsäure (RNA, aus dem Englischen für *ribonucleic acid*) aus Zellen erfolgte innerhalb dieser Arbeit mit dem *RNeasy Mini Kit* (vgl. 2.3.15) nach dem Manuskript des Herstellers. Für jeden Extraktions-Ansatz wurde vor Versuchsbeginn der im Kit enthaltende RLT-Puffer im Verhältnis von 1:100 mit β -Mercaptoethanol versetzt. Die Konzentrationsbestimmung der präparierten RNA-Suspensionen erfolgte mit dem *Nanodrop2000* über die Absorptionsmessung und Kalkulation der 260 / 280- und 260 / 230-nm-Verhältnisse (vgl. 2.4.2.1). Die RNA-Proben wurden bei -20 °C gelagert.

2.4.2.6 RNA-Extraktion aus Geweben

Die RNA-Isolation aus Tumoren erfolgte mit dem *QIAzol Lysis Reagent*. Die Tumorgewebestücke wurden in einer 100 mm Zellkulturschale zerkleinert und jeweils 1 ml *QIAzol Lysis Reagent* aufgenommen und mit einem Homogenisator lysiert. Die anschließende Extraktion und Reinigung der Tumor-RNA wurde entsprechend dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

2.4.2.7 Sanger-Sequenzierung (BMFZ)

Die Sanger-Sequenzierung von Nukleinsäuren wurden in den Laboren des *Genomics & Transcriptomics Laboratory* (GTL) der HHU-D durchgeführt. Die Proben wurden zunächst im eigenen Labor mittels *Nanodrop2000* quantifiziert. Gemäß den Vorgaben des GTL wurden die DNA-Proben mit H₂O verdünnt und für die Sequenzierungsreaktion mit den jeweiligen Oligonukleotiden versetzt. Die Resultate der Sequenzierungsreaktionen wurden anschließend vom GTL bereitgestellt.

2.4.2.8 DNA-Restriktion mittels Restriktionsenzymen

Die DNA für die DNA-Restriktion wurde zuvor durch eine erfolgreiche Plasmid-DNA-Isolation, wie in Kap. 2.4.2.4 beschrieben, gewonnen. Das isolierte Plasmid wurde mittels *Nanodrop2000* quantifiziert, und die Konzentration wurde entsprechend angepasst. Das Restriktionsenzym (*Esp3I*) wurde ausgewählt, um spezifische Restriktionsschnitte in die *Multicloning site* in der Ziel-Plasmid-DNA zu erzeugen. Dieses Enzym erkennt und schneidet die DNA an dem Sequenzabschnitt mit der Basenabfolge 5'-CGTCTC-3'. Die DNA-Restriktion wurde gemäß den Empfehlungen von *New England Biolabs* durchgeführt. In einem typischen Reaktionsvolumen wurden 1 µg der Ziel-DNA, 10 U *Esp3I*-Restriktionsenzym (1 µl), 5 µl 10x *Cutsmart buffer* mit sterilem, nukleasefreiem H₂O bis zum endgültigen Volumen von 50 µl vermischt. Die DNA-Restriktion erfolgte durch Inkubation der Reaktionsmischung bei 37 °C über Nacht gemäß der Herstellerangaben. Die restriktionsverdauten DNA-Fragmente wurden durch Agarosegel-Elektrophorese analysiert (vgl. Kap. 2.4.2.9).

2.4.2.9 Quantifizierung mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde durchgeführt um die Größe und Integrität der Nukleinsäuren, insbesondere der restriktionsverdauten DNA-Fragmente, zu analysieren. Dies ermöglichte die Bestätigung erfolgreicher DNA-Restriktionen und die Überprüfung von Reinheit sowie die Einschätzung der Qualität des isolierten genetischen Materials.

Die Agarosegele wurden jeweils frisch vor der Verwendung durch Auflösen von Agarose (1,5%) in 150 ml 1x TAE-Puffer hergestellt. Die Agarose wurde durch Erhitzen gelöst. Nach dem Abkühlen des Gemischs wurde der Farbstoff *SYBR Safe* im Verhältnis von 1:10.000 hinzugefügt, um die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar zu machen. Die Gelmischung wurde in eine Gussform gegeben, in der die Gel-Kämme für die Bildung von Taschen platziert wurden. Nach dem Erstarren des Gels wurden die Kämme entfernt und die zu analysierenden Proben (500 ng DNA / Probenansatz) wurden mit *6x Purple loading dye* gemischt und in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Als Größenstandards wurde ein DNA-Marker ebenfalls mit auf das Gel geladen. Für die Analyse von großen Plasmid-DNA-Fragmenten wurde der *Gene ruler 1 kb plus* Marker verwendet; für die Analyse von kleinen Fragmenten wurde der *Gene ruler 100 BP plus* Marker verwendet.

Für die Elektrophorese wurden die beladenen Gele mit 1x TAE-Puffer überschichtet und eine Spannung (120 V) angelegt, um die Nukleinsäuren durch das Agarosegel zu bewegen. Die Elektrophorese wurde für 30 bis 60 Min durchgeführt, um die Trennung der DNA-Fragmente gemäß ihrer Größe zu ermöglichen.

Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht betrachtet, um die DNA-Banden sichtbar zu machen. Die Gele wurden mit dem *INTAS* Gel-Dokumentationssystem fotografiert, um die Effizienz der Restriktion und die Größe der entstandenen Fragmente zu bestimmen. Die Größe der DNA-Fragmente wurde durch den Vergleich mit den aufgetragenen DNA-Leitern eingeschätzt.

2.4.2.10 Synthese von *complementary* DNA durch reverse Transkription

In jede Synthese von *complementary* DNA (cDNA) wurden 1000 ng RNA eingesetzt und enzymatisch durch die reverse Transkriptase (RT) in einzelsträngige cDNA transkribiert. Die Komponenten des Syntheseansatzes sowie das Protokoll zur Amplifikation der Probe mittels des sind in Tab. 27 aufgeführt.

cDNA-Syntheseansatz		Thermal Cycler Protokoll	
Reagenz / Konzentration	Volumen [μ l]	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit [Min]
RNA in RNase freiem H ₂ O	1000 ng ad 12,5 μ l H ₂ O	50	30
dNTP-Mix (10 mM)	1	85	5
Oligo(dT) ₁₈ Primer (0,5 μ g/ μ l)	1	4	∞
RT-Puffer	4		
RiboLock RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	0,5		
Maxima H Minus RT (200 U/ μ l)	1		

Tabelle 27: Zusammensetzung von cDNA-Synthese-Ansätzen mit Angabe des *S1000 Thermal Cycler S*-Protokolls.

Nach Ausführung des Protokolls im *Cycler* wurde die cDNA 1:17 mit RNase freiem H₂O auf eine finale Konzentration von 50 ng/ μ l verdünnt.

2.4.2.11 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion

Die quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) wurde für differentielle Genexpressionsanalysen von Zellen genutzt und umfasst die Amplifikation von Nukleinsäuren einer Probe mit zusätzlichem Einbau eines DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs. Die Detektion des emittierten Fluoreszenzsignals erfolgt durch entsprechende Laserbestrahlung innerhalb des *C1000 Touch Thermal Cycler CFX384 Real-Time System* und erlaubt die Quantifizierung von Nukleinsäuren innerhalb der zu untersuchenden Probe. Die Fluoreszenzsignale entstehen hierbei proportional zur Menge des amplifizierten Produkts. Die Komposition des Reaktionsansatzes und das Protokoll des *CFX384 Touch Thermal Cyclers* sind Tab. 28 zu entnehmen.

Reaktionsansatz / Triplikat	
Reagenz / Konzentration	Volumen [μ l]
cDNA 1:17 mit H ₂ O verdünnt	8,5
Luna universal qPCR Mastermix	7,5
Primer Forward (10 μ M)	0,5
Primer Reverse (10 μ M)	0,5

qRT-PCR Protokoll		
Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit	Zyklen
95	120 Sek	
95	10 Sek	39 x
60	30 Sek	
Detektion		
95	30 Sek	
95 - 65 in 0,5-Intervallen	5 Sek Detektion / Intervall	Erstellung Schmelzkurve

Tabelle 28: Reaktionsansatz und Protokoll für die Durchführung der qRT-PCR. Der Reaktionsansatz gilt für ein Triplikat unter Verwendung von 384-Well-Platten. Die cDNA wurde gemäß Kap. 2.4.2.10 produziert. Die Ansetzung erfolgte in PCR-Reaktionsgefäßen, es wurden je 5 μ l eines Ansatzes als technische Replikate aufgetragen. Das aufgelistete qRT-Protokoll wurde in dem *CFX384 Touch Thermal Cycler* durchgeführt.

Die Proben wurden als Triplikate mit je 5 μ l / Well auf die 384-Well-Platte überführt. Die Auswertung erfolgte mit der *BioRad CFX Maestro Software* und *Microsoft Excel 2019*. Die Genexpressionsanalyse umfasste die Normalisierung der gemessenen C_T-Werte (aus dem Englischen: *Cycle threshold*) der einzelnen Gene gegen C_T-Werte der Haushaltsgene *ACTB* und *GAPDH* für die Berechnung der relativen Genexpressions-Intensität (Δ C_T-Wert). Für die Berechnung der differentiellen Genexpression (Quantifizierung des Differentialausdrucks, X-fache Veränderung, aus dem Englischen für *fold change* (FC)) wurden die Werte behandelter Proben neben der Normalisierung gegen die Haushaltsgene zusätzlich gegen die Werte der unbehandelten Kontrollen normalisiert ($\Delta\Delta$ C_T-Wert).

2.4.2.12 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde als zentrale Methode eingesetzt, um spezifische DNA-Sequenzen zu amplifizieren. Um die zu amplifizierende Zielregion zu adressieren, wurden mit Hilfe von *Software-Tools* (*Primer3*, *insilco PCR*) Oligonukleotid-Sonden (*Primer*) entworfen. Die PCR-Reaktionen wurden in einem finalen Volumen von 25 μ l durchgeführt. Die Reaktionsmischung enthielt 5 μ l genomische DNA (100 ng / 5 μ l), 1 μ l jeweils von den vorwärts und rückwärts gerichteten Primern (10 μ M), 20 μ l *PCR Master Mix* (enthalten 0,2 μ l *Taq DNA Polymerase*, 2,5 μ l *10x PCR buffer* und 0,5 μ l dNTPs (10 mM) aufgefüllt mit sterilem,

nukleasefreiem H₂O). Die thermischen Bedingungen wurden entsprechend den Anforderungen der jeweiligen *Primer*-Paare optimiert. Die PCR-Reaktionen wurden in dem *S1000 Thermal Cycler S* durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR-Methode zur Genotypisierung der *FOXA2*-KO-Klone in den 1411H-Zellen angewendet. Das folgende Protokoll wurde für die Genotypisierungsstrategie optimiert und für alle Genotypisierungsversuche angewendet.

Der thermische Zyklus bestand aus einer initialen Denaturierung bei 95 °C für 15 Min, gefolgt der von 44 Zyklen von Denaturierung bei 95 °C für 30 Sek, *Annealing* bei der optimierten, *Primer*-spezifischen Temperatur für 30 Sek und einer Elongation bei 72 °C für 30 Sek durchgeführt. In einem weiteren (45.) Zyklus wurde eine Elongation bei 72 °C für 3 Min durchgeführt. Für eine Qualitätskontrolle wurde ein zusätzlicher Ansatz statt DNA mit H₂O mitgeführt und als negative Kontrolle wurde Wildtyp-DNA mitgeführt. Die amplifizierten PCR-Produkte wurden durch die Agarosegel-Elektrophorese (vgl. Kap. 2.4.2.9) analysiert. Die Gelbilder wurden mit einem Gel-Dokumentationssystem (*Intas*) erfasst, um die Größe und Integrität der PCR-Produkte zu überprüfen.

2.4.2.13 Erstellung einer Einzelzell-Bibliothek zur RNA-Sequenzierung von Einzelzellen

Für die Herstellung einer Einzelzelltropfen-Bibliothek wurden insgesamt 10.000 Einzelzellen auf dem *10X Chromium Controller*-System unter Verwendung des *Chromium Single Cell 3' NextGEM Reagent Kit v3.1* gemäß den Anweisungen des Herstellers generiert. Die RNA-Sequenzierung quantifiziert kurze Nukleinsäure-Fragmente (*Reads*), die aus einer RNA-Matrix abgeleitet werden. Die Sequenzierung wurde auf einem *NextSeq2000*-System mit einer mittleren Sequenzierungstiefe von ~ 50.000 *Reads* pro Zelle für Genexpressions-Bibliotheken durchgeführt.

Sowohl die Erstellung der Einzelzell-Bibliothek mit anschließender RNA-Sequenzierung als auch die bioinformatischen Analysen wurden in Kooperation mit Dr. Tobias Lautwein aus dem GTL der HHU-D durchgeführt.

Die Gesamtheit der Einzelzell-RNA-Sequenzierungs-Daten wurde auf der *Gene Expression Omnibus-Website* unter der Nummer GSE241060 veröffentlicht (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>, Stand 16.02.2024).

2.4.3 Protein-Analytik

2.4.3.1 Proteinextraktion aus Zellen

Für die Isolation zellulärer Proteine aus viablen Zellen wurden die Zellen gemäß Kap. 2.4.1.2 abgelöst und geerntet. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation (99 x g, 5 Min) pelletiert, anschließend mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (8000 x g, 5 Min). Die Pellets wurden mit je 50 µl bis 100 µl 1 x RIPA-Puffer inklusive Protease-Inhibitor-Cocktail (1 *cOmplete ULTRA* Tablette / 10 ml 1 x RIPA-Puffer) lysiert und 30 Min auf Eis inkubiert. Der Zelldebris wurde bei 12.000 x g und 4 °C für 10 Min sedimentiert. Die proteinhaltige Lösung (Überstand) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

2.4.3.2 BCA-Assay zur Konzentrationsbestimmung von Proteinsuspensionen

Nach der Proteinextraktion erfolgte die quantitative Bestimmung der Konzentration der Proteinsuspensionen mittels des *Pierce BCA Protein Assay-Kits*. Durch die im Kit vorliegende BSA-Verdünnungsreihe (0 µg bis 2000 µg BSA) erfolgte die Messung einer linearen Reaktionskurve, die die genaue Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Proben ermöglicht. Die zu bestimmenden Proteinsuspensionen wurden für die Messungen 1:10 in H₂O verdünnt. Die Prozedur des Assays erfolgte entsprechend der Vorgaben des Herstellers. Die BSA-Standardreihe, sowie die zu bestimmenden Proben wurden in Duplikaten (je 10 µl / 96-Well-Vertiefung) auf eine 96-Well-Platte aufgetragen und mit 200 µl der BCA-Reaktionslösung (Reagenz A + Reagenz B im Verhältnis von 1:50) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Min bei 37 °C erfolgte die Absorptionsmessung bei 570 nm in dem *iMark Microplate Reader*.

2.4.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht das Auftrennen von Proteinsuspensionen entsprechend ihres Molekulargewichts innerhalb eines feinporigen Polyacrylamidgels durch das Erzeugen eines elektrischen

Feldes. Die SDS-PAGE wurde als biochemische Identifikations- und Quantifizierungsmethode für Proteine angewendet. Das Polyacrylamidgel besteht aus zwei Schichten dessen Zusammensetzung in Tab. 29 aufgelistet wurde. Zu analysierende Protein-Suspensionen wurden jeweils auf 20 µg Protein in 12,5 µl H₂O verdünnt und mit 4 µl *Roti-Load* versetzt (Gesamtvolumen: 16,5 µl pro Ansatz). Das Probengemisch wurde für 5 Min bei 95 °C denaturiert und herunterzentrifugiert. Neben den Proben wurden 5 µl eines Protein-Größenstandards (*Page Ruler Prestained Protein Ladder*, vgl. Kap. 2.3.3) in dem 12 %-igen Polyacrylamidgel in 1 x Tris / Glycin / SDS-Laufpuffer elektrophoretisch bei einer Spannung von 99 V aufgetrennt.

	12 %-iges Trenngel	4 %-iges Sammelgel
Substanz / Konzentration	Volumen [ml]	Volumen [ml]
H ₂ O (Millipore)	3,3	3,4
Acrylamid 30 %	4	0,83
1,5 M Tris pH 8.8	2,5	-
1 M Tris pH 6,8	-	0,63
SDS 10 % (w/v)	0,1	0,05
APS 10 % (w/v)	0,1	0,05
TEMED	0,005	0,005

Tabelle 29: Zusammensetzung der Polyacrylamidgelparteien. Die Mengenangaben entsprechen der Herstellung von zwei Gelen.

2.4.3.4 Western Blot und Protein-Detektion durch Chemilumineszenz

Nach abgeschlossener SDS-PAGE-Prozedur (vgl. Kap. 2.4.3.3) wurden die größengemäß aufgetrennten Proteine mittels *Trans-Blot Turbo Transfer System* auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (*Immobilion-P*) transferiert. Dazu wurde die PVDF-Membran für 2 Min in Methanol (MeOH) aktiviert, mit H₂O (Millipore) gewaschen. Die aktivierte Membran und vier gleichgroße Filter-Papiere (*Whatman*) wurden bis zum Transferstart in 1 x Tris / Glycin-Blottingpuffer inklusive 20 % MeOH inkubiert. Für den Proteintransfer wurden je zwei *Whatman*-Papiere / PVDF-Membran / Polyacrylamidgel / zwei *Whatman*-Papiere geschichtet und in der Kassette des *Trans-Blot Turbo Transfer System* in 1 x Tris / Glycin-Blottingpuffer für 20 Min bei 25 V elektrophoretisch transferiert. Zur Prüfung des erfolgreichen Transfers wurden die Proteine auf der PVDF-Membran mittels *Ponceau-S*-Lösung (0,5 % (w/v) *Ponceau-S*

in 5 % (v/v) Essigsäure) angefärbt. Die Entfärbung erfolgte durch Waschen der Membran mit H₂O (Millipore) und PBS-T (PBS inklusive 0,1 % (v/v) *Tween20*). Die Membran wurde anschließend 60 Min bei Raumtemperatur in 50 ml Röhrchen, gefüllt mit 5 ml Blocking-Puffer (PBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v)), abgesättigt. Fortan wurde die Membran für 4 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper in Blocking-Puffer, danach dreimal in PBS-T für 5 Min und weitere 2 h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper in Blocking-Puffer inkubiert. Nach erneutem Waschen (dreimal mit PBS-T für jeweils 5 Min) wurden die Membranen mit dem Substrat (*ECL Western Blotting Substrate*) für 5 Min im Dunkeln inkubiert und anschließend mit dem *ChemiDoc Imaging System* detektiert.

2.4.3.5 Stripping von Western Blot-Membranen

Um den Nachweis von mehreren Proteinen ähnlichen Molekulargewichts zu ermöglichen, wurden die gebunden Antikörper von der Membran entfernt (*Stripping-Methode*). Die Membran wird dafür 30 Min bei 60 °C im Wasserbad in 50 ml *Stripping-Puffer* (Pro Ansatz: 390 µl β-Mercaptoethanol, 5 ml 20 % SDS (w / v), 3,125 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8.8 ad 50 ml H₂O (Millipore)) geschwenkt. Die Membran wurde nachfolgend dreimal mit PBS-T gewaschen und konnte nachfolgend, ohne eine Kreuzreaktion mit den zuvor genutzten Antikörpern hervorzurufen, erneut für die Western Blot-Prozedur (Kap. 2.4.3.4) verwendet werden.

2.4.3.6 Durchflusszytometrisches Quantifizieren und Sortieren von Zellen anhand des Oberflächenproteins CXCR4

Das Durchflusszytometer wurde für das Sortieren und Sammeln lebendiger Zellen aus einer heterogenen Zellsuspension angewendet. Zu Beginn wurden Zellen gemäß Kap. 2.4.1.2 geerntet und anschließend mit 5 ml FACS-Puffer (PBS, 2 mM EDTA, 0,5 % (w/v) BSA) gewaschen und bei 99 x g für 5 Min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert, mit einem Fluorophor-gekoppeltem Antikörper (1:100) vermischt und für 30 Min unter Schütteln bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gefärbt. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Zellen anschließend mit 1000 µl FACS-Puffer vermischt, bei 99 x g für 5 Min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen und im Zellsortierer vermessen. Während der Sortierung wurde die Zellsuspension durch eine enge Kapillare geleitet, in der die Zellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung in einzelne Zellen separiert wurde. Die Einzelzellen wurden durch eine Düsen Spitze tröpfchenweise abgegeben und anschließend mit einem oder mehreren Lasern analysiert. Tröpfchen, die Zellen gemäß der Sortierkriterien enthalten, wurden elektrisch aufgeladen und durch elektrisch geladene Ablenkplatten in ein mit Medium befülltes Auffangbehältnis geleitet. Ungeladene Tröpfchen wurden entsorgt. Wie bei der Durchflusszytometrie können die Zellen anhand von Parametern wie Vorwärtstreulicht (FSC), Seitenstreulicht (SSC) sowie spezifischen Fluoreszenzemissionen von Antikörpern, Markern und Sonden identifiziert werden. Die Zellsortierung wurde mit dem *MoFlo XDP* Zellsortierer durchgeführt, der mit 13 Lasern und Detektoren (UV-Bereich (375 nm), Blau (488 nm) und Rot (640 nm)) und der *Summit-Software* ausgestattet ist. Die Standardkonfiguration des Geräts bestand aus einer 100 µm-Düse mit einer Sortierfrequenz von 39 KHz, einem Druck von 26 PSI und einer 30-fachen Tropfenverzögerung. Die Zellen wurden anhand der Vorwärtstreue (FSC-H) im Vergleich zur Seitenstreuung (SSC-H), des Ausschlusses von Dubletten (SSC-W im Vergleich zu SSC-H) und der Positivität und Negativität des CXCR4-PE-Signals identifiziert.

2.4.4 Mikrobiologische Methoden

2.4.4.1 Produktion von Agarplatten und Bakterien-Wachstumsmedium

Für die Kultivierung von *Escherischia coli* (*E. coli*) wurden Petrischalen mit festem Agar hergestellt. Für die Expansion von einzelnen Kulturen wurde flüssiges Wachstumsmedium verwendet. Die Herstellung erfolgte jeweils aus den in Tab. 30 aufgelisteten Chemikalien und Substanzen.

Agar		LB-Flüssigmedium	
Substanz	Menge / Volumen	Substanz	Menge / Volumen
Difco Luria Agar Base, Miller	30,5 g	Difco Luria Broth Base, Miller	15,5 g
H ₂ O (Millipore)	1000 ml	H ₂ O (Millipore)	1000 ml
Ampicillin (100 mg/ml)	1 ml	Ampicillin (100 mg/ml)	1 ml

Tabelle 30: Zusammensetzung der Anzucht- und Vermehrungsmedien für *E. coli* Bakterien. Die Herstellung des Agars diente der Produktion von festen Agarplatten für die Anzucht transformierter Prokaryoten, wohingegen das LB-Flüssigmedium für die weitere Expansion einzelner Bakterienkulturen verwendet wurde.

Um Kontaminationen vorzubeugen, wurden die Medien im Autoklav bei 121 °C und 1,05 bar für 15 Min sterilisiert. Nach Abkühlen (45 bis 50 °C) des Mediums wurde das Ampicillin (1:1000) hinzugefügt und die Petrischalen mit 20 ml Medium steril befüllt. Die Zugabe des Antibiotikums zu dem flüssigen Luria Bertani (LB)-Medium erfolgte jeweils frisch vor der Verwendung. Nach Abkühlen der Platten wurden sie mit *Parafilm* abgedichtet und in einer verschließbaren Plastikfolie bei 4 °C bis zu einem Monat bis zur Verwendung gelagert.

2.4.4.2 Klonierungsstrategie der *lentiSAMv2-FOXA2*- und *SOX17*-Konstrukte

Mit dem Ziel, die *FOXA2*-Überexpression zu realisieren, wurde die nachfolgende Klonierungsstrategie für den Zielvektor *lentiSAMv2* entworfen und für alle generierten Klonierungs-Konstrukte verfolgt. Das *lentiSAMv2-SOX17*-Klonierungskonstrukt wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Hubert Schorle (Abteilung für Molekularpathologische Diagnostik, Universitätsklinikum Bonn, Bonn, Deutschland) für die hier durchgeführten Versuche bereitgestellt. Die Sequenzen der *SOX17*-adressierenden guideRNAs sind in Tab. 31 hinterlegt.

Für die Vorbereitung der Plasmid-DNA wurde der *lentiSAMv2*-Vektor mithilfe des Esp3I-Restriktionsenzym linearisiert, um offene Stellen zu erzeugen (vgl. Kap. 2.4.2.8). Anschließend wurden spezifische guideRNAs, die *FOXA2* und *SOX17* adressieren, an die offenen Stellen des Vektors (Tab. 31).

guideRNAs	
Oligonukleotidbezeichnung	Sequenz (5' → 3')
<i>FOXA2G1</i>	GCGGCGGGAAGCGCGCGGCG
<i>FOXA2G2</i>	TATGCCCCATCATTGATTCC
<i>FOXA2G3</i>	GGCAGTGCCGAGCTGCCCCG
<i>FOXA2G4</i>	GGGCTGCCGGGTGGCGGCTG
<i>SOX17G2</i>	GTGGGGTTGGACTGGGACGT

Tabelle 31: Verwendete guideRNAs. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma Aldrich Chemicals GmbH produziert. Die *SOX17G2*-Sequenz wurde durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hubert Schorle (Abteilung für Molekularpathologische Diagnostik, Universitätsklinikum Bonn, Bonn, Deutschland) an das *lentiSAMv2*-Vektorrückgrat kloniert und für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche bereitgestellt.

Dafür wurden 1 µl der vorwärts gerichteten guideRNA (3 µg/µl) mit 1 µl der rückwärts gerichteten guideRNA (3 µg/µl) und 28 µl *Annealing*-Puffer (Tab. 32) vermischt.

Annealing-Puffer	
Konzentration / Substanz	Konzentration
Kalziumacetat (KCH ₃ COO)	100 mM
M HEPES pH 7.4	30 mM
Magnesiumacetat (Mg(CH ₃ COO) ₂)	2 mM
Ad. 5 ml H ₂ O (Millipore)	

Ligationsansatz	
Substanz	Volumen [µl]
<i>lentiSAMv2</i> -DNA (4 µg)	5
10x CutSmart buffer	20
Esp3I	4
H ₂ O (Millipore)	11

Tabelle 32: Zusammensetzung des *Annealing*-Puffers und die Angabe der Bestandteile eines Ligationsansatzes. Die Volumina des Ligationsansatzes sind jeweils für eine Ligation angegeben.

Die *guideRNAs* wurden für 4 Min bei 95 °C und anschließend für 10 Min bei 70 °C im *S1000 Thermal Cycler S* an das Vektorrückgrat hybridisiert und danach 10 Min bei geöffnetem Deckel des Blockzyklers auf Raumtemperatur herunter gekühlt. Es folgte die Ligationsphase, bei der die angelagerten *guideRNAs* mit der linearisierten Vektor-DNA mithilfe des Enzyms *T4 DNA Ligase* bei 37°C über Nacht im *S1000 Thermal Cycler S* ligiert wurden (Tab. 32). Das verknüpfte *guideRNA*-Vektor-Konstrukt wird nun als Klonierungskonstrukt bezeichnet.

Zur Überprüfung der erfolgreichen Ligation wurde Kontroll-Restriktionsverdau auf einem Agarosegel (1,5 %) durchgeführt (vgl. Kap. 2.4.2.9). Gleichzeitig erfolgte eine Sanger-Sequenzierung, um den Einbau der *guideRNAs* zu verifizieren (vgl. Kap.

2.4.2.7). Das final überprüfte Klonierungskonstrukt wurde mittels der Transformation wie im folgenden Abschnitt beschrieben in *E. coli* TOP10 Bakterien eingeschleust und vermehrt (vgl. Kap. 2.4.4.3). Die erfolgreiche Amplifikation des Klonierungskonstrukts wurde erneut durch weitere Sanger-Sequenzierung verifiziert (vgl. Kap. 2.4.2.7).

2.4.4.3 Transformation kompetenter *E. coli* TOP10 Bakterien

DNA-Transformation von *E. coli* erfolgte gemäß dem Protokoll von Sambrook et al. (1989) mit einigen Modifikationen (142). Für einen Transformationsansatz wurden 25 µl kompetente Zellen mit 0,5 µl Plasmid-DNA (100 ng/µl) gemischt und in einem 1,5 ml-Röhrchen für 30 Min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden dann einem Wärmeimpuls bei 42 °C für 30 Sek ausgesetzt, gefolgt von einer sofortigen Kühlung auf Eis. Anschließend wurden 125 µl S.O.C.-Medium hinzugefügt, und die Zellen wurden bei 37 °C für eine h bei 300 rpm auf dem *Thermomixer* 5436 inkubiert. Nach der Inkubation wurden 50 µl der Bakteriensuspension je Agarplatte ausgesät und bei 37 °C über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Die auf den Agarplatten gewachsenen, transformierten Kulturen wurden durch die entsprechende Antibiotikaresistenz selektiert. Für die weitere Expansion der Einzelzell-Kolonien wurde eine Kolonie mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und in ein Plastikröhrchen mit 3 ml flüssigem LB-Medium inklusive Ampicillin (1:1000) überführt. Die Inkubation der Kultur erfolgte über Nacht bei 37 °C unter Schütteln bei 225 rpm. Für eine DNA-Isolation der Kulturen wurden 1,5 ml der aufgeschüttelten Flüssigkulturen verwendet (vgl. Kap. 2.4.2.2).

Für die weitere Expansion der Kulturen wurden 1,5 ml der aufgeschüttelten Flüssigkulturen in Erlenmeyerkolben mit 250 ml LB-Medium inklusive Ampicillin (1:1000) überführt und erneut über Nacht unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Die Isolation der Plasmid-DNA wurde mittels des *QIAGEN Maxiprep Kits* nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.4.5 Histologische Methoden

2.4.5.1 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie (IHC) wurde durchgeführt, um die Lokalisation spezifischer Proteine in den Tumorgewebeschnitten zu analysieren und zu quantifizieren. Die IHC-Färbungen wurden von dem erfahrenen Pathologen PD Dr. Felix Bremmer (Universitätsmedizin Göttingen, Institut für Pathologie, Göttingen, Deutschland) in einer Kooperation durchgeführt und analysiert. Die Tumorgewebestücke wurden in 4 % Paraformaldehyd fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Der Tumor-Paraffinblock wurde in 4-µm-Schnitte geschnitten. Als nächstes wurden die einzelnen Schnitte entparaffiniert und rehydriert und anschließend wurden Antikörperfärbungen mittels eines Antigen-Demaskierungsprotokoll durchgeführt (98 °C in EDTA-Puffer (pH 9, 20 Min)). Die Gewebeschnitte wurden blockiert um unspezifische Bindungen zu minimieren. Die Gewebeschnitte wurden 30 Min bei Raumtemperatur mit den Primärantikörpern inkubiert. Nach dem Abwaschen der Antikörperlösungen wurden die Schnitte mit den *horseradish peroxidase* (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörpern für 25 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Immunreaktion wurde unter Verwendung des *DAB + Chromogen*-Systems entwickelt. Zusätzlich erfolgte eine Hämatoxylin- und Eosin- (HE) Färbung (*Hematoxylin solution acc. to Gill 2* und *Eosin Y Solution Alcoholic*-Färbelösungen) für die Visualisierung verschiedener Gewebestrukturen.

