

Aus der Klinik für Urologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. Peter Albers

**Ableitung neuer Therapieoptionen für refraktäre
Dottersacktumoren *in vitro***

Dissertation

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

vorgelegt von
Katja Christina Ruhnke

2025

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

gez.:

Dekan/in: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. Daniel Nettersheim

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. Björn Stork

Auflistung der Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Margaretha A. Skowron, Mara Kotthoff, Felix Bremmer, Katja Ruhnke, Fatma Parmaksiz, Annika Richter, Stefan Küffer, Kirsten Reuter-Jessen, Stella Pauls, Anja Stefanski, Philipp Ströbel, Kai Stühler and Daniel Nettersheim: 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* 2023; <https://doi.org/10.1186/s10020-023-00636-3>

Zusammenfassung

Keimzelltumoren gehören zu den häufigsten malignen Tumoren bei jungen Männern zwischen 15 und 44 Jahren. Aufgrund der immer weiter steigenden Inzidenz ist die Forschung an molekularen und genetischen Grundlagen sehr wichtig. Die aktuelle Therapie besteht in einer chirurgischen Resektion und / oder Chemotherapie mit Cisplatin. Obwohl viele Patienten mit der Cisplatin-basierten-Chemotherapie gut behandelt werden können, gibt es dennoch einen nicht zu vernachlässigen Anteil an Tumorpatienten, die eine Resistenz gegen Cisplatin entwickeln oder die Langzeitschäden aufgrund der toxischen Wirkung des Cisplatins davontragen.

Testikuläre Keimzelltumoren entstehen aus einer entarteten primordialen Keimzelle und können in Seminome und Nicht-Seminome unterteilt werden. Letztere, zu denen die Embryonalkarzinome (EK) gehören, können zu Teratomen, Chorionkarzinomen oder Dottersacktumoren (DST) differenzieren. Der DST hat meistens eine schlechte Prognose und entsteht oft als Rezidiv nach Chemotherapie.

In vorherigen Forschungen wurde eine Genexpression von FOXA2 in DST entdeckt, die für die Differenzierung von EK zu DST entscheidend sein könnte. Zudem waren Gene des WNT-, BMP- und MAPK-Signalwegs hochreguliert. Die Expression dieser Gene ist zudem typisch für Leberzellen und Zellen des hepatozellulären Karzinoms. Auch der hepatozelluläre Faktor HNF1b wurde in DST detektiert. Aufgrund dieser molekularen Ähnlichkeit zwischen dem DST und dem hepatozellulären Karzinom wurden bei der Ableitung neuer Therapieoptionen für den DST Therapeutika des hepatozellulären Karzinoms hinzugezogen. Zudem wurden mithilfe des „Human Phospho-Kinase Arrays“ Proteine in DST-Zellen detektiert, die mögliche Zielproteine von Inhibitoren sein könnten. Hieraus wurden 13 Therapeutika ausgewählt, die in dieser Forschungsarbeit an DST-Zellen getestet wurden. Es handelte sich dabei um die Tyrosinkinase-Inhibitoren Sorafenib, Ibrutinib, Nintedanib, Lenvatinib, Regorafenib, Cabozantinib und Imatinib, die PARP-Inhibitoren Olaparib und Talazoparib, und die Aurorakinase-Inhibitoren Danusertib, AZD4547, SNS-314 und Apatinib. Die Wirkung der Medikamente auf DST-Zellen (GCT72) wurde durch Messung der Zellviabilität mithilfe des XTT-Assays untersucht. Die Zellviabilität der GCT72-Zellen lag 72 Stunden nach der Behandlung mit allen Inhibitoren jeweils unter 50 %. Alle Inhibitoren wiesen demnach eine zytotoxische Wirkung auf DST-Zellen auf, die sich in den mittleren effektiven Konzentrationen unterschied. Die sechs wirksamsten Medikamente wurden daraufhin auch bei weiteren

Zellen des Dottersacktumors, Fibroblasten, Endothelzellen und Zellen des hepatozellulären Karzinoms im XTT-Assay angewendet.

Die Wirkung der sechs Inhibitoren auf GCT72-Zellen konnte durch Apoptose-Assay mit Annexin-V- und Propidiumiodid-Färbung mit anschließender Durchflusszytometrie spezifiziert werden. Dabei stieg der Anteil der apoptotischen Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle vor allem bei Nintedanib, Sorafenib und Talazoparib. Zudem wurde die Wirkung der Inhibitoren auf den Zellzyklus untersucht. Dabei konnten die Zellzyklusphasen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nach Behandlung mit Danusertib, SNS-314 und Talazoparib nicht mehr eindeutig differenziert werden.

Basierend auf einer molekularen Ähnlichkeit zu HCC und der Proteindetektion im Human Phospho-Kinase Array, konnten in dieser Studie Tyrosinkinase-, Aurorakinase- und PARP-Inhibitoren (TAPi) als mögliche Therapieoption für Patienten mit (refraktärem) DST identifiziert werden.

Summary

Germ cell tumors are among the most common malignant tumors in young men between 15 and 44 years of age. Due to the ever-increasing incidence, research into molecular and genetic principles is very important. The current therapy consists of surgical resection and/or chemotherapy with cisplatin. Although many patients can be treated well with cisplatin-based chemotherapy, there is still a non-negligible proportion of tumor patients who develop resistance to cisplatin-therapy or suffer long-term damage due to the toxic effects of cisplatin.

Testicular germ cell tumors arise from a degenerated primordial germ cell and can be divided into seminomas and non-seminomas. The latter, which include embryonal carcinomas (EC), can differentiate into teratomas, choriocarcinomas or yolk-sac tumors (YST). YST usually has a poor prognosis and often occurs as a recurrent tumor after chemotherapy.

In previous research, the gene expression of FOXA2 was discovered in YST, which is crucial for the differentiation of EC into YST. In addition, genes of the WNT, BMP and MAPK signaling pathways were upregulated. The expression of these genes is also typical for liver cells and hepatocellular carcinoma cells. The hepatocellular factor HNF1b was also detected in YST. Due to this molecular similarity between the YST and the hepatocellular carcinoma, therapeutic agents for hepatocellular carcinoma were included in the derivation of new therapy options for YST. In addition, the human phospho-kinase array was used to detect proteins in YST cells that could be possible target proteins. From the resulting possible therapeutics, 13 were selected and tested on YST cells in this study. These were the tyrosine kinase inhibitors Sorafenib, Ibrutinib, Nintedanib, Lenvatinib, Regorafenib, Cabozantinib and Imatinib, the PARP inhibitors Olaparib and Talazoparib, and the aurora kinase inhibitors Danusertib, AZD4547, SNS-314 and Apatinib. The effect of the drugs was examined in GCT72 YST cells by measuring cell viability using the XTT-assay. The cell viability of the GCT72 cells was below 50 % at 72 hours after treatment with all inhibitors. All inhibitors therefore influenced YST cells, which differed in the mean effective concentrations. The six most effective drugs were then also used in YST cells, fibroblasts, endothelial cells and hepatocellular carcinoma cells in the XTT-cell viability-assays.

The effect of the six inhibitors on GCT72 cells could be specified by apoptosis assay using Annexin V and propidium iodide staining with subsequent flow cytometry. The proportion of apoptotic cells increased compared to the DMSO control, especially with

Nintedanib, Sorafenib and Talazoparib. In addition, the effect of the inhibitors on the cell cycle was examined. The cell cycle phases could no longer be clearly differentiated compared to the DMSO control after treatment with Danusertib, SNS-314 and Talazoparib.

Based on molecular similarity to HCC and protein detection in the human phospho-kinase array, this study identified Tyrosine kinase-, Aurora kinase- and PARP-inhibitors (TAPi) as a possible therapeutic option for patients with (refractory) YST.

Abkürzungsverzeichnis

ACTB	Actin beta
AFP	Alpha-Fetoprotein
ALB	Albumin
APOA1	Apolipoprotein A-I
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BCA	Bicinchoninsäure
BCLC	Barcelona Clinic Liver Cancer
BMP	Bone morphogenetic proteins
BTK	Bruton tyrosine kinase
CDK4/6	Cyclin-abhängige Kinasen 4/6
cDNA	Komplementäre DNA
CEUS	Kontrastmittelverstärkter Ultraschall
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CREB	cAMP responsive element binding protein
CSK	C-terminal Src kinase
CT	Computertomographie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Sodiumdeoxycholat
DST	Dottersacktumor
EAU	European Association of Urology
EC	Embryonal carcinomas
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EK	Embryonalkarzinom
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
FCS	Fetal calf serum
FFPE	Formaldehyde-fixed paraffin-embedded
FGA/B/G	Fibrinogen alpha/beta/gamma chain
FGFR	Fibroblast growth factor receptor

FLT	Fms related receptor tyrosine kinase
FOXA2	Forkhead-Box-Protein A2
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GATA3/4/6	Gata binding protein 3/4/6
GCNIS	Germ-Cell-Neoplasia-in-situ
GPC3	Glypican 3
GPOH	Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie
GSK	Glycogen synthase kinase
GY	Gray
h	Hour
HAND1	Heart and neural crest derivatives expressed 1
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HDAC	Histondeacetylasen
HNF1b	Hepatocyte nuclear factor 1-beta
HRP	Horseradish peroxidase
HSP	Heat shock protein
IC50	Mittlere inhibitorische Konzentration
KDR	Kinase insert domain receptor
LDH	Laktat-Dehydrogenase
MAPK	Mitogen-activated protein Kinase
MFB	Transdifferenzierte Myofibroblasten
ml	Milliliter
MRT	Magnetresonanztomographie
NASH	Non-alcoholic steatohepatitis
nM	Nanomolar
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
PBS	Phosphate buffered saline
PD-L1	Programmed cell death ligand-1
PDGFR	Platelet derived growth factor receptor
pH	Potentia hydrogenii
PLAP	Plazentare alkalische Phosphatase
PMS	N-Methylphenazoniummethylsulfat

pRB	Retinoblastomprotein
PS	Phosphatidylserin
qRT-PCR	Real-time quantitative PCR
RIPA	Radioimmunpräzipitation
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	Dodecylsulfat
SOX17	SRY-box transcription factor 17
SOX2	SRY-box transcription factor 2
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
TARE	Transarterielle Radioembolisation
TESE	Testikuläre Spermienextraktion
TGCT	Testicular Germ Cell Tumor
TIN	Testikuläre intraepitheliale Neoplasie
TNM	Tumor-node-metastasis
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
XTT	Natrium-3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis-(4-methoxy-6-nitro)-benzolsulfonsäurehydrat
YST	Yolk sac tumor
β-HCG	Humanes Choriongonadotropin
μL	Mikroliter
μM	Mikromol

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Keimzelltumor	1
1.1.1	Epidemiologie und Risikofaktoren	1
1.1.2	Histopathologische Klassifikation	2
1.1.3	Prognosefaktoren	4
1.1.4	Diagnostik und Therapeutische Optionen.....	4
1.2	Dottersacktumore.....	7
1.2.1	Entstehung und Epidemiologie.....	7
1.2.2	Differenzierung und Diagnose.....	8
1.3	Dottersacktumor und Hepatozelluläres Karzinom.....	9
1.3.1	Therapeutische Optionen	10
1.4	Ziele der Arbeit.....	11
2	Materialien und Methoden.....	12
2.1	Materialien	12
2.1.1	Humane Keimzelltumor-, Leberkrebs- und Kontrollzelllinien.....	12
2.1.2	Materialien der Zellkultur	12
2.1.3	Zellkulturmedien und Supplemente	13
2.1.4	Materialien für BCA-Protein-Assay	14
2.1.5	Materialien für Human Phospho-Kinase Array Kit.....	14
2.1.6	Verwendete Inhibitoren	15
2.1.7	Materialien für XTT-Assay	16
2.1.8	In der qRT-PCR verwendete Primer.....	16
2.1.9	Materialien für RNA-Isolation.....	17
2.1.10	Materialien für Proteinextraktion.....	17
2.1.11	Materialien für Annexin V/PI Apoptose- und Zellzyklus-Analyse	18

2.2	Methoden	19
2.2.1	Kultivierung	19
2.2.2	Passagieren der Zellen	19
2.2.3	Trypsinieren	19
2.2.4	Automatisierte Zellzählung.....	19
2.2.5	XTT-Assay.....	20
2.2.6	Annexin V / PI Apoptose-Assay.....	22
2.2.7	Zellzyklus-Analysen	23
2.2.8	cDNA-Synthese	23
2.2.9	qRT-PCR	24
2.2.10	Human Phospho-Kinase Array	24
3	Ergebnisse	27
3.1	Proteindetektion mittels „Human-Phospho-Kinase-Array“.....	27
3.2	Genexpressionsanalyse mittels RNA-seq- und TCGA-Daten	29
3.3	Validierung der Genexpression mittels qRT-PCR.....	34
3.4	Zellviabilitätsmessung mittels XTT-Reduktionstest	35
3.5	Untersuchung der Apoptoseinduktion	42
3.6	Zellzyklusanalyse.....	45
4	Diskussion.....	48
5	Schlussfolgerung.....	53
6	Literatur- und Quellenverzeichnis	54

1 Einleitung

1.1 Keimzelltumor

1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Der Keimzelltumor (KZT) ist der häufigste Tumor bei jungen Männern zwischen 20 und 45 Jahren. Der Anteil der KZT an allen Krebserkrankungen ist zwar mit 1,5 % eher gering, dennoch steigt die Inzidenz jährlich immer weiter an und lag zuletzt bei 10 / 100.000 Männern. Jährlich erkranken in Deutschland ca. 4000 Menschen an einem KZT und ca. 150 Patienten versterben an dieser Erkrankung. Das mittlere Erkrankungsalter beträgt 38 Jahre (1).