Die gefärbten Gewebeschnitte wurden schließlich mittels Hellfeldmikroskopie geprüft und untersucht. Die Bilder wurden unter standardisierten Bedingungen erfasst und für die quantitative Auswertung analysiert. Die Auswahl und die Verdünnungen der verwendeten Antikörper wurden auf Grundlage vorheriger Forschungen von Dr. Felix Bremmer getroffen.

2.4.6 *In silico*-Methoden

2.4.6.1 Design und Herstellung von Oligonukleotiden für die cDNA-Synthese

Die Oligonukleotide für die qRT-PCR (vgl. Kap. 2.3.9 und 2.4.2.11) wurden aus der *PrimerBank*-Datenbank (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/index.html>) übernommen (143). Wenn dort keine bereits etablierten Gensequenzen in der verfügbaren *PrimerBank*-Datenbank verfügbar waren, wurde die benötigte Gensequenz mit Hilfe der *Ensembl*-Datenbank (<https://www.ensembl.org/index.html>) festgestellt und kopiert (144). Die identifizierten Gensequenzen wurden in das *Online-Tool Primer3Plus* (<https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>) eingeschleust um entsprechende *Primer*-Paare zu erstellen (145). Die benötigten Parameter wurden auf die optimale Größe (20 Bp), die Schmelztemperatur (60 °C), den GC-Gehalt (50 %) und eine Produktgröße von 50 bis 250 Bp eingestellt. Um die Amplifikation von genomischer DNA zu vermeiden, wurden die *Primer*-Sequenzen so ausgewählt, dass sie Exon-übergreifend liegen. Die Gen-spezifische Sequenz wurde mittels des *Online-Tools in silico PCR* (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>) untersucht (146).

Die erstellten *Primer*-Paare wurden von Sigma-Aldrich Chemicals GmbH (Taufkirchen, Deutschland) hergestellt (vgl. Tab. 9 für die Auflistung der verwendeten Sequenzen).

2.4.6.2 Re-Analyse von *Microarray*-Daten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits veröffentlichte Daten zur Genexpression in EC- und YST-Geweben für die Identifikation möglicher Oberflächenproteine erneut analysiert. Die Datenerhebung und Analysen wurden in der Publikation von Wruck et al. durchgeführt und veröffentlicht (61).

3. Ergebnisse

In früheren Forschungsarbeiten wurde der Transkriptionsfaktor und Differenzierungsfaktor SOX17 als ein entscheidender Initiator in der YST-Entwicklung identifiziert (vgl. Kap. 1.1.4, Abb. 3 - 6) (61). Im Vergleich zur Vorläuferläsion (EC) wurde eine verstärkte Expression von Signalwegsmolekülen der BMP-, FGF-, MAPK-, TGF-beta- und WNT-Signalwege beobachtet, was die Differenzierung in YST begünstigte (Abb. 3, Abb. 6). Um die Transformation von EC- zu YST-ähnlichen Zellen zu überprüfen, wurden EC- und YST-assoziierte Marker verwendet. Zur Gewährleistung der Unterscheidung zwischen den verschiedenen Subtypen (EC und YST) anhand der ausgewählten Marker wurde die basale Genexpressionsintensität der betreffenden Faktoren in den verwendeten EC-Zelllinien (2102EP, 833KE, GCT27, NCCIT, NT2/D1) und YST-Zelllinien (1411H, GCT72) im Vergleich zu YST-Gewebeproben (n = 4) gemessen (Abb. 9). Es wurden YST-spezifische Genexpressionsmuster (*APOA1*, *CXCR4*, *FOXA2*, *GATA6*, *SOX17*) identifiziert, die sowohl in den YST-ähnlichen Zelllinien (1411H, GCT72) als auch in den YST-Gewebeproben nachweisbar waren (Abb. 9). Im Gegensatz dazu wurde die Expression von Pluripotenzfaktoren (*NANOG*, *OCT3/4*, *SOX2*) in den EC-Zellen in Zelllinien-spezifischer Ausprägung bestätigt, während in den YST-Zelllinien und -geweben keine Expression dieser Faktoren nachgewiesen wurde (Abb. 9). Folglich ermöglichen die ausgewählten Pluripotenz- und YST-Marker eine Unterscheidung der Subtypen (EC und YST).

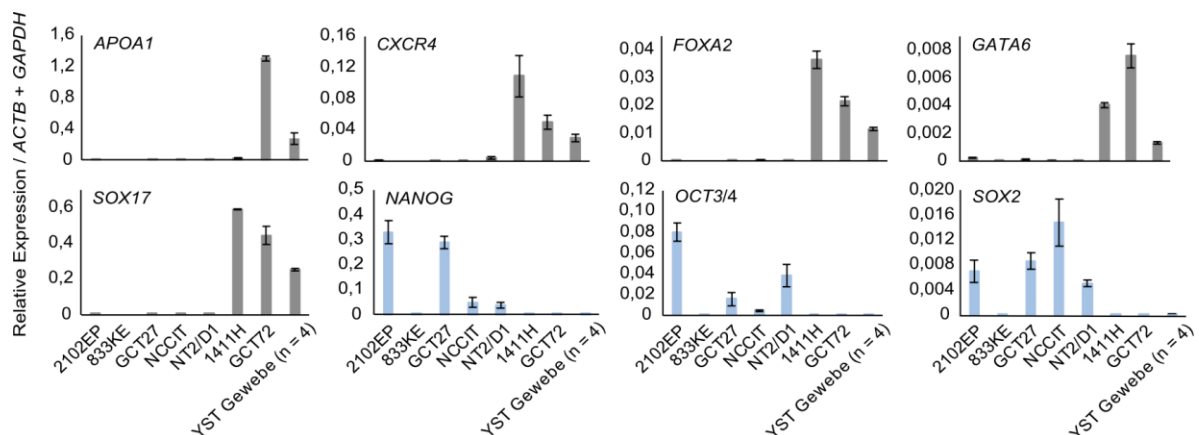


Abbildung 9: Genexpressionsanalyse von YST- und Pluripotenz-Markergenen. Die basalen Genexpressionsintensitäten von YST-assoziierten Genen (*APOA1*, *CXCR4*, *FOXA2*, *GATA6*, *SOX17*) und Pluripotenzgenen (*NANOG*, *OCT3/4*, *SOX2*) wurden in verschiedenen GCT-Zelllinien und YST-Geweben analysiert, dabei wurden EC-Zellen (2102EP, 833KE, GCT27, NCCIT und NT2/D1), EC-YST-

Intermediäre-Zellen (1411H), YST-Zellen (GCT72) und YST-Gewebeproben (n = 4) inkludiert. Die *Housekeeping*-Gene *ACTB* und *GAPDH* wurden zur Normalisierung der Daten verwendet.

Für die gezielte Induktion der YST-spezifischen Differenzierung in EC-Zellen wurde das CRISPR/dCas9-SAM-System eingesetzt, um die endogene Expression von *SOX17* zu stimulieren. Für die geplante Imitation der YST-Differenzierung *in vitro* wurde zunächst die Überexpression von *SOX17* / *SOX17* in fünf EC-Zelllinien (biologische Replikate: 2102EP, 833KE, GCT27, NCCIT und NT2/D1) etabliert. Die Wirksamkeit dieser Induktion wurde über einen Zeitraum von 96 h sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene überwacht und erfolgreich nachgewiesen (Abb. 10 A / B). Neben der steigenden Genexpressionsintensität von *SOX17* in den analysierten EC-Zellen wurde auch eine zunehmende Akkumulation von *SOX17*-Protein über den Zeitraum von 96 h festgestellt, während das *Housekeeping*-Protein Vinculin konstant blieb (Abb. 10 B).

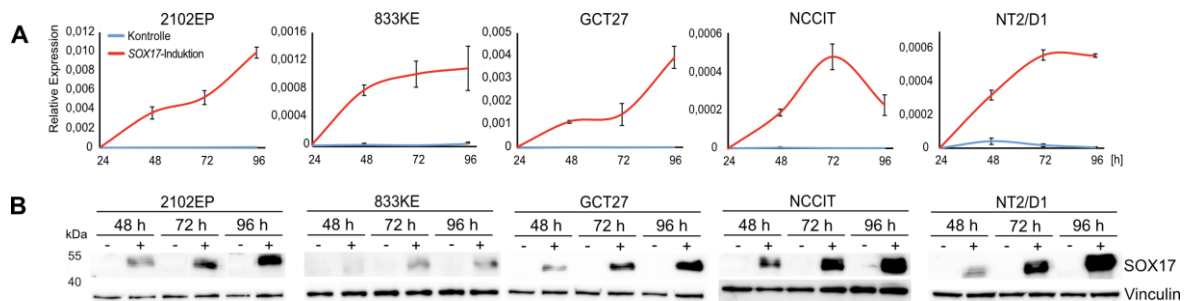


Abbildung 10: Etablierung der *SOX17* / *SOX17*-Induktion auf RNA- und Proteinebene. A: *SOX17*-Genexpressionsanalyse in EC-Zellen (2102EP, 833KE, GCT27, NCCIT und NT2/D1) über 96 h nach der LVP-vermittelten Induktion von *SOX17*. Die rote Linie zeigt die LVP-behandelten Proben und die blaue Linie stellt die Lösungsmittelkontrolle dar. Für die Normalisierung wurden *ACTB* und *GAPDH* als *Housekeeping*-Gene verwendet. B: Proteinniveau von *SOX17* nach der LVP-vermittelten *SOX17* / *SOX17*-Induktion (+) im Vergleich mit den parentalen Lösungsmittel-behandelten EC-Zellen (-) 2102EP, 833KE, GCT27, NCCIT und NT2/D1 über 96 h. Als *Housekeeping*-Protein wurde Vinculin verwendet.

Im folgenden Schritt wurden die YST-spezifischen Gene *APOA1*, *CST1*, *DUSP4*, *FOXA2* und *GATA6* und die EC- / Pluripotenzgene *NANOG*, *OCT3/4* und *SOX2* auf Veränderungen in ihrer Genexpressionsintensität in einer Kinetik von 48 h bis 96 h nach der initialen *SOX17* / *SOX17*-Induktion untersucht (Abb. 11).

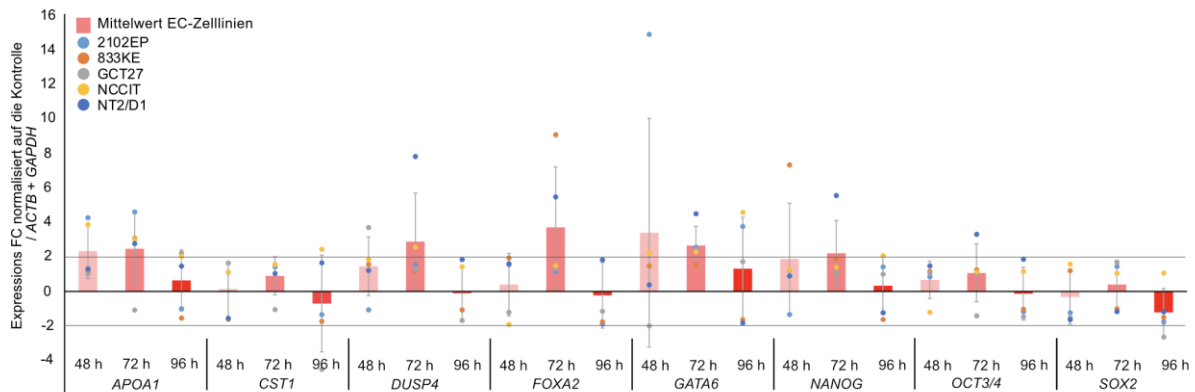


Abbildung 11: Genexpressionsanalyse von YST- und Pluripotenz-Markergenen im zeitlichen Verlauf nach der *SOX17* / *SOX17*-Induktion. Die Genexpressionsanalyse der dargestellten YST-assoziierten Gene (*APOA1*, *CST1*, *DUSP4*, *FOXA2*, *GATA6*) und Pluripotenzfaktoren (*NANOG*, *OCT3/4*, *SOX2*) wurde mittels qRT-PCR in den EC-Zelllinien 2102EP (hellblaue Punkte), 833KE (orangene Punkte), GCT27 (graue Punkte), NCCIT (gelbe Punkte) und NT2/D1 (dunkelblaue Punkte) nach der Induktion von *SOX17* / *SOX17* bestimmt. Die Balken stellen die Mittelwerte der Expressionsfaltveränderungen zu der Lösungsmittelkontrolle der fünf analysierten EC-Zelllinien (dargestellt durch die Punkte unterschiedlicher Farbe) dar. Die graue Linie markiert die Expressionsveränderung (FC) von -2 / 2. Für die Normalisierung der Genexpression wurden die *Housekeeping*-Gene *ACTB* und *GAPDH* verwendet.

Die Genexpressionsanalyse zeigte eine leichte, temporäre Heraufregulation von *APOA1*, *DUSP4*, *FOXA2* und *GATA6* mit einem FC von > 2 , die jedoch nach 96 h wieder abnahm (Abb. 11). Eine Verminderung der Expression der Pluripotenzmarker *NANOG* und *SOX2* wurde lediglich im Mittelwert der untersuchten EC-Zellen durch eine leichte Abnahme der Genexpressionsintensität nach 96 h beobachtet (Abb. 11). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass zusätzliche Reize für eine effektive YST-ähnliche Differenzierung erforderlich sind.

Die Verstärkung des YST-Zellschicksals sollte durch die Aktivierung oder Hemmung der BMP-, FGF-, MAPK-, TGF-beta- und WNT-Signalwege mittels rekombinanter Signalproteine erreicht werden. Als nächster Schritt wurden die individuellen Effekte von rekombinanten Signalproteinen und Inhibitoren als Stimuli der BMP-, FGF-, MAPK-, TGF-beta- und WNT-Signalkaskaden untersucht. Die EC-Zelllinie NCCIT wurde als Modell-Zelllinie für die initialen Tests verwendet. Die Substanzen wurden

den Zellen durch tägliche Mediumwechsel zugeführt, wobei die Behandlung der EC-Zellen entweder aktivierend (a) oder inhibierend (i) auf die BMP- (a: BMP2, BMP4; i: NOGGIN), FGF- (a: FGF2 / FGF4 + Heparin), MAPK- (i: SCH772984), TGF-beta- (a: Activin-A) und WNT- (a: WNT3a, WNT5a, CHIRON; i: XAV-939) Signalkaskaden wirkte. Nach 96 h wurden die Zellen hinsichtlich der YST-spezifischen und Pluripotenz-assoziierten Genexpressionsintensitäten analysiert. Die Aktivierung / Inhibition der Signalwege resultierte in geringfügigeren Veränderungen der YST-spezifischen und Pluripotenz-assoziierten Genexpression (Abb. 12).

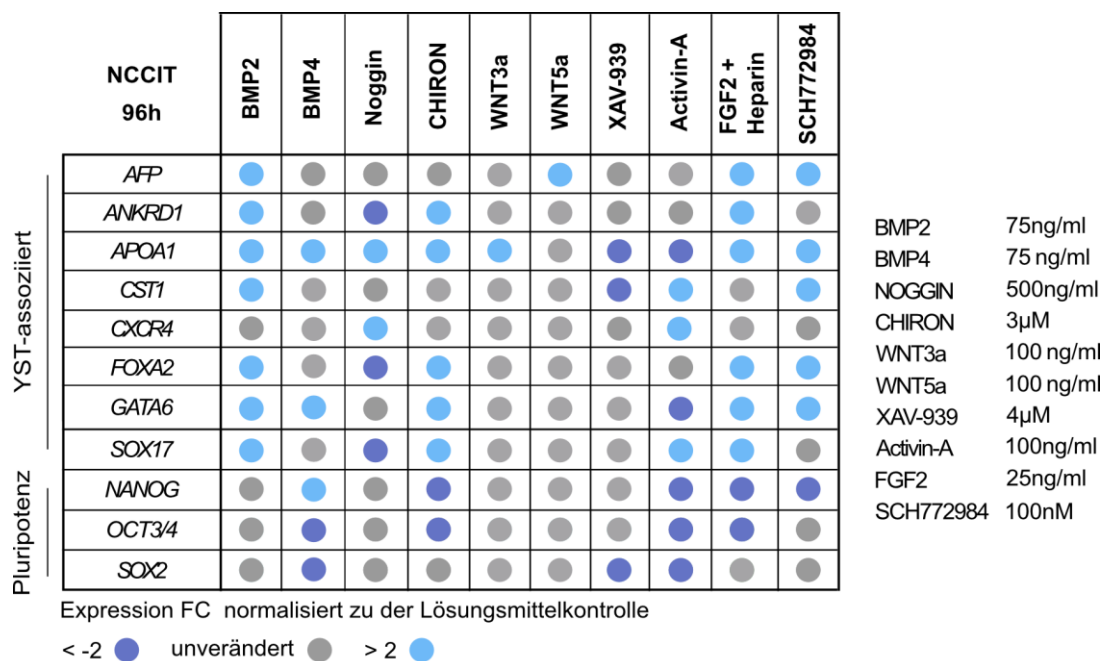


Abbildung 12: Graphische Darstellung der Genexpressionsanalyse nach Stimulation differenzierungsfördernder Signalkaskaden. Die Genexpressionsanalyse zeigt die Veränderungen in der Expression (FC) von YST- und Pluripotenz-assoziierten Faktoren in NCCIT-Zellen am vierten Tag nach der Stimulation mit den angegebenen rekombinanten Proteinen oder Inhibitoren in den rechts von der Grafik angegebenen Konzentrationen. Veränderungen mit einem FC von mindestens -2 sind in dunkelblau markiert, unveränderte Expressionen in grau und FC > 2 in hellblau. *ACTB* und *GAPDH* wurden als *Housekeeping*-Gene und zur Normalisierung verwendet.

Die Aktivierung des BMP-Signalwegs wurde stärker durch rekombinantes BMP2 als durch BMP4 in die Richtung des YST-assoziierten Genexpressionsmusters gelenkt. Insbesondere BMP2 konnte die verstärkte Expression (FC > 2) von *AFP*, *ANKRD1*, *APOA1*, *CST1*, *FOXA2*, *GATA6* und *SOX17* modulieren. Die BMP-Signalinhibition mittels rekombinantem NOGGIN führte hauptsächlich zu einer Hemmung der Expression der YST-assoziierten Differenzierungsfaktoren *FOXA2* und *SOX17*. Daher scheint die Aktivierung des BMP-Signalwegs durch BMP2 ein möglicher Stimulus zu

sein für die Entwicklung von EC-Zellen in Richtung des YST-Zellschicksals, während die Inhibition des BMP-Signalwegs den gegenläufigen Effekt erzielt (Abb. 12).

Die Stimulation des WNT-Signalwegs zeigte die stärksten Effekte durch die Applikation des GSK3-Inhibitors CHIRON, indem neben den postulierten YST-Schlüsselfaktoren *FOXA2* und *SOX17* weitere YST-assoziierte Gene wie *ANKRD1*, *APOA1* und *GATA6* heraufreguliert wurden ($FC > 2$), während gleichzeitig eine Repression ($FC < -2$) von *NANOG* und *OCT3/4* beobachtet wurde (Abb.12). Die Applikationen von weiteren WNT-Signalkomponenten, wie rekombinantem WNT3a, WNT5a, und dem pharmakologischen WNT-Inhibitor XAV-939, hatten sowohl hinsichtlich einer YST-spezifischen Genexpression als auch auf die Pluripotenz der Zellen keine bedeutenden Effekte (Abb. 12).

Die Aktivierung des TGF-beta-Signalwegs mittels Activin-A führte zu einer *SOX17*-Induktion. Die Behandlung mit Activin-A bewirkte außerdem eine Heraufregulation der YST-assoziierten Faktoren *CST1* und *CXCR4* ($FC > 2$), begleitet von einer Repression ($FC < -2$) der Pluripotenzgene *NANOG*, *OCT3/4* und *SOX2* (Abb. 12).

Durch die Stimulation der FGF-Signaltransduktion durch rekombinantes FGF2 in Kombination mit Heparin wurde eine Bandbreite an YST-Faktoren (*AFP*, *ANKRD1*, *APOA1*, *FOXA2*, *GATA6* und *SOX17*) mit einem Expressionsanstieg von $FC > 2$ induziert. Ebenfalls wurde durch die FGF2-Heparin-Behandlung eine Abnahme der Expressionsintensität der Pluripotenzfaktoren *NANOG* und *OCT3/4* herbeigeführt (Abb. 12).

Nach der Inhibition des MAPK-Signalwegs mit dem pharmakologischen ERK1/2-Inhibitor SCH772984 wurde eine Verminderung der Genexpression des Pluripotenzfaktors *NANOG* festgestellt ($FC < -2$), während eine heraufregulierte Genexpression ($FC > 2$) der YST-spezifischen Faktoren *AFP*, *APOA1*, *CST1*, *FOXA2* und *GATA6* gemessen wurde (Abb. 12).

Die Einzelbehandlungen mit rekombinantem BMP2, CHIRON, rekombinantem Activin-A, rekombinantem FGF2 in Kombination mit Heparin und SCH772984 zeigten allgemein die vielversprechendste Stimulation von YST-assoziierten Genen (Abb. 12).

Im weiteren Verlauf wurden zusätzlich zu den zuvor getesteten Stimuli der Signalwege verschiedene Zellkulturmedien und -bedingungen untersucht um die bestmögliche

YST-assoziierte Differenzierung zu erreichen. Die Behandlung von EC-Zellen in verschiedenen Kulturmedien mit unterschiedlichen Zusätzen (N2B27 + 10 % FCS; N2B27 + 20 % *KnockOut*-Serumersatz (KOSR); RPMI / DMEM + 5 % / 20 % KOSR; RPMI / DMEM + 10 % FCS + B27-Zusatz) wurde von vergleichbaren Forschungsstudien von Markouli et al. und Mackinlay et al., in denen pluripotente Stammzellen in das Endoderm oder Dottersack-Zellschicksal differenziert wurden, abgeleitet (147). Jedoch hatten die durchgeführten Versuche mit den unterschiedlichen Medien und Medienzusätzen basierend auf Morphologie und Expression von YST-assoziierten Faktoren entweder keinen wesentlichen Einfluss auf den YST-ähnlichen Differenzierungsprozess selbst oder führten zu einer reduzierten Zellviabilität oder gesteigerter Apoptose-Induktion im Vergleich zum Standard-Kulturmedium. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde festgelegt, dass das YST-Differenzierungsprotokoll routinemäßig im Standard-Kulturmedium der betreffenden Zelllinie durchgeführt werden sollte (vgl. Kap. 2.3.6, Tab. 6).

Im nächsten Schritt wurden die effektivsten Signalfaktoren (Activin-A, BMP2, CHIRON, FGF2 und Heparin) mit der Induktion von SOX17 / SOX17 in Doppel-, Dreifach- oder Vierfachkombinationen über einen Zeitraum von acht Tagen in der EC-Zelllinie NCCIT getestet, um zu prüfen, ob die Mehrfach-Stimulation zu einem stärkeren YST-assoziierten Genexpressionsprofil führen kann (Abb. 13 A).

Darüber hinaus wurden verschiedene Zeitpunkte für die SOX17 / SOX17-Induktion getestet. Die Ansätze um fassten die Induktion von SOX17 / SOX17 am ersten Tag des Experiments t, wobei in dieser Protokollvariante die rekombinanten Signalproteine ab dem zweiten Tag bis zum achten Tag alle 48 h erneuert wurden (Abb. 13 A / B). In einem zweiten Ansatz wurden die Kombinationen gleich gehalten, jedoch wurde die SOX17 / SOX17-Induktion am dritten Tag durchgeführt (Abb. 13 A / C).

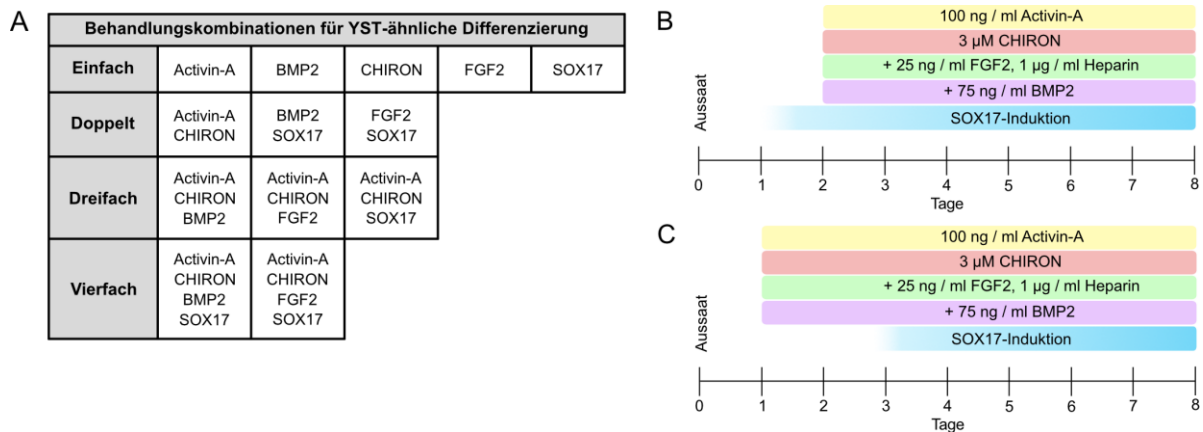


Abbildung 13: Schema der durchgeführten Kombinationsbehandlungen für die YST-ähnliche Differenzierungsreaktion aus EC-Zellen. A: Darstellung der getesteten Kombinationsbehandlungen für die Etablierung des YST-Differenzierungsprotokolls. B: Modellvariante des YST-Differenzierungsprotokolls unter Applikation der aufgelisteten rekombinanten Proteine / Inhibitoren und einer SOX17 / SOX17-Induktion am ersten Tag des Protokolls. C: Modellvariante des YST-Differenzierungsprotokolls unter Applikation der aufgelisteten rekombinanten Proteine / Inhibitoren und einer SOX17 / SOX17-Induktion am dritten Tag des Protokolls.

Die morphologischen Veränderungen der behandelten Zellen zeigten unterschiedlich ausgeprägte makroskopische Effekte. Nach vier Tagen begannen die Zellen sich morphologisch zu verändern. In den Zellen der unterschiedlichen Versuchsansätze kam es zur Ausbildung von Zellstrukturen wie Lamellipodien und Filopodien. Die Zellpopulationen waren generell aufgelockert und es wurden polygonale Zelltypen und auch spindelförmige Zellen beobachtet im Gegensatz zu der stammzellartig wachsenden Lösungsmittelkontrolle mit kleinen kompakten Zellmorphologien (Abb. 14). Die morphologischen Veränderungen häuften sich über die Versuchsdauer von acht Tagen an und die Unterschiede zu der Kontrollpopulation intensivierten sich stetig. Somit erwies sich der Versuchsaufbau von acht Tagen mit einer Applikation der rekombinanten Signalfaktoren in zeitlichen Abständen von 48 h als eine sinnvolle Versuchsanpassung, die für die nachfolgenden Differenzierungs-Experimente beibehalten wurde.

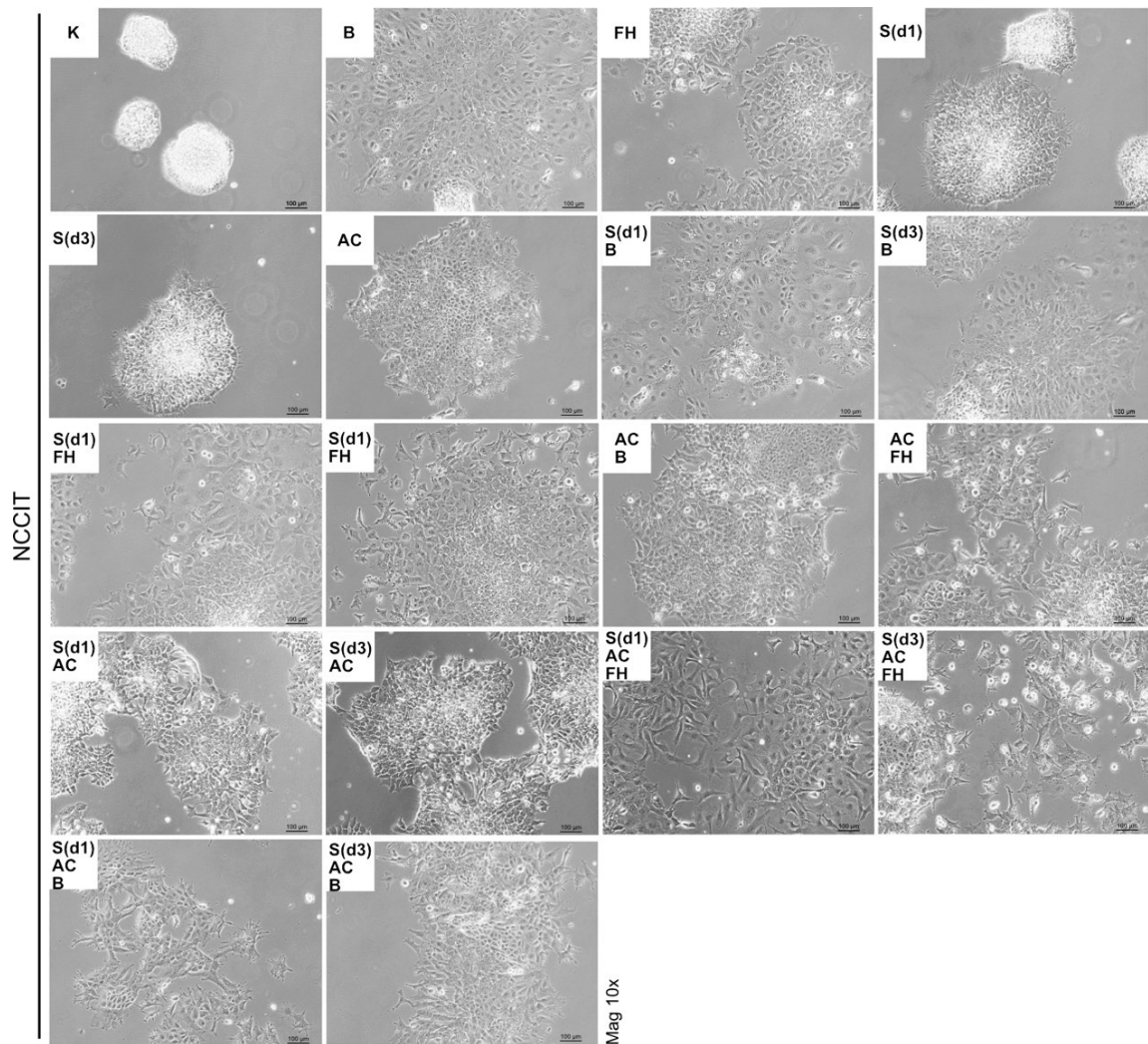


Abbildung 14: Makroskopische Dokumentation von NCCIT-Zellen unter Behandlung mit den Einzel-, Doppel-, Dreifach- und Vierfachkombinationen des YST-Differenzierungsprotokolls. Die Fotos wurden am achten Tag des Versuchs mit der jeweiligen Behandlungssubstanz (oben links an dem Bildrand vermerkt) aufgenommen und mit der Lösungsmittelkontrolle (K) verglichen. Die Zellen wurden entweder mit einer Einfach-, Zweifach-, Dreifach- oder Vierfachkombination aus der SOX17 / SOX17-Induktion am ersten Tag (d1) des oder am dritten Tag (d3) Experiments, einer Applikation von Activin-A (A), BMP2 (B), CHIRON (C), FGF2 (F) und Heparin (H) für acht Tage im Abstand von 48 h behandelt. Die Fotos wurden mit einer zehnfachen Vergrößerung (Mag 10x) im Hellfeldmikroskop aufgenommen. Die Länge des Skalenbalken beträgt 100 µm.