In **Abbildung 1** sieht man, dass die Erkrankung des testikulären Keimzelltumors weltweit stark variiert. Während in großen Teilen Afrikas und Asiens die Häufigkeit der Erkrankung bei unter 1 von 100.000 männlichen Personen liegt, beträgt sie in Norwegen bis zu 9,9 / 100.000, in Dänemark bis zu 9,4 / 100.000 und in der Schweiz 9,2 / 100.000. Obwohl die Inzidenz in den zuletzt genannten Ländern am höchsten ist, ist die Sterberate dort im Vergleich zu anderen Ländern gering. Dies legt nahe, dass eine starke Verbesserung der Therapieoptionen vor allem in Nicht-Europäischen Ländern nötig ist, um die Mortalitätsrate zu senken (2).

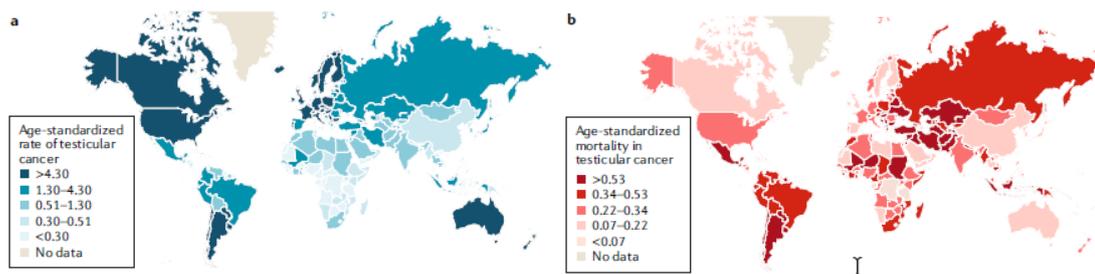


Abbildung 1: Häufigkeit (a) und Sterberate (b) an testikulärem Keimzelltumor weltweit. (2)

Die Inzidenz weist eine geographische, ethnische, altersabhängige und sozioökonomische Abhängigkeit auf und hat sich zwischen den Jahren 1973 bis 2008 in nahezu allen Industrieländern verdoppelt (3).

Die steigende Inzidenzrate betrifft vor allem die kaukasische Bevölkerung. Bei jungen hellhäutigen Männern in nördlichen Ländern ist die Inzidenzrate 10-mal höher als bei

dunkelhäutigen und asiatischen Männern. Die Inzidenz ist daher abhängig von der Geburtsstätte. In verschiedenen Studien wurde festgestellt, dass die Inzidenz der KZT bei Einwanderern nicht abhängig von dem derzeitigen Lebensort, sondern von dem Geburtsort ist [3].

Erstmalig beschrieben wurde der KZT 1972 als *Carcinoma in situ*. Die 5-Jahres-Überlebensrate stieg von unter 30 % im Jahr 1950 an auf ca. 95 % im Jahr 2018. Dies liegt vor allem an der hohen Sensitivität des Keimzelltumors auf die systemische Therapie (2).

Der größte Risikofaktor für testikuläre Tumore ist vor allem eine familiäre Vorbelastung durch KZT. Aber auch das Klinefelter-Syndrom, Mikrolithiasis und Kryptorchismus sind zu beachtende Risikofaktoren. Kryptorchismus erhöht das Risiko um das 5-fache [3]. Kryptorchismus beschreibt das Fehlen mindestens eines Hodens im Hodensack. Es ist eine der häufigsten angeborenen Missbildungen. Normalerweise entwickeln sich die Hoden embryonal im Retroperitoneum des Abdomens und wandern dann durch den Leistenkanal in das Skrotum. Beim Kryptorchismus hat dieser *Deszensus testis* gar nicht oder nicht vollständig stattgefunden. Meistens kann man bei betroffenen Patienten, den nicht abgesenkten Hoden im Inguinalkanal tasten, bei wenigen verbleibt er im Retroperitoneum oder fehlt komplett (4).

Weitere Risikofaktoren sind eine wiederholte Diagnose eines testikulären Keimzelltumors in der Vergangenheit, genetische Veranlagung und mütterliche *in utero* Exposition. Diese Exposition beinhaltet Faktoren wie das Rauchen während der Schwangerschaft oder den hormonellen Einfluss von Östrogen (5).

1.1.2 Histopathologische Klassifikation

Die Keimzelltumoren werden nach dem histopathologischen Aussehen, der Keimzelllinie und dem Erkrankungsalter eingeteilt. In **Abbildung 2** sieht man eine schematische Darstellung der histopathologischen Klassifikation. Man unterscheidet zwei Hauptgruppen, die Keimzellneoplasie in situ (GCNIS, im Englischen „germ cell neoplasia in situ“) -assoziierten testikulären Keimzelltumoren (TKZT) und die nicht-GCNIS-assoziierten TKZT (2).

Die nicht-GCNIS-assoziierten TKZT werden unterteilt in den Typ-I und Typ-III. Der Typ-I-Keimzelltumor tritt vor allem präpubertär bei jungen Männern auf und schließt das Teratom und den Dottersacktumor (DST) ein. Es wird davon ausgegangen, dass sich dieser Tumortyp aus einer embryonalen Keimzelle entwickelt, deren Differenzierung

durch ungünstige Umweltbedingungen gestört wird. Die weitere Entwicklung wird dahingehend gestört, dass das Pluripotenzprogramm nicht herunterreguliert werden kann. Es entwickelt sich stattdessen eine Zelle, die sich in eine Teratomzelle oder in eine Dottersacktumorzelle differenziert (2).

Bei dem Typ-I-Tumor geht man von einem genetischen Einfluss durch die Genotypen der Mutter aus (2).

Der Typ-III-Keimzelltumor kommt vor allem bei älteren Männern vor und wird als spermatozytischer Tumor bezeichnet. Der Tumor entwickelt sich aus einer Spermatogonie und ist gutartig (2).

Zu den GCNIS-assoziierten TGCTs gehört der Keimzelltumor vom Typ-II. Er tritt am häufigsten auf und betrifft insbesondere junge Männer zwischen 15 und 45 Jahren. Man unterscheidet dabei die Seminome von den Nicht-Seminomen. Bei den Keimzelltumorzellen vom Typ-II handelt es sich beim Embryonalkarzinom um pluri- bis totipotente Zellen, d.h. sie können sich in alle embryonalen und nicht-embryonalen Zellen differenzieren. Nicht-Seminome sind meistens eine Mischung aus Embryonalkarzinomen, Teratomen, Dottersacktumoren, Chorionkarzinomen und Seminomen (2).

Nicht-Seminome entwickeln sich aus dem Embryonalkarzinom (EK). Dieses kann sich in ein Teratom oder in extraembryonales Gewebe differenzieren. Zu den extraembryonalen Gewebeteilen zählen der Dottersacktumor und das Chorionkarzinom (6).

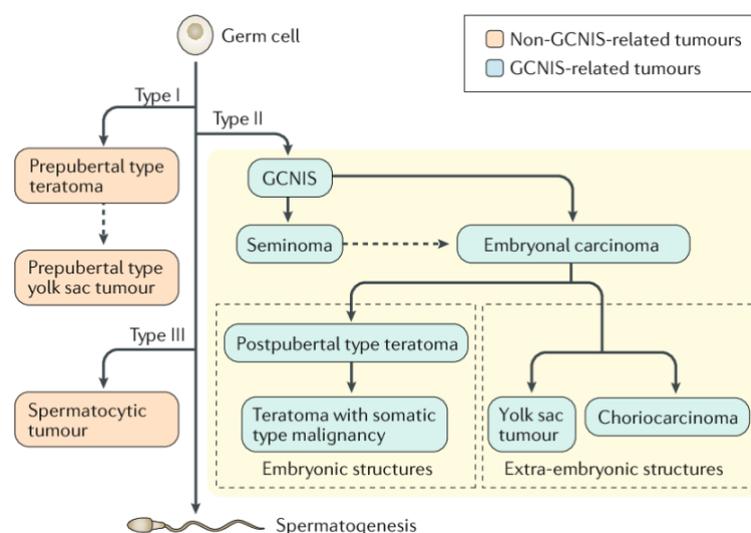


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Einteilung des testikulären Keimzelltumors. (2)

1.1.3 Prognosefaktoren

Laut der „European Association of Urology“ (EAU) tritt bei 15 – 30 % der Patienten mit einem Keimzelltumor ein Rezidiv nach der Erstbehandlung mit Chemotherapie auf. Diese benötigen dann eine weitere zusätzliche Rezidiv-Therapie. Das Langzeitüberleben nach Erstdiagnose liegt bei 15 – 30 Jahre (7).

Zudem werden auch Nebenwirkungen der Therapie auf andere Organsysteme beobachtet. Nierenerkrankungen, zerebrovaskuläre Ereignisse, sekundäre Leukämien und Schlaganfälle sind Beispiele für solche Nebenwirkungen. Auch die psychische Gesundheit kann durch physische Krankheitssymptome reduziert werden. Dadurch kann die Lebensqualität stark abnehmen (7). Dennoch sind vor allem seit der Möglichkeit der Chemotherapie mit Cisplatin die Heilungschancen gestiegen (8).

Jedoch benötigen 5 – 10 % der Patienten mit KZT und 20 – 30 % der Patienten mit Metastasen eine Rezidiv-Therapie und können nicht direkt geheilt werden. Dann können die Patienten nur noch von einer palliativen Chemotherapie profitieren (9).

Man teilt die Patienten mit metastasierten Keimzelltumoren in eine „gute“, „intermediäre“ oder „schlechte“ Prognosegruppe ein. Die „gute“ Prognosegruppe umfasst 60 % der Patienten mit einem metastasierten Keimzelltumor. Dabei handelt es sich um einen gonadalen oder retroperitonealen Primärtumor mit niedrigen Tumormarkern. Die Metastasen befinden sich dabei allein in Lymphknoten und / oder der Lunge. Die Langzeitüberlebensrate beträgt nach Cisplatin-basierter Chemotherapie zwar 90 %, hat sich in den letzten 15 Jahren jedoch nicht verbessert (10).

Der „intermediären“ Prognosegruppe können 20 – 25% aller metastasierten Patienten zugeordnet werden. Die Tumormarker sind höher als bei der „guten“ Prognosegruppe und die Langzeitüberlebensrate nach Cisplatin-basierter Chemotherapie liegt bei 80 % (10).

15 – 16 % werden zu der „schlechten“ Prognosegruppe gezählt. Dies sind Patienten mit einem primär mediastinalen Keimzelltumor. Dieser hat zudem hohe Tumormarker und nichtpulmonale viszerale Metastasen. Die Langzeitüberlebensrate liegt hier bei 40 – 50% (10).

1.1.4 Diagnostik und Therapeutische Optionen

Die Verdachtsdiagnose des TKZT wird bei der Anamnese und körperlichen Untersuchung gestellt, wenn eine schmerzlose Hodenvergrößerung zu erkennen und eine derbe, schmerzlose, intratestikuläre Raumforderung zu tasten ist. Danach wird die Diagnose gesichert durch Sonographie beider Hoden, des Retroperitoneums und

Abdomens, durch Bestimmung der Serum-Tumormarker Alpha-1-Fetoprotein (AFP), humanes Choriongonadotropin (β -HCG), Plazentare Alkalische Phosphatase (PLAP) und Lactatdehydrogenase (LDH) und durch ein CT des Thorax und Abdomens nach einer Ablatio testis (11).