Um potenzielle, molekulare Veränderungen im Hinblick auf eine Differenzierungsreaktion der EC-Zellen in Richtung des YST-Zellschicksals zu untersuchen, wurden die isolierten Zellen nach den verschiedenen Behandlungsansätzen einer Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR unterzogen. Zur Beurteilung der Differenzierungseffizienz in der Richtung des YST-Zellschicksals wurden YST-assoziierte Faktoren (*APOA1*, *CST1*, *FOXA2*, *GATA6* und *SOX17*) ebenso analysiert wie die Expressionsintensitäten von Pluripotenzfaktoren (*NANOG*, *OCT3/4*, *SOX2*) (Abb. 15).

Die Genexpressionsanalysen wurden nach jedem Versuchsansatz nach acht Tagen durchgeführt.

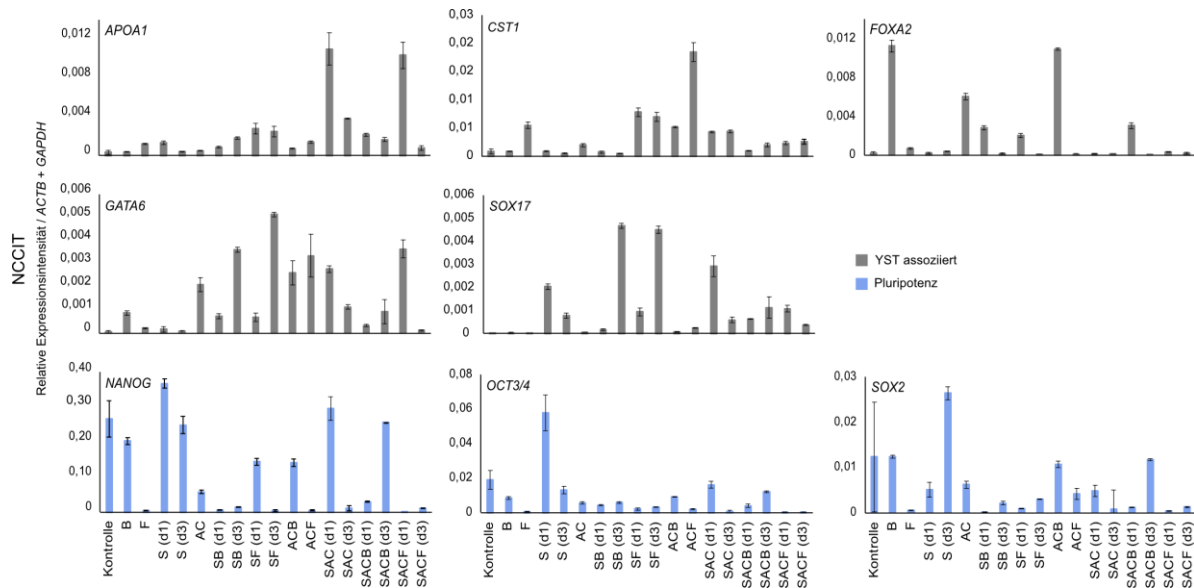


Abbildung 15: Genexpressionsanalyse der YST- und Pluripotenz-Markgenexpression in NCCIT. Die NCCIT-Zellen wurden mit den unterschiedlichen Einzel-, Doppel-, Dreifach- und Vierfachkombinationen aus der SOX17 / SOX17-Induktion am ersten Tag (d1) oder am dritten Tag (d3) des Experiments, Activin-A (A), CHIRON (C), BMP2 (B), FGF2 und Heparin (F) für acht Tage im zeitlichen Abstand von 48 h behandelt. Die YST- (in grau dargestellt) und Pluripotenz- (in blau dargestellt) assoziierten Markergene wurden am achten Tag des Protokolls vermessen. Für die Normalisierung wurden die *Housekeeping*-Gene *ACTB* und *GAPDH* verwendet.

In den verschiedenen Behandlungsansätzen wurde eine Heraufregulation der untersuchten YST-assoziierten Gene im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle festgestellt (Abb. 15). Insbesondere fiel die deutliche Induktion von *APOA1* auf, die durch die Kombination aus der SOX17 / SOX17-Induktion am ersten Tag des Protokolls (d1), Activin-A und CHIRON sowie der zusätzlichen Kombination mit FGF2 und Heparin (Abb. 15) erreicht wurde. Die *CST1*-Expression wurde hauptsächlich durch die FGF2-Heparin-Behandlung induziert. Darüber hinaus führten Kombinationen aus der SOX17 / SOX17-Induktion (d1 / d3) und FGF2 und Heparin, sowie alle untersuchten Dreifach- und Vierfachkombinationen, zu einer vergleichbaren Intensitätssteigerung der *CST1*-Expression (Abb. 15). Die Induktion von *FOXA2* wurde durch die Applikation von BMP2 im Einzelansatz, die Kombination aus Activin-A und CHIRON oder durch die Behandlungen mit BMP2 kombiniert mit der Induktion der SOX17-Überexpression (d1) und der zusätzlichen Zugabe von Activin-A und CHIRON nachgewiesen (Abb. 15). *GATA6* wurde durch die Behandlung mit BMP2, FGF2 mit Heparin oder durch die alleinige Induktion von SOX17 / SOX17 geringfügig

heraufreguliert. Jedoch wurden moderate bis starke *GATA6*-Genexpressionsintensitäten infolge der Kombinationen aus *SOX17* / *SOX17*-Induktion (d1 / d3) und BMP2, Activin-A, CHIRON und FGF2 mit Heparin gemessen (Abb. 15). Insbesondere die Kombinationen aus der *SOX17* / *SOX17*-Induktion (d3) gefolgt von der Behandlung mit FGF2 und Heparin und die Kombination aus der *SOX17* / *SOX17*-Induktion (d1) kombiniert mit Activin-A und CHIRON und der Vierfachkombination aus *SOX17* / *SOX17*-Induktion (d1), Activin-A, CHIRON und FGF2 mit Heparin resultierten in einer starken *GATA6*-Heraufregulation (Abb. 15).

Die in YST zu erwartende Herunterregulation der Pluripotenzfaktoren im Vergleich zur Kontrolle wurde vor allem durch die Kombinationsbehandlung der *SOX17* / *SOX17*-Induktion, Activin-A, CHIRON und FGF2 mit Heparin effizient erreicht (Abb. 15). Generell wurde festgestellt, dass die Protokollvarianten, in der *SOX17* / *SOX17* am ersten Tag induziert wird, stärkere YST-assoziierte Genexpressionsmuster hervorruft als bei einer zeitversetzten Induktion am dritten Tag (Abb. 15).

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die Dreifachkombination, bestehend aus der *SOX17* / *SOX17*-Induktion kombiniert mit Activin-A und CHIRON (SAC), sowie die Vierfachkombination, die zusätzlich FGF2 und Heparin enthält (SACF), als effektive Behandlungsansätze für das Auslösen der YST-ähnlichen Differenzierung identifiziert. Beide Ansätze (SAC, SACF) mit der *SOX17* / *SOX17*-Induktion (d1) durchgeführt, zeichnen sich dadurch aus, dass sie insgesamt die meisten YST-assoziierten Faktoren induzieren, die Pluripotenz vermindern und zudem eine hohe Zellviabilität während des Experiments gewährleisten (Abb. 15). In einem weiteren Versuchsansatz wurde die Stabilität bzw. Halbwertszeit der supplementierten Signalfaktoren Activin-A und CHIRON getestet, um zu bestimmen, ob die aktive Signaltransduktion von Activin-A und CHIRON über die gesamte Versuchsdauer von acht Tagen aufrechterhalten werden muss um die EC-Zellen optimal und effizient in die YST-Richtung zu transformieren. Dafür wurde eine weitere Versuchsreihe mit den identifizierten vielversprechendsten Kombinationen (SAC und SACF) durchgeführt, bei der die Zugabe von Activin-A und CHIRON am zweiten Tag und am vierten Tag des Protokolls statt bisher am dem zweiten, vierten und sechsten Tag (die Behandlung erfolgte im Abstand von 48 h) des Experiments erfolgte (Abb. 16).

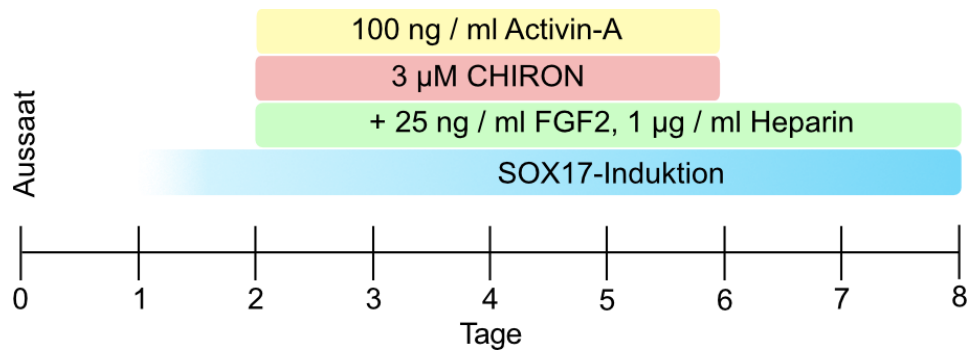


Abbildung 16: Protokollvariante des YST-Differenzierungsprotokolls. Das Protokoll beinhaltet die Applikation der aufgelisteten rekombinanten Proteine / Inhibitoren und der SOX17 / SOX17-Induktion am ersten Tag des Protokolls. Activin-A und CHIRON wurden am zweiten und vierten Tag appliziert, FGF2 und Heparin wurde am zweiten, vierten und sechsten Tag hinzugefügt.

Die Zellen, die den Vierfachkombinationen (S(AC)F, SACF) ausgesetzt waren, zeigten stärkere morphologische Veränderungen von einer dicht gepackten, stammzellartigen Zellpopulation zu einer aufgelockerten Zellpopulation im Vergleich zu den Zellen, die den Dreifachkombinationen (S(AC), SAC) ausgesetzt waren und vielmehr ein ähnliches Wachstumsverhalten wie die Kontrollzellen aufwiesen (Abb. 17 A). Die Zellen in den Dreifachkombinations-Ansätzen zeigten kleinere und rundere Zellen, während diejenigen, die der Vierfachkombination ausgesetzt waren, größere, leicht durchscheinende und zusätzlich spindelförmige Zellen aufwiesen (Abb. 17 A). Darüber hinaus wurden am achten Tag des Experiments unterschiedliche Zellzahlen nach der Zellernte mittels der Trypanblau-basierten Zellzählmethode im automatischen Zellzähler TC20 ermittelt. Die Zellzahlen geben Aufschluss über die Proliferationsrate der Zellen, und sowohl unter der Behandlung mit Dreifach- als auch mit Vierfachkombinationen wuchsen die Zellen langsamer im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 17 B).

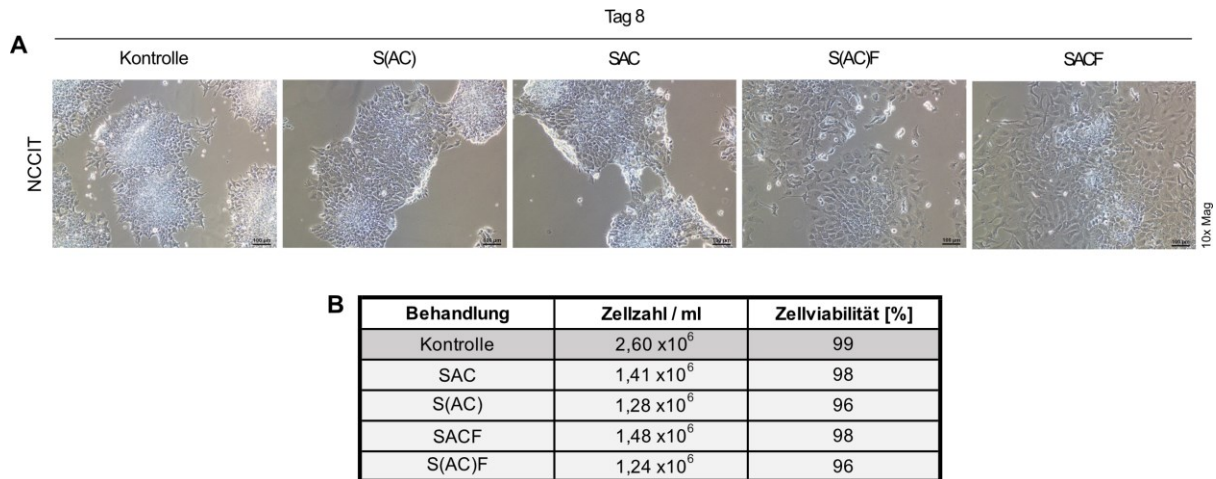


Abbildung 17: Analyse von NCCIT-Zellen nach der Behandlung mit unterschiedlichen Varianten des YST-Differenzierungsprotokolls. A: Makroskopische Dokumentation der morphologischen Merkmale in NCCIT-Zellen nach den unterschiedlichen Behandlungskombinationen des YST-Differenzierungsprotokolls. Die Zellen wurden zweimal mit der Dreifachkombination S(AC) aus der SOX17 / SOX17-Induktion (S) am ersten Tag des YST-Differenzierungsprotokolls und zusätzlich mit Activin-A (A) und CHIRON (C) behandelt. Die Zellen wurden zweimal mit der Vierfachkombination S(AC)F aus der S am ersten Tag des YST-Differenzierungsprotokolls und zusätzlich mit A und C behandelt. Die SAC- und SACF-Behandlung wurde dreimal innerhalb der acht Tage appliziert. Die Aufnahmen wurden am achten Tag des Experiments in einer 10-fachen Vergrößerung aufgenommen (10x Mag). Die Länge des Skalenbalken beträgt 100 µm. B: Dokumentation der am achten Tag des YST-Differenzierungsprotokolls isolierten Zellzahlen mit Angabe der Zellviabilität der SAC, S(AC), S(AC)F, SACF behandelten NCCIT-Zellen.

Im Allgemeinen wurde nach jeder durchgeführten Behandlung mit den Dreifach- und Vierfachkombinationen (S(AC) / SAC / S(AC)F / SACF) sowohl bei der zweifachen als auch bei der dreifachen Zugabe von Activin-A und CHIRON eine Steigerung der YST-spezifischen Genexpressionsmuster in den Zellen beobachtet. Die Genexpressionsintensitäten der YST-spezifischen Faktoren *APOA1*, *CXCR4* und *SOX17* wurden in jedem getesteten Versuchsansatz (SAC, S(AC), SACF und S(AC)F) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle deutlich heraufreguliert (Abb. 18). Die Gene *CST1* und *GATA6* wurden ausschließlich von den Vierfachkombinationsbehandlungen mit der zusätzlichen Zugabe von FGF2 und Heparin induziert und zeigten somit eine Steigerung der Genexpression in fünf von sechs geprüften YST-assoziierten Genen (*APOA1*, *CST1*, *CXCR4*, *GATA6*, *SOX17*). Die Pluripotenzfaktoren wurden durch die Applikation der Vierfachkombinationen (SACF und S(AC)F) stärker inhibiert im Vergleich zu den Dreifachbehandlungen (Abb. 18).

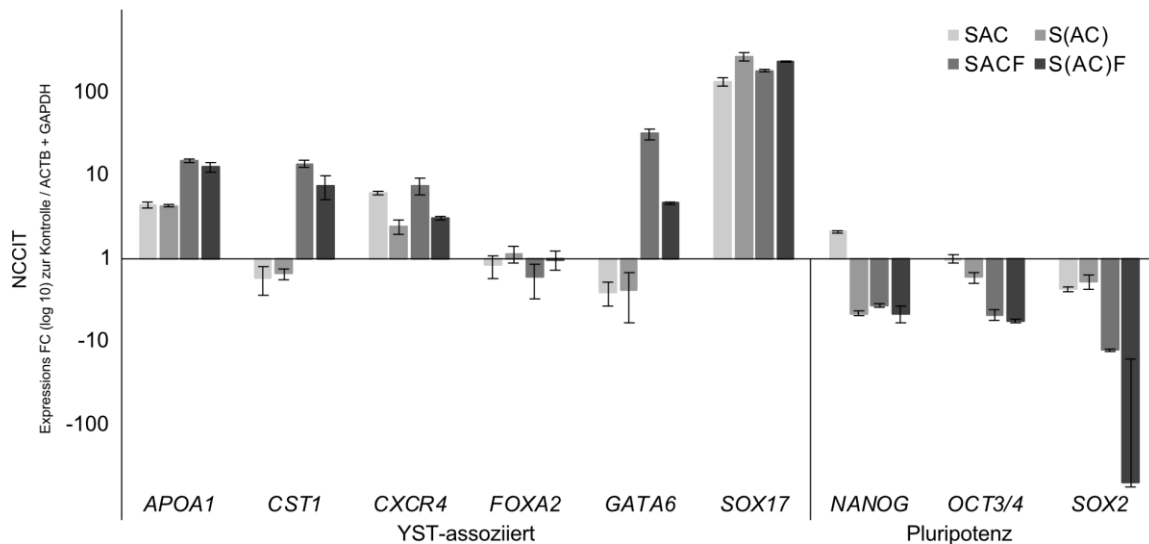


Abbildung 18: Genexpressionsanalyse von YST- und Pluripotenzmarkergenen nach der Behandlung mit unterschiedlichen Varianten des YST-Differenzierungsprotokolls. Die Expressionsveränderung (FC) (log10-Skala) von YST-assoziierten Genen (*APOA1*, *CST1*, *CXCR4*, *FOXA2*, *GATA6*, *SOX17*) und Pluripotenzgenen (*NANOG*, *OCT3/4*, *SOX2*) wurde am achten Tag der SAC, S(AC), S(AC)F und SACF-Behandlung, auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle bezogen, in NCCIT-Zellen bestimmt. Für die Normalisierung wurden die *Housekeeping*-Gene *ACTB* und *GAPDH* verwendet.

Die morphologische Beobachtung der Zellen während der Versuchsdurchführung zeigte ebenfalls eine erhöhte Zellviabilität unter Behandlung mit FGF2 und Heparin zusätzlich zu der *SOX17* / *SOX17*-Induktion und der Applikation von Activin-A und CHIRON.

Insgesamt scheinen die Vierfachkombinationen einen stärkeren Einfluss auf die YST-spezifische Differenzierungsreaktion in EC-Zellen *in vitro* zu haben. Zusätzlich erwies sich die konstante Applikation der Signalproteine (Activin-A und CHIRON) über die gesamte Versuchsdauer, also eine dauerhafte Stimulation der TGF-beta und WNT-Signalkaskaden, als besonders effektiv für die Etablierung der stabilen YST-assoziierte Genexpressionsmuster und die Hemmung des Pluripotenznetzwerks (*NANOG*, *OCT3/4* und *SOX2*). Infolgedessen wurde das neu etablierte YST-Differenzierungsprotokoll für alle künftigen Differenzierungsversuche in EC-Zellen angewendet. Das Protokoll beginnt mit der Induktion des Differenzierungsfaktors *SOX17* / *SOX17* am ersten Tag, gefolgt von einem Mediumwechsel zum YST-Differenzierungsmedium am nächsten Tag. Dieses Medium besteht aus dem Standard-Zellkulturmedium der jeweiligen Zelllinie, das mit Activin-A, CHIRON, FGF2 und Heparin supplementiert ist (Abb. 19). Am vierten und sechsten Tag erfolgt dann ein weiterer Mediumwechsel zu frischem YST-Differenzierungsmedium (Abb. 19).

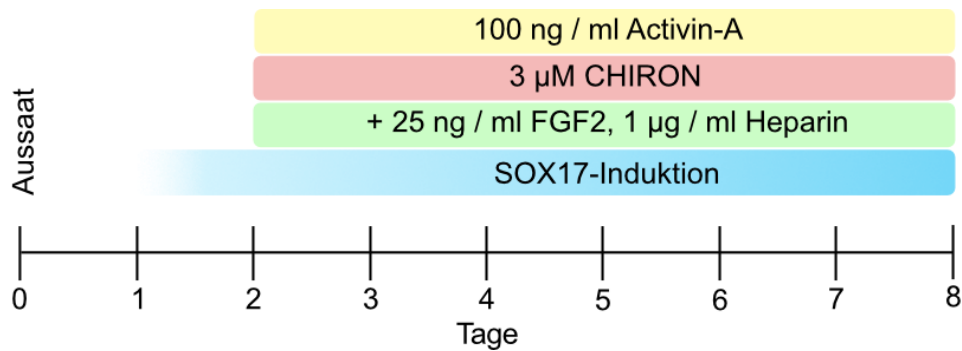


Abbildung 19: Finale Protokollvariante des YST-Differenzierungsprotokolls. Das Protokoll beinhaltet die Applikation der aufgelisteten rekombinanten Proteine / Inhibitoren und einer SOX17 / SOX17-Induktion am ersten Tag des Protokolls. Activin-A, CHIRON, FGF2 und Heparin wurden am zweiten, vierten und sechsten Tag durch einen Mediumwechsel appliziert.

Im weiteren Verlauf wurden die Effekte der einzelnen Komponenten sowie jegliche möglichen Kombinationen des neu etablierten YST-Differenzierungsprotokolls nach der festgelegten Versuchsperiode von acht Tagen untersucht. Dafür erfolgte erneut die Genexpressionsanalyse der YST-spezifischen und Pluripotenzgene in NCCIT-Zellen (Abb. 20). Wie zuvor beobachtet, trugen die Effekte der einzelnen Komponenten des YST-Differenzierungsprotokolls (SOX17 / SOX17-Induktion, Activin-A, CHIRON, FGF2 und Heparin (SCAF)) gemeinsam dazu bei die Genexpression von YST-spezifische Genen (*APOA1*, *CST1*, *CXCR4*, *FOXA2*, *GATA6* und *SOX17*) im Vergleich zu der Kontrolle zu induzieren. Die Expression der Pluripotenzgene *NANOG*, *OCT3/4* und *SOX2* wurde im Vergleich zu der Kontrolle vermindert (Abb. 20). Die beschriebenen Veränderungen des Genexpressionsprofils in Richtung eines YST-ähnlichen Zellschicksals bekräftigten die Effektivität und Wirksamkeit der SCAF-Behandlungskombination zur Differenzierung von EC- zu YST-ähnlichen Zellen *in vitro*.

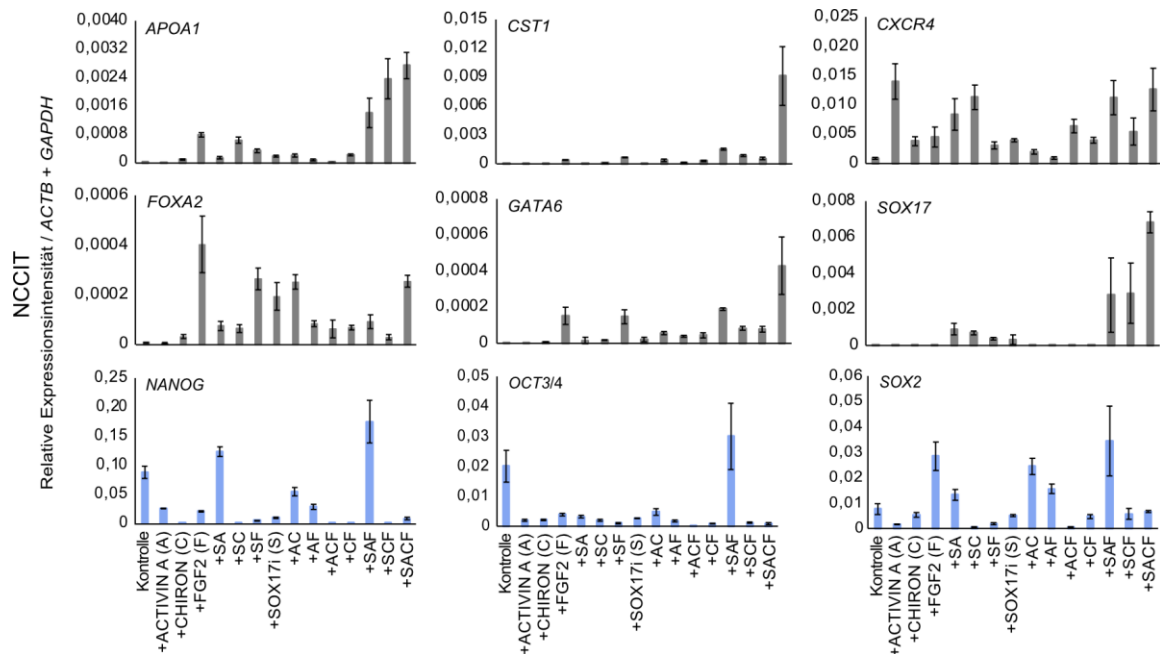
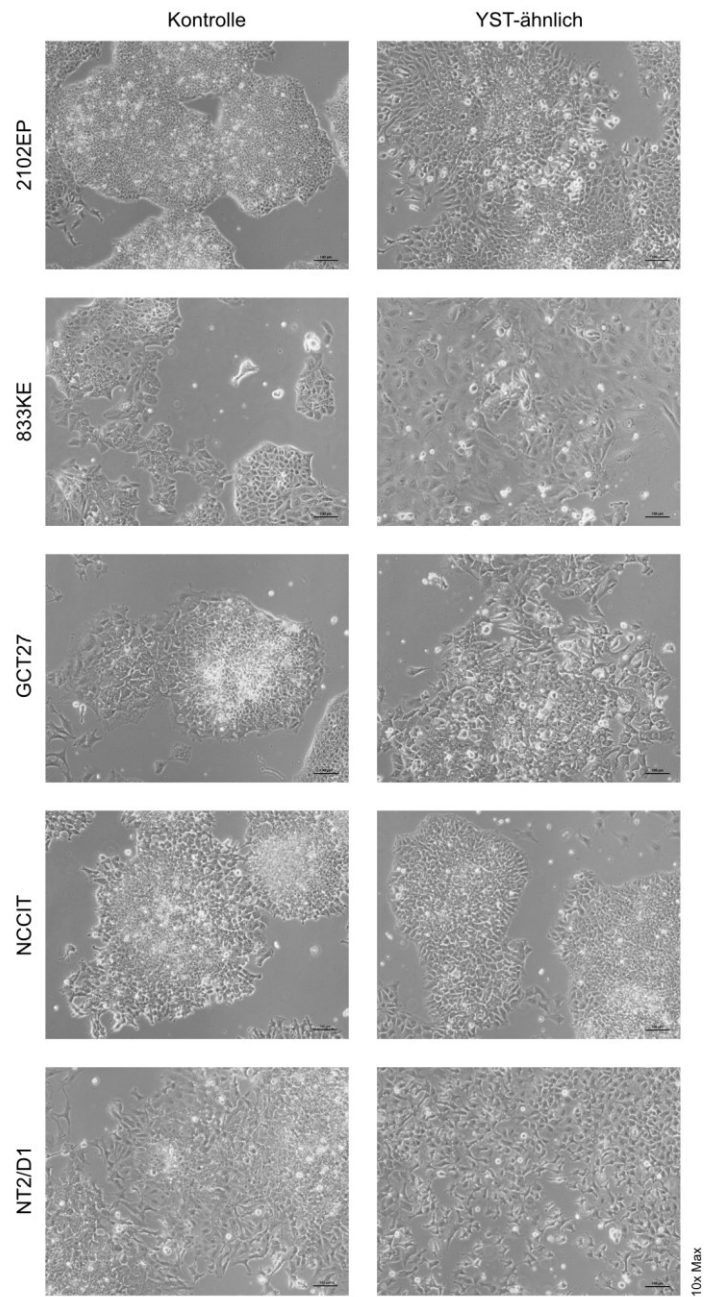


Abbildung 20: Genexpressionsanalyse von YST- und Pluripotenzenmarkergenen nach Behandlungen der Komponenten des YST-Differenzierungsprotokolls zur Optimierung des YST-Differenzierungsprotokolls. Die Expression der YST-assoziierten Genen (*APOA1*, *CST1*, *CXCR4*, *FOXA2*, *GATA6*, *SOX17*; in grau dargestellt) und Pluripotenzenmarkern (*NANOG*, *OCT3/4*, *SOX2*; in blau dargestellt) wurde nach Behandlung mit Einfach-, Zweifach-, Dreifach- und Vierfachkombinationen nach einer achttägigen Behandlung vermessen. Die Behandlungen setzten sich aus Activin-A (A), CHIRON (C), FGF2 und Heparin (F) und der *SOX17* / *SOX17*-Induktion zusammen. Für die Normalisierung wurden die *Housekeeping*-Gene *ACTB* und *GAPDH* verwendet.