Ein generelles Screening auf einen TKZT wird aktuell nicht empfohlen, jedoch wird jungen Männern eine regelmäßige Selbstuntersuchung der Hoden angeraten, insbesondere bei Vorliegen von Risikofaktoren. Bei Auffälligkeiten sollten sie sich dann einem Urologen vorstellen (12).

Da die Erkrankung selten auftritt, ist eine einheitliche Therapieempfehlung für Praxen ohne entsprechende Expertise wichtig. Diese ist bei frühen und nicht metastasierten Hodentumoren vorhanden. Für Hodentumore, die metastasieren oder sich in einem späten Stadium befinden, ist diese jedoch nicht verfügbar. Aufgrund dessen ist es wichtig, diese Patienten an spezialisierte Hodentumorzentren weiterzuleiten (12).

Die Primärtherapie eines TKZT besteht in einer inguinalen radikalen Orchiektomie. Falls die Dignität des Tumors makroskopisch unklar ist, sollte eine Schnellschnittdiagnostik intraoperativ durchgeführt werden. Falls die Skrotalwand infiltriert oder das Wachstum perforierend ist, sollte eine Hemiskrotektomie vorgenommen werden (11).

Bei Ausbildung vital bedrohlicher Metastasen sollte die Ablatio testis nicht primär vorgenommen werden, sondern erst sekundär nach primärer Chemotherapie (11).

Es kann eine Enukleationsresektion durchgeführt werden, wenn die Testosteron- und LH-Serumspiegel präoperativ normal sind, der Tumor diagnostisch gut abgrenzbar vom umliegenden Gewebe ist, intraoperativ eine Schnellschnittdiagnostik möglich ist und postoperativ der Patient eine hohe Mitarbeit bei der medizinischen Behandlung zeigt. Bei der Organ-erhaltenden Therapie wird die physiologische Testosteronsynthese bei etwa 90 % der Patienten aufrechterhalten und 10 % können trotz beidseitigem Keimzelltumor auf natürlichem Wege Kinder zeugen (11).

Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt nach Tumorenukleation bei 99 % und die lokale Rezidivrate bei 5,5 % (3).

Eine Keimzellneoplasie in situ (KZNIS) kann durch Bestrahlung mit 18 Gray (Gy) therapiert werden. Diese kann jedoch aufgeschoben werden, falls bei dem Patienten noch ein Kinderwunsch vorhanden ist. Dann sollte er jedoch regelmäßige Kontrolluntersuchungen wahrnehmen. Die TIN ist eine obligate Präkanzerose und liegt zu 5 % auch im kontralateralen Hoden vor. Dieser sollte biopsiert werden, wenn das Hodenvolumen weniger als 12 ml beträgt und das Patientenalter unter 30 liegt (11).

Die Behandlung von Patienten mit metastasiertem Keimzelltumor unterscheidet sich zwischen den verschiedenen Prognosegruppen. Patienten mit guter Prognose sollen mit der Standardchemotherapie aus Cisplatin, Etoposid und Bleomycin (PEB) behandelt werden. 3 Zyklen im 5-Tages-Regime erzielten in Studien die besten Ergebnisse. Die rezidivfreie 2-Jahres-Überlebensrate betrug dort 90,4 %. Cisplatin ist zudem deutlich weniger neuro- und nephrotoxisch als Carboplatin. Bleomycin hat jedoch eine nicht außer Acht zu lassende pulmonale Toxizität. Daher wird bei Patienten mit Lungenvorerkrankungen auf Bleomycin verzichtet und stattdessen mit 4 Zyklen Cisplatin und Etoposid (EP) behandelt (10).

Patienten aus der „intermediären“ Prognosegruppe werden mit 4 Zyklen PEB-Chemotherapie mit einer Etoposidgesamtdosis von 500 mg/m² therapiert. Wenn Bleomycin kontraindiziert ist, kann alternativ mit 4 Zyklen Etoposid, Ifosfamid und Cisplatin therapiert werden (10).

Patienten mit schlechter Prognose haben bei einer Behandlung mit 4 Zyklen BEP ein Langzeitüberleben von ca. 50 %. Bisher wurde durch Erhöhung der Medikamentendosierung keine Wirksamkeitssteigerung erzielt, sondern die Toxizität sogar erhöht. Eine andere Therapiemöglichkeit stellt die Hochdosischemotherapie mit Blutstammzellunterstützung dar. In Studien mit der Hochdosischemotherapie aus Carboplatin, Etoposid und Ifosfamid wurde der Überlebensvorteil mit dieser Therapie auf 10 – 15 % geschätzt. Das Langzeitüberleben betrug dort 75 % (10).

Die Heilungschancen unter Chemotherapie mit Cisplatin sind seit langer Zeit sehr gut. Jedoch entwickeln 10 – 15% der Patienten verschiedene Resistenzmechanismen gegen diese Therapie. Bisher gibt es keine eindeutige Therapie gegen diese Cisplatin-Resistenz. Daher werden aktuell alternative Therapiemöglichkeiten untersucht (8).

Eine Alternative zu Cisplatin sind Ifosfamid, Gemcitabin, Oxaliplatin, Paclitaxel und Etoposid. Diese haben in Studien eine klinische Wirksamkeit gezeigt. Neben dieser Monotherapie kann auch eine Kombinationschemotherapie in Frage kommen. Dabei erreichte die Kombination aus Gemcitabin, Oxaliplatin und Paclitaxel (GOP) in Studien bei 51 % der Patienten eine Remission (8).

Bei Patienten mit einer Erhöhung des α -Fetoproteins (AFP) ohne Dynamik kann eine „Desperation surgery“ vorgenommen werden. Dabei sollte jedoch eine R0-Resektion aller Läsionen erzielt werden können. Bei erhöhten β -HCG-Werten sollte diese Therapie jedoch nicht in Betracht gezogen werden. Bei einer „Desperation surgery“ wird eine alleinige operative Resektion vorgenommen ohne Systemtherapie (8).

Je nach Therapie sollte dem Patienten vor einer Behandlung eine Fertilitätsprotektion angeboten werden. Vor der Ablatio testis, Strahlentherapie oder Chemotherapie stellt die Kryokonservierung eine mögliche Option dar. Falls präoperativ eine Azoospermie vorliegen sollte, kann eine bilaterale testikuläre Spermienextraktion in Betracht gezogen werden (12).

1.2 Dottersacktumore

1.2.1 Entstehung und Epidemiologie

Dottersacktumore (DST) sind maligne KZT die aus den primordialen Keimzellen (PKZ) entstehen. 80 % befinden sich in den Ovarien oder Testikeln, während dagegen 10 – 20 % extragonadal gelegen sind. Die PKZ können in die Genitalleisten wandern und auf dem Weg im gesamten Körper entarten. Zudem zeigen die DST Strukturmerkmale, die eine endodermale extraembryonale Differenzierung widerspiegeln (13).

Die DST entwickeln sich als Typ-I-Keimzelltumor im Neugeborenen- bis Kleinkindalter und als Typ-II-Nicht-Seminom postpubertär. Die Proteine KIT, plazentare alkalische Phosphatase 1 (PLAP1), OCT4, NANOG, der Transkriptionsfaktor SOX17, das RNA-bindende Protein LIN28 und die miRNAs miR-371-3 und miR-302/367 haben einen Einfluss auf die Entwicklung einer Keimzellneoplasie in situ. Aus dieser können sich dann Seminome oder Nicht-Seminome entwickeln, was wiederum durch äußere Einflussfaktoren bestimmt wird (2).

Nicht-Seminome können sich anschließend in undifferenzierte Embryonalkarzinome oder in differenzierte Teratome, Chorionkarzinome und Dottersacktumore entwickeln. Wie zuvor erwähnt spielen bestimmte Proteine eine wichtige Rolle in der Differenzierung. So kann beispielsweise OCT3/4 in Seminome und Embryonalkarzinome detektiert werden, jedoch nicht in Chorionkarzinome, Teratome oder Dottersacktumoren. Die genaue Entstehung ist noch unbekannt. Es wird jedoch vermutet, dass bei der Entwicklung vom Seminom zum Embryonalkarzinom die Mikroumgebung und epigenetische Modifikation eine Rolle spielen (7).

Der Dottersacktumor zählt zu den Keimzelltumoren mit einer extraembryonalen Differenzierung, dessen Histologie trophoblastären Zellen ähnelt. Die Inzidenz in der Neonatalzeit beträgt 21,1 auf 1 Millionen Kinder. Dabei tritt er meist als maligne Entität eines Teratoms auf. Vor allem im Säuglings- und Kindesalter treten Dottersacktumore

auf. In der Pubertät erweitert sich das Spektrum auf Seminome und Nicht-Seminome, welche sehr häufig Mischformen aus Dottersacktumor und Teratomen sind (14).

Das α -fetoprotein (AFP) ist ein Protein, das vom DST sezerniert wird. Es ist ein Biomarker und korreliert mit der Malignität des DST (15).

1.2.2 Differenzierung und Diagnose

In Studien wurde die Differenzierung von Embryonalkarzinomen zu DST untersucht. Dafür führten Wruck et al. eine Metaanalyse von Hochdurchsatzdaten der Gen- und Mikro-RNA-Expression, DNA-Methylierung und Mutationslast durch, um molekulare und epigenetische Mechanismen zu verstehen. Die Ergebnisse wurden mittels qRT-PCR und Immunhistochemie verifiziert. Es wurde festgestellt, dass die Differenzierung einer Kontrolle durch verschiedene Gene unterliegt. In adulten Dottersacktumoren (aDST) waren im Vergleich zu EK die Expression von Genen wie *FOXA2* und *SOX17* hochreguliert, während dagegen *SOX2* herunterreguliert war. Für die Untersuchung der Transkriptionsfaktor-Bindestellen wurden ChiP-Seq-Daten des ENCODE-Projekts untersucht. Für die Untersuchung der Differenzierung wurden zudem Leberzellkarzinomzellen herangezogen, da diese eine starke Expression von *FOXA2* und weiteren DST-assoziierten Faktoren aufweisen. Insgesamt zeigte sich im Vergleich von aDST und pädiatrischen Dottersacktumoren (pDST) eine ähnliche Genexpression, während dagegen sich die Genexpression in aDST stark von der Genexpression in EK unterschied. *FOXA2* wurde dabei als Schlüsselgen identifiziert. Dieser Transkriptionsfaktor agiert in Verbindung mit *SOX17*, dessen Expression in DST vor allem im Vergleich zu Seminomen hochreguliert ist, und spielt eine entscheidende Rolle in der Zelldifferenzierung auch anderer Tumorarten wie dem Blasenkarzinom und Prostatakarzinom. Es wurde festgestellt, dass die Differenzierung von Seminom-Zellen in Nicht-Seminomzellen mit DST-Anteilen durch die *SOX17*-Expression induziert wird, welche wiederum durch die *FOXA2*-Expression induziert wird. Wruck et al. vermuten, dass eine *FOXA2*-Induktion eine Hochregulierung von *SOX17* in *SOX17*-/*SOX2*+ EK auslöst. **Abbildung 3** zeigt eine schematische Übersicht der Differenzierung. In Hepatozyten und Leberzellkarzinomzellen konnten diese DST-assoziierten Gene ebenfalls detektiert werden und auch der in DST wichtige WNT- und BMP-Signalweg scheint hier eine Rolle zu spielen. Man kann daher von einer molekularen Verwandtschaft zwischen Leber-/Leberzellkarzinomzellen und DST-Zellen ausgehen (6).

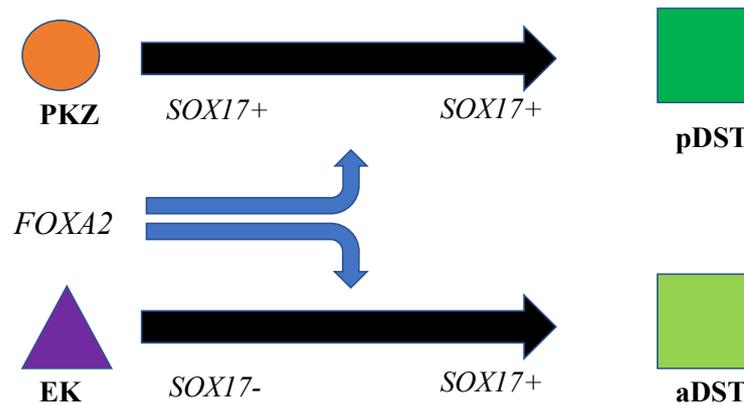


Abbildung 3: DST-Differenzierung unter *FOXA2* und *SOX17*.

1.3 Dottersacktumor und Hepatozelluläres Karzinom

Zwischen dem DST und dem Hepatozellulären Karzinom (HZK) gibt es Gemeinsamkeiten auf molekularer Ebene. Zum einen werden Gene wie *FOXA2*, *SOX17*, *AFP*, *APOA1/A2/B*, *ALB*, *TTR*, *FGA/B/G* und *GATA3/4/6* in beiden Tumorzellen exprimiert, zum anderen spielt der WNT- und BMP-Signalweg in beiden Entitäten eine wichtige Rolle bei der Zelldifferenzierung (6).

In vorherigen Studien wurde die Genexpression in adulten und pädiatrischen Dottersacktumorzellen, sowie in Embryonalkarzinomzellen, den Vorläuferzellen des DST, untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Genexpression im adulten (aDST) und pädiatrischen (pDST) Dottersacktumor sehr ähnlich ist, während dagegen das EK sich auf Gen- und MicroRNA-Expressionsebene stark von dem aDST unterscheidet. Daher vermutet man ähnliche molekulare Mechanismen und ähnliche Wirksamkeit von Therapeutika im aDST und pDST (6).

Die Analyse des *FOXA2*-Genlokus in Leberzellen und Zellen des Hepatozellulären Karzinoms zeigte eine starke Expression dieses Gens. Zudem wurde eine Expression verschiedener Gene detektiert, die auch typisch für den DST sind (*AFP*, *APOA1/A2/B*, *ALB*, *FGA/B/G*, *GATA3/4/6*). Dieses Genexpressionsprofil wurde immunhistochemisch auf Protein-Ebene untersucht. Dafür wurden in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Keimzelltumorgewebe (FFPE) angefärbt. Alle Gewebe des aDST zeigten eine starke Expression von *FOXA2* (100 %), *GATA3* (100 %), *SOX17* (100 %), *GPC3* (93 %) und *AFP* (95 %). Durch Analyse der *FOXA2*-Genexpression können zudem die Anteile des DST in einem gemischten KZT von anderen Komponenten, wie dem Teratom oder Chorionkarzinom, unterschieden werden (6).

Die WNT-, BMP- und MAPK-Signalwege sind in Dottersacktumorzellen hochreguliert, während sie in Embryonalkarzinomzellen runterreguliert sind. Im Vergleich dazu spielen die WNT- und BMP-Signalwege auch in der Differenzierung von humanen pluripotenten Stammzellen zu Hepatozyten eine große Rolle (6).

Auf molekularer Ebene zeigen DST demnach eine hohe Ähnlichkeit zu Leberzellen und Zellen des HZK. Aufgrund dieser molekularen Verwandtschaft sollen in dieser Doktorarbeit Therapieoptionen des HZK auf DST-Zellen in vivo angewendet werden.

Deswegen wird im Folgenden zunächst auf Therapieoptionen bei Hepatozellulärem Karzinom eingegangen.

1.3.1 Therapeutische Optionen

Circa 90% aller Hepatozellulären Karzinome entstehen aufgrund einer Leberzirrhose. Dabei haben Patienten mit einer Leberzirrhose oder einer chronischen Virusinfektion ein höheres Risiko an einem HZK zu versterben. Oft wird das HZK erst diagnostiziert, wenn der Patient Symptome aufweist. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt dann bei 0 - 10 %.

Bei HZK-Patienten ohne Leberzirrhose stellt die Resektion des Karzinoms die Therapie der Wahl dar. Dabei sind bei bis zu 60 % der Patienten mit einem HZK kurative Resektionen möglich. Eine regelmäßige Nachsorge über 5 Jahre soll nach Resektion eines HZK ohne Leberzirrhose erfolgen (16).

Innerhalb der Systemtherapie des HZK gibt es Substanzen mit einem Wirksamkeitsnachweis in Phase-III-Studien. Diese können bei HZK-Patienten mit erhaltener Leberfunktion und Fernmetastasen angewendet werden. Der Wirksamkeitsnachweis liegt vor für eine Kombinationstherapie mit den Antikörpern Atezolizumab gegen PD-L1 und Bevacizumab gegen VEGF, für die Tyrosinkinase-Inhibitoren Sorafenib und Lenvatinib, bzw. für Regorafenib und Cabozantinib nach Vortherapie mit Sorafenib, und für den VEGF-R2 Antikörper Ramucirumab für Patienten nach Sorafenib und einem Alpha-Fetoprotein-Wert von ≥ 400 ng/ml (16).

In einer 2008 durchgeführten Zulassungsstudie führte Sorafenib bei Patienten mit fortgeschrittenem HZK zu einem Gesamtüberleben von 10,7 Monaten gegenüber 7,9 Monaten mit Placebo. Die Überlebensrate nach einem Jahr betrug bei Sorafenib 44 % im Vergleich zum Placebo mit 33 %. Außerdem verlängerte sich der Zeitpunkt bis zur radiologischen Progression von 2,8 auf 5,5 Monate unter Therapie mit Sorafenib (16).

Neben Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Sorafenib und Lenvatinib, werden auch Forschungen zu anderen molekular-zielgerichteten Therapiemöglichkeiten durchgeführt.

Studien zeigten einen kontrollierenden Effekt auf das HZK-Wachstum und eine Hemmung der Tumervaskulogenese durch Inhibition der Poly(ADP-ribose)-Polymerase (PARP) (17).

Der Aurorakinase/YAP/P21- Signalweg scheint zudem in der Onkogenese des HZK von Bedeutung zu sein. Eine Aurorakinase-Inhibition mag demnach ein weiterer möglicher Therapieansatz sein (18).

1.4 Ziele der Arbeit

Aufgrund einer vermehrten Cisplatinresistenz und starken nephro- und neurotoxischen Nebenwirkungen dieser Chemotherapie, steigt die Mortalität der Patienten mit einem Dottersacktumour. Da insbesondere der DST sehr maligne und aggressiv ist, bedarf es hier einer Untersuchung weiterer Therapieoptionen.

In dieser Doktorarbeit sollen daher neue Therapieoptionen für DST *in vitro* untersucht werden. Dafür nehmen wir eine molekulare Ähnlichkeit des DST zum Hepatozellulären Karzinom (HZK) an und wählen daher Medikamente aus, die in der Leitlinie des HZK empfohlen werden oder in ersten Studien vielversprechende Ergebnisse erzielten. Zudem werden Proteine in Dottersacktumorzellen identifiziert, die mögliche Ziele weiterer Medikamente sein könnten.

Insgesamt soll überprüft werden, ob Tyrosinkinase-, Aurorakinase- und PARP-Inhibitoren (TAPi) eine mögliche Therapieoption für Dottersacktumore wären.

Dies soll in Dottersacktumorzellen, Fibroblasten, Endothelzellen und HZK-Zellen untersucht werden. Zuerst sollen TAPi-Zielproteine und deren Genexpression in DST-Zellen mittels qRT-PCR ermittelt und anschließend die Zellviabilität nach Inhibitorbehandlung mittels XTT-Assay gemessen werden. Eine spezifische Wirkung auf Apoptoseinduktion und Zellzyklusveränderungen wird anschließend untersucht.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Humane Keimzelltumor-, Leberkrebs- und Kontrollzelllinien

Übersicht der verwendeten humanen Keimzelltumor-, Leberkrebs- und Kontrollzelllinien. Aufgelistet sind der Ursprung des Gewebes und das Geschlecht der Patienten, aus denen die jeweiligen Zelllinien gewonnen wurden.

Zelllinie	Ursprung	Geschlecht
GCT72	Dottersacktumor	männlich
1411H	Dottersacktumor	männlich
NOY-1	Dottersacktumor	weiblich
NOY-1-R	Dottersacktumor	weiblich
HepG2	Hepatozelluläres Karzinom	-
HVHF2	Vorhaut; Fibroblasten	männlich
MPAF	Haut; Fibroblasten	männlich
HUVEC	Umbilicalvene; Endothelzellen	-

Tabelle 1: In dieser Studie verwendete Zelllinien.

2.1.2 Materialien der Zellkultur

Materialien für die Standard-Kultivierung von Keimzelltumor-, Leberkarzinom- und Kontrollzelllinien in der Zellkultur. Aufgelistet sind die jeweiligen Materialien, der Hersteller des Produkts und der Standort in Deutschland.

Material	Hersteller	Standort in DE
(D)PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Automatischer Zellzähler TC20TM	BioRad	Feldkirchen
CO ₂ -Inkubator HeraCell 150i	Thermo Fisher Scientific	Darmstadt
DMEM (1x) + GlutaMAX™	Thermo Fisher Scientific	Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Endothelial Cell Growth Medium	PromoCell	Heidelberg
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom/MERCK	Berlin/Darmstadt
Glas-Pasteur-Pipetten	Brand	Anröchte
Kühlzentrifuge Allegra 2IR Centrifuge	BeckmanCoulter	Krefeld
L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific	Darmstadt
Nicht-essenzielle Aminosäuren	Thermo Fisher Scientific	Darmstadt
P/S	Thermo Fisher Scientific	Darmstadt
Pipetten 0.5 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf	Leipzig
Reaktionsgefäße 0.5 ml	Eppendorf	Leipzig
Röhrchen 15 ml/50 ml	Greiner Bio-One	Frickenhausen
RPMI Medium 1640 (1x)	Thermo Fisher Scientific	Darmstadt
Sterile Pipetten 5 ml/10 ml/25 ml	Sarstedt	Nümbrecht
T-75 Zellkultur-Flaschen	Greiner Bio-One	Frickenhausen
Trypanblau 0.4 %	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Trypsin-EDTA 0.05 % Phenolrot	Thermo Fisher Scientific	Darmstadt
Zählkammern	BioRad	Feldkirchen
Zentrifuge 5810	Eppendorf	Leipzig

Tabelle 2: Zellkulturmaterialien.

2.1.3 Zellkulturmedien und Supplemente

Übersicht des jeweiligen Mediums und der Supplemente.

Zelllinie	Medium	Supplemente
GCT72	RPMI Medium	10% FCS; 1% P/S; 1% L/G
1411H	DMEM	10% FCS; 1% P/S; 1% L/G
NOY-1	RPMI Medium	10% FCS; 1% P/S; 1% L/G
NOY-1-R	RPMI Medium	10% FCS; 1% P/S; 1% L/G
HepG2	DMEM	10% FCS; 1% P/S
HVHF2	DMEM	10% FCS; 1% P/S; 1% L/G
MPAF	DMEM	10% FCS; 1% P/S; 1% L/G; 1x Non-essential amino acids; 100 nM β-Mercaptoethanol
HUVEC	Endothelial Cell Growth Medium	10% FCS; 1% P/S; 1% L/G (PromoCell)

Tabelle 3: Zellkulturmedien.

2.1.4 Materialien für BCA-Protein-Assay

Um die Menge an Proteinen in den jeweiligen Proben zu bestimmen, wurde der BCA (Bicinchoninsäure)-Protein-Assay genutzt. Zur spektrophotometrischen Messung der Platten wurde der „iMark Microplate Reader“ von Bio-Rad Laboratories GmbH genutzt. Der verwendete Radioimmunpräzipitations-Assay-Puffer (RIPA) setzte sich zusammen aus 110 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,5% DOC, 0,1% SDS, 50 mM Tris in H₂O und wird auf einen pH von 8 eingestellt.

Material
96-Well-Platte
Albumin Standard (Verdünnungsreihe in RIPA 2 mg, 1 mg, 0,5 mg, 0,25 mg, 0,125 mg, 0,063 mg, 0,032 mg)
iMark Microplate Reader
Pierce™ BCA Protein Assay Reagent A/B
Thermomixer Comfort
Tischzentrifuge Mini Spin
Chemikalien für RIPA-Puffer
DOC (SodiumDeoxycholat, C ₂₄ H ₃₉ NaO ₄)
Natriumchlorid (NaCl)
SDS ultra pure (Dodecylsulfat, C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S)
Tris (Trisaminomethan, NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃)
Triton X-100

Tabelle 4: Übersicht der für einen BCA-Protein-Assay benötigten Materialien.

2.1.5 Materialien für Human Phospho-Kinase Array Kit

Übersicht der für den „Human Phospho-Kinase-Array“ benötigten Materialien der Firma R&D Systems®.

Material
Human Phospho-Kinase Array
Array Buffer 1
Array Buffer 2 (5x Konzentrat)
Array Buffer 3
Lysis Buffer 6
Waschpuffer-Konzentrat
Detektionsantikörper-Cocktail A
Detektionsantikörper-Cocktail B
Streptavidin-Horseradishperoxidase (HRP)
Chemisches Reagenz 1
Chemisches Reagenz 2
8-Well-Multischale
Transparenz-Overlay-Vorlage

Tabelle 5: „Human-Phospho-Kinase-Array“ Materialien.