Darauf wurde das etablierte YST-Differenzierungsprotokoll auf die verbleibenden vier EC-Zelllinien (833KE, 2102EP, GCT27, NT2/D1) angewendet, bei denen zu Beginn bereits die *SOX17* / *SOX17*-Induktion erfolgreich nachgewiesen wurde und die somit für die Protokollprüfung vorbereitet waren (Abb. 10). Jeder Versuchsansatz wurde in drei separaten technischen Replikaten pro Bedingung ($n = 3$ Kontrollen, $n = 3$ Behandlungen) durchgeführt und für die finale Analyse zusammengeführt. Die differenzierenden Zellen wurden mikroskopisch auf morphologische Veränderungen untersucht und fotografisch dokumentiert (Abb. 21 A). Aufgrund individueller Merkmale der einzelnen Zelllinien, bedingt durch Unterschiede in der Grundbiologie aufgrund ihres Herkunftsgewebes und der Patientencharakteristika (Alter und Isolationsort der Tumoren / Metastasen), variierten die EC-Zelllinien bereits im pluripotenten Grundzustand. Dennoch konnten in allen EC-Zelllinien im Verlauf des YST-Differenzierungsprotokolls morphologische Anpassungen beobachtet werden: Von dicht gepackten, stammzellartigen Zellpopulationen zu locker angeordneten Zellverbänden mit polygonal geformten Zellen (Abb. 21 A). Es wurden ebenfalls spindelförmige, längliche Zellmorphologien beobachtet (Abb. 21 A).

A

Tag 8

**B**

Zelllinie	Behandlung	Zellzahl / ml	Viabilität [%]
2102EP	Kontrolle	$4,24 \times 10^6$	98
	YST-ähnlich	$1,90 \times 10^6$	97
833KE	Kontrolle	$7,32 \times 10^5$	98
	YST-ähnlich	$4,83 \times 10^5$	98
GCT27	Kontrolle	$4,25 \times 10^6$	98
	YST-ähnlich	$1,95 \times 10^6$	96
NCCIT	Kontrolle	$3,65 \times 10^6$	95
	YST-ähnlich	$1,41 \times 10^6$	94
NT2/D1	Kontrolle	$8,42 \times 10^5$	97
	YST-ähnlich	$4,67 \times 10^5$	100

Abbildung 21: Analyse von EC-Zellen nach der YST-ähnlichen Differenzierung. A: Makroskopische Dokumentation der morphologischen Merkmale in EC-Zellen (2102EP, 833KE, GCT27, NCCIT und NT2/D1) nach der Anwendung des YST-Differenzierungsprotokolls über acht Tage. Die Aufnahmen wurden mittels eines 10-fach vergrößernden Objektivs im Hellfeldmikroskop aufgenommen (Mag 10x). Die Länge des Skalenbalken beträgt 100 μm . B: Dokumentation der am achten Tag des YST-Differenzierungsprotokolls isolierten Zellen mit Angabe der Zellzahlen und der Zellviabilität der Kontroll- und YST-ähnlich differenzierten EC-Zellen.

In allen fünf untersuchten Zelllinien (2102EP, 833KE, GCT27, NCCIT und NT2/D1) wurden signifikant niedrigere Zellzahlen in den Proben, auf die das YST-Differenzierungsprotokoll angewendet wurde, festgestellt (Abb. 21 B). Die Zellviabilität der Proben, die mit dem YST-Differenzierungsprotokoll behandelt wurden, war nach den acht Versuchstagen sowohl in den Kontrollzellen als auch in den Zellen, die YST-ähnlich differenziert wurden, vergleichbar hoch und betrug über 95 % (Abb. 21 B).

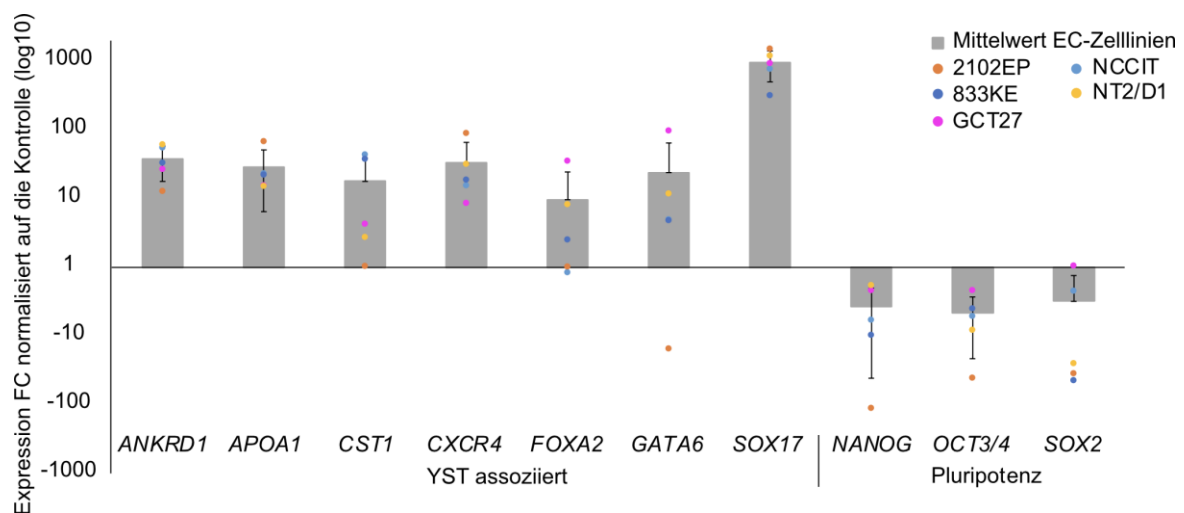


Abbildung 22: Genexpressionsanalyse von YST- und Pluripotenzgenen in YST-ähnlich differenzierten Zellen. Die Expressionsveränderungen (FC) (log10-Skala) der YST-assoziierten Gene (*ANKRD1*, *APOA1*, *CST1*, *CXCR4*, *FOXA2*, *SOX17*) und Pluripotenzgene (*NANOG*, *OCT3/4*, *SOX2*) wurden in YST-ähnlich differenzierten Zellen in 2102EP (orangene Punkte), 833KE (dunkelblaue Punkte), GCT27 (pinke Punkte), NCCIT (hellblaue Punkte), NT2/D1 (gelbe Punkte)) am achten Tag der des Differenzierungsprotokolls im Vergleich zu der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle vermessen. Jeder farbige Punkt steht für eine EC-Zelllinie, die in jeweils dreifacher technischer Ausführung analysiert wurde. *ACTB* und *GAPDH* wurden als *Housekeeping*-Gene verwendet.

Nach der Zellernte erfolgte die molekulare Analyse (qRT-PCR) der YST-assoziierten Faktoren und Pluripotenzfaktoren in den fünf untersuchten EC-Zelllinien (2102EP, 833KE, GCT27, NCCIT und NT2/D1). Die YST-assoziierten Faktoren *ANKRD1*, *APOA1*, *CST1*, *CXCR4*, *DUSP4*, *FOXA2*, *GATA6* und *SOX17* wurden im Durchschnitt aller betrachteten Messungen im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle heraufreguliert, während die EC- und Pluripotenzfaktoren *NANOG*, *OCT3/4* und *SOX2* in den behandelten EC-Zelllinien im Vergleich mit den Kontrollzellen herunterreguliert

vorlagen (Abb. 22). Insbesondere wurden die YST-assoziierten Faktoren *ANKRD1*, *APOA1*, *CXCR4* und *SOX17* in der Gesamtheit der fünf analysierten EC-Zelllinien durch das YST-Differenzierungsprotokoll sehr stark ($FC > 10$) induziert (Abb. 22).

Die totipotente Zelllinie 2102EP wies im Vergleich zu anderen EC-Zelllinien, wie in Abb. 22 ersichtlich, eine schwächere Induktion der *CST1*- und *FOXA2*-Expression auf. Dennoch wurde eine deutliche Hemmung der Pluripotenzfaktoren (*NANOG*, *OCT3/4*, *SOX2*) durch die SACF-Behandlung festgestellt (Abb. 22). Repetitive Versuchsdurchführungen zeigten zudem die Unterdrückung der *GATA6*-Expression in 2101EP.

Aufgrund der Asynchronität von Differenzierungsreaktionen, bei denen nicht alle Zellen gleichzeitig exakt in den gewünschten Zustand (hier: YST-ähnlich) umprogrammiert werden, wurde die Effektivität des YST-Differenzierungsprotokolls durch die Anreicherung von Zellen überprüft, die YST-ähnliche Eigenschaften aufweisen. Zu diesem Zweck wurden *Microarray*-Daten aus der vorherigen Publikation von Wruck et al. einer erneuten Analyse unterzogen und mit der Fachliteratur verglichen, um Faktoren zu identifizieren, die exklusiv oder signifikant höher in YST im Vergleich zu EC exprimiert werden (61). Insbesondere wurde geprüft, ob diese Faktoren als Oberflächenproteine der Zellen produziert werden, um sie anschließend für eine durchflusszytometrische Anreicherung der YST-ähnlichen Zellen nutzen zu können. Dabei wurde der transmembranständige G-Protein-gekoppelte Rezeptor *CXCR4* (auch bekannt als CD184) als potenzieller Zelloberflächenmarker für YST-Zellen identifiziert (148). Daraufhin wurde der Genexpressionsstatus dieses Oberflächenrezeptors in den parental EC-Zellen, in den YST-ähnlich differenzierten EC-Zellen nach Durchführung des YST-Differenzierungsprotokolls und in den etablierten YST-Zelllinien 1411H und GCT72 untersucht (Abb. 23).

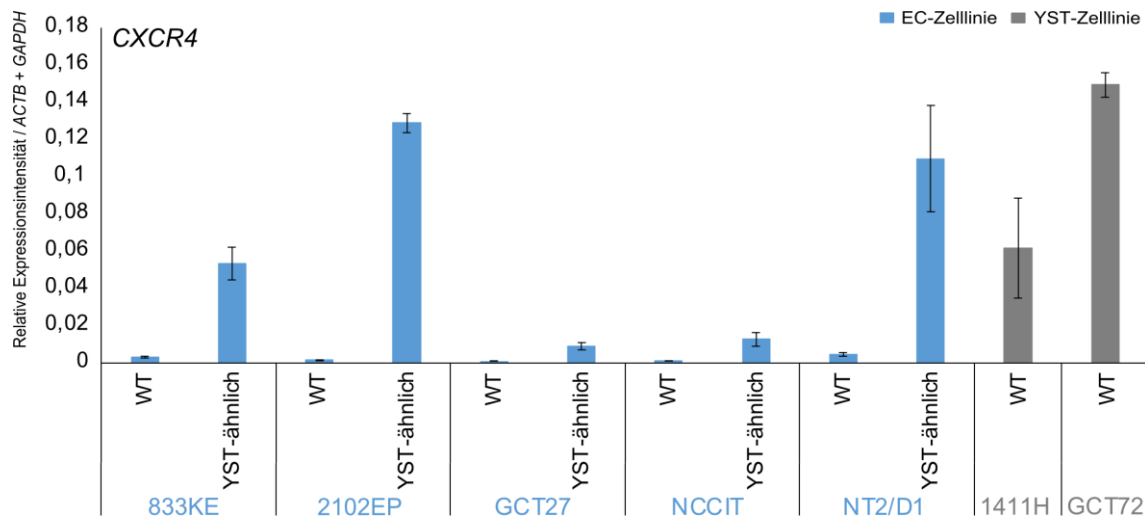


Abbildung 23: Genexpressionsanalyse der CXCR4-Expression in EC- und YST-Zellen. Analyse der CXCR4-Genexpression in den EC-Zelllinien (833KE, 2102EP, GCT27, NCCIT und NT2/D1, blaue Balken) im parentalen Zustand (WT) und im YST-ähnlichen Zellschicksal (YST-ähnlich) nach durchführung des YST-Differenzierungsprotokolls. Die YST-Zelllinien 1411H und GCT72 (graue Balken) wurden als CXCR4⁺-Kontrollzellen verwendet. Für die Normalisierung wurden die *Housekeeping*-Gene *ACTB* und *GAPDH* verwendet.

Die EC-Zelllinien 2102EP, 833KE, GCT27, NCCIT und NT2/D1 wiesen eine vernachlässigbare Expressionsintensität von CXCR4 auf, wie in Abb. 23 veranschaulicht. Im Gegensatz dazu zeigten die durch das YST-ähnlich differenzierten Zellen eine deutliche Zunahme der CXCR4-Expressionsintensität (Abb. 22, Abb. 23). In den YST-Zelllinien, die als CXCR4⁺-Kontrollen dienen sollten, wurde wie erwartet ein markantes CXCR4-Expressionsniveau beobachtet (Abb. 23). Zusammenfassend scheint die Genexpressionsintensität von CXCR4 mit dem YST-Zellstatus assoziiert zu sein. Im nächsten Schritt wurde das Proteinniveau des identifizierten YST-assoziierten Oberflächenmarkers CXCR4 untersucht, um zu analysieren, ob eine Zellsortierung unter Verwendung dieses YST-assoziierten Oberflächenmarkers funktional durchführbar ist. Die Testung und Etablierung des PE-konjugierten CXCR4-Antikörpers wurde in der YST-Zelllinie GCT72 durchgeführt, bei der bereits ein bekanntes CXCR4-Proteinlevel vorlag (Abb. 24) (148). Die Antikörperfärbung gegen CXCR4 wurde, wie in Abb. 24 dargestellt, erfolgreich etabliert. Die Messung ergaben, dass etwa 62 % der untersuchten GCT72-Zellen CXCR4-Protein produzierten (Abb. 24).

GCT72

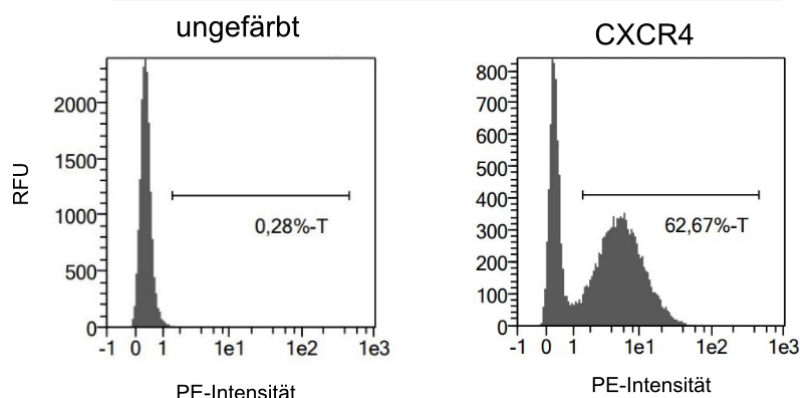


Abbildung 24: Durchflusszytometrische Bestimmung des CXCR4-Proteinniveaus in der YST-Zelllinie GCT72. Als technische Kontrolle wurde ebenfalls eine Probe mit ungefärbten Kontrollzellen gemessen. Die Kontrollzellen zeigten keine PE-Signalintensität, während die mit dem Fluorophor (PE)-gekoppelten CXCR4-Antikörper markierten Zellen eine CXCR4⁺-Population von 62,67 % der vermessenen 55.000 Zellen aufwiesen. Die Intensität ist in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) angegeben.

Anschließend wurden die EC-Zelllinien erneut mittels des YST-Differenzierungsprotokolls in das YST-Zellschicksal transformiert. Nach der Isolation der Zellen am achten Tag des Protokolls wurde die Zellviabilität ermittelt und die Zellen, analog zu dem Protokoll der erfolgreichen Testfärbung (Abb. 24), mit PE-gekoppelten CXCR4-Antikörpern gegen den YST-assoziierten Oberflächenmarker CXCR4 markiert. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Messung zur Determinierung des CXCR4-Proteinniveaus in den YST-ähnlichen Zellen.

Zelllinie	Behandlung	CXCR4-Protein [%]	Viabilität [%]
2102EP	Kontrolle	2,21	99
	YST-ähnlich	52,13	98
GCT27	Kontrolle	0,18	98
	YST-ähnlich	1,75	94
NCCIT	Kontrolle	0,84	100
	YST-ähnlich	1,94	99
NT2/D1	Kontrolle	0,19	98
	YST-ähnlich	71,42	100

Abbildung 25: Durchflusszytometrische Bestimmung des CXCR4-Proteinniveaus in den YST-ähnlich differenzierten Zelllinien 2102EP, GCT27, NCCIT und NT2/D1 mit zusätzlicher Dokumentation der Zellviabilität zum Zeitpunkt der Zellernte.

In den Zelllinien 2102EP und NT2/D1 wurde nach der Anwendung des YST-Differenzierungsprotokolls eine deutliche Steigerung der CXCR4-Proteinproduktion im Vergleich zu den Kontrollzellen beobachtet (Abb. 25). Dahingegen wurde in den

Zelllinien GCT27 und NCCIT trotz einer erhöhten *CXCR4*-Genexpression (Abb. 23) keine messbare *CXCR4*-Proteinproduktion nach Anwendung des YST-Differenzierungsprotokolls festgestellt (Abb. 25). Infolgedessen lassen sich die YST-ähnlichen Zellen der Zelllinien 2102EP und NT2/D1 mithilfe des Oberflächenmarkers *CXCR4* in *CXCR4*⁻ (EC-ähnliche) und *CXCR4*⁺ (YST-ähnliche) Zellen unterscheiden. Für die Zelllinien GCT27 und NCCIT ist eine *CXCR4*-basierte Diskriminierung von EC- und YST-ähnlichen Zellen durch eine durchflusszytometrische Vermessung nicht möglich.

Im nächsten Schritt wurden die YST-ähnlich differenzierten Zellen der Zelllinien 2102EP und NT2/D1 in Zusammenarbeit mit der *Corefacility Flow Cytometry* der HHU-D in *CXCR4*⁻ (EC-ähnliche) und *CXCR4*⁺ (YST-ähnliche) -Zellpopulationen sortiert. Hierfür wurde zunächst das YST-Differenzierungsprotokoll in einem größeren Versuchsansatz (fünf 10 cm-Schalen pro Behandlungskondition) erneut durchgeführt. Anschließend wurden die behandelten Zellen unter gleichen Bedingungen geerntet und zusammengeführt, bevor sie mittels des *CXCR4*-PE-Antikörpers markiert und lebend sortiert wurden (Abb. 26 A / B).

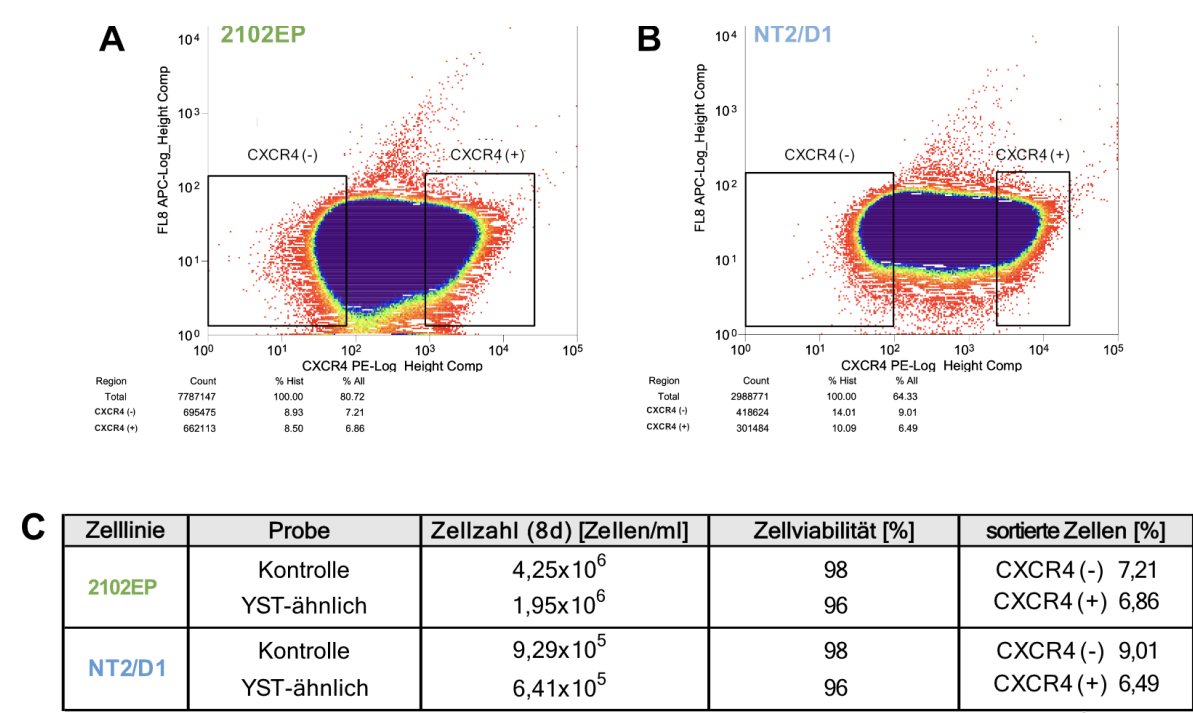


Abbildung 26: CXCR4-basierte Zellsortierung von viablen YST-ähnlich differenzierten 2102EP- und NT2/D1-Zellen mittels Durchflusszytometrie. A: Verteilung der *CXCR4*⁻ und *CXCR4*⁺-Zellen der 2102EP-Zelllinie. Die schwarzen Kästen markieren die schwächsten *CXCR4*-markierten (*CXCR4*⁻) und die stärksten *CXCR4*-markierten (*CXCR4*⁺) Zellen. B: Verteilung der *CXCR4*⁻ und *CXCR4*⁺-Zellen der NT2/D1-Zelllinie. Die schwarzen Kästen markieren die schwächsten *CXCR4*-markierten (*CXCR4*⁻) und die stärksten *CXCR4*-markierten (*CXCR4*⁺) Zellen. C: Dokumentation der Zellzahlen und Zellviabilität

von YST-ähnlichen 2102EP- und NT2/D1-Zellen am achten Tag der YST-Differenzierung, die mittels CXCR4⁺-Durchflusszytometrie-Messung vermessen wurden.

Die Zellzahlen der isolierten Kontrollzellen fielen erneut deutlich höher aus als in den YST-ähnlichen Zellen. Die Zellviabilität der Kontroll- und der YST-ähnlichen Zellen war zum Messzeitpunkt, wie in Abb. 26 C dargestellt, gleichermaßen hoch ($\geq 96\%$). Um ausreichend Zellen für die molekularen Analysen zu erhalten und trotzdem eine hohe Stringenz der Zelldiskriminierung zu gewährleisten, wurden die *Gates* so ausgewählt, dass mindestens $3,0 \times 10^5$ Zellen pro Kondition lebend sortiert wurden. Die Sortierungs-*Gates* wurden entsprechend ausgewählt: Die Sortierung der CXCR4⁺-Zellen erfolgte basierend auf der höchsten Fluoreszenzintensität (6,49 % für NT2/D1 - 6,86 % für 2102EP), während die Sortierung der CXCR4⁻-Zellen auf der niedrigsten Färbeintensität basierte (7,21 % - 9,01 %) (Abb. 26 A-C).

Die Genexpressionsanalyse der CXCR4⁻ und CXCR4⁺-Zellen zeigte neben der zu erwartenden Zunahme der CXCR4-Expression (FC > 100) eine verstärkte Expression typischer YST-Markergene (*ANKRD1*, *APOA1*, *FOXA2*, *SOX17*) in der CXCR4⁺-Zellpopulation und gleichzeitig eine Reduktion der Expression in den Pluripotenzgenen *NANOG*, *OCT3/4* und *SOX2* (Abb. 27).

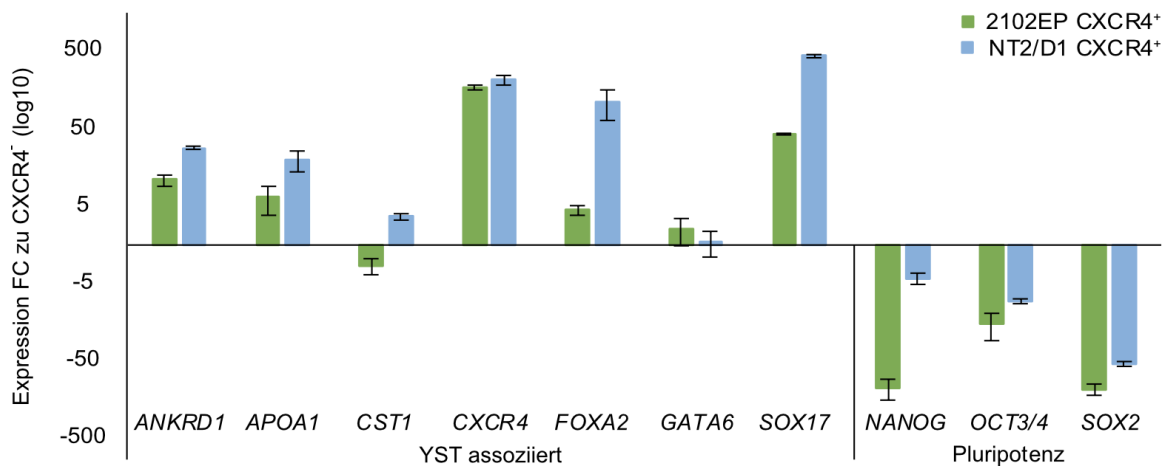


Abbildung 27: Genexpressionsanalyse von YST- und Pluripotenzgenen in CXCR4⁺-Zellpopulationen nach YST-ähnlicher Differenzierung der EC-Zelllinien 2102EP und NT2/D1. Die Expressionsveränderung (FC) (log₁₀-Skala) der YST-assoziierten Gene (*ANKRD1*, *APOA1*, *CST1*, *CXCR4*, *FOXA2*, *GATA6*, *SOX17*) und Pluripotenzgene (*NANOG*, *OCT3/4*, *SOX2*) in CXCR4⁺-Zellen wurden am achten Tag des YST-Differenzierungsprotokolls, normalisiert auf die CXCR4⁺-Zellpopulation, gemessen. Die grünen Balken markieren die CXCR4⁺-Zellen der Zelllinie 2102EP, während die blauen Balken die CXCR4⁺-Zellen der Zelllinie NT2/D1 darstellen. Für die Normalisierung wurden die *Housekeeping*-Gene *ACTB* und *GAPDH* verwendet.

Dementsprechend wurde die Anreicherung von YST-ähnlichen Zellen mithilfe des YST-assoziierten Oberflächenmarkers CXCR4 erfolgreich durchgeführt und auf molekularer Ebene validiert. Die Zellsortierung bestätigte, dass insbesondere die CXCR4⁺-Population ein YST-ähnliches Expressionsmuster aufweist und das Auftreten von CXCR4 maßgeblich mit dem YST-Zellschicksal in den Zelllinien 2102EP und NT2/D1 korreliert.

Um daraufhin zu untersuchen, ob das *in vitro* induzierte Zellschicksal auch in einem *in vivo*-Setting mit intakter, physiologischer Tumormikroumgebung manifestiert wird und ob das neue YST-Modell für Experimente im lebenden Organismus geeignet ist, wurden YST-ähnliche Zellen (differenziert aus GCT27, NCCIT und NT2/D1) nach der Anwendung des YST-Differenzierungsprotokolls in die Flanken von Nacktmäusen injiziert (Abb. 28). Das Wachstum der Tumoren wurde stetig überwacht und dokumentiert.

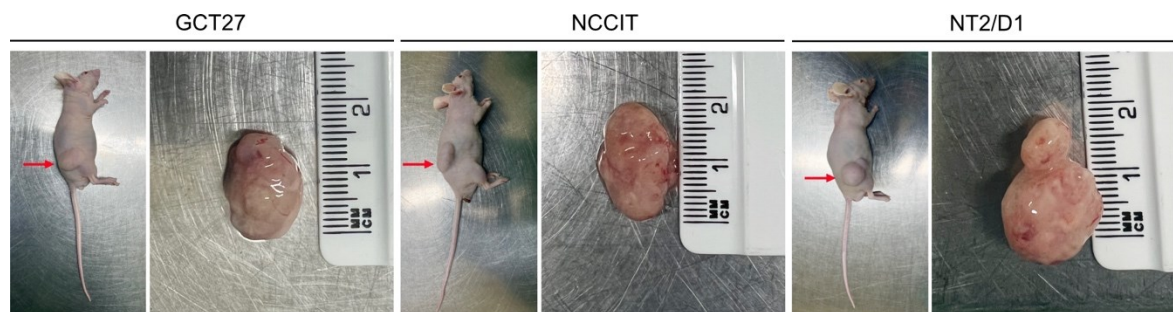


Abbildung 28: Makroskopische Dokumentation der Tumore vor und nach der Isolation von xenotransplantierten YST-ähnlichen GCT27-, NCCIT- und NT2/D1-Zellen am Tag der Tumorisolation. Die roten Pfeile markieren die Lokalisation der Tumoren zum Zeitpunkt der Isolation.

Die Tumoren wurden isoliert sobald ein Tumolvolumen von etwa 1 bis 1,5 cm³ erreicht wurde (Abb. 28) und anschließend molekularbiologisch auf RNA- (Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR) und Proteinebene (mittels IHC-Färbungen) analysiert (Abb.29, Abb. 30).

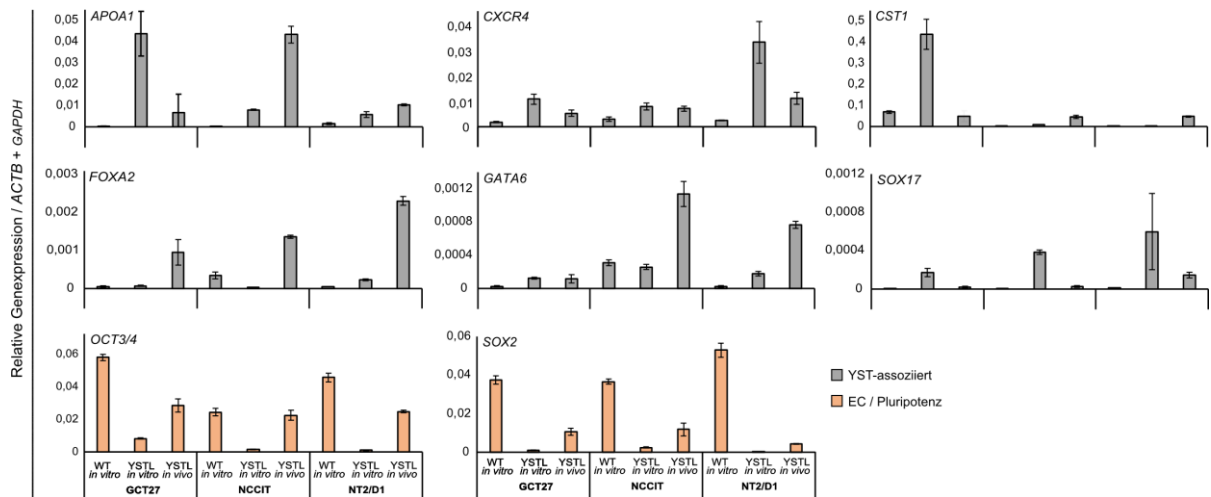


Abbildung 29: Genexpressionsanalyse von YST- und Pluripotenzgenen vor und nach der Xenotransplantation der YST-ähnlich differenzierten GCT27-, NCCIT- und NT2/D1-Zellen. Die relativen Genexpressionsintensitäten der YST-assozierten Gene (*APOA1*, *CXCR4*, *CST1*, *FOXA2*, *GATA6*, *SOX17*) und Pluripotenzgene (*OCT3/4*, *SOX2*) wurden in den parentalen Zelllinien (WT *in vitro*), YST-ähnlichen Zellen *in vitro* (YSTL *in vitro*) am achten Tag des Differenzierungsprotokolls und den entsprechenden Tumorgewebeproben (YSTL *in vivo*, n = 3 je Zelllinie), die aus den YST-ähnlichen Xenografts isoliert wurden, gemessen. Für die Normalisierung wurden die *Housekeeping*-Gene *ACTB* und *GAPDH* verwendet.