2.1.6 Verwendete Inhibitoren

Übersicht der verwendeten Inhibitoren mit den jeweiligen Herstellern.

Inhibitoren	Hersteller	Standort	Katalognummer
Apatinib	Selleckchem	München	S5248
AZD4547	Selleckchem	München	S280105
Cabozantinib (BMS-907351)	Selleckchem	München	S1119
Danusertib (PHA-739358)	Selleckchem	München	S1107
Ibrutinib (PCI-32765)	Selleckchem	München	S2680
Imatinib (STI571) Mesylate	Selleckchem	München	S1026
Lenvatinib (E7080)	Selleckchem	München	S1164
Nintedanib (BIBF 1120)	Selleckchem	München	S1010
Olaparib	Cayman Chemical	Hamburg	10621
Regorafenib (BAY 73-4506)	Selleckchem	München	S1178
SNS-314 Mesylate	Selleckchem	München	S8699
Sorafenib (BAY 43-9006)	Selleckchem	München	S7397
Talazoparib (BMN 673)	Cayman Chemical	Hamburg	19782

Tabelle 6: Inhibitoren. Alle in DMSO gelöst.

2.1.7 Materialien für XTT-Assay

Zur spektrophotometrischen Messung der XTT-behandelten Platten wurde der „iMark Microplate Reader“ von Bio-Rad Laboratories GmbH genutzt.

Zur tabellarischen und graphischen Auswertung der LD50 -Werte wurde „GraphPadPrism6.01“ der Firma GraphPad Software Inc. benutzt.

Übersicht der verwendeten Materialien für ein XTT-Assay.

Material	Hersteller	Standort
96-Well-Platte	Greiner Bio-One	Kremsmünster (Österreich)
Costar® Reagenzreservoir, 50 ml	Corning	New York (USA)
iMark Microplate Reader	Bio-Rad Laboratories GmbH	Feldkirchen (Deutschland)
Multikanalpipette	Eppendorf	Hamburg (Deutschland)
PMS (1,25 mM in PBS gelöst)	Greiner Bio-One	Kremsmünster (Österreich)
XTT (1 mg/ml gelöst in RPMI-Medium)	Cayman Chemical	Michigan (USA)

Tabelle 7: XTT-Assay Materialien.

2.1.8 In der qRT-PCR verwendete Primer

Übersicht über verwendete Oligonukleotide, die in der qRT-PCR verwendet wurden, deren Sequenz und deren Hersteller.

Gen	Sequenz fw	Sequenz rev	Hersteller	Standort in DE
<i>ABL1</i>	TGAAAAGCTCCGGGTCTTAGG	TTGACTGGCGTGATGTAGTTG	Sigma Aldrich	Darmstadt
<i>ABL2</i>	GAGAATGCAACCGAGAAGAGG	CTTAAGCCAAAGTCAGCCAC	Sigma Aldrich	Darmstadt
<i>ACTB</i>	AAAGACCTGTACGCCAACAC	GTCATACTCTGCTTGCTGAT	Sigma Aldrich	Darmstadt
<i>AURKA</i>	TGGTGGTCACTACATGCTC	TGCATCCGACCTTCAATCATTTTC	Sigma Aldrich	Darmstadt
<i>AURKB</i>	CGCAGAGAGATCGAAATCCAG	AGATCCTCTCCGGTCATAAAA	Sigma Aldrich	Darmstadt
<i>AXL</i>	ATCAGCTTCGGCTAGGCAG	TCCGCGTAGCACTAATGTTCT	Sigma Aldrich	Darmstadt
<i>BRAF</i>	TGCAAGGTGTGGAGTTACAGT	TCTCCAACACTTCCACATGCA	Sigma Aldrich	Darmstadt
<i>BTK</i>	TCCGAGAAGAGGTGAAGAGTC	AGAAGACGTAGAGAGGCCCTT	Sigma Aldrich	Darmstadt
<i>CSK</i>	CTGACGTGTGGAGTTTCGGA	GCAGCTCGTGGGTTTTGATG	Sigma Aldrich	Darmstadt
<i>EGFR</i>	CCCACTCATGCTCTACAACCC	TCGCACTTCTTACACTTCCGG	Sigma Aldrich	Darmstadt
<i>FGFR1</i>	AATGAGTACGGCAGCATCAAC	ACCTCGATGTGCTTTAGCCAC	Sigma Aldrich	Darmstadt
<i>FGFR2</i>	CGCTGGGGAATATACGTGCT	AGGTAGTCTGGGGAAGCTGT	Sigma Aldrich	Darmstadt
<i>FGFR3</i>	CCCAAATGGGAGCTGTCTCG	CCCGGTCTTGTCAATGCC	Sigma Aldrich	Darmstadt
<i>FGFR4</i>	CCATAGGGACCCCTCGAATAG	CAGCGAACTTGACGGTGT	Sigma Aldrich	Darmstadt
<i>FLT1</i>	GAAAACGCATAATCTGGGACAGT	GCGTGGTGTGCTTATTTGGA	Sigma Aldrich	Darmstadt
<i>FLT4</i>	TGCTCAAGGAGGTGACAGAG	CGCGAGTAGATGCTGGGG	Sigma Aldrich	Darmstadt
<i>GAPDH</i>	TGCCAAATATGATGACATCAAGAA	GAGTGGGTGTGCTGTTG	Sigma Aldrich	Darmstadt
<i>HCK</i>	CCCTGTATGATTACGAGGCCA	CACTCCCCGATTCTCTAGG	Sigma Aldrich	Darmstadt
<i>KDR</i>	GTGATCGGAAATGACACTGGAG	CATGTTGGTCACTAACAGAAGCA	Sigma Aldrich	Darmstadt
<i>KIT</i>	CAACCAAGGCCGACAAAAGG	CTAGGGCCAACTCGTCATCC	Sigma Aldrich	Darmstadt
<i>LCK</i>	TGCCATTATCCCATAGTCCCA	GAGCCTTCGTAGGTAACCAGT	Sigma Aldrich	Darmstadt
<i>LYN</i>	GCTTTTGGCACCAGGAAATAGC	TCATGTCGCTGATACAGGGAA	Sigma Aldrich	Darmstadt
<i>MET</i>	ACTCCCATCCAGTGTCTCCA	TGGAAATGTCTGAGCCCAA	Sigma Aldrich	Darmstadt
<i>PARP1</i>	TGCTGCTGTGAACTCCTCTG	CATGGCCTTCACTTCATCCT	Sigma Aldrich	Darmstadt
<i>PARP2</i>	ACACCCATTGGACCAACACT	GTGGGAGCATGGGTAGATTG	Sigma Aldrich	Darmstadt
<i>PDGFRA</i>	TTGAAGGCAGGCACATTTACA	GCGACAAGGTATAATGGCAGAAT	Sigma Aldrich	Darmstadt
<i>PDGFRB</i>	AGACACGGGAGAATACTTTTGC	AGTTCCTCGGCATCATTAGGG	Sigma Aldrich	Darmstadt
<i>RAF1</i>	GGGAGCTTGAAGACGATCAG	ACACGGATAGTGTGCTTGTC	Sigma Aldrich	Darmstadt
<i>RET</i>	ACACGGCTGCATGAGAACAA	GCCCTCACGAAGGGATGTG	Sigma Aldrich	Darmstadt
<i>SRC</i>	TCGTGCGAGAAAGTGAGACC	GCTTGCAGATCTGTAGTGC	Sigma Aldrich	Darmstadt
<i>YES1</i>	CTCAGGGTAACGCCTTTTGG	CACCACCTGTAAACCAGCAG	Sigma Aldrich	Darmstadt

Tabelle 8: Primerliste.

2.1.9 Materialien für RNA-Isolation

Für die Isolation der RNA aus den Zellpellets wurde das RNeasy® Mini-Kit der Firma QIAGEN GmbH (Hilden, Deutschland) verwendet und nach dem „Quick-Start Protocol March 2016“ vorgegangen.

2.1.10 Materialien für Proteinextraktion

Der für die Proteinextraktion verwendete RIPA-Puffer setzte sich zusammen aus 110 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,5% DOC, 0,1% SDS, 50 mM Tris und wird auf einen pH von 8 eingestellt.

Der Phosphatase- und Protease-Inhibitor wurden jeweils 1%ig in RIPA-Puffer gelöst.

Übersicht der für die RNA-Isolation und die Proteinextraktion benötigten Materialien.

Material	Hersteller
PBS	Sigma-Aldrich
Phosphatase-Inhibitor	Sigma-Aldrich
Protease-Inhibitor	Sigma-Aldrich
QIAzol® Lysis Reagent	QIAGEN
Röhrchen 15 ml	Greiner Bio-One
Trypsin-EDTA 0,05 % Phenolrot	Gibco, Thermo Fisher Scientific
Zellkultur Schale, PS, 100/20 mm	Greiner Bio-One
Zentrifuge 5810	Eppendorf
Chemikalien für RIPA-Puffer	
DOC (SodiumDeoxycholat, C ₂₄ H ₃₉ NaO ₄)	Sigma Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	VWR Chemicals
SDS ultra pure (Dodecylsulfat, C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S)	CARL ROTH GmbH + Co. KG
Tris (Trisaminomethan, NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃)	VWR Chemicals
Triton X-100	Sigma-Aldrich

Tabelle 9: RNA-Isolation und Proteinextraktion Materialien.

2.1.11 Materialien für Annexin V/PI Apoptose- und Zellzyklus-Analyse

Der Annexin V-Bindepuffer wurde als Mastermix bestehend aus 10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1,6 mM CaCl₂ gelöst in PBS angesetzt.

Übersicht der für das Annexin V/PI Apoptose-Assay und Zellzyklus-Analyse mittels Durchflusszytometrie benötigten Materialien.

Material	Firma
6-Well-Platten	Sarstedt
MACSQuant® und MACSQuant Analyzer 10, Version 2.13.0 Durchflusszytometer	MiltenyiBiotec
MACSQuantify Software Version 2.11 zur Datenauswertung	MiltenyiBiotec
Rekombinantes Annexin V FITC-Konjugat	MiltenyiBiotec
PBS	Sigma-Aldrich
PI (2 mg/ml gelöst in PBS, gelagert bei 4°C)	Sigma-Aldrich
Polystyrol-Röhrchen	VWR Chemicals
Trypsin-EDTA 0,05 % Phenolrot	Gibco, Thermo Fisher Scientific
Vortex Mixer	Scientific Industries

Tabelle 10: Apoptose- und Zellzyklus-Assay Materialien.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung

Die humanen Keimzelltumor-, Leberkarzinom- und Kontrollzelllinien wurden in DMEM-, RPMI- oder Fibroblasten-Medium mit den jeweils zelllinienabhängigen Supplementen in T-75-Flaschen im Inkubator bei 37 °C und einem 7.5 %igem CO₂-Gehalt kultiviert (vgl. Tabellen 1-3).

2.2.2 Passagieren der Zellen

Je nach Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 70 - 90 % passagiert.

Zuerst wurde das Zellmedium der T-75-Flasche abgesaugt und die Zellen mit 4 ml PBS gewaschen. Um die adhärenen Zellen danach vom Flaschenboden zu lösen, wurde das PBS abgesaugt und 1 ml Trypsin (0,05 %) hinzugegeben. Anschließend wurde für 3 - 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Um den enzymatischen Verdau abzustoppen, wurden 4 ml FCS-haltiges Medium hinzugefügt.

15 ml des entsprechenden Zellmediums wurden jeweils in eine neue T-75-Flasche vorgelegt und in dieses abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen ein Teil der Zellsuspension überführt (vgl. Tabellen 1-3).

2.2.3 Trypsinieren

Bei der Keimzelltumorzelllinie GCT72 wurde in 2 Schritten trypsinieren, da zuerst die mit den GCT72-Zellen zusammenlebenden Fibroblasten gelöst und entfernt werden mussten. Daher wurde nach der erstmaligen Zugabe von 1 ml Trypsin (0,05 %) für 15 Sekunden bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 4 ml FCS-haltigem Medium gestoppt. Die übrigbleibenden GCT72-Zellen wurden erneut mit 1 ml Trypsin (0,05 %) behandelt und für 3 - 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde die Reaktion erneut durch Zugabe von 4 ml FCS-haltigem Medium gestoppt. Die Zellsuspension kann dann weiterverwendet werden (vgl. Tabellen 1-3).

2.2.4 Automatisierte Zellzählung

Die Zellzählung wurde mit dem automatisierten Zellzähler (TC20TM, BioRad) durchgeführt. Es handelt sich dabei um eine kombinierte Zellzählung mit Vitaltest durch Trypanblau.

Die Trypanblau-Färbung ist eine klassische Methode für die Zellzählung. Der Farbstoff Trypanblau ist sauer und gehört zur Gruppe der Azofarbstoffe. Dessen Anion bindet an Zellproteine. Dabei ist diese Färbung mit Trypanblau eine Ausschlussfärbung. Dadurch, dass die Membran der toten Zellen durchlässig wird, dringt der Farbstoff nur in diese ein und wird von lebenden Zellen nicht aufgenommen. Dies liegt an der molekularen Größe ($M = 960,8 \text{ g/mol}$) des Farbstoffes, durch die er nur durchlässige Membranen passieren kann. Zu beachten ist vor allem die Einwirkzeit des Trypanblaus auf die Zellen. Diese sollte nicht zu lang sein, da sonst der Farbstoff zytotoxisch wirkt und die Zellzahl durch Töten der gesunden Zellen verfälscht wird. Die Zellen, die nicht gefärbt wurden, entsprechen den gesunden Zellen (Vitaltest).

Die Vitalität der Zellen wird folgenderweise berechnet:

$$\text{lebende Zellen in \%} = \frac{\text{ungefärbte Zellen}}{(\text{ungefärbte} + \text{gefärbte Zellen})} * 100$$

Mit dem automatisierten Zellzähler wird die Gesamtzahl der Zellen, die Zahl der lebenden Zellen und die Vitalität in % gemessen. Es werden jeweils 10 μl Trypanblau (0,4 %) mit 10 μl der jeweiligen Zellsuspension vermischt und anschließend auf einen Einwegzählschieber aufgebracht. Der Zellzähler ermittelt dann sowohl die Zellzahl pro ml, sowie die Anzahl vitaler Zellen in Prozent.

2.2.5 XTT-Assay

Bei dem XTT-Test, auch Reduktionstest genannt, wird eine Enzymaktivität gemessen, durch die die Viabilität und Toxizität der Zellen berechnet werden kann.

Der Farbstoff XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-innersalt-2H-tetrazolium, monosodiumsalt) färbt sich durch die Reduktion seines Tetrazolringes hell orange. Die Reduktion erfolgt durch Dehydrogenasen, die sich bei vitalen Zellen im Mitochondrium befinden. Demnach kann das farbige Reaktionsprodukt Formazan nur in lebenden, metabolisch aktiven Zellen gebildet werden. N-Methylphenazoniummethylsulfat (PMS) dient dabei als Elektronenüberträger. Nachfolgend ist in **Abbildung 4** die Reduktionsreaktion abgebildet.

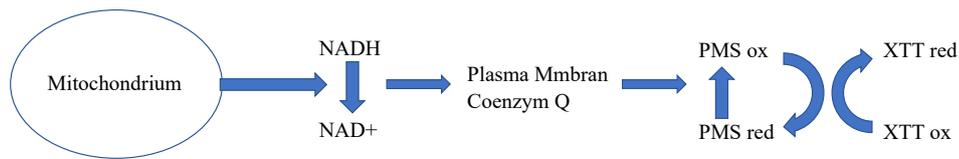


Abbildung 4: XTT-Reduktion.

Nach der Reaktion kann das entstandene Formazan durch das ELISA-Platten-Lesegerät iMark von BioRad 2019 spektrophotometrisch detektiert werden, wobei die Intensität der Färbung proportional zur Anzahl vitaler Zellen ist.

Für den XTT-Assay wurden auf einer 96-Well-Platte 3000 Zellen pro Well in jeweils 50 μ l Zellmedium ausgesät.

Die Zellen wurden erst 24 Stunden nach der Aussaat mit Inhibitoren behandelt, um eine Adhärenz der Zellen an die Vertiefung der 96-Well-Platte zu gewährleisten.

In dem Versuch wurde eine DMSO-Lösemittelkontrolle entsprechend der höchsten Konzentration des Inhibitors eingesetzt, da alle verwendeten Inhibitoren in DMSO-Lösungsmittel gelöst wurden. Dies ermöglicht eine Bewertung der Zellviabilität nach der Behandlung unabhängig von der Wirkung des Lösungsmittels auf die Zellen.

Der erste Messzeitpunkt erfolgte 24 Stunden nach Behandlung, dann nach 48 Stunden, 72 Stunden und 96 Stunden. Dafür wurde in jedes zu messende Well 50 μ L XTT und 0,5 μ l PMS (1.25 mM) pipettiert, sodass sich ein Gesamtvolumen von 150 μ L pro Well ergab. Im Anschluss wurden die 96-Well-Platten bei 37°C für 4 Stunden inkubiert. Die dann folgende Absorptionsmessung im ELISA Platten-Lesegerät erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm (Wellenbereich des orangefarbenen Formazans) und von 655 nm (Hintergrundabsorption der Proben/Leerwert).

Um die Zellviabilität zu ermitteln, wurde von den Messwerten in der Auswertung der 450 nm Wert gegen den 655 nm Wert normalisiert und anschließend gegen die jeweiligen Lösungsmittelkontrollen normalisiert. Die daraus hervorgehenden Probenwerte wurden dann ebenfalls nochmal gemittelt.

Grafisch lässt sich dann die Viabilität der Zellen gegen die Konzentration des Medikaments darstellen. So kann die LD50 ermittelt werden, aus der sich die geeigneten zelllinienspezifischen Wirkkonzentrationen der Substanzen für weitere Versuche ableiten lassen. Zudem wird der Zeitpunkt ermittelt, an dem das Therapeutikum die größte Wirkungssensitivität erreicht.

2.2.6 Annexin V / PI Apoptose-Assay

Mittels Annexin V und Propidiumiodid wird untersucht, ob die behandelten Zellen viabel sind, sich in Apoptose befinden oder nekrotisch sind. Der Annexin V-Assay basiert auf der Messung eines Verlusts der Membranasymmetrie der Zellen. Unter physiologischen Bedingungen besteht die Zellmembran aus einer strikten asymmetrischen Verteilung von Phospholipiden in einer Lipiddoppelschicht. Die amphiphilen Phospholipide besitzen eine hydrophile Kopfgruppe und eine hydrophobe Schwanzgruppe. Es bildet sich eine Doppelschicht, bei der die hydrophilen Köpfe nach außen und die hydrophoben Schwänze nach innen zeigen. Phosphatidylserin (PS) liegt dabei in gesunden Zellen immer in der zytosolischen Seite der Lipiddoppelschicht. In frühen Stadien der Apoptose bleibt die Stabilität der Membran erhalten, jedoch ordnen sich die Phospholipide neu an. Das Phosphatidylserin gelangt dabei in die äußere Schicht der Membran. Dort kann es durch Annexin V gebunden und fluoroskopisch detektiert werden.

Durch Zugabe von Propidiumiodid kann dann zwischen einer frühen Apoptose, einer späten Apoptose und einer Nekrose unterschieden werden. Propidiumiodid interkaliert in die DNA der Zellen und kann dann fluoroskopisch detektiert werden. Es gelangt jedoch nur nach Zerstörung der Membran in die Zellen. Demnach befindet sich die Zelle bei positiver Propidiumiodid-Detektion in der späten Apoptose oder Nekrose. Im Vergleich zur Nekrose sind jedoch in der späten Apoptose noch Phosphatidylserinmoleküle vorhanden. Demnach kann hier Annexin V binden.

Der Apoptose-Assay kann daher durch simultane Verwendung von Annexin V und Propidiumiodid zur Diskriminierung der Zellviabilität verwendet werden.

Für diesen Apoptose-Assay wurden die zu untersuchenden Zellen in eine 6-Well-Platte ausgesät. Die Zellzahl pro Well betrug 90.000 und es wurden je 2 ml des Zellgemisches in jedes Well pipettiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit den jeweiligen Inhibitoren behandelt. Dafür wurde die Konzentration des LD50-Werts nach 72 Stunden verwendet, die zuvor bei XTT-Analysen berechnet werden konnte. Nach 72 Stunden wurden dann die Zellen für die Analyse durch Trypsinieren geerntet. Dabei wurden die Zellen mit „Annexin V-binding buffer“ gewaschen, zentrifugiert und erneut mit genanntem Puffer gewaschen. 2,5 µl Annexin V FITC-Konjugat und 7,5 µl Propidiumiodid (PI) wurden in 70 µl „Annexin V-binding buffer“ zugesetzt und die Proben bei Raumtemperatur lichtgeschützt für 15 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl „Annexin V-binding buffer“ konnten die Proben im MACSQuant® X gemessen werden. Dabei wurden 5×10^4 Zellen in einem Streudiagramm vermessen.

2.2.7 Zellzyklus-Analysen

Der Zellzyklus besteht aus einer Mitose, in der sich die Zelle teilt, und einer anschließenden Interphase. Diese kann in die G1-, S- und G2-Phase unterteilt werden. Die G1-Phase schließt sich direkt an die Zellteilung an und beinhaltet das Zellwachstum und die Bildung von Organellen mit Protein- und RNA-Synthese. Darauf folgt die S-Phase, in der die DNA repliziert wird, sodass jedes Chromosom aus zwei Chromatiden besteht. In der G2-Phase werden die RNA und zellteilungsspezifische Proteine synthetisiert. Die Zelle wächst weiterhin, bevor sie sich dann abrundet und durch Flüssigkeitsaufnahme vergrößert. In der darauffolgenden Phase kommt es dann zur Mitose und Zytokinese.

Für diesen Zellzyklus-Assay wurden die zu untersuchenden Zellen wie in 2.2.6 beschrieben behandelt.

Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen in 300 μ l PBS aufgenommen und resuspendiert. Dann wurden langsam 700 μ l eiskaltes Ethanol (100 %) unter ständigem Vortexen hinzugegeben, um die Zellen in insgesamt 70 % Ethanol zu fixieren. Nach anschließendem Zentrifugieren und Waschen mit PBS wurden die Zellen in 500 μ l „FACS cell cycle puffer“ resuspendiert. Dieser Puffer besteht aus 2 μ g / ml PI und 200 μ g / ml RNaseA (Qiagen, 100 mg/ml). Die Proben wurden dann bei Raumtemperatur lichtgeschützt 5-10 Minuten inkubiert und im MACSQuant® X gemessen. Es wurden 5×10^4 Zellen in einem Streudiagramm vermessen.

2.2.8 cDNA-Synthese

Die cDNA (komplementäre DNA) wird mittels des Enzyms Reverse Transkriptase als Abschrift einer RNA synthetisiert. Diese RNA-abhängige DNA-Polymerase benötigt ein Oligonukleotid (Primer) zur Synthese. Ein Primer ist ein kurzer komplementärer DNA-Abschnitt, welcher an die RNA bindet. Dafür wurde ein Oligo-dT-Nukleotid eingesetzt, welches komplementär zum Poly-A-Schwanz der eukaryotischen mRNA ist.

Für die cDNA-Synthese wurden 1000 ng RNA zu 12,5 μ l mit RNase freiem Wasser aufgefüllt. Dazu wurde pro Ansatz ein Mastermix aus 1 μ l dNTP-Mix (10 mM), 1 μ l Oligo(dT)-Primer (0,5 μ g / μ l), 4 μ l RT Buffer (5 x), 1 μ l Maxima H Minus Reverse Transkriptase (200 U / μ l) und 0,5 μ l RiboLock RNase Inhibitor (40 U / μ l) hinzugegeben. Anschließend wurde die Synthese mit dem S100™ Thermal Cycler nach dem „Quick-Start Protocol March 2016“ durchgeführt.

2.2.9 qRT-PCR

Die Real-Time Quantitative PCR ist eine Methode der Genexpressionsanalyse, bei der gebildete PCR-Produkte (semi-)quantifiziert werden. Diese Quantifizierung wird durch einen DNA-interkalierenden Farbstoff ermöglicht. Zusätzlich zu den in der qualitativen PCR verwendeten Komponenten (dNTPs, Puffer, Polymerase) enthält der hier verwendete ‚Mastermix‘ daher zusätzlich den Farbstoff SybrGreen. Nach jedem Zyklus wird die Fluoreszenzemission der Farbstoff-Moleküle gemessen. So kann dann die Menge des entstandenen Produkts bestimmt werden. Wir verwenden den ‚Luna® Universal qPCR Master Mix‘, welcher den Farbstoff SYBR® Green I enthält.

Eine relative Quantifizierung wird dadurch ermöglicht, dass ein in allen Zellen ubiquitär exprimiertes Gen als Referenzgen (Haushaltsgen) gemessen wird. Dazu wurden *GAPDH* und *ACTB* verwendet. Der Mittelwert der Expression des Referenzgens wird dann von den Werten der Genexpression der Proben subtrahiert.