Die Expressionsintensitäten der YST-assozierten Markergene wurden nach der Anwendung des YST-Differenzierungsprotokoll, wie zuvor bereits beobachtet (vgl. Abb. 22), *in vitro* im Vergleich zu den parentalen EC-Zellen deutlich gesteigert (Abb. 29). Die Genexpression der *in vitro* stark induzierten Faktoren (*APOA1*, *CXCR4*, *GATA6*, *SOX17*) blieb auch während des monatelangen *in vivo*-Wachstums bis hin zum Isolationszeitpunkt messbar und war im Vergleich zu den parentalen Zellen der jeweiligen Zelllinie erhöht (Abb. 29). Besonders auffällig war die zunehmende Expression des YST-Schlüsselfaktors *FOXA2* in den drei untersuchten Zelllinien (GCT27, NCCIT und NT2/D1). Die *FOXA2*-Expression wurde bereits durch die *in vitro*-Differenzierung leicht induziert und anschließend durch die Xenotransplantation und die *in vivo*-Tumorprogression deutlich gesteigert (Abb. 29). Dies legt nahe, dass *FOXA2* / *FOXA2* eine wichtige Rolle als Stabilisator für die Etablierung des YST-Zellschicksals spielen könnte, wie bereits von Wruck et al. postuliert (61).

Die Herunterregulation der Pluripotenzfaktoren *OCT3/4* und *SOX2* blieb nach der *in vitro*-Differenzierung zu YST-ähnlichen Zellen auch in den langfristig *in vivo* gewachsenen Tumoren im Vergleich zu den Kontrollzellen bestehen (Abb. 29). Es wurde lediglich ein minimaler Anstieg der Genexpressionsintensität von *OCT3/4* und *SOX2* in den isolierten Tumorseiten (*in vivo*) verglichen mit den *in vitro* differenzierten

Zellen beobachtet. Dieser Expressionsanstieg der Pluripotenzfaktoren deutet auf das Vorhandensein undifferenzierter Zellen (EC-ähnlich) in den injizierten Zellpopulationen hin. Dies legt nahe, dass das beobachtete Tumorwachstum eine Komposition eines gemischten GCT aus EC- und YST-ähnlichen Zellen darstellt, was anschließend auf Proteinebene validiert werden sollte.

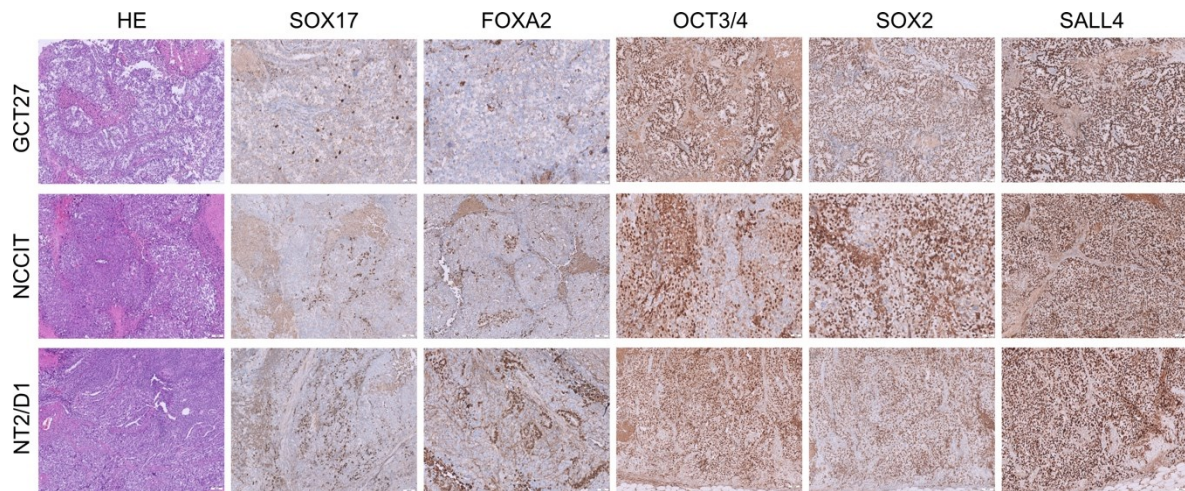


Abbildung 30: HE- und IHC-Färbung der isolierten YST-ähnlich differenzierten Tumorproben nach der Xenotransplantation in Nacktmausflanken. Die IHC-Färbung wurde für die YST-Markerproteine FOXA2 und SOX17, die Pluripotenzfaktoren OCT3/4 und SOX2 und den Keimzellmarker SALL4 exemplarisch für jede xenotransplantierte YST-ähnliche Zellpopulation (GCT27, NCCIT, NT2/D1; jeweils n = 3 Xenografts) durchgeführt. Skalenbalken: 100 - 200 µm.

Auf Proteinniveau war die Gesamtheit der Tumorzellen positiv für SALL4, einen weitverbreiteten allgemeinen Marker für GCT (Abb. 30). Darüber hinaus wiesen die isolierten Gewebeproben ebenfalls eine fokale Positivität für die YST-Marker SOX17 und FOXA2 auf und zeigten in der HE-Färbung eine charakteristische YST-ähnliche Morphologie (Abb. 30).

Zusätzlich wurden, wie auf RNA-Ebene bereits beobachtet (Abb. 29), Zellpopulationen identifiziert, die positiv für Pluripotenzmarker OCT3/4 und SOX2 waren, wobei keine Überlappungen mit den SOX17- und FOXA2-positiven Zellpopulationen festgestellt wurden (Abb. 30).

Als nächster Schritt mit dem Ziel der Entschlüsselung der molekularen Mechanismen der YST-Entstehung wurde das Transkriptom der Zelllinien, in denen bisher keine YST-ähnliche Anreicherung über den Oberflächenmarker CXCR4 möglich war (GCT27, NCCIT), auf Einzelzellebene sequenziert. Dieser Ansatz sollte dazu beitragen, die dynamischen Differenzierungsprozesse von dem pluripotenten

Zellcharakter der Ursprungs-EC-Zellpopulation, über die möglichen Zwischenstadien der YST-Entwicklung bis hin zum frühen und reifen YST-Zellschicksal zu verfolgen. Dabei sollen idealerweise Markergene und transkriptionelle Expressionsmuster zur Charakterisierung der YST-Differenzierungsstadien identifiziert werden. Die Einzelzell-RNA-Sequenzierung wurde zuerst mit den Zelllinien GCT27 und NCCIT nach Anwendung des YST-Differenzierungsprotokolls in Zusammenarbeit mit Dr. Tobias Lautwein (GTL, HHU-D) durchgeführt. Anhand von *Uniform Manifold Approximation and Projection* (UMAP-) Analysen wurden 11 unterschiedliche transkriptionelle Signaturen (*Cluster*) nach der Anwendung des YST-Differenzierungsprotokolls in GCT27- und NCCIT-Zellen klassifiziert (Abb. 31 A).

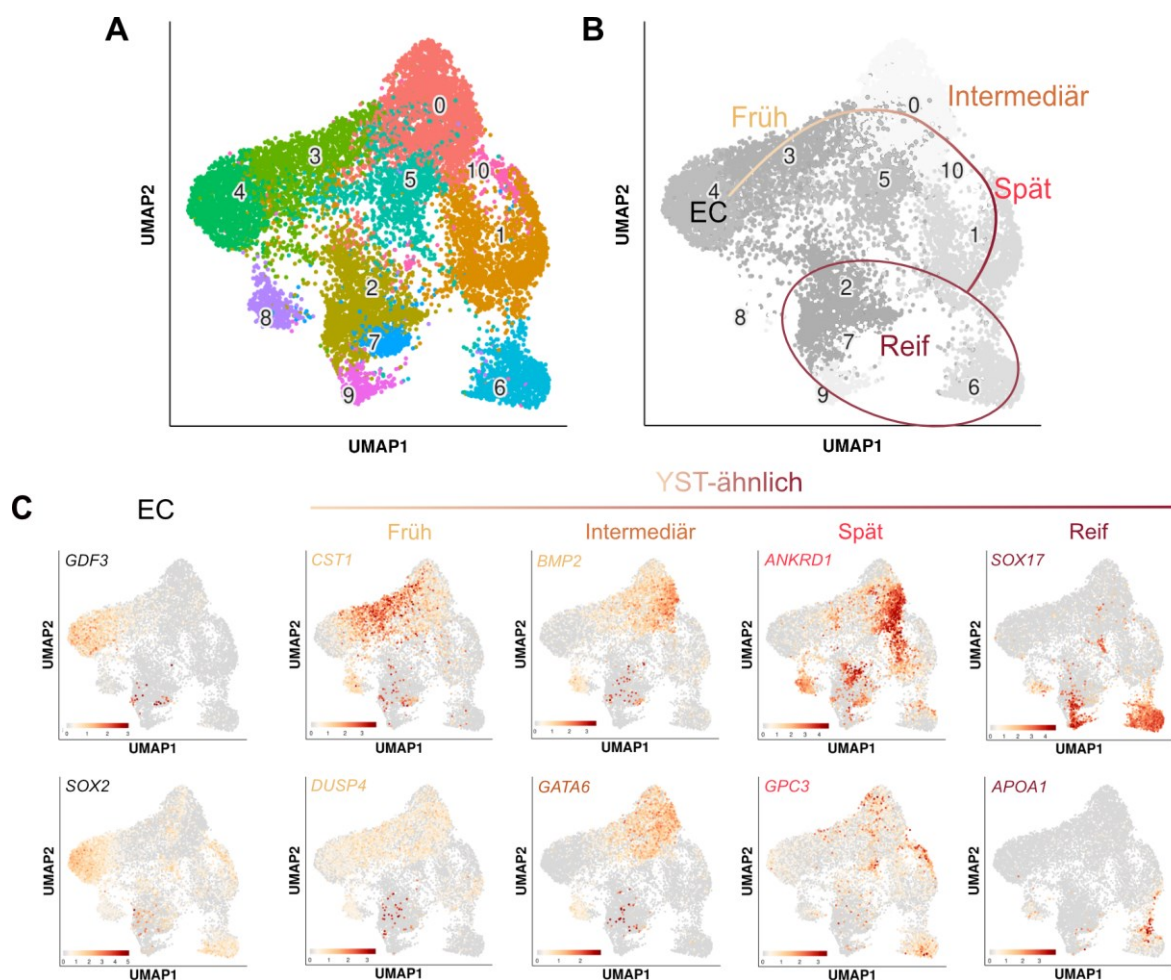


Abbildung 31: Analyse der Einzelzell-RNA-Sequenzierung in den YST-ähnlich differenzierten GCT27- und NCCIT-Zellen. A: UMAP-Clustering von YST-ähnlichen GCT27- und NCCIT-Zellen auf der Grundlage von 11 verschiedenen, einzigartigen Transkriptionssignaturen (*Cluster* 0 - 10) durch die 11 unterschiedlichen Farbtöne dargestellt. Jeder Punkt des Plots stellt eine vermessene Einzelzelle dar. B: Visualisierung der Differenzierungsdynamik von EC-Zellen über frühe, intermediäre, späte und reife YST-Differenzierungsstadien. C: Genexpressionsanalyse von Markergenen, die kennzeichnend für die EC- (*GDF3*, *SOX2*) und YST-Zellschicksale sind, wobei frühe (*CST1*, *DUSP4*), intermediäre (*BMP2*, *GATA6*), späte (*ANKRD1*, *GPC3*) und reife (*SOX17*, *APOA1*) YST-ähnliche Zellen identifiziert wurden.

Die Expression konventioneller EC-Marker wie *GDF3* und *SOX2* wurde hauptsächlich in *Cluster* c4 detektiert, der demnach als eine (bis zum Zeitpunkt der Messung) undifferenzierte, pluripotente EC-ähnliche Population interpretiert wurde (Abb. 31 B). Bei der Überprüfung der Expression charakteristischer YST-Markergene wurden mehrere Zellpopulationen identifiziert, die sich über die *Cluster* c3, c0, c5, c10, c1 und c6 bis hin zu c9, c2 und c7 erstrecken (Abb. 31 A / B). Somit wurden verschiedene intermediäre Zwischenstufen mit YST-ähnlichen Zellen in teilweise überlappenden Differenzierungsstadien identifiziert. Frühe YST-ähnliche Zellen in den *Clustern* c3, c5 und c0 exprimieren beispielsweise *CST1* und *DUSP4*, zeigen jedoch zusätzlich noch geringe *SOX2*-Expressionsintensitäten in einigen Zellen. Die intermediären, EC- / YST-Zellen, die sich inmitten der Zellschicksalstransformation befinden, wurden in den *Clustern* c0, c5 und c10 anhand der Markerexpression von *BMP2* und *GATA6* beobachtet (Abb. 31 A / B). Späte YST-ähnliche Zellen exprimieren zum Beispiel *ANKRD1* und *GPC3* und wurden dem *Cluster* c1 zugeordnet (Abb. 31 A / B). Reife YST-ähnliche Zellen wurden in den *Clustern* c6, c9, c2 und c7 anhand der YST-assoziierten Genexpression von beispielsweise *SOX17* und *APOA1* charakterisiert (Abb. 31 A / B). Generell wurde in den früheren YST-Stadien sowohl eine Expression von EC- / Pluripotenzgenen als auch YST-Markergenen beobachtet (zum Beispiel teilweise überlappende Expressionen von *GDF3* / *SOX2* und *CST1* / *DUSP4*), während in den späteren YST-ähnlichen Differenzierungsstadien bis hin zu den reifen, YST-ähnlichen Zellen die Expression von EC-/ Pluripotenzgenen nahezu vollständig unterdrückt wurde (Abb. 31 A / B). In diesen Zellen wurden vorwiegend YST-assoziierte Gene exprimiert (Abb. 31 A / B).

Im nächsten Schritt wurde die nullipotente EC-Zelllinie 2120EP ebenfalls mittels Einzelzell-RNA-Sequenzierung nach der Anwendung des YST-Differenzierungsprotokolls analysiert, um zu untersuchen, ob sich die Dynamik der YST-Differenzierung ähnlich wie in den zuvor untersuchten pluripotenten Zelllinien GCT27 und NCCIT entwickelt. Die zuvor etablierte *Clustering*-Stringenz wurde beibehalten und es wurden ebenfalls 11 unterschiedliche *Cluster* identifiziert (Abb. 32 A).

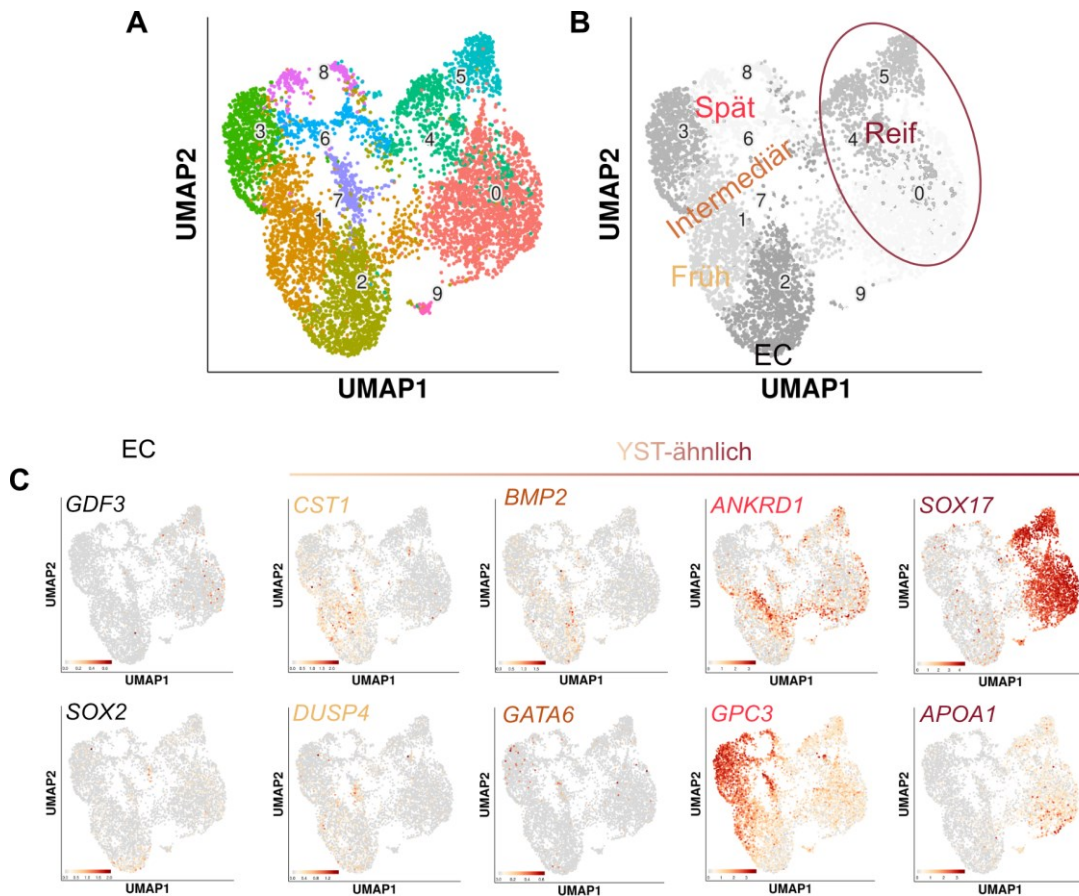


Abbildung 32: Analyse der Einzelzell-RNA-Sequenzierung in den YST-ähnlich differenzierten 2102EP-Zellen. A: UMAP-Clustering von YST-ähnlichen 2102EP-Zellen auf der Grundlage von 11 verschiedenen, einzigartigen Transkriptionssignaturen (Cluster 0 - 10) in 11 unterschiedlichen Farbtönen dargestellt. Jeder Punkt des Plots stellt eine detektierte Einzelzelle dar. B: Visualisierung der Differenzierungsdynamik von EC-Zellen über frühe, intermediäre, späte und reife YST-Differenzierungsstadien. C: Genexpressionsanalyse von Markergenen, die kennzeichnend für die EC- (*GDF3*, *SOX2*) und YST-Zellschicksale sind, wobei frühe (*CST1*, *DUSP4*), intermediäre (*BMP2*, *GATA6*), späte (*ANKRD1*, *GPC3*) und reife (*SOX17*, *APOA1*) YST-ähnliche Zellen unterschieden wurden.

Im Allgemeinen wurden bei der Zelllinie 2102EP weniger Zellen im EC-ähnlichen Zellschicksal anhand der Expression der EC- / Pluripotenzgene (hier dargestellt anhand von *GDF3* und *SOX2*) identifiziert als bei den Zelllinien GCT27 und NCCIT (vgl. Abb. 31 C, Abb. 32 C). Andererseits wurde eine besonders markante, stark *SOX17*⁺-Zellpopulation detektiert (Abb. 32 A / B). Der Switch von der EC-assoziierten *SOX2*- zu der YST-assoziierten *SOX17*-Expression scheint in dieser Zelllinie unter Anwendung des YST-Differenzierungsprotokolls besonders effizient zu sein, da kaum *SOX2*⁺-Zellen (undifferenzierte, parentale EC-Zellen) detektiert wurden. Ähnlich wie in den pluripotenten Zelllinien GCT27 und NCCIT wurde in der nullipotenten Zelllinie 2102EP ebenfalls die Expression von frühen YST-Markergenen (*CST1*, *DUSP4*), intermediären (*BMP2*, *GATA6*), späten (*ANKRD1*, *GPC3* in) und reifen (*SOX17*,

APOA1) YST-assoziierten Markergenen festgestellt (Abb. 32 A / B). Die *Cluster* der einzelnen Differenzierungsstadien scheinen in den YST-ähnlichen 2102EP-Zellen stärker zu überlappen, da einige Zellen die Genexpression von mehreren YST-Markergenen unterschiedlich klassifizierter Differenzierungsstadien aufweisen. Außerdem ist anzumerken, dass sich besonders viele Zellen bereits im späten und reifen YST-ähnlichen Zellschicksal detektiert wurden.

Die mögliche Verbindung zwischen der Entwicklung von YST und der Ausbildung von Cisplatinresistenz-Mechanismen hat insbesondere in klinischen Szenarien das Interesse geweckt, da die YST-Entwicklung als ein potenzieller Fluchtmechanismus von NSE unter der Cisplatin-basierten Standardtherapie betrachtet wird. In dieser Studie sollte daher untersucht werden, ob die *in vitro* differenzierten YST-ähnlichen Zellen molekularbiologische Eigenschaften aufweisen, die mit einer Cisplatinresistenz assoziiert sind und ob diese maligne Transformation von EC-Zellen zwangsläufig mit einer erhöhten Cisplatinresistenz einhergeht. Dafür wurde die Genexpressionsintensität von Faktoren der Cisplatinresistenz-Mechanismen, sogenannte Galluzzi-Faktoren, untersucht (149). Die mit einer Cisplatinresistenz-assoziierten Gene wurden von Galluzzi et al. systematisch in verschiedene Kategorien der Resistenzentwicklung eingeteilt, darunter Prozesse, die 1) in die Bindung von Cisplatin an die DNA involviert sind (Prä-Target-Faktoren: *CTR1*, *GSR*, *GSTP1*, *MT1F*, *MRP2*), 2), die sich direkt auf die Adduktbildung von Cisplatin konzentrieren (On-Target-Faktoren: *BRCA1*, *BRCA2*, *ERCC1 / 2 / 4*, *HSP6*, *MLH1*, *MSH2 / 3*, *POLH*, *POLK*, *REV1 / 3L / 7*, *VDAC*), 3), die Cisplatin-induzierte Apoptose-Induktion veranlassen (Post-Target-Faktoren: *BAX*, *BCCXL*, *BIRC5*, *CAPN1*, *LGALS3*, *MAPK1 / 8*, *MCL1*, *TP53*) und 4), die Signalaktivitäten nach der Cisplatin-Verstoffwechselung steuern und die nicht offensichtlich / direkt mit und auf Cisplatin reagieren (Off-Target Faktoren: *ERBB2*) (149).

Interessanterweise wurden in den durchgeführten Einzelzell-RNA-Sequenzierungen Subpopulationen der YST-ähnlich differenzierten 2102EP-, GCT27- und NCCIT-Zellen identifiziert, die eine erhöhte Genexpression charakteristischer Gene für die Entwicklung von einer Cisplatinresistenz aufwiesen (Abb. 33 A / B) (149).

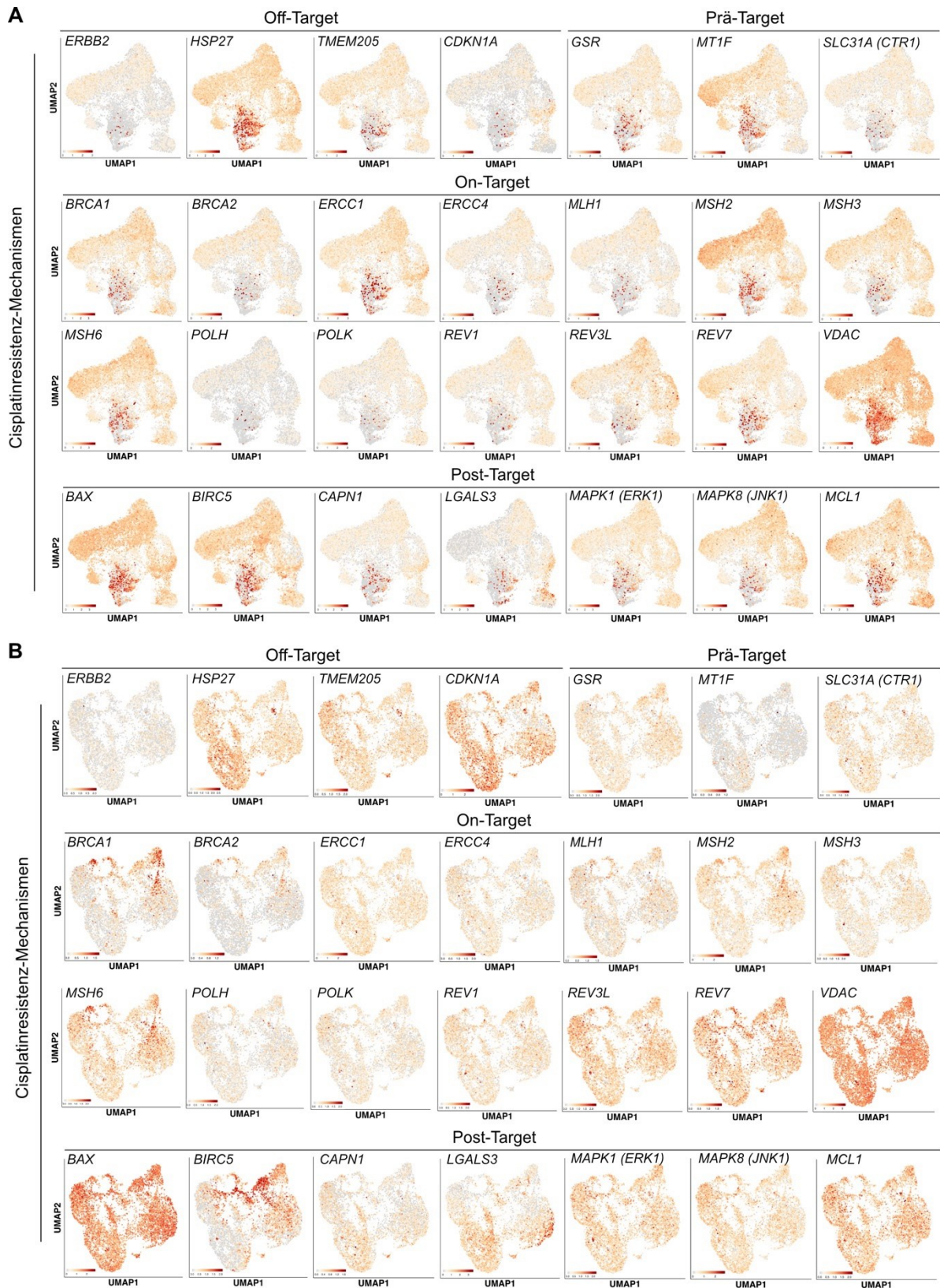


Abbildung 33: Genexpressionsanalyse der Einzelzell-RNA-Sequenzierung bezüglich der Cisplatinresistenz-Mechanismen in den YST-ähnlich differenzierten 2102EP-, GCT27- und NCCIT-Zellen. A: Identifikation von Cisplatinresistenz-assoziierten Genexpressionssignaturen in YST-ähnlichen GCT27- und NCCIT-Zellen am achten Tag des YST-Differenzierungsprotokolls auf der Grundlage der Expression bekannter Resistenzfaktoren, die von Galluzzi et al. in Prä- (GSR, MT1F, CTR1), On- (BRCA1, BRCA2, ERCC1, ERCC4, MHL1, MSH2, MSH3, MSH6, POLH, POLK, REV1,

REV3L, REV7, VDAC), Post- (*BAX, BIRC5, CAPN1, LGALS3, MAPK1, MAPK8, MCL1*) und Off-Target-Mechanismen (*ERBB2, HSP27, TMEM205, CDKN1A*) klassifiziert wurden (149). B: Identifikation von Cisplatinresistenz-assoziierten Genexpressionsmustern in YST-ähnlichen 2102EP-Zellen am achten Tag des YST-Differenzierungsprotokolls auf der Grundlage der Expression bekannter Resistenzfaktoren, die von Galluzzi et al. in Prä- (*GSR, MT1F, CTR1*), On- (*BRCA1, BRCA2, ERCC1, ERCC4, MHL1, MSH2, MSH3, MSH6, POLH, POLK, REV1, REV3L, REV7, VDAC*), Post- (*BAX, BIRC5, CAPN1, LGALS3, MAPK1, MAPK8, MCL1*) und Off-Target-Mechanismen (*ERBB2, HSP27, TMEM205, CDKN1A*) klassifiziert wurden (149).

Die cisplatinresistenten YST-ähnlichen Zellen, die ursprünglich aus den pluripotenten Zelllinien GCT27 und NCCIT generiert wurden, wurden hauptsächlich in den *Clustern* c2, c7 und c9 detektiert (Abb. 31, Abb. 33 A). Diese *Cluster* enthielten Zellen verschiedener Differenzierungsstadien, darunter intermediäre, späte und reife YST-ähnliche Zellen (Abb. 31, Abb. 33 A). Die identifizierten cisplatinresistenten Zellen der *Cluster* c2, c7 und c9 wurden größtenteils als *SOX17⁺*-Zellen identifiziert, die die reifen YST-ähnlichen Zellen repräsentieren (Abb. 31, Abb. 33 A). Die reifen *SOX17⁺*-Zellen der differenzierten GCT27- und NCCIT-Zelllinien im *Cluster* c6 zeigten im Gegensatz zu den *SOX17⁺*-Zellen in *Clustern* c2, c7 und c9 eine geringfügige oder keine überlappende Expression mit den untersuchten Galluzzi-Faktoren (149). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass nicht alle YST-ähnlichen Zellen zwangsläufig eine Cisplatinresistenz während der Reprogrammierung ihres Zellschicksals entwickeln. Interessanterweise zeichneten sich die Zellen, die sich in der cisplatinresistenten und reifen YST-ähnlichen Zellpopulation durch eine generell schwache *GATA3*-Expression und eine ausbleibende Expression des YST-Faktors *FOXA2* aus (Abb. 34).

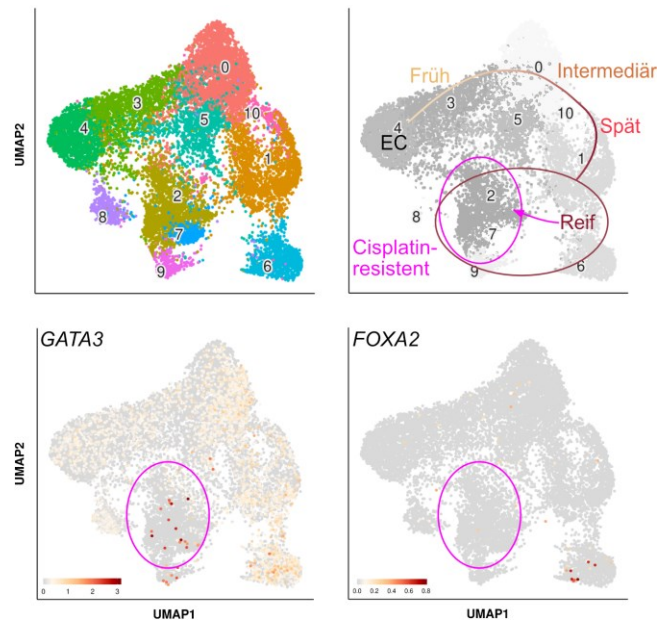


Abbildung 34: Genexpressionsanalyse von YST-Faktoren in cisplatinresistenten YST-ähnlichen GCT27 und NCCIT-Zellen. Die *GATA3*-Expression ist nur in wenigen cisplatinresistenten, reifen YST-ähnlichen Zellen messbar und die *FOXA2*-Expression ist in der cisplatinresistenten, YST-ähnlichen Zellpopulation nicht messbar.

Im Gegensatz dazu verteilte sich die Expression der Galluzzi-Faktoren in der ursprünglich nullipotenten Zelllinie 2102EP gleichmäßig über alle analysierten *Cluster* und zeigte keine exklusive und ausgeprägte cisplatinresistente und gleichzeitig *SOX17*⁺-Zellpopulation (Abb. 33 B) (149).

Um zu untersuchen, ob die gesteigerte Expression der Cisplatinresistenz-assoziierten Faktoren in den *in vitro* generierten YST-ähnlichen Zellen durch eine Cisplatin-basierte Therapie noch stärker stimuliert werden könnte, wurden die YST-ähnlich differenzierten Zellen einer Behandlung mit der halbletalen Dosis (LD50) an Cisplatin unterzogen und anschließend molekular analysiert. Zunächst wurde die für Cisplatin geltende LD50-Konzentration mittels zytotoxischen Zellviabilitäts-Assay (XTT-Assay) für die verwendeten EC-Zelllinien nach 48 h (LD50_{48h}) kalkuliert (Abb. 34 A / B).

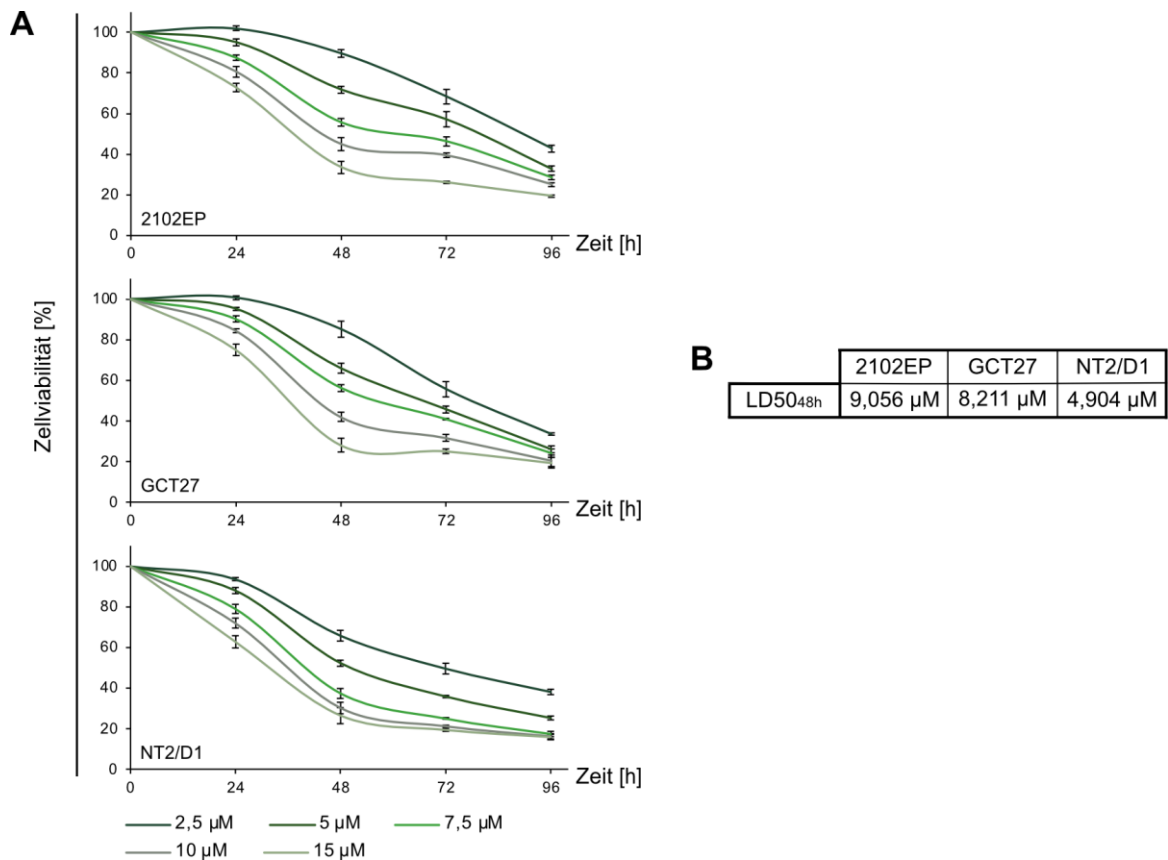


Abbildung 35: Determinierung der halbletalen Dosis an Cisplatin in den EC-Zelllinien 2102EP, GCT27 und NT2/D1. A: XTT-Zellviabilitätsmessungen über 96 h in 2102EP-, GCT27- und NT2/D1-Zellen nach der Behandlung mit Cisplatin (2,5 µM, 5 µM, 7,5 µM, 10 µM und 15 µM). B: Ermittelte LD50-Konzentrationen für Cisplatin der EC-Zelllinien 2102EP, GCT27 und NT2/D1 nach 48 h (LD50_{48h}).

Anschließend wurden die Zellen der Zelllinien 2102EP, GCT27 und NT2/D1 gemäß des etablierten YST-Differenzierungsprotokolls behandelt. Ab dem siebten Tag des Protokolls wurde dem Differenzierungsmedium zusätzlich Cisplatin in der entsprechenden Konzentration der zuvor ermittelten LD50_{48h}-Konzentration für die jeweilige Zelllinie zugeführt (Abb. 35 B). Als Qualitätskontrollen der Versuche wurden sowohl Lösungsmittel-behandelte Kontrollzellen für die YST-ähnliche Differenzierung selbst und zusätzlich für die Behandlung mit Cisplatin verwendet.

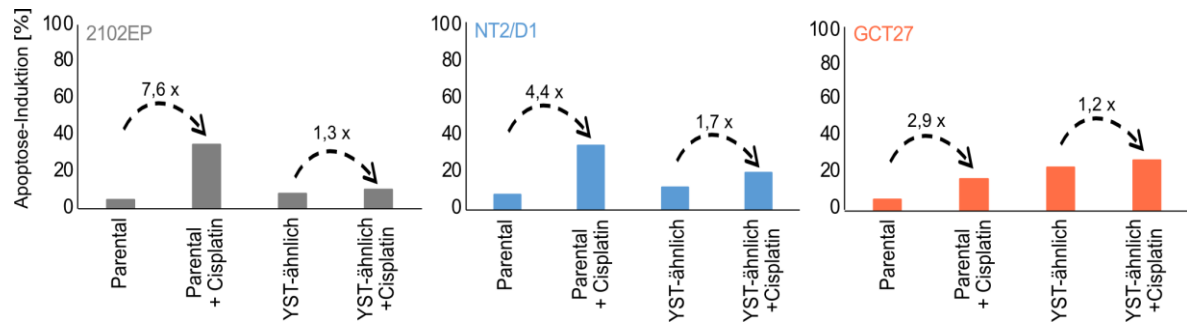


Abbildung 36: Durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptose-Induktion in YST-ähnlichen und parental 2102EP-, NT2/D1- und GCT27-Zellen. Die Apoptose-Messung wurde 48 h nach der Behandlung mit Cisplatin in den LD50_{48h}-Konzentrationen mit jeweils 55.000 Zellen pro Probe durchgeführt.

Im Anschluss wurde die Apoptose-Induktion mittels Durchflusszytometrie gemessen. Dabei führte die Behandlung mit Cisplatin in den parental Kontrollzellen der Zelllinien 2102EP, GCT27 und NT2/D1 zu einem 7,6-fachen, 2,9-fachen und 4,4-fachen Anstieg des prozentualen Anteils an apoptotischen Zellen (Abb. 36). Im Gegensatz dazu wurde in den mit Cisplatin behandelten YST-ähnlichen Zellen eine deutlich geringere Apoptose-Induktion beobachtet (Abb. 36). In 2102EP-Zellen wurde durch die zytotoxische Wirkung von Cisplatin ein 1,3-facher, in GCT27-Zellen ein 1,2-facher und in NT2/D1-Zellen ein 1,7-facher Anstieg des Anteils an apoptotischen Zellen durchflusszytometrisch gemessen (Abb. 36). Es wurde allgemein beobachtet, dass die unbehandelten YST-ähnlichen Zellen im Vergleich zu den parental, unbehandelten Kontrollzellen eine leicht erhöhte Apoptose-Induktion aufwiesen. Um nun molekular zu analysieren, ob die beobachtete Cisplatinresistenz mit einem Anstieg der Genexpression der Galluzzi-Faktoren einhergeht, wurde zum Zeitpunkt der Apoptose-Messung gleichzeitig eine Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR in den Kontrollzellen und den YST-ähnlich differenzierten Zellen mit und ohne vorherige Cisplatin-Behandlung durchgeführt (Abb. 37) (149).

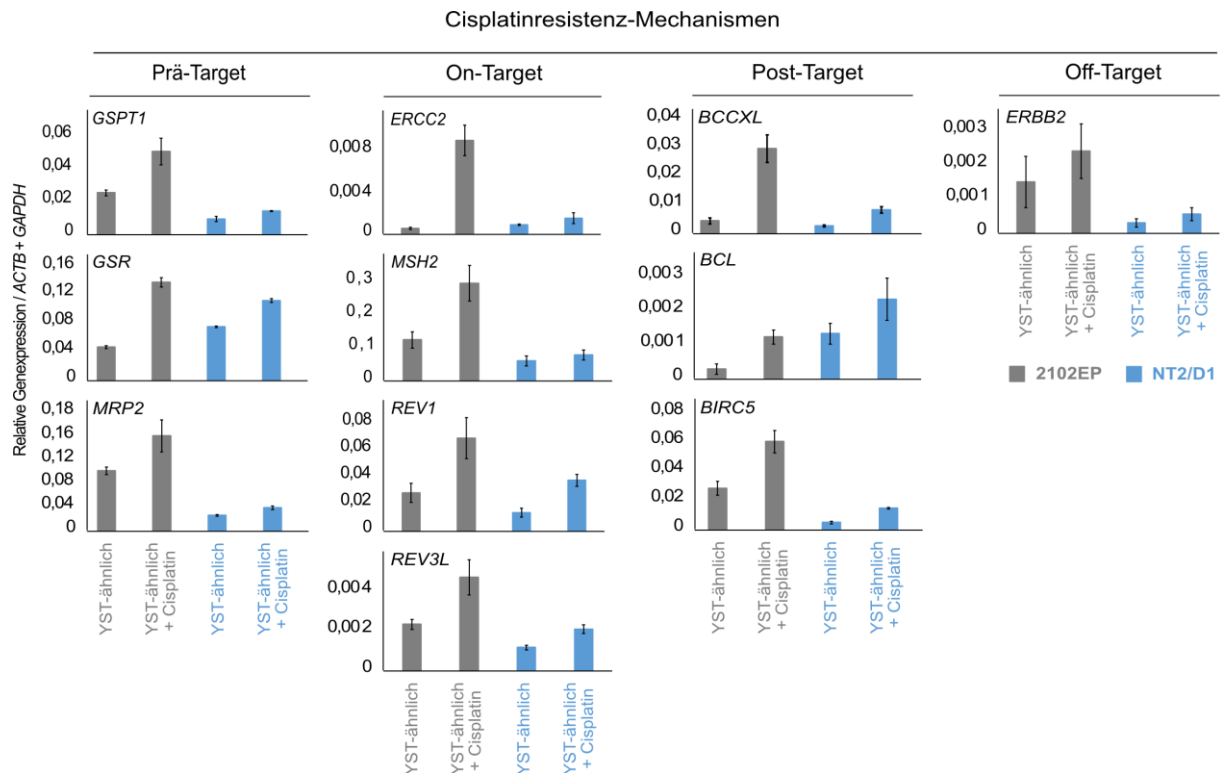


Abbildung 37: Genexpressionsanalyse von Genen der von Galluzzi definierten Cisplatin-Resistenzmechanismen in YST-ähnlich differenzierten Zellen (149). Die relative Genexpression der Galluzzi-Faktoren (unterteilt in Prä- (*GSTP1*, *GSR*, *MRP2*), On- (*ERCC2*, *MSH2*, *REV1*, *REV3L*), Post- (*BCLXL*, *BCL*, *BIRC5*) und Off-Target-Mechanismen (*ERBB2*) der Cisplatinresistenz) wurde in YST-ähnlichen und parental 2102EP und NT2/D1-Zellen nach Durchführung des YST-Differenzierungsprotokolls und zweitägiger Inkubation mit Cisplatin (LD5048h) gemessen (149). *ACTB* und *GAPDH* wurden als *Housekeeping*-Gene und zur Normalisierung der Daten verwendet.

Es wurde eine signifikante Steigerung der Genexpressionsintensität in YST-ähnlichen Zellen nach der Behandlung mit Cisplatin in den untersuchten Galluzzi-Faktoren im Vergleich zu den undifferenzierten, parental EC-Zellen gemessen (Abb. 37). In Folge der Heraufregulation der Galluzzi-Faktoren zeigte sich bei den YST-ähnlichen Zellen im Vergleich zu den parental EC-Zellen eine verringerte Empfindlichkeit gegenüber Cisplatin anhand einer verminderten Induktion von Apoptose (Abb. 35). Die verringerte Sensitivität gegenüber Cisplatin wurde besonders ausgeprägt in den 2102EP-Zellen im Vergleich zu den NT2/D1-Zellen messbar, was mit der ursprünglich höheren Resistenz der 2102EP-Zellen im Vergleich zu den NT2/D1-Zellen übereinstimmt (Abb. 32, Abb. 33, Abb. 37).

In der vorangegangenen Studie von Wruck und Kotthoff et al. und ebenfalls von weiteren Forschungsgruppen wurde postuliert, dass neben SOX17 ebenso FOXA2 ein entscheidender Faktor für die initiale Differenzierung von EC zu YST darstellt und möglicherweise oberhalb von SOX17 in der hierarchischen Abfolge wirkt (61,63).

Während des experimentellen Teils dieser Promotion wurde ergebnislos versucht, die Expression von *FOXA2* in EC-Zelllinien zu stimulieren. Dies umfasste den Einsatz eines geeigneten *FOXA2*-CRISPR/dCas9-SAM-Systems, sowie die Transfektion einer kommerziell erhältlichen *FOXA2*-cDNA (*FOXA2*(NM_021784)-pLenti-C-mGFP-P2A-Puro, Origene). Es wurden außerdem direkte *FOXA2*-Proteintransfektionen ohne positive Resultate getestet. Des Weiteren wurden Versuchsansätze unternommen in denen die *FOXA2*-Expression in YST-Zelllinien (1411H und GCT72) durch genomischen KO mittels des CRISPR/Cas9-Systems auszugeschaltet werden sollte oder durch Inhibition mittels siRNA-Transfektion unterdrückt werden sollte. Diese Versuche blieben erfolglos und führten entweder zu keinen messbaren Veränderungen im Proteinniveau von *FOXA2*, konnten keine Funktionsunterdrückung erreichen oder führten zu einem unmittelbaren Zelltod der behandelten Zellen. Daher konnte die molekulare Rolle von *FOXA2* / *FOXA2* bei der YST-Entwicklung nicht direkt untersucht werden. Trotz dieser Hindernisse wurde nach Anwendung des neu etablierten YST-Differenzierungsprotokolls und Xenotransplantationen von YST-ähnlichen Zellen eine Heraufregulation von *FOXA2* / *FOXA2* auf RNA- und Proteinebene beobachtet (Abb. 26 - 30).

4. Diskussion und Schlussfolgerung

Angeichts des aggressiven Wachstumverhaltens von YST und der hohen Sterblichkeit, die bei GCT-Patienten mit YST-Komponente zu verzeichnen ist, ist die Erforschung gezielter Behandlungsansätze und die Verbesserung der Frühdiagnose von besonderer Bedeutung. Da die zugrunde liegenden Mechanismen der YST-Entstehung bisher weitgehend unklar waren, war das Hauptziel dieser Arbeit, die molekularen Prozesse im Detail zu entschlüsseln um das Verständnis der Krankheit zu vertiefen und damit die Grundlage für die Entwicklung spezifischer Behandlungsmöglichkeiten künftig zu schaffen.

Wie bereits gezeigt wurde, spielen die Transkriptionsfaktoren SOX2 und SOX17 eine bivalente und bedeutende Rolle während der molekularbiologischen Determinierung und Entwicklung der verschiedenen GCT-Subtypen (vgl. Kap. 1.1.3) (55,56,68). Während der GCT-Pathogenese wird SOX2 in pluripotenten EC-Zellen exprimiert, während SOX17 in latent pluripotenten SE und extraembryonalen YST exprimiert wird. Sowohl SOX2 als auch SOX17 sind in der Lage, ein undifferenziertes Zellschicksal in EC (pluripotent) und SE (latent pluripotent) aufrechtzuerhalten. Während SOX2 maßgeblich an der Erhaltung der zellulären Pluripotenz beteiligt ist, ist der Differenzierungsfaktor SOX17 während der frühen Embryonalentwicklung an der Spezifizierung von Keimzellen beteiligt und reguliert demnach viele Gene, die essenziell für die endodermale Differenzierung sind und die Ausbildung endodermaler Gewebe regulieren (55,56,150–152). Neben diesen Funktionen hat SOX17 ebenfalls Auswirkungen auf die Tumorentwicklung und Tumorprogression. Die verstärkte Expression von SOX17 in verschiedenen Tumoren, einschließlich YST, deutet auf regulative Funktion während der Zellproliferation, Differenzierung und Metastasierung von Tumoren hin. In der vorausgehenden Studie von Wruck et al. wurde eine deutlich erhöhte Expression von SOX17 in Kombination mit einer erhöhten Aktivierung der BMP-, TGF-beta WNT- und FGF-Signalwege in YST-Geweben im Vergleich zu den pluripotenten, SOX2 exprimierenden EC-Geweben festgestellt (61). Dies legt nahe, dass SOX17 in Kombination mit den genannten Signalwegen die Differenzierung von YST aus EC vorantreiben könnte (61). Die Expression von SOX17, die während der YST-ähnlichen Differenzierung in EC-Zellen im Rahmen dieser Arbeit induziert wurde, ahmt eine solche Veränderung der Signaltransduktion in den untersuchten EC-Zellen nach und ermöglichte so die Analyse der molekularen Funktion von SOX17 im Kontext

der YST-Entwicklung. Die zellulären Veränderungen in ursprünglich pluripotenten EC-Zellen nach der Anwendung des neu etablierten YST-Differenzierungsprotokolls zeigten, dass die orchestrierte Induktion von SOX17 / SOX17 und die Aktivierung der WNT- (durch CHIRON), TGF-beta- (mittels Activin-A) und FGF-Signalwege (durch FGF2 in Kombination mit Heparin) zu einer effizienten Differenzierung in Richtung YST-Zellschicksal führt (Abb. 12, 15, 18, 20, 22). Innerhalb von acht Tagen entstand unter Anwendung des neuartigen YST-Differenzierungsprotokolls eine gemischte Population von GCT-Zellen, die aus undifferenzierten EC-Zellen, frühen, intermediären, späten und reifen YST-ähnlichen Zellen bestand (Abb. 19, 31, 32). Die Zusammensetzung an Zellen einer gemischten GCT-Population (EC-ähnlich und YST-ähnlich) blieb auch nach der Xenotransplantation der YST-ähnlichen Zellen in die Flanken von Nacktmäusen nachweisbar, wobei eine ausgeprägtere EC-Population (SOX2⁺, OCT3/4⁺) beobachtet wurde (Abb. 29, Abb. 30). Dies lässt sich darauf zurückführen, dass die EC-Zellen aufgrund ihres stammzellartigen Charakters *in vivo* schneller proliferieren und die YST-Zellen (SOX17⁺, FOXA2⁺) somit überwachsen (Abb. 29, Abb. 30). Durch die Schaffung eines reproduzierbaren und funktionalen YST-ähnlichen Forschungsmodells wurde nicht nur eine Grundlage für die detaillierte *in vitro*-Erforschung der YST-assoziierten Differenzierungsprozesse geschaffen, sondern auch der Weg für zukünftige Medikamenten-Screenings zur Identifizierung von YST-spezifischen Therapeutika geebnet. Dies ist von herausragender Bedeutung und bietet einen Mehrwert, da bisher kein derart physiologisches Modell verfügbar ist, das die klinische Situation von GCT mit YST-Anteil authentisch widerspiegelt. Es ist zu erwarten, dass dieses Forschungsmodell zukunftsweisende Forschungsergebnisse liefern wird, die eine direkte Relevanz für die klinische Praxis haben könnten.

Neben SOX17 wurde FOXA2 als weiterer Initiator in der Entwicklung von YST postuliert (61). Die direkte Untersuchung der molekularen Funktion von FOXA2 während der YST-Differenzierung war aufgrund des Scheiterns der Versuche, FOXA2 in EC-Zellen zu induzieren oder in YST-Zellen zu hemmen, im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Es wurde vermutet, dass FOXA2 während der YST-Entwicklung vor SOX17 agieren könnte, da FOXA2 in der Literatur als Pionierfaktor beschrieben ist, der direkten Zugang zu geschlossenem Chromatin hat und somit besonders effektive Differenzierungsreaktionen einleiten könnte (61,153). FOXA2 spielt zudem eine bedeutende Rolle als Differenzierungsfaktor während der frühen murinen Leberentwicklung und bei der Regulation des Leberstoffwechsels (154–157). In

Experimenten bei denen die Deletion von *FOXA2* in einer humanen Leberzelllinie (HepG2) durchgeführt wurde, zeigen sich hauptsächlich metabolische Einschränkungen wie die Inhibition der Glykolyse, des TCA-Zyklus und der oxidativen Phosphorylierung, sowie die Abweichung der endodermalen Keimblattdifferenzierungslinie in Richtung Neuroektoderm- oder Mesoderm-ähnliche Zellschicksale (157). Diese Befunde legen nahe, dass *FOXA2* möglicherweise nicht direkt an den initialen YST-Differenzierungsprozessen beteiligt ist, sondern auch in YST, anstelle der zuvor angenommenen entwicklungsbiologischen Funktion als Initiator und Schlüsselfaktor der YST-Entwicklung, eine metabolische Funktion übernehmen könnte. *FOXA2* reguliert wichtige Transkriptionsfaktoren wie FXR und LXR-alpha, die wiederum den Stoffwechsel in Leberzellen kontrollieren (153,158). Frühere Studien haben eine starke Ähnlichkeit zwischen YST und Leberkarzinomen aufgezeigt, sodass neben den beobachteten transkriptionellen Gemeinsamkeiten auch vergleichbare Mechanismen der Stoffwechselregulation sowohl in YST als auch in Leberzellen greifen könnten (61,159,160). Dieser Aspekt wurde in dieser Arbeit jedoch nicht vertieft untersucht, da der Fokus auf den molekularen Entwicklungsprozessen von YST lag. In den Versuchen zur YST-ähnlichen Differenzierung im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Heraufregulation des *FOXA2*-Transkripts und des *FOXA2*-Proteins nach der Anwendung des neuartigen YST-Differenzierungsprotokolls festgestellt (Abb. 12, Abb. 27, Abb. 29, Abb. 30). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass *FOXA2* eine Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung des YST-Zellschicksals spielt, jedoch die regulatorische Funktion nicht zwangsläufig vor *SOX17*, sondern möglicherweise synchron, parallel oder sogar nach *SOX17* einsetzt. Insbesondere zeigten die Ergebnisse der Xenografts eine stabile *FOXA2*-Expression nach monatelanger Tumorprogression *in vivo*, was darauf hindeutet, dass *FOXA2* möglicherweise besonders durch Signale aus der Tumormikroumgebung induziert wird und eher am Erhalten des YST-Zellschicksals beteiligt ist, wie auch bereits von Nettersheim et al. vermutet (68).

In stammzellbasierten Studien beschrieben Mackinlay et al. und Markouli et al. eine Differenzierungsreaktion von humanen embryonalen bzw. pluripotenten Stammzellen (hESC / hPSC) in Richtung des extraembryonalen Endoderms bzw. Dottersacks (YS) (147,161). Die starke molekularbiologische Ähnlichkeit zwischen hESC und den malignen EC-Zellen erlaubte die Hypothese, dass möglicherweise ähnliche Faktoren und Prozesse an den YS- / YST-artigen Differenzierungsprozessen beteiligt sind.

Mackinlay et al. konnten, nachdem der WNT-Aktivator CHIRON in Kombination mit Activin-A (TGF-beta-Signalstimulus) appliziert wurde, eine Induktion endodermaler / YST-assoziiierter Markergene wie *AFP*, *APOA1*, *ANKRD1*, *CST1*, *FOXA2*, *GATA6* und *SOX17* nachweisen (161). Gleichzeitig wurde eine Reduktion der Genexpression der Pluripotenzfaktoren *NANOG*, *OCT3/4* und *SOX2* beobachtet (161). Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den Ergebnissen dieser Studie zu der YST-Differenzierung und stützen die in der Literatur beschriebene Ähnlichkeit zwischen benignen hESC- und malignen EC-Zellen und legen die Vermutung nahe, dass ähnliche Signalprozesse in die Hemmung der Pluripotenz und die endodermale bzw. YS- / YST-ähnliche Differenzierung involviert sein könnten (61,162). Markouli et al. berichteten darüber hinaus, dass eine anhaltende Aktivierung der WNT- (vermittelt durch CHIRON) und BMP- (vermittelt durch BMP4) Signalwege die Differenzierung von hESC in das definitive Endoderm beeinträchtigt und die Zellen schließlich in das extraembryonale Mesoderm treibt (147). Die mesodermale Differenzierungsreaktion konnte durch die anschließende Inhibition der zuvor aktivierten WNT- (inhibiert durch den pharmakologischen WNT-Inhibitor XAV-939) und BMP- (inhibiert durch rekombinantes NOGGIN) Signalwege umgekehrt werden, wodurch die Zellen in die endodermale Entwicklung geleitet werden (147). Die in dieser Arbeit durchgeführten Behandlungen der EC-Zelllinie NCCIT, die eine Hemmung der WNT- und BMP-Signalwege mit den WNT- (XAV-939) und BMP- (rekombinantes NOGGIN) Signalwegsinhibitoren zur Folge hatten, konnten jedoch keine messbaren Effekte hinsichtlich endodermaler oder YST-assoziiierter Genexpressionsveränderungen zeigen. Somit scheint die WNT- und BMP-Inhibition kein wesentlicher Prozess während der YST-Differenzierung *in vitro* darzustellen (Abb. 12). Demgegenüber konnte die Aktivierung des BMP-Signalwegs durch BMP2 und BMP4 in der EC-Zelllinie NCCIT als Stimulus für die Ausbildung eines YST-ähnlichen Zellschicksals identifiziert werden. Durch die viertägige Behandlung mit rekombinantem BMP2-Protein wurden die YST-assoziierte Gene *AFP*, *ANKRD1*, *APOA1*, *CST1*, *FOXA2*, *GATA6* und *SOX17* heraufreguliert (FC > 2, Abb. 12). Die Pluripotenzfaktoren wurden jedoch kaum dereguliert. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass weitere Signalwegsmoleküle für die Differenzierung in ein YST-assoziiertes Zellschicksal notwendig sein müssten (Abb. 12). Aus diesem Grund identifizierten wir neben den von Mackinlay et al. verwendeten Signalmolekülen (Activin-A und CHIRON) die Supplementierung von FGF2 und Heparin als zusätzliche Stimuli für die effektive Induktion des YST-Zellschicksals, denn die Behandlung mit

FGF2 und Heparin unterdrückte die Expression Pluripotenzfaktoren *NANOG* und *OCT3/4* besonders wirksam (Abb. 12) (161). Durch den Vergleich der durchgeführten Differenzierungsversuche wurde außerdem festgestellt, dass die Anwendung von rekombinantem FGF2-Protein positive Effekte auf den Erhalt der Zellviabilität über die gesamte Versuchsdauer zeigte, da sich wenige tote Zellen schwimmend im Überstand befanden. Es wurde außerdem eine erhöhte Zellviabilität bei den differenzierenden Zellen beobachtet, die FGF2 erhielten im Vergleich zu den Zellen, die stattdessen mit BMP2/4 behandelt wurden. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde in der endgültigen Version des YST-Differenzierungsprotokolls FGF2 zusammen mit Heparin anstelle von BMP2 oder BMP4 verwendet (Abb. 19).