Für die qRT-PCR wurden zwei Mastermixe vorbereitet. Der eine (MM1) besteht aus 0.5 µl cDNA (1000 ng / 20 µl) (Gesamt cDNA 19 µl) und 8 µl H₂O (Gesamt H₂O 304 µl). Der zweite Mastermix (MM2) besteht aus 7,5 µl Luna qPCR Master Mix, 0,5 µl 3‘-5‘ Primer und 0,5 µl 5‘-3‘ Primer. Beide Mastermixe wurden zusammen pipettiert und vermengt. Dann wurden jeweils 5 µl des Gemisches in drei Wells der 384-well Platte pipettiert. Nachdem alle Proben auf die Platte gebracht wurden, wurde die Platte in den Light Cycler® 96 befördert und die qRT-PCR nach dem ‚S1000 Thermal Cycler S‘-Protokoll durchgeführt.

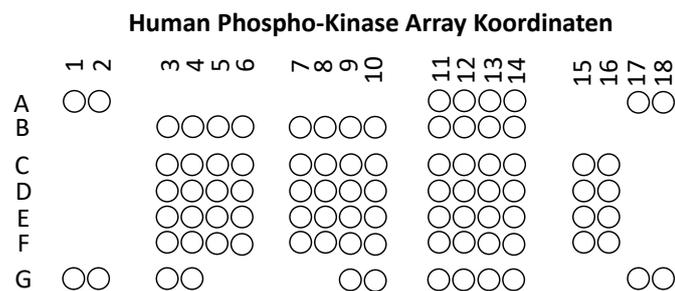
2.2.10 Human Phospho-Kinase Array

Mit dem ‚Human Phospho-Kinase Array‘ kann die Phosphorylierung von Kinasen und deren Substraten analysiert werden, um die Zellantwort auf ändernde Umweltbedingungen zu beobachten. Im Vergleich zu mehreren ‚Western Blots‘, können hier 43 Kinasen gleichzeitig detektiert werden. Die auf dem Array vorgegebenen Antikörper wurden aus Zelllinien gewonnen, von denen bekannt ist, dass sie das Zielprotein exprimieren. Jeder erfasste Antikörper wird in Duplikaten auf einer Nitrocellulose-Membran sichtbar. Um die Phosphorylierung bewerten zu können, werden phosphospezifische Antikörper für einen Chemilumineszenz-Nachweis benutzt. Es werden Positivkontrollen und PBS-Negativkontrollen verwendet, um eine Relation zu den gemessenen Kinase- und Proteinaktivitäten herstellen zu können.

In unserem Fall wurden die 8 Membran-Sets (A und B) mit 8 Proben, bestehend aus Proteinen 8 verschiedener Zelllinien, behandelt. Für jede Probe wurden dabei 400 µg Protein pro Membran-Set (A und B) eingesetzt. Die Proteinmenge wurde dafür zuvor mit einem BCA-Assay gemessen.

Der Human-Phospho-Kinase-Array wurde nach dem Herstellerprotokoll von RnDSystems durchgeführt.

Koordinaten auf der Membran und zugehörige Kinasen und Proteine:



Membran/ Koordinate	Ziel/ Kontrolle	Phosphorylierung
A-A1, A2	Referenzwert	-
B-A11, A12	Akt 1/2/3	T308
B-A13, A14	Akt 1/2/3	S473
B-A17, A18	Referenzwert	-
A-B3, B4	CREB	S133
A-B5, B6	EGFR	Y1086
A-B7, B8	eNOS	S1177
A-B9, B10	ERK1/2	T202/Y204, T185/Y187
B-B11, B12	Chk-2	T68
B-B13, B14	c-Jun	S63
A-C3, C4	Fgr	Y412
A-C5, C6	GSK-3α/β	S21/S9
A-C7, C8	GSK-3β	S9
A-C9, C10	HSP27	S78/S82
B-C11, C12	p53	S15
B-C13, C14	p53	S46
B-C15, C16	p53	S392
A-D3, D4	JNK 1/2/3	T183/Y185, T221/Y223
A-D5, D6	Lck	Y394
A-D7, D8	Lyn	Y397
A-D9, D10	MSK1/2	S376/S360
B-D11, D12	p70 S6 Kinase	T389
B-D13, D14	p70 S6 Kinase	T421/S424
B-D15, D16	PRAS40	T246

A-E3, E4	p38 α	T180/Y182
A-E5, E6	PDGFR β	Y751
A-E7, E8	PLC- γ 1	Y783
A-E9, E10	Src	Y419
B-E11, E12	PYK2	Y402
B-E13, E14	RSK1/2	S221/S227
B-E15, E16	RSK1/2/3	S380/S386/S377
A-F3, F4	STAT2	Y689
A-F5, F6	STAT5a/b	Y694/Y699
A-F7, F8	WNK1	T60
A-F9, F10	Yes	Y426
B-F11, F12	STAT1	Y701
B-F13, F14	STAT3	Y705
B-F15, F16	STAT3	S727
A-G1, G2	Referenzwert	-
A-G3, G4	β -Catenin	-
A-G9, G10	PBS (Negativkontrolle)	-
B-G11, G12	STAT6	Y641
B-G13, G14	HSP60	-
B-G17, G18	PBS (Negativkontrolle)	-

Tabelle 11: Koordinatenübersicht.

3 Ergebnisse

3.1 Proteindetektion mittels „Human-Phospho-Kinase-Array“

Für die Untersuchung der Proteinaktivität verschiedener Signalwege wurde der „Human-Phospho-Kinase-Array“ an 8 verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Da sich diese Arbeit mit dem Dottersacktumor beschäftigt, wurden vor allem die Dottersacktumorzelllinie GCT72, die Embryonalkarzinomzelllinie 1411H und die weibliche Dottersacktumorzelllinien NOY1 und NOY1-R ausgewählt. Dazu zogen wir im Vergleich die Fibroblasten HVHF2 und MPAF hinzu. Da eine molekulare Ähnlichkeit zwischen dem Dottersacktumor und dem Hepatozellulären Karzinom (HZK) gesehen wurde, führten wir die Untersuchung ebenfalls an der HZK-Zelllinie HepG2 durch. Die Pixelintensität korreliert dabei positiv mit der Proteinmenge. Das Ziel dieses Experiments war es, Signalwege im Dottersacktumor zu identifizieren, die mögliche Angriffspunkte molekular zielgerichteter Therapeutika sein können.

Abbildung 5 stellt das Ergebnis des „Human-Phospho-Kinase-Arrays“ dar. Mithilfe eines Koordinaten-Templates konnten die „Spots“ identifiziert werden. Die Intensitäten der Duplikate wurden gemessen und der Mittelwert berechnet. Von jedem Punkt wurde ein gemittelttes Hintergrundsignal subtrahiert. Die gemessenen Pixelintensitäten wurden in **Abbildung 6** grafisch dargestellt.

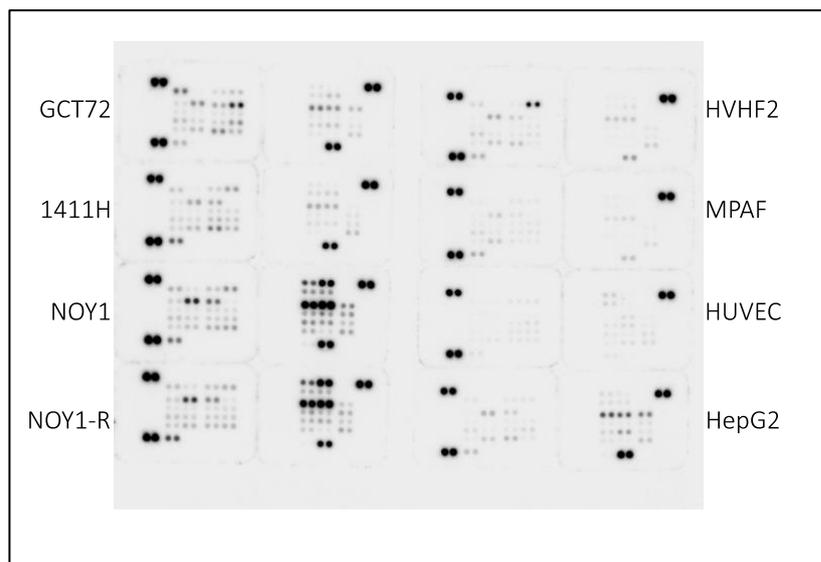


Abbildung 5: „Human-Phospho-Kinase-Array“.

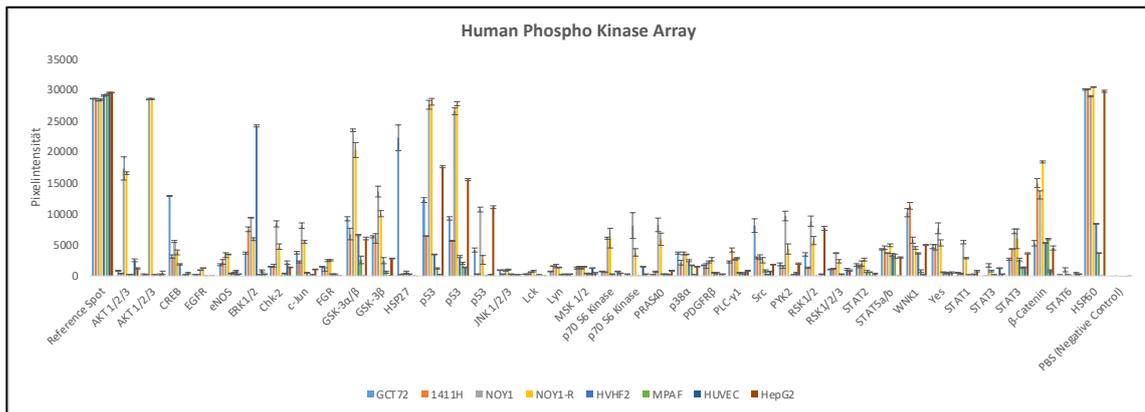


Abbildung 6: Proteinmenge anhand der Pixelintensität. Übersicht der Menge aller 40 Proteine im Vergleich zum positiven Referenzwert und der negativen PBS-Kontrolle.

Die Pixelintensität der Referenzwerte lag bei allen 8 Zelllinien über 27000 und war ähnlich stark. Die PBS-Negativkontrolle als Schwarzwert, in **Abbildung 6** ganz rechts dargestellt, betrug weniger als 31 Pixel. Es wurde eine densitometrische Auswertung der Pixelintensitäten durchgeführt, um stark exprimierte Proteine herauszufiltern. Als Limit wurde dabei 10.000 gesetzt. Unter allen getesteten Proteinen konnten 13 identifiziert werden, die eine Pixelintensität von mehr als 10.000 aufwiesen. Diese werden in **Abbildung 7** dargestellt.

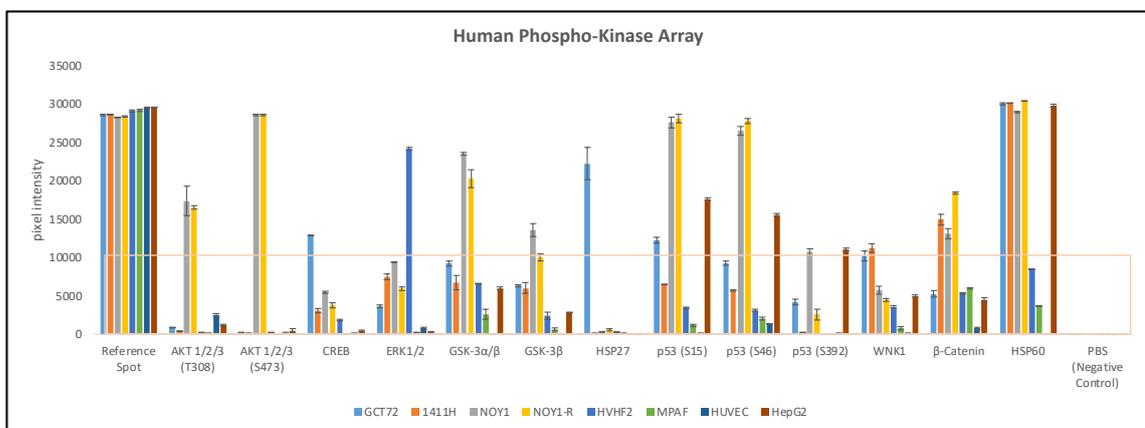


Abbildung 7: Übersicht aller Proteine mit einer Pixelintensität über 10000.