Die Aktivierung von *SOX17* / *SOX17* und den WNT-, TGF-beta- und FGF-Signalwegen führte durch die Anwendung des finalen YST-Differenzierungsprotokolls sowohl morphologisch als auch molekularbiologisch zu einem YST-ähnlichen Zellschicksal (Abb. 21, Abb. 22, Abb. 27, Abb. 29, Abb. 30). Dieses, in EC-Zellen induzierte, YST-ähnliche Zellschicksal wurde durch die Anreicherung von viablen YST-ähnlichen Zellen mittels des YST-assoziierten Oberflächenrezeptors CXCR4 nach der Anwendung des Differenzierungsprotokolls bestätigt (Abb. 23 - 27). Die Ergebnisse der nachfolgenden Genexpressionsanalysen der CXCR4⁺-Zellpopulation bestätigen die YST-ähnliche Differenzierungsreaktion in den CXCR4⁺-Zellen durch das neu etablierte Protokoll. Die Anwesenheit von CXCR4 in den mit dem YST-Differenzierungsprotokoll behandelten Zellen korreliert somit, wie bereits in Vorarbeiten in YST-Zelllinien und -geweben beobachtet, mit dem YST-Zellschicksal (148,159). Die YST-ähnlich differenzierten Zellen der Zelllinien 2102EP, GCT27 und NCCIT wurden hochauflösend auf Einzelzell-Ebene sequenziert und bestätigten, dass sowohl nullipotente (2102EP) als auch pluripotente (GCT27 und NCCIT) EC-Zellen in der Lage sind, ein YST-ähnliches Zellschicksal auszubilden (Abb. 31, Abb. 32). Die Transformation der Zellen verläuft dynamisch und weist unterschiedlich ausgeprägte Differenzierungsstadien auf (frühe, intermediäre, späte und reife YST-ähnliche Entwicklungsstadien), die sich anhand von transkriptionellen Signaturen unterscheiden lassen. Desweiteren wurde die Induktion von Genen beobachtet, die den Cisplatinresistenz-Mechanismen zuzuordnen sind (Galluzzi-Faktoren(149)). Die Expression von Faktoren der Prä-, On-, Post-, und Off-Target-Mechanismen in YST-ähnlichen Zellen weist darauf hin, dass die Resistenzentstehung ein multifaktorieller Prozess zu sein scheint (Abb. 33). Die Aktivierung verschiedener resistenzfördernder

Signalwege stellt ein bedeutendes Hindernis bei der Überwindung der Therapieflucht und des Therapieversagens bei GCT-Patienten dar. Die vorliegenden Daten zeigen, dass häufig mehrere Resistenz-Mechanismen gleichzeitig aktiviert werden (149,163–166). Obwohl die Hemmung einzelner Signalwege der Cisplatinresistenz-Mechanismen durch vorhandene pharmakologische Inhibitoren zu einer partiellen Wiederherstellung der Empfindlichkeit gegenüber Cisplatin führen kann, bleibt möglicherweise eine gewisse Resistenz bestehen, die den Therapieerfolg durch die Redundanz der multifaktoriellen Resistenz-Mechanismen beeinträchtigen könnte (149). Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die YST-ähnliche Differenzierung *in vitro* direkt mit der Induktion von Cisplatinresistenz-Mechanismen korreliert und möglicherweise eine Art Fluchtmechanismus der GCT-Erkrankung unter Therapie darstellen könnte. Die Analysen der YST-ähnlichen Zellen mittels Einzelzell-RNA-Sequenzierung spiegelten Merkmale einer beginnenden Cisplatinresistenz wider, die anschließend funktional durch Apoptose-Messungen der untersucht und bestätigt wurden (Abb. 36). Es wurde festgestellt, dass die YST-ähnlichen Zellen eine höhere Induktion von Apoptose aufweisen, was durch die fortlaufende Differenzierung und die damit verbundene zelluläre Stressreaktion erklärt werden kann. Die YST-ähnlichen Zellen zeigten darüber hinaus im Vergleich zu ihren parental undifferenzierten (EC)-Vorläuferzellen eine erhöhte Resistenz gegenüber Cisplatin (siehe Abb. 36). Dies legt nahe, dass die YST-ähnlichen Entwicklungsprozesse in Verbindung mit der Entwicklung einer Cisplatin-Resistenz stehen. Die molekularen Veränderungen, wie die veränderten Signaltransduktionen in den YST-ähnlichen Zellen während der Transformation von dem pluripotenten EC-Zellschicksal zu dem YST-ähnlichen Zellschicksal, scheinen eine Aktivierung der Resistenzmechanismen zu begünstigen. Möglicherweise finden bislang unbekannte *Crosstalks* der YST-assoziierten Signalkaskaden und der Cisplatinresistenz-assoziierten Signalkaskaden statt, die zur Ausbildung der hoch malignen und therapieresistenten YST-Komponente und somit zu refraktären GCT führen könnten. Während EC in der klinischen Praxis oft erfolgreich mit einer Cisplatin-basierten Chemotherapie behandelt werden können, sind YST häufig therapieresistent und führen oft zu einem Therapieversagen bis hin zum Versterben der betroffenen Patienten. Das neu etablierte YST-Modell spiegelt somit die klinische Realität hinsichtlich der Komposition aus EC- und YST-ähnlichen Zellen und der steigenden Cisplatinresistenz wider und ermöglicht die künftige Erforschung der dort ablaufenden Signalprozesse. Des Weiteren wurde zusätzlich anhand von *in*

vitro-Behandlungen von YST-ähnlichen Zellen bestätigt, dass in den bereits resistenteren YST-ähnlichen Zellen das weitere Zuführen von Cisplatin zu einer Steigerung der Cisplatinresistenz führen kann (Abb. 36). Dies könnte durch die intrinsisch modulierte Signaltransduktion der Cisplatinresistenz-Mechanismen, die bereits durch die hoch maligne Differenzierung von EC zu YST in den YST-ähnlichen Zellen aktiviert wurden, erfolgen (149). Die Ergebnisse stützen daher die anfänglich gestellte Hypothese, dass die Entwicklung von YST tatsächlich mit der Entstehung von Therapieresistenzen korrelieren könnte. Dies legt nahe, dass die transformierten YST-ähnlichen Tumorzellen möglicherweise über Detoxifizierungsmechanismen (Galluzzi-Faktoren) verfügen und diese verstärkt aktivieren um ihr Überleben unter der Anwendung von (Cisplatin-basierten) therapeutischen Maßnahmen zu sichern. (Abb. 33, Abb. 36, Abb. 37). Die Hemmung der Signalwege, die direkt mit der Cisplatinresistenz in Verbindung stehen (Galluzzi-Faktoren), könnte zu einer partiellen Wiederherstellung der Empfindlichkeit gegenüber Cisplatin führen (149), jedoch führt die Hemmung der durch Galluzzi beschriebenen Cisplatinresistenz-Mechanismen nur zur oberflächlichen Abmilderung der Resistenz, da die Resistenz-Entwicklung in GCT bereits mit der Differenzierung in Richtung des YST-Zellschicksals bedingt durch die beschriebenen Therapieflucht unter Cisplatin-basierter Chemotherapie beginnt. Basierend auf den Ergebnissen dieser Studie deutet sich demnach an, dass eine frühzeitige gezielte Blockierung von SOX17 und den nachgeschalteten Signalwegen, die die YST-ähnliche Differenzierung fördern (wie FGF-, TGF-beta- und WNT-Signalwegen), eine sinnvolle Strategie sein könnte um das Risiko der Resistenzentwicklung bereits bei Auftreten eines EC zu minimieren (Abb. 38). Diese Behandlungsstrategie könnte möglicherweise die maligne Transformation von EC-Zellen zu refraktären YST-Komponenten unterbinden und ebenfalls die Therapierbarkeit von NSE deutlich verbessern.

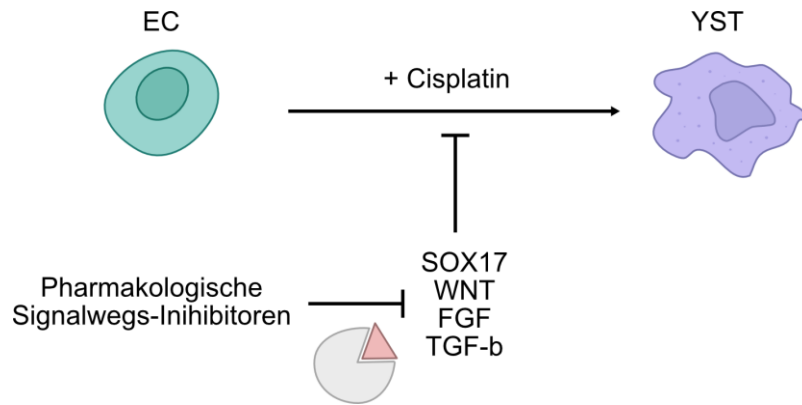


Abbildung 38: Schematische Darstellung der künftig möglichen Behandlungsoptionen von EC zur Unterbindung der YST-Entwicklung und der Entwicklung von Therapieresistenzen. Unter der geläufigen Cisplatin-basierten Standardtherapie reprogrammieren sich EC-Komponenten oftmals im Sinne einer Therapieflucht in YST. Um diese hoch aggressive Entwicklung von YST aus EC zu verhindern, könnten pharmakologische Inhibitoren eingesetzt werden, die SOX17 oder die identifizierten, differenzierungsfördernden FGF-, TGF-beta- (TGF- β) und WNT-Signalwege in YST hemmen. Dies stellt eine potenziell neuartige Therapieoption dar, die additiv zu der herkömmlichen Cisplatin-basierten Chemotherapie eingesetzt werden könnte.

In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Ricci et al. wurde das Auftreten einer speziellen Form von YST, dem sarkomatoiden YST, als besonders aggressiver histopathologischer Subtyp beschrieben (167). Die Autoren postulieren, dass die Entstehung des sarkomatoiden YST-Subtyps möglicherweise durch die Cisplatin-basierte Chemotherapie bedingt wird, welche eine Veränderung der Genexpressionsprofilen und der Proteinproduktion begünstigt, die sich von der klassischen YST-Biologie unterscheidet. Dabei wurden beispielsweise YST-untypische Proteinniveaus beobachtet, wie zum Beispiel nur fokal positive Areale von GATA3 und das Fehlen des üblicherweise exprimierten, spezifischen YST-Faktors FOXA2 bei den von Ricci et al. beschriebenen sarkomatoiden YST (61–63,167). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Einzelzell-Analysen bestätigten eine geringe GATA3-Expression und zeigten ebenfalls keine FOXA2-Expression in den identifizierten Cisplatin-resistenten Zellpopulationen (Abb. 34). Diese Veränderung könnte eine temporäre Modulation in der zellulären Signaltransduktion auslösen, die wiederum eine schnelle und hoch aggressive Tumorprogression fördern könnte (164). Zudem wurden spindelförmige und längliche Zellen, charakteristisch für Sarkome, unter den YST-ähnlichen Zellen beobachtet. Somit könnten die identifizierten YST-ähnlichen, cisplatinresistenten Zellen möglicherweise einen Übergang zu einem sarkomatoiden Phänotyp durchlaufen haben (Abb. 21 A). Neben der verstärkten Expression der Galluzzi-Faktoren könnten somit die sarkomatoiden Veränderungen in

YST-ähnlichen Zellen, ebenfalls molekulare Merkmale von cisplatinresistenten YST darstellen (149,167).

Zusammenfassend tragen die Erkenntnisse dieser Forschungsarbeit dazu bei, die Herausforderungen bezüglich der klinischen Behandlung von GCT besser zu verstehen. Insbesondere der Zusammenhang zwischen der hoch aggressiven YST-Entwicklung und der oftmals damit verbundenen Cisplatinresistenz-Entwicklung. Diese Studie identifizierte die molekularen Mechanismen, die eine dynamische Differenzierungsreaktion von EC-Zellen über verschiedene Entwicklungsstadien bis hin zu reifen YST-Zellen regulieren. Die Induktion von SOX17 / SOX17 und die orchestrierte Aktivierung der WNT, TGF-beta und FGF-Signalwege initiieren, etablieren und stabilisieren die Transformation eines YST-artigen Zellschicksals (Abb. 39). Diese Entwicklung wurde neben den *in vitro*-Analysen ebenfalls nach monatelanger *in vivo*-Tumorprogression im Nacktmausmodell durch die Isolation von GCT-Proben mit YST-Kompartimenten beobachtet (Abb. 28 - 30). Des Weiteren wurde die YST-Entwicklung als Fluchtmechanismus unter Cisplatin-basierter Therapie identifiziert, der durch weitere Chemotherapie-Behandlungen möglicherweise ein besonders aggressiven, histopathologisch sarkomatoid wachsenden YST-Subtyp hervorbringen könnte (Abb. 39).

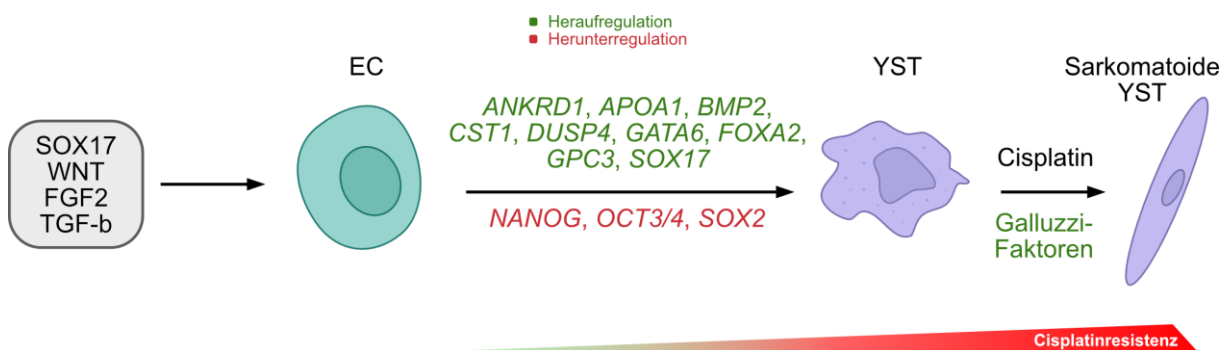


Abbildung 39: Graphische Zusammenfassung der YST-Entwicklung. Die Aktivierung von SOX17 und den WNT-, FGF2-, TGF-beta(TGF-b)-Signalwegen führt zu der Heraufregulation YST-assoziierter Gene (*ANKRD1, APOA1, BMP2, CST1, DUSP4, GATA6, FOXA2, GPC3, SOX17*) während die in rot markierten Pluripotenzgene (*NANOG, OCT3/4, SOX2*) herunterreguliert werden um das YST-Zellschicksal zu etablieren. Unter der Behandlung mit Cisplatin werden in YST die Galluzzi-Faktoren induziert, die durch die gesteigerte Cisplatinresistenz eine Therapieflucht ermöglichen (149). Die Behandlung von Cisplatin kann außerdem zu dem histopathologisch sarkomatoid wachsendem YST-Subtyp führen und zeichnet sich durch eine längliche bis spindelförmige Morphologie aus.

Somit wurde ein neuartiges und physiologisches *in vitro*- und *in vivo* Modell für YST etabliert, welches die detaillierte Erforschung und Charakterisierung der YST-

Entwicklung ermöglicht. Darüber hinaus dient es als Grundlage für die Durchführung von Wirkstoff-*Screenings*, um spezifische therapeutische Ansätze für YST zu identifizieren oder die Bildung von YST zu verhindern.

5. Literaturverzeichnis

1. Chiquoine AD. THE IDENTIFICATION, ORIGIN, AND MIGRATION OF THE PRIMITIVE GERM CELLS IN THE MOUSE EMBRYO. [cited 2024 Jan 11]; Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ar.1091180202>
2. Mäkelä JA, Koskenniemi JJ, Virtanen HE, Toppari J. Testis Development. *Endocr Rev* [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2024 Jan 11];40(4):857–905. Available from: <https://dx.doi.org/10.1210/er.2018-00140>
3. Otis EM, Brent R. Equivalent ages in mouse and human embryos. *Anat Rec* [Internet]. 1954 Sep 1 [cited 2024 Jan 11];120(1):33–63. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ar.1091200104>
4. Irie N, Tang WWC, Azim Surani M. Germ cell specification and pluripotency in mammals: a perspective from early embryogenesis. *Reprod Med Biol* [Internet]. 2014 Oct 3 [cited 2024 Jan 11];13(4):203–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25298745/>
5. 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 6 [cited 2024 Jan 11];22(12):1617. Available from: [/pmc/articles/PMC2428060/](https://pmc/articles/PMC2428060/)
6. Arnold SJ, Robertson EJ. Making a commitment: cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2009 Feb [cited 2024 Jan 11];10(2):91–103. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19129791/>
7. Anderson RA, Fulton N, Cowan G, Coutts S, Saunders PTK. Conserved and divergent patterns of expression of DAZL, VASA and OCT4 in the germ cells of the human fetal ovary and testis. *BMC Dev Biol* [Internet]. 2007 [cited 2024 Jan 11];7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18088417/>

8. Mamsen LS, Brøchner CB, Byskov AG, Møllgård K. The migration and loss of human primordial germ stem cells from the hind gut epithelium towards the gonadal ridge. *Int J Dev Biol* [Internet]. 2012 [cited 2024 Jan 11];56(10–12):771–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23417399/>
9. Cavaleri F, Schöler HR. Nanog: A New Recruit to the Embryonic Stem Cell Orchestra. *Cell*. 2003 May 30;113(5):551–2.
10. Høyer PE, Byskov AG, Møllgård K. Stem cell factor and c-Kit in human primordial germ cells and fetal ovaries. *Mol Cell Endocrinol*. 2005 Apr 29;234(1–2):1–10.
11. McLaren A. Germ cells and germ cell sex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* [Internet]. 1995 [cited 2024 Jan 11];350(1333):229–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8570686/>
12. Goto T, Adjaye J, Rodeck CH, Monk M. Identification of genes expressed in human primordial germ cells at the time of entry of the female germ line into meiosis. *Mol Hum Reprod* [Internet]. 1999 Sep 1 [cited 2024 Jan 11];5(9):851–60. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/molehr/5.9.851>
13. Kerr CL, Hill CM, Blumenthal PD, Gearhart JD. Expression of pluripotent stem cell markers in the human fetal ovary. *Hum Reprod* [Internet]. 2008 [cited 2024 Jan 11];23(3):589–99. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18203707/>
14. Kerr CL, Hill CM, Blumenthal PD, Gearhart JD. Expression of Pluripotent Stem Cell Markers in the Human Fetal Testis. *Stem Cells*. 2008 Feb 1;26(2):412–21.
15. Rosario R, Childs AJ, Anderson RA. RNA-binding proteins in human oogenesis: Balancing differentiation and self-renewal in the female fetal germline. *Stem Cell Res* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2024 Jan 11];21:193. Available from: [/pmc/articles/PMC5446320/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/275446320/)

16. Saitou M, Yamaji M. Germ cell specification in mice: signaling, transcription regulation, and epigenetic consequences. *Reproduction* [Internet]. 2010 Jun [cited 2024 Jan 11];139(6):931–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20371640/>
17. Koopman P, Münsterberg A, Capel B, Vivian N, Lovell-Badge R. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* 1990 348:6300 [Internet]. 1990 [cited 2024 Jan 11];348(6300):450–2. Available from: <https://www.nature.com/articles/348450a0>
18. Goodfellow PN, Lovell-Badge R. SRY AND SEX DETERMINATION IN MAMMALS. 1993 [cited 2024 Jan 11]; Available from: www.annualreviews.org
19. Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Munsterberg A, et al. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. 1990;
20. 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 [cited 2024 Jan 11];121(5):1487–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7789278/>
21. Vincent SD, Dunn NR, Sciammas R, Shapiro-Shalef M, Davis MM, Calame K, et al. The zinc finger transcriptional repressor Blimp1/Prdm1 is dispensable for early axis formation but is required for specification of primordial germ cells in the mouse. *Development* [Internet]. 2005 Mar 15 [cited 2024 Jan 11];132(6):1315–25. Available from: <https://dx.doi.org/10.1242/dev.01711>
22. Starz-Gaiano M, Lehmann R. Moving towards the next generation. *Mech Dev* [Internet]. 2001 [cited 2024 Jan 11];105(1–2):5–18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11429277/>

23. Lawson KA, Dunn NR, Roelen BAJ, Zeinstra LM, Davis AM, Wright CVE, et al. Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev* [Internet]. 1999 Feb 15 [cited 2024 Jan 11];13(4):424–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10049358/>
24. 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 15 [cited 2024 Jan 11];130(18):4279–86. Available from: <https://dx.doi.org/10.1242/dev.00640>
25. Boldajipour B, Mahabaleshwar H, Kardash E, Reichman-Fried M, Blaser H, Minina S, et al. Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration. *Cell* [Internet]. 2008 Feb 8 [cited 2024 Jan 11];132(3):463–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18267076/>
26. Lennartsson J, Rönnstrand L. Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications. *Physiol Rev* [Internet]. 2012 Oct 1 [cited 2024 Jan 15];92(4):1619–49. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23073628/>
27. Fendler A, Stephan C, Yousef GM, Kristiansen G, Jung K. The translational potential of microRNAs as biofluid markers of urological tumours. *Nat Rev Urol* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2024 Jan 15];13(12):734–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27804986/>
28. Messerschmidt DM, Knowles BB, Solter D. DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. *Genes Dev* [Internet]. 2014 Apr 15 [cited 2024 Jan 15];28(8):812–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24736841/>
29. Mäkelä JA, Toppari J. Spermatogenesis. *Endocrinology (Switzerland)* [Internet]. 2017 [cited 2024 Jan 11];417–55. Available from:

https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-319-44441-3_13

30. Shojaeian A, Mehri-Ghahfarrokhi A, Banitalebi-Dehkordi M. Monophosphoryl Lipid A and Retinoic Acid Combinations Increased Germ Cell Differentiation Markers Expression in Human Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stromal Cells in an In vitro Ovine Acellular Testis Scaffold. *Int J Mol Cell Med* [Internet]. 2020 [cited 2024 Jan 11];9(4):288. Available from: [/pmc/articles/PMC7936076/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/336076/)
31. de Rooij DG. Organization of the seminiferous epithelium and the cycle, and morphometric description of spermatogonial subtypes (rodents and primates). *The Biology of Mammalian Spermatogonia* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2024 Jan 11];3–20. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4939-7505-1_1
32. Johnson L. Efficiency of spermatogenesis. *Microsc Res Tech* [Internet]. 1995 Dec 1 [cited 2024 Jan 11];32(5):385–422. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jemt.1070320504>
33. McKinnell C, Mitchell RT, Morris K, Anderson RA, Kelnar CJ, Wallace WH, et al. Perinatal germ cell development and differentiation in the male marmoset (*Callithrix jacchus*): similarities with the human and differences from the rat. *Hum Reprod* [Internet]. 2013 [cited 2024 Jan 11];28(4):886–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23321215/>
34. Li R, Albertini DF. The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2013 14:3 [Internet]. 2013 Feb 22 [cited 2024 Jan 11];14(3):141–52. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrm3531>
35. Cheng L, Albers P, Berney DM, Feldman DR, Daugaard G, Gilligan T, et al. Testicular cancer. Vol. 4, *Nature Reviews Disease Primers*. Nature Publishing Group; 2018.
36. Park JS, Kim J, Elghiaty A, Ham WS. Recent global trends in testicular cancer incidence and mortality. *Medicine (United States)*. 2018;

37. Oosterhuis JW, Looijenga LHJ. Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(3):210–22.
38. Oosterhuis JW, Looijenga LHJ. Human germ cell tumours from a developmental perspective. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2019;19(9):522–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41568-019-0178-9>
39. Reuter VE. Origins and molecular biology of testicular germ cell tumors. *Mod Pathol* [Internet]. 2005 [cited 2024 Jan 16];18 Suppl 2:51–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15761466/>
40. Ye H, Ulbright TM. Difficult differential diagnoses in testicular pathology. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2012 Apr [cited 2024 Jan 16];136(4):435–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22458906/>
41. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol* [Internet]. 2016 [cited 2024 Jan 9];70(1):93–105. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26935559/>
42. Mikuz G. [Germ cell and sex cord-stromal tumors of the testis: WHO classification 2016]. *Pathologe* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2024 Jan 9];38(3):209–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28474163/>
43. Krege S, Beyer J, Souchon R, Albers P, Albrecht W, Algaba F, et al. European Consensus Conference on Diagnosis and Treatment of Germ Cell Cancer: A Report of the Second Meeting of the European Germ Cell Cancer Consensus group (EGCCCG): Part I. *Eur Urol*. 2008;53(3):478–96.
44. Berney DM, Looijenga LHJ, Idrees M, Oosterhuis JW, Rajpert-De Meyts E, Ulbright TM, et al. Germ cell neoplasia in situ (GCNIS): evolution of the current nomenclature for testicular pre-invasive germ cell malignancy. *Histopathology*. 2016;69(1):7–10.

45. Sonne SB, Almstrup K, Dalgaard M, Juncker AS, Edsgard D, Ruban L, et al. Analysis of gene expression profiles of microdissected cell populations indicates that testicular carcinoma in situ is an arrested gonocyte. *Cancer Res* [Internet]. 2009 Jun 15 [cited 2024 Jan 15];69(12):5241–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19491264/>
46. Van De Geijn GJM, Hersmus R, Looijenga LHJ. Recent developments in testicular germ cell tumor research. *Birth Defects Res C Embryo Today* [Internet]. 2009 Mar [cited 2024 Jan 15];87(1):96–113. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19306344/>
47. Baroni T, Arato I, Mancuso F, Calafiore R, Luca G. On the Origin of Testicular Germ Cell Tumors: From Gonocytes to Testicular Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 2019 [cited 2024 Jan 15];10(JUN):343. Available from: [/pmc/articles/PMC6563414/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3431414/)
48. Looijenga LHJ, Zafarana G, Grygalewicz B, Summersgill B, Debiec-Rychter M, Veltman J, et al. Role of gain of 12p in germ cell tumour development. *APMIS*. 2003 Jan 1;111(1):161–70.
49. Rosenberg C, Van Gurp RJHLM, Geelen E, Oosterhuis JW, Looijenga LHJ. Overrepresentation of the short arm of chromosome 12 is related to invasive growth of human testicular seminomas and nonseminomas. *Oncogene* [Internet]. 2000 Nov 30 [cited 2024 Jan 15];19(51):5858–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11127816/>
50. Bosl GJ, Ilson DH, Rodriguez E, Motzer RJ, Reuter VE, Chaganti RSK. Clinical relevance of the i(12p) marker chromosome in germ cell tumors. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 1994 Mar 2 [cited 2024 Jan 15];86(5):349–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8308927/>
51. Atkin NB, Baker MC. i(12p): Specific chromosomal marker in seminoma and malignant teratoma of the testis? *Cancer Genet Cytogenet* [Internet]. 1983 Oct 1 [cited 2024 Jan 15];10(2):199–204. Available from: <http://www.cancerjournal.org/article/0165460883901255/fulltext>

52. Clark AT, Rodriguez RT, Bodnar MS, Abeyta MJ, Cedars MI, Turek PJ, et al. Human STELLAR, NANOG, and GDF3 genes are expressed in pluripotent cells and map to chromosome 12p13, a hotspot for teratocarcinoma. *Stem Cells* [Internet]. 2004 Mar [cited 2024 Jan 15];22(2):169–79. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14990856/>
53. Kristensen DG, Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Almstrup K. Epigenetic features of testicular germ cell tumours in relation to epigenetic characteristics of foetal germ cells. *Int J Dev Biol* [Internet]. 2013 [cited 2024 Jan 16];57(2–4):309–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23784842/>
54. Nettersheim D, Heukamp LC, Fronhoffs F, Grewe MJ, Haas N, Waha A, et al. Analysis of TET Expression/Activity and 5mC Oxidation during Normal and Malignant Germ Cell Development. *PLoS One* [Internet]. 2013 Dec 26 [cited 2024 Jan 16];8(12):82881. Available from: </pmc/articles/PMC3873252/>
55. Jostes S V., Fellermeier M, Arévalo L, Merges GE, Kristiansen G, Nettersheim D, et al. Unique and redundant roles of SOX2 and SOX17 in regulating the germ cell tumor fate. *Int J Cancer*. 2020 Mar 15;146(6):1592–605.
56. Nettersheim D, Heimsoeth A, Jostes S, Schneider S, Fellermeier M, Hofmann A, et al. SOX2 is essential for in vivo reprogramming of seminoma-like TCam-2 cells to an embryonal carcinoma-like fate. *Oncotarget*. 2016;7(30):47095–110.
57. 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 2023 Nov 14];11(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26226633/>
58. 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* [Internet]. 2008 May [cited 2024 Jan 15];215(1):21–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18348160/>

59. Gillis AJM, Stoop H, Biermann K, van Gurp RJHLM, Swartzman E, Cribbes S, et al. Expression and interdependencies of pluripotency factors LIN28, OCT3/4, NANOG and SOX2 in human testicular germ cells and tumours of the testis. *Int J Androl*. 2011 Aug;34(4 PART 2).
60. 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 2024 Jan 15];160(1–2):253–68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25543152/>
61. Wruck W, Bremmer F, Kotthoff M, Fichtner A, Skowron MA, Schönberger S, et al. The pioneer and differentiation factor FOXA2 is a key driver of yolk-sac tumour formation and a new biomarker for paediatric and adult yolk-sac tumours. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2021 [cited 2021 Mar 11];25(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33448076/>
62. Bremmer F, Lubk L, Str€ Obel P, Nettersheim D. Updating germ cell tumour pathogenesis-the ability of seminomas for FOXA2-driven extra-embryonic differentiation. Available from: <https://doi.org/10.1111/his.14933>
63. Ricci C, Ambrosi F, Franceschini T, Giunchi F, Di Filippo G, Franchini E, et al. FoxA2 is a reliable marker for the diagnosis of yolk sac tumour postpubertal-type. *Histopathology* [Internet]. 2023 Sep 1 [cited 2023 Dec 20];83(3):465–76. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/his.14968>
64. Bokemeyer C, Kollmannsberger C, Stenning S, Hartmann JT, Horwich A, Clemm C, et al. Metastatic seminoma treated with either single agent carboplatin or cisplatin-based combination chemotherapy: a pooled analysis of two randomised trials. *Br J Cancer* [Internet]. 2004 [cited 2023 Nov 24];91:683–7. Available from: www.bjcancer.com

65. 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). *Annals of Oncology*. 2007 May 1;18(5):917–24.
66. Oing C, Giannatempo P, Honecker F, Oechsle K, Bokemeyer C, Beyer J. Palliative treatment of germ cell cancer. *Cancer Treat Rev [Internet]*. 2018 Dec 1 [cited 2024 Jan 18];71:102–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30415106/>
67. Nettersheim D, Gillis AJM, Looijenga LHJ, Schorle H. TGF- β 1, EGF and FGF4 synergistically induce differentiation of the seminoma cell line TCam-2 into a cell type resembling mixed non-seminoma. *Int J Androl [Internet]*. 2011 Aug 1 [cited 2022 Apr 19];34(4 PART 2):e189–203. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2605.2011.01172.x>
68. Nettersheim D, Vadder S, Jostes S, Heimsoeth A, Schorle H. TCam-2 Cells Deficient for SOX2 and FOXA2 Are Blocked in Differentiation and Maintain a Seminoma-Like Cell Fate In Vivo. *Cancers (Basel) [Internet]*. 2019 May 25 [cited 2023 Nov 14];11(5). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31130628>
69. Wruck W, Bremmer F, Kotthoff M, Fichtner A, Skowron MA, Schönberger S, et al. The pioneer and differentiation factor FOXA2 is a key driver of yolk-sac tumour formation and a new biomarker for paediatric and adult yolk-sac tumours. *J Cell Mol Med [Internet]*. 2021 Feb 1 [cited 2023 Nov 24];25(3):1394–405. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33448076/>
70. Bertz J, Buttman-Schweiger N, Kraywinkel K. Epidemiologie bösartiger Hodentumoren in Deutschland. *Onkologe [Internet]*. 2017 Feb 1 [cited 2020 Oct 9];23(2):90–6. Available from: www.krebsdaten.de
71. 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* [Internet]. 2021 May [cited 2024 Jan 9];71(3):209–49. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33538338/>
72. 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* [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2024 Jan 9];76(5):615–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31324498/>
 73. 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 2024 Jan 15];3(1):4–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25331326/>
 74. Ruf CG, Isbarn H, Wagner W, Fisch M, Matthies C, Dieckmann KP. Changes in epidemiologic features of testicular germ cell cancer: age at diagnosis and relative frequency of seminoma are constantly and significantly increasing. *Urol Oncol* [Internet]. 2014 [cited 2024 Jan 18];32(1):33.e1-33.e6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23395239/>
 75. McGlynn KA, Devesa SS, Sigurdson AJ, Brown LM, Tsao L, Tarone RE. Trends in the incidence of testicular germ cell tumors in the United States. *Cancer* [Internet]. 2003 Jan 1 [cited 2024 Jan 8];97(1):63–70. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cncr.11054>
 76. Cook MB, Akre O, Forman D, Patricia Madigan M, Richiardi L, McGlynn KA. A systematic review and meta-analysis of perinatal variables in relation to the risk of testicular cancer—experiences of the son. *Int J Epidemiol* [Internet]. 2010 Dec [cited 2024 Jan 8];39(6):1605. Available from: [/pmc/articles/PMC2992627/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2092627/)
 77. 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 2024 Jan 16];118(12):3099–111. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16395710/>
78. 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* [Internet]. 2016 Nov 18 [cited 2024 Jan 9];96(1):55–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26582516/>
 79. Ganmaa D, Li XM, Wang J, Qin LQ, Wang PY, Sato A. Incidence and mortality of testicular and prostatic cancers in relation to world dietary practices. *Int J Cancer* [Internet]. 2002 Mar 10 [cited 2024 Jan 16];98(2):262–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11857417/>
 80. Giannandrea F, Fagnoli S. Environmental Factors Affecting Growth and Occurrence of Testicular Cancer in Childhood: An Overview of the Current Epidemiological Evidence. *Children* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2024 Jan 16];4(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2726662/>
 81. Liu S, Semenciw R, Waters C, Wen SW, Mery LS, Mao Y. Clues to the aetiological heterogeneity of testicular seminomas and non-seminomas: time trends and age-period-cohort effects. *Int J Epidemiol* [Internet]. 2000 [cited 2024 Jan 16];29(5):826–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11034964/>
 82. Dieckmann KP, Pichlmeier U. Clinical epidemiology of testicular germ cell tumors. *World J Urol* [Internet]. 2004 [cited 2024 Jan 8];22(1):2–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15034740/>
 83. Hemminki K, Li X. Familial risk in testicular cancer as a clue to a heritable and environmental aetiology. *British Journal of Cancer* 2004 90:9 [Internet]. 2004 Mar 16 [cited 2024 Jan 8];90(9):1765–70. Available from: <https://www.nature.com/articles/6601714>
 84. Mai PL, Friedlander M, Tucker K, Phillips KA, Hogg D, Jewett MAS, et al. The International Testicular Cancer Linkage Consortium: A

- Clinicopathologic Descriptive Analysis of 461 Familial Malignant Testicular Germ Cell Tumor Kindred. *Urol Oncol* [Internet]. 2010 [cited 2024 Jan 9];28(5):492. Available from: [/pmc/articles/PMC2891341/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22891341/)
85. 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* [Internet]. 2015 Aug 1 [cited 2024 Jan 8];68(2):283–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25913387/>
86. Turnbull C, Litchfield K, Shipley J, Turnbull C. Common variants identified in genome-wide association studies of testicular germ cell tumour: an update, biological insights and clinical application. 2015 [cited 2024 Jan 9]; Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/andr.304>
87. Greene MH, Mai PL, Loud JT, Pathak A, Peters JA, Mirabello L, et al. Familial testicular germ cell tumors (FTGCT) - overview of a multidisciplinary etiologic study. *Andrology* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2024 Jan 9];3(1):47–58. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25303766/>
88. 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. *European Journal of Cancer Part A* [Internet]. 1997 Feb 1 [cited 2024 Jan 8];33(2):244–52. Available from: <http://www.ejancer.com/article/S0959804996004595/fulltext>
89. Harland SJ, Cook PA, Fossa SD, Horwich A, Parkinson MC, Roberts JT, et al. Risk factors for carcinoma in situ of the contralateral testis in patients with testicular cancer. An interim report. *Eur Urol* [Internet]. 1993 [cited 2024 Jan 9];23(1):115–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8477771/>
90. 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 [cited 2024 Jan 8];98(1):20–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23193201/>

91. Florou M, Tsilidis KK, Siomou E, Koletsa T, Syrnioti A, Spyridakis I, et al. Orchidopexy for congenital cryptorchidism in childhood and adolescence and testicular cancer in adults: an updated systematic review and meta-analysis of observational studies. *Eur J Pediatr*. 2023 Jun 1;182(6):2499–507.
92. Forman D, Pike MC, Davey G, Dawson S, Baker K, Chilvers CED, et al. Aetiology of testicular cancer: association with congenital abnormalities, age at puberty, infertility, and exercise. United Kingdom Testicular Cancer Study Group. *BMJ : British Medical Journal [Internet]*. 1994 May 5 [cited 2024 Jan 8];308(6941):1393. Available from: [/pmc/articles/PMC2540340/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2540340/)
93. Cook MB, Akre O, Forman D, Patricia Madigan M, Richiardi L, McGlynn KA. A systematic review and meta-analysis of perinatal variables in relation to the risk of testicular cancer--experiences of the son. *Int J Epidemiol [Internet]*. 2010 Dec [cited 2024 Jan 9];39(6):1605–18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20660640/>
94. Chan E, Wayne C, Nasr A. Ideal timing of orchiopexy: a systematic review. *Pediatr Surg Int [Internet]*. 2014 Jan [cited 2024 Jan 8];30(1):87–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24232174/>
95. Higgins M, Smith DE, Gao D, Wilcox D, Cost NG, Saltzman AF. The impact of age at orchiopexy on testicular cancer outcomes. *World J Urol [Internet]*. 2020 Oct 1 [cited 2024 Jan 8];38(10):2531–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31781896/>
96. Pettersson A, Richiardi L, Nordenskjold A, Kaijser M, Akre O. Age at surgery for undescended testis and risk of testicular cancer. *N Engl J Med [Internet]*. 2007 May 3 [cited 2024 Jan 8];356(18):1835–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17476009/>
97. Banks K, Tuazon E, Berhane K, Koh CJ, De Filippo RE, Chang A, et al. Cryptorchidism and testicular germ cell tumors: Comprehensive meta-analysis reveals that association between these conditions diminished over time and is modified by clinical characteristics. *Front Endocrinol*

- (Lausanne) [Internet]. 2013 Feb 1 [cited 2024 Jan 9];3. Available from: /pmc/articles/PMC3574983/
98. Møller H, Skakkebaek NE. Risk of testicular cancer in subfertile men: case-control study. *BMJ : British Medical Journal* [Internet]. 1999 Feb 2 [cited 2024 Jan 8];318(7183):559. Available from: /pmc/articles/PMC27753/
 99. Raman JD, Nobert CF, Goldstein M. Increased incidence of testicular cancer in men presenting with infertility and abnormal semen analysis. *J Urol* [Internet]. 2005 [cited 2024 Jan 8];174(5):1819–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16217294/>
 100. Walsh TJ, Croughan MS, Schembri M, Chan JM, Turek PJ. Increased Risk of Testicular Germ Cell Cancer Among Infertile Men. *Arch Intern Med* [Internet]. 2009 Feb 2 [cited 2024 Jan 8];169(4):351. Available from: /pmc/articles/PMC2881689/
 101. Doria-Rose VP, Biggs M Lou, Weiss NS. Subfertility and the risk of testicular germ cell tumors (United States). *Cancer Causes Control* [Internet]. 2005 Aug [cited 2024 Jan 8];16(6):651–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16049803/>
 102. Latif T, Jensen TK, Mehlsen J, Holmboe SA, Brinth L, Pors K, et al. Semen Quality as a Predictor of Subsequent Morbidity: A Danish Cohort Study of 4,712 Men With Long-Term Follow-up. *Am J Epidemiol* [Internet]. 2017 Oct 15 [cited 2024 Jan 9];186(8):910–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28498890/>
 103. Hardell L, Van Bavel B, Lindström G, Eriksson M, Carlberg M, Tuomisto J, et al. In utero exposure to persistent organic pollutants in relation to testicular cancer risk. *Int J Androl* [Internet]. 2006 Feb [cited 2024 Jan 15];29(1):228–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16371110/>
 104. Hardell L, Van Bavel B, Lindström G, Carlberg M, Eriksson M, Dreifaldt AC, et al. Concentrations of polychlorinated biphenyls in blood and the risk for testicular cancer. *Int J Androl*. 2004 Oct;27(5):282–90.

105. Zavos C, Andreadis C, Diamantopoulos N, Mouratidou D. A hypothesis on the role of insulin-like growth factor I in testicular germ cell tumours. *Med Hypotheses* [Internet]. 2004 [cited 2024 Jan 8];63(3):511–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15288379/>
106. Stephansson O, Wahnström C, Pettersson A, Sørensen HT, Tretli S, Gissler M, et al. Perinatal risk factors for childhood testicular germ-cell cancer: A Nordic population-based study.
107. Rasmussen F, Gunnell D, Ekblom A, Hallqvist J, Tynelius P. Birth weight, adult height, and testicular cancer: cohort study of 337,249 Swedish young men. *Cancer Causes Control* [Internet]. 2003 Aug [cited 2024 Jan 8];14(6):595–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12948291/>
108. Gallagher RP, Huchcroft S, Phillips N, Hill GB, Coldman AJ, Coppin C, et al. Physical activity, medical history, and risk of testicular cancer (Alberta and British Columbia, Canada). *Cancer Causes Control* [Internet]. 1995 Sep [cited 2024 Jan 8];6(5):398–406. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8547537/>
109. Dieckmann KP, Pichlmeier U. Is risk of testicular cancer related to body size? *Eur Urol* [Internet]. 2002 Dec 1 [cited 2024 Jan 8];42(6):564–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12477651/>
110. Akre O, Ekblom A, Sparén P, Tretli S. Body Size and Testicular Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* [Internet]. 2000 Jul 5 [cited 2024 Jan 8];92(13):1093–6. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/jnci/92.13.1093>
111. Dieckmann KP, Hartmann JT, Classen J, Lüdde R, Diederichs M, Pichlmeier U. Tallness is associated with risk of testicular cancer: evidence for the nutrition hypothesis. *Br J Cancer* [Internet]. 2008 Nov 11 [cited 2024 Jan 9];99(9):1517. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18579680/>
112. McGlynn KA, Sakoda LC, Rubertone M V., Sesterhenn IA, Lyu C, Graubard BI, et al. Body Size, Dairy Consumption, Puberty, and Risk of

- Testicular Germ Cell Tumors. *Am J Epidemiol* [Internet]. 2007 Feb 15 [cited 2024 Jan 8];165(4):355–63. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/aje/kwk019>
113. Skakkebaek NE. Testicular dysgenesis syndrome: new epidemiological evidence. *Int J Androl* [Internet]. 2004 Aug [cited 2024 Jan 9];27(4):189–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15271197/>
 114. Akre O, Richiardi L. Does a testicular dysgenesis syndrome exist? *Human Reproduction* [Internet]. 2009 Sep 1 [cited 2024 Jan 9];24(9):2053–60. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/humrep/dep174>
 115. S3-Leitlinie Keimzelltumoren des Hodens.
 116. Gilligan T, Beard C, Chism D, Cost N, Derweesh IH, Emamekhoo H, et al. NCCN Guidelines Version 2.2018 Testicular Cancer NCCN Guidelines Index Table of Contents Discussion. 2018;
 117. Yacoub JH, Oto A, Allen BC, Coakley F V., Friedman B, Hartman MS, et al. ACR Appropriateness Criteria Staging of Testicular Malignancy. *Journal of the American College of Radiology* [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2024 Jan 10];13(10):1203–9. Available from: <https://ohsu.elsevierpure.com/en/publications/acr-appropriateness-criteria-staging-of-testicular-malignancy>
 118. Wetenschappelijke ondersteuning van het College voor Oncologie: een update van de nationale richtlijn voor testiskanker KCE reports 142A. [cited 2024 Jan 10]; Available from: <http://www.kce.fgov.be>
 119. Testicular Cancer - INTRODUCTION - Uroweb [Internet]. [cited 2024 Jan 10]. Available from: <https://uroweb.org/guidelines/testicular-cancer>
 120. Kliesch S, Kamischke A, Cooper TG, Nieschlag E. Kryokonservierung menschlicher Spermien zur Zeugungsreserve. *Andrologie* [Internet]. 2009 [cited 2024 Jan 10];515–31. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-92963-5_24

121. Dittrich R, Kliesch S, Schüring A, Balcerek M, Baston-Büst DM, Beck R, et al. Fertility Preservation for Patients with Malignant Disease. Guideline of the DGGG, DGU and DGRM (S2k-Level, AWMF Registry No. 015/082, November 2017) - Recommendations and Statements for Girls and Women. Geburtshilfe Frauenheilkd [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2024 Jan 10];78(6):567–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29962516/>
122. Williams IV DH, Karpman E, Sander JC, Spiess PE, Pistors LL, Lipshultz LI. Pretreatment Semen Parameters in Men With Cancer. J Urol [Internet]. 2009 Feb [cited 2024 Jan 10];181(2):736–40. Available from: <https://www.auajournals.org/doi/10.1016/j.juro.2008.10.023>
123. Van Der Kaaij MAE, Heutte N, Van Echten-Arends J, Raemaekers JMM, Carde P, Noordijk EM, et al. Sperm quality before treatment in patients with early stage Hodgkin's lymphoma enrolled in EORTC-GELA Lymphoma Group trials. Haematologica [Internet]. 2009 Oct 22 [cited 2024 Jan 10];94(12):1691–7. Available from: <http://www.haematologica.org/journal/2009/12/1691.html>
124. 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 2024 Jan 10];99(7):533–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17405998/>
125. Gizzi M, Oberic L, Massard C, Poterie A, Gwenael LT, Lorient Y, et al. Predicting and preventing thromboembolic events in patients receiving cisplatin-based chemotherapy for germ cell tumours. Eur J Cancer [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2024 Jan 10];69:151–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27821318/>
126. Ross A, Bhasin S. Hypogonadism: Its Prevalence and Diagnosis. Urol Clin North Am [Internet]. 2016 May 1 [cited 2024 Jan 10];43(2):163–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27132573/>
127. de Wit R, Stoter G, Kaye SB, Sleijfer DT, Jones WG, ten Bokkel Huinink WW, et al. Importance of bleomycin in combination chemotherapy for

good-prognosis testicular nonseminoma: a randomized study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Genitourinary Tract Cancer Cooperative Group. <https://doi.org/10.1200/JCO.1997.15.5.1837> [Internet]. 2016 Sep 21 [cited 2024 Jan 10];15(5):1837–43. Available from: <https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.1997.15.5.1837>

128. Lauritsen J, Kier MGG, Bandak M, Mortensen MS, Thomsen FB, Mortensen J, et al. Pulmonary function in patients with germ cell cancer treated with bleomycin, etoposide, and cisplatin. *Journal of Clinical Oncology* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2024 Jan 10];34(13):1492–9. Available from: <https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2015.64.8451>
129. Cano Garcia C, Panunzio A, Tappero S, Piccinelli ML, Barletta F, Incesu RB, et al. Survival of Testicular Pure Embryonal Carcinoma vs. Mixed Germ Cell Tumor Patients across All Stages. *Medicina (B Aires)* [Internet]. 2023 Mar 1 [cited 2024 Jan 10];59(3). Available from: [/pmc/articles/PMC10056449/](https://pmc/articles/PMC10056449/)
130. Haugnes HS, Bosl GJ, Boer H, Gietema JA, Brydyø M, Oldenburg J, et al. Long-Term and Late Effects of Germ Cell Testicular Cancer Treatment and Implications for Follow-Up. *Journal of Clinical Oncology* [Internet]. 2012 Oct 20 [cited 2024 Jan 10];30(30):3752–63. Available from: <https://research.rug.nl/en/publications/long-term-and-late-effects-of-germ-cell-testicular-cancer-treatme>
131. Haugnes HS, Oldenburg J, Bremnes RM. Pulmonary and cardiovascular toxicity in long-term testicular cancer survivors. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2015 Sep 1;33(9):399–406.
132. O’Sullivan JM, Huddart RA, Norman AR, Nicholls J, Dearnaley DP, Horwich A. Predicting the risk of bleomycin lung toxicity in patients with germ-cell tumours. *Annals of Oncology*. 2003 Jan 1;14(1):91–6.
133. 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 2024 Jan 10];110(1):256. Available from: [/pmc/articles/PMC3887279/](#)
134. Fung C, Fossa SD, Milano MT, Oldenburg J, Travis LB. Solid Tumors After Chemotherapy or Surgery for Testicular Nonseminoma: A Population-Based Study. *J Clin Oncol* [Internet]. 2013 [cited 2024 Jan 10];31:3807–14. Available from: [www.jco](#)
 135. Pectasides D, Pectasides M, Farmakis D, Aravatinos G, Nikolaou M, Koumpou M, et al. Gemcitabine and oxaliplatin (GEMOX) in patients with cisplatin-refractory germ cell tumors: a phase II study. *Ann Oncol* [Internet]. 2004 Mar [cited 2024 Jan 10];15(3):493–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14998855/>
 136. De Giorgi U, Rosti G, Aieta M, Testore F, Burattini L, Fornarini G, et al. Phase II study of oxaliplatin and gemcitabine salvage chemotherapy in patients with cisplatin-refractory nonseminomatous germ cell tumor. *Eur Urol* [Internet]. 2006 Nov [cited 2024 Jan 10];50(5):1032–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16757095/>
 137. Kollmannsberger C, Beyer J, Liersch R, Schoeffski P, Metzner B, Rick O, et al. Combination chemotherapy with gemcitabine plus oxaliplatin in patients with intensively pretreated or refractory germ cell cancer: a study of the German Testicular Cancer Study Group. *J Clin Oncol* [Internet]. 2004 [cited 2024 Jan 10];22(1):108–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14701772/>
 138. Oechsle K, Kollmannsberger C, Honecker F, Mayer F, Waller CF, Hartmann JT, et al. Long-Term Survival After Treatment with Gemcitabine and Oxaliplatin With and Without Paclitaxel Plus Secondary Surgery in Patients with Cisplatin-Refractory and/or Multiply Relapsed Germ Cell Tumors. *Eur Urol*. 2011 Oct 1;60(4):850–5.
 139. Seidel C, Oechsle K, Lorch A, Dieing A, Hentrich M, Hornig M, et al. Efficacy and safety of gemcitabine, oxaliplatin, and paclitaxel in cisplatin-refractory germ cell cancer in routine care—Registry data from an outcomes research project of the German Testicular Cancer Study Group.

Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations. 2016 Apr 1;34(4):168.e21-168.e28.

140. Oechsle K, Honecker F, Cheng T, Mayer F, Czaykowski P, Winkquist E, et al. Preclinical and clinical activity of sunitinib in patients with cisplatin-refractory or multiply relapsed germ cell tumors: a Canadian Urologic Oncology Group/German Testicular Cancer Study Group cooperative study. *Ann Oncol* [Internet]. 2011 [cited 2024 Jan 10];22(12):2654–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21415240/>
141. Feldman DR, Turkula S, Ginsberg MS, Ishill N, Patil S, Carousso M, et al. Phase II trial of sunitinib in patients with relapsed or refractory germ cell tumors. *Invest New Drugs* [Internet]. 2010 Aug [cited 2024 Jan 10];28(4):523–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19547919/>
142. Integration of Viral DNA Sequences in Cells Transformed by Adenovirus 2 or SV40 on JSTOR [Internet]. [cited 2024 Feb 7]. Available from: <https://www.jstor.org/stable/35452>
143. 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* [Internet]. 2010 Nov 10 [cited 2024 Jan 22];38(Database issue):D792. Available from: <https://pmc/articles/PMC2808898/>
144. Howe KL, Achuthan P, Allen J, Allen J, Alvarez-Jarreta J, Ridwan Amodé M, et al. Ensembl 2021. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2021 Jan 8 [cited 2024 Jan 22];49(D1):D884–91. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/nar/gkaa942>
145. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2012 Aug [cited 2024 Jan 22];40(15). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22730293/>
146. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, et al. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res* [Internet]. 2002 Jun

- 1 [cited 2024 Jan 22];12(6):996. Available from: [/pmc/articles/PMC186604/](https://pmc/articles/PMC186604/)
147. Markouli C, De Deckersberg EC, Dziedzicka D, Regin M, Franck S, Keller A, et al. Sustained intrinsic WNT and BMP4 activation impairs hESC differentiation to definitive endoderm and drives the cells towards extra-embryonic mesoderm. *Scientific Reports* 2021 11:1 [Internet]. 2021 Apr 15 [cited 2023 Dec 5];11(1):1–13. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-87547-7>
148. Wakileh GA, Bierholz P, Kotthoff M, Skowron MA, Bremmer F, Stephan A, et al. Molecular characterization of the CXCR4 / CXCR7 axis in germ cell tumors and its targetability using nanobody-drug-conjugates. *Exp Hematol Oncol* [Internet]. 2023 Dec 1 [cited 2023 Dec 20];12(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37996954/>
149. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* [Internet]. 2012 [cited 2023 Dec 14];31:1869–83. Available from: www.nature.com/onc
150. Kanai-Azuma M, Kanai Y, Gad JM, Tajima Y, Taya C, Kurohmaru M, et al. Depletion of definitive gut endoderm in Sox17-null mutant mice. *Development* [Internet]. 2002 [cited 2024 Mar 18];129(10):2367–79. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11973269/>
151. Niakan KK, Ji H, Maehr R, Vokes SA, Rodolfa KT, Sherwood RI, et al. Sox17 promotes differentiation in mouse embryonic stem cells by directly regulating extraembryonic gene expression and indirectly antagonizing self-renewal. *Genes Dev* [Internet]. 2010 Feb 1 [cited 2024 Mar 18];24(3):312–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20123909/>
152. Shimoda M, Kanai-Azuma M, Hara K, Miyazaki S, Kanai Y, Monden M, et al. Sox17 plays a substantial role in late-stage differentiation of the extraembryonic endoderm in vitro. *J Cell Sci* [Internet]. 2007 Nov 1 [cited 2024 Mar 18];120(Pt 21):3859–69. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17940068/>

153. Hao Y, Han L, Wu A, Bochkis IM. Pioneer Factor Foxa2 Mediates Chromatin Conformation Changes for Activation of Bile Acid Targets of FXR. *CMGH* [Internet]. 2024 Jan 1 [cited 2024 Feb 19];17(2):237–49. Available from: <http://www.cmghjournal.org/article/S2352345X23001881/fulltext>
154. Dufort D, Schwartz L, Harpal K, Rossant J. The transcription factor HNF3beta is required in visceral endoderm for normal primitive streak morphogenesis. *Development* [Internet]. 1998 Aug [cited 2024 Feb 19];125(16):3015–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9671576/>
155. Weinstein DC, Ruiz i Altaba A, Chen WS, Hoodless P, Prezioso VR, Jessell TM, et al. The winged-helix transcription factor HNF-3 beta is required for notochord development in the mouse embryo. *Cell* [Internet]. 1994 Aug 26 [cited 2024 Feb 19];78(4):575–88. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8069910/>
156. Sund NJ, Ang SL, Sackett SD, Shen W, Daigle N, Magnuson MA, et al. Hepatocyte Nuclear Factor 3 β (Foxa2) Is Dispensable for Maintaining the Differentiated State of the Adult Hepatocyte. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2000 Jul 1 [cited 2024 Feb 19];20(14):5175. Available from: </pmc/articles/PMC85966/>
157. Warren I, Moeller MM, Guiggey D, Chiang A, Maloy M, Ogoke O, et al. FOXA1/2 depletion drives global reprogramming of differentiation state and metabolism in a human liver cell line and inhibits differentiation of human stem cell-derived hepatic progenitor cells. *FASEB J* [Internet]. 2023 Jan 1 [cited 2024 Feb 19];37(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36515690/>
158. Hao Y, Han L, 1# AW, Bochkis IM. Pioneer factor Foxa2 mediates chromatin conformation changes in ligand-dependent activation of nuclear receptor FXR. *bioRxiv* [Internet]. 2023 Mar 8 [cited 2024 Feb 19];2023.03.06.531297. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.03.06.531297v1>

159. Skowron MA, Kotthoff M, Bremmer F, Ruhnke K, Parmaksiz F, Richter A, et al. Targeting CLDN6 in germ cell tumors by an antibody-drug-conjugate and studying therapy resistance of yolk-sac tumors to identify and screen specific therapeutic options. *Molecular Medicine* [Internet]. 2023 [cited 2023 Dec 14];29:40. Available from: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.MolecularMedicine>
160. Ang LT, Tan AKY, Autio MI, Goh SH, Choo SH, Lee KL, et al. A Roadmap for Human Liver Differentiation from Pluripotent Stem Cells. *Cell Rep*. 2018 Feb 20;22(8):2190–205.
161. Mackinlay KML, Weatherbee BAT, Rosa VS, Handford CE, Hudson G, Coorens T, et al. An in vitro stem cell model of human epiblast and yolk sac interaction. *Elife* [Internet]. 2021 Aug 1 [cited 2023 Dec 5];10. Available from: [/pmc/articles/PMC8370770/](https://pmc/articles/PMC8370770/)
162. Rossant J, Papaioannou VE. The relationship between embryonic, embryonal carcinoma and embryo-derived stem cells. *Cell Differ* [Internet]. 1984 [cited 2024 Feb 19];15(2–4):155–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6399008/>
163. Köberle B, Tomicic MT, Usanova S, Kaina B. Cisplatin resistance: Preclinical findings and clinical implications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2010 Dec 1;1806(2):172–82.
164. Giaccone G. Clinical perspectives on platinum resistance. *Drugs* [Internet]. 2000 Oct 15 [cited 2024 Feb 21];59(SUPPL. 4):9–17. Available from: <https://link.springer.com/article/10.2165/00003495-200059004-00002>
165. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* [Internet]. 2003 Oct 20 [cited 2024 Feb 21];22(47):7265–79. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14576837/>
166. Sanderson BJS, Ferguson LR, Denny WA. Mutagenic and carcinogenic properties of platinum-based anticancer drugs. *Mutation*

Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 1996 Aug 17;355(1–2):59–70.

167. Ricci C, Ambrosi F, Grillini A, Massari F, Fiorentino M, Colecchia M, et al. Analysis of GATA3 and FOXA2 expression suggests that downregulation of genes involved in the maintenance of a mature yolk sac tumor phenotype may underlie sarcomatoid transformation. *Virchows Archiv* 2023 [Internet]. 2023 Dec 23 [cited 2023 Dec 27];1:1–5. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00428-023-03725-0>

Danksagung

Ich möchte diese Gelegenheit nutzen, um allen Personen zu danken, die mich während meiner Dissertation maßgeblich unterstützt haben.

Zuallererst möchte ich hier Prof. Dr. Daniel Nettersheim für seine kontinuierliche die Anleitung, Ermutigung und besonders die unerschöpfliche Geduld während des gesamten Forschungsprozesses danken. Seine fachliche Expertise und seine stetige Motivation haben wesentlich dazu beigetragen, dass dieses Projekt erfolgreich abgeschlossen werden konnte.

Ein besonderer Dank geht auch an alle Mitarbeitende des urologischen Forschungslabors, die während meiner Promotionszeit dort tätig waren. Danke für das großartige und einwandfreie Teamwork, die Unterstützungen an den Wochenenden im Labor und die inspirierenden und kreativen Diskussionen während der gesamten gemeinsamen Zeit im Labor und auf allen dazugehörigen Veranstaltungen.

Liebe Melli, liebe Alexa und lieber Aaron ein riesiges Dankeschön an euch für die großartigen Jahre, die wir zusammen als Doktorandenfamilie verbringen durften. Melli, danke, dass du mich auch in meinen hitzigen momenten ertragen hast und stets ein offenes Ohr für mich hattest und immer noch hast – Ich habe dich sehr lieb und bin wirklich froh dich kennengelernt zu haben! Lieber Aaron, auch wenn wir uns am Anfang wohl nicht sicher waren, haben wir nach einiger Zeit doch gemerkt, dass anders nicht immer schlecht ist. Besonders über unsere Andersartigkeiten konnten wir herzlich viel lachen und haben weder Erwartens die eine oder andere Ansicht auf interessante Weise geteilt. Danke für deine warmherzige, erfrischende Art im Laboralltag. Liebe Alexa, als meine treue Leidensgenossin während der kompletten vier Jahre im urologischen Forschungslabor sind wir durch alle zugehörigen Höhen und Tiefen zusammen gestürzt: Die ersten Vorträge, die ersten Konferenzen, die ersten Publikationen und die Erschaffung der Wall of Depression. Außerdem durfte ich auch privat eine Menge mit dir erleben und erwandern und bin wirklich unendlich dankbar, dass wir das ganze zusammen über die Bühne gebracht haben und selbst schwerste mathematischen Herausforderungen überwunden wurden. Danke, dass wir für all die

durchlebten Phasen passende Memes und die perfekte musikalische Untermalung finden konnten – ein Hoch auf dich Schappy!

Maggi und Anna auch ein großes Dankeschön an euch! Ihr hab mit unter die wildesten Fragen meinerseits beantworten müssen, stürmische Umarmungen empfangen und eine Menge Zellkulturpartys mit mir ertragen! Dank eurer Gelassenheit und absoluten Professionalität in Sachen Lab & Life durfte ich eine Menge lernen und mich weiterentwickeln und hab mich nie allein gelassen gefühlt. Ihr seid einsame Spitze, bleibt wie ihr seid!

An dieser Stelle möchte ich mich außerdem ganz besonders bei Pailin bedanken. Du hast mir in deinem Laborjahr ganz besonders viel Kraft gegeben (mitunter auch nicht selten in Form von Nahrung). Du bist eine besondere Freundin für mich geworden und hast eigentlich jeden Tag noch ein bisschen besser gemacht! Danke, dass du immer für mich da bist!

Zudem möchte ich auch Gamal, David, Fatma und Christian einmal besonders hervorheben, denn ich hatte unendlich viel Spaß mit euch im Laboralltag. Ihr seid mir auch außerhalb der weißen Laborwände sehr ans Herz gewachsen und habt mich definitiv jedem noch so grauen Labortag zum Lachen gebracht. Es war mir ein Fest mit euch geforscht zu haben!

Ein besonderes Dankeschön geht selbstverständlich an meine Familie und meine Freunde für das entgegengebrachte Verständnis, die Unterstützung und die Ermutigungen sowohl in meiner Forschungsphase als auch während der Anfertigung dieser Dissertationsschrift. Es ist schön so viel Rückhalt von allen Seiten zu bekommen. Danke, dass es euch gibt – ich liebe euch !

Zuletzt möchte ich mich bei allen Institutionen und Organisationen bedanken, die zur Finanzierung dieser Forschungsarbeit beigetragen haben. An dieser Stelle möchte ich die Düsseldorf School of Oncology und das Centrum für integrative Onkologie besonders hervorheben. Ihre Unterstützung hat es mir ermöglicht, meine akademischen Ziele zu verfolgen, mich wissenschaftlich weiterzuentwickeln und diese Dissertation erfolgreich abzuschließen. Ich bin unendlich dankbar für all die Unterstützung und Hilfe, die ich auf meinem akademischen Weg erhalten habe.