In der männlichen Dottersacktumorzelllinie GCT72 zeigten vor allem die Proteine CREB, HSP27, p53, WNK1 und HSP60 eine erhöhte Aktivität. HSP27 ist ein Hitzeschockprotein, welches durch MAPK-Aktivierung phosphoryliert wird. Aber auch der wnt/ β -Catenin-Signalweg wird davon beeinflusst (19).

In der Dottersacktumorzelllinie 1411H konnte bei den Proteinen WNK1, β -Catenin und HSP60 eine hohe Pixelintensität gemessen werden. „With-no-lysine kinase 1“ (WNK1)

scheint eine Rolle im Signalweg der Dottersacktumoren zu spielen. Es gehört zu den Serin/Threonin Protein Kinasen, aktiviert den MAPK-Signalweg und spielt somit eine Rolle beim Zellwachstum. WNK1 beeinflusst dadurch die Tumorprogression. Bisher gibt es aufgrund der hohen Toxizität keinen zugelassenen WNK1-Hemmer (20).

In den weiblichen Dottersacktumorzelllinien NOY1 und NOY1-R wurde eine erhöhte Aktivität von Akt 1/2/3, GSK-3 α / β , p53, β -Catenin und HSP60 gemessen. Die Fibroblasten HVHF2 und MPAF zeigten erhöhte Proteinaktivitäten von ERK1/2. In der endothelialen HUVEC-Zelllinie lag die gemessene Pixelintensität bei allen Proteinen unter 10000. In der HepG2-Zelllinie zeigten die Proteine p53 und HSP60 eine erhöhte Signalaktivität. Diese beiden Proteine sind ebenfalls in der Dottersacktumorzelllinie GCT72 exprimiert, sodass hier eine Gemeinsamkeit vorliegt. WNK1 und HSP60 sind zudem sowohl in Dottersacktumorzellen als auch in Embryonalkarzinomzellen und weiblichen Dottersacktumorzellen exprimiert. WNK1 konnte zudem in HZK-Zellen detektiert werden und ein Verlust unterdrückte in Studien die Zellproliferation von HZK-Zellen. (21)

3.2 Genexpressionsanalyse mittels RNA-seq- und TCGA-Daten

Eine Genexpressionsanalyse mittels RNA-seq- und TCGA-Daten führten wir zuerst durch, um die Expressionsstärke der Gene der Zielproteine zu ermitteln. Denn wir wollten nur Inhibitoren testen, deren Zielproteine in Dottersacktumorzellen vorhanden sind.

Zunächst wurden verschiedene Inhibitoren ausgewählt, die zum Teil schon beim Hepatozellulären Karzinom verwendet werden oder in der neuesten Tumorthherapie eine Rolle spielen. Um die Wirksamkeit auf die hier untersuchten Zelllinien zu vermuten, wurden die Zielproteine dieser Inhibitoren ermittelt.

Die Zielproteine der eingesetzten Inhibitoren wurden mithilfe von Selleck Chemicals GmbH identifiziert und sind in **Tabelle 12** dargestellt. Selleck Chemicals GmbH ist ein internationales Unternehmen und führender Anbieter für biochemische Produkte. Der Hauptsitz befindet sich in Houston, USA, ein weiterer Unternehmenssitz ist in München angesiedelt. Spezialisiert ist Selleck Chemicals auf Inhibitoren und die Untersuchung von Zellsignalwegen. Bevor wir die Wirkung der Inhibitoren an Zellen in vitro testeten, führten wir eine genetische Analyse durch. Dafür identifizierten wir die Zielproteine der Inhibitoren, welche in **Tabelle 12** dargestellt sind. Demnach sind Apatinib, AZD4547,

Cabozantinib, Ibrutinib, Imatinib, Lenvatinib, Nintedanib, Regorafenib und Sorafenib Tyrosinkinaseinhibitoren. Dabei sind die Zielproteine BRAF und RAF1 spezifisch für Regorafenib und Sorafenib. FGFR wird vor allem durch AZD4547, Cabozantinib, Lenvatinib und Nintedanib inhibiert. Ibrutinib inhibiert YES1. PDGFRA wird durch AZD4547, Imatinib, Lenvatinib und Nintedanib inhibiert. Danusertib und SNS-314 sind Aurorakinaseinhibitoren, wobei FGFR1 auch von Danusertib inhibiert wird. Olaparib und Talazoparib inhibieren PARP1 und PARP2.

	Inhibitoren	Zielproteine
Tyrosinkinaseinhibitoren	Apatinib	KDR, KIT, RET, SRC
	AZD4547	FGFR1/2/3/4, FLT1/4, KDR, KIT, PDGFRA/B, RET
	Cabozantinib	FGFR1/2/3/4, KDR
	Ibrutinib	BTK, CSK, EGFR, LCK, RET, YES1
	Imatinib	ABL1/2, KIT, PDGFRA/B
	Lenvatinib	FGFR1/2/3/4, FLT1/4, KDR, KIT, PDGFRA/B, RET
	Nintedanib	FGFR1/2/3/4, FLT1/4, KDR, LCK, LYN, PDGFRA/B, SRC
	Regorafenib	BRAF, FLT1/4, KDR, KIT, PDGFRB, RAF1, RET
	Sorafenib	BRAF, FGF1/4, KDR, KIT, PDGFRB, RAF1
Aurorakinaseinhibitoren	Danusertib	ABL1/2, AURKA/B, FGFR1, RET
	SNS-314	AURKA/B, AXL, FLT4
PARP-Inhibitoren	Olaparib	PARP1/2
	Talazoparib	PARP1/2

Tabelle 12: Zielproteine der Inhibitoren.

Die Expression der Gene dieser Zielproteine wurde mittels RNA-seq-Daten in den Zelllinien TCam-2 (Seminome), GCT72 (Dottersacktumor), 2102EP (Embryonalkarzinom), HUVEC (Endothelzellen) und HVHF2 (Fibroblasten) analysiert. Diese ist in **Abbildung 8** graphisch dargestellt.

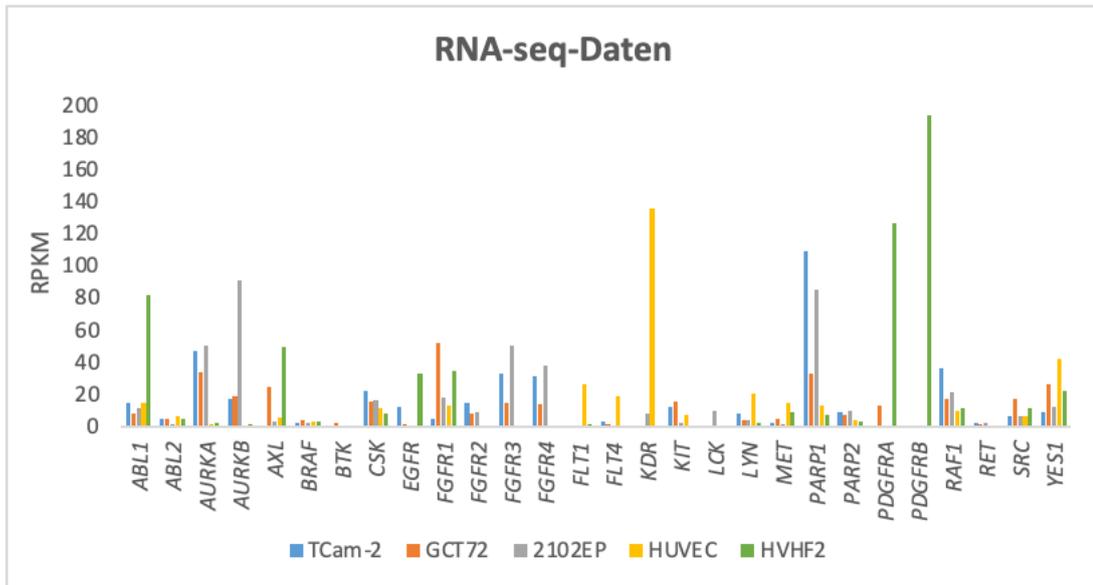


Abbildung 8: Expression der Gene anhand von RNA-seq-Daten in den Zelllinien TCam-2, GCT72, 2102EP, HUVEC und HVHF2 (Die Expressionsstärke wird in 'Reads per kilobase of transcript per Million mapped reads' angegeben.).

Im der folgenden **Abbildung 9** sind die Gene nach ihrer Expressionsintensität in der Dottersacktumorzelllinie GCT72 geordnet dargestellt, da dies unsere zu untersuchende Zelllinie ist. Es fällt generell auf, dass diese Reihenfolge ähnlich zu der beim Embryonalkarzinom (2102EP) ist, während dagegen die Fibroblasten (HUVEC und HVHF2) eine andere Reihenfolge aufweist. Am stärksten exprimiert wird *FGFR1* in den GCT72-Zellen. Es fällt auf, dass Gene der Zielproteine der oben genannten Inhibitoren, wie *FGFR1*, *AURKA*, *PARP1*, *YES1*, *AXL*, *AURKB*, *RAF1* in den Dottersacktumorzellen besonders stark exprimiert werden. Dies spricht für einen möglichen Ansatzpunkt und Wirksamkeit dieser Inhibitoren.

	2102EP	GCT72	HUVEC	JAR	JURKAT	TCam-2	HVHF2
FGFR1	17,91	51,91	12,91	15,70	4,97	4,76	34,90
AURKA	50,39	33,76	1,54	45,36	37,82	47,18	1,98
PARP1	84,77	33,24	13,24	58,27	71,84	108,85	6,99
YES1	11,86	25,99	41,82	30,44	2,91	9,11	22,31
AXL	3,16	24,78	5,44	0,01	0,01	0,12	49,15
AURKB	90,59	18,48	0,38	20,24	49,19	17,37	1,11
RAF1	21,04	17,26	9,98	30,69	14,67	36,57	11,33
SRC	6,51	16,97	6,71	15,96	3,97	6,44	11,19
KIT	2,23	15,70	7,38	0,00	0,20	11,79	0,17
CSK	16,30	15,63	11,44	7,09	75,83	22,36	8,17
FGFR3	50,61	14,80	0,40	6,71	0,86	33,22	0,31
FGFR4	38,09	13,39	0,15	2,36	2,31	31,15	0,26
PDGFRA	0,65	12,83	0,03	0,01	0,00	0,27	126,34
ABL1	11,34	8,38	14,53	4,73	19,96	14,21	81,79
FGFR2	9,05	7,74	0,01	2,90	0,03	14,28	0,06
PARP2	9,35	7,28	4,08	11,01	14,72	8,50	2,62
ABL2	1,08	4,79	6,72	1,65	3,70	4,27	4,60
MET	1,71	4,32	14,24	5,28	0,11	2,02	9,06
LYN	3,45	3,94	20,02	36,26	0,00	7,73	2,55
BRAF	1,97	3,48	3,03	12,03	4,13	1,81	2,88
BTK	0,14	2,01	0,03	0,08	0,12	0,06	0,00
EGFR	0,44	1,52	0,44	7,29	0,00	11,93	33,16
FLT4	0,48	1,38	18,45	0,17	3,33	2,89	0,01
RET	2,48	1,22	0,01	0,00	0,04	2,58	0,06
PDGFRB	0,45	0,82	0,05	0,06	0,04	0,12	193,84
FLT1	0,29	0,37	25,91	0,08	1,96	0,01	1,47
KDR	8,35	0,12	135,74	0,00	0,01	0,65	0,01
LCK	9,74	0,04	0,01	0,08	121,88	0,19	0,36

Abbildung 9: Zielgenexpression in der Dottersacktumorzelllinie GCT72 (RNA-Seq-Daten).

Um die Expression in den RNA-Seq-Daten zu validieren, wurde eine weitere Analyse durchgeführt. Dafür untersuchten wir die gleichen Gene mithilfe des cBio-Portals. Dieses ist eine Plattform zur Erforschung von Datensätzen zur Tumorgenomik. Es speichert Mutationen, DNA-Kopienzahl, mRNA-Daten, Expressionsdaten, Daten auf Proteinebene und Phosphoproteinebene. Für unsere Untersuchung verwendeten wir „TCGA“-Daten. Dies sind Daten des „National Cancer Institutes“. Es wurden über 20.000 primäre Krebsarten molekular charakterisiert und Proben von 33 Krebsarten verglichen.

In unserer Studie verglichen wir Seminome und Nicht-Seminome miteinander. Spezifiziert wurde diese Einteilung in Embryonalkarzinome, gemischte Keimzelltumoren, Seminome und Teratome, wobei zu den gemischten Keimzelltumoren auch die Dottersacktumore zählen.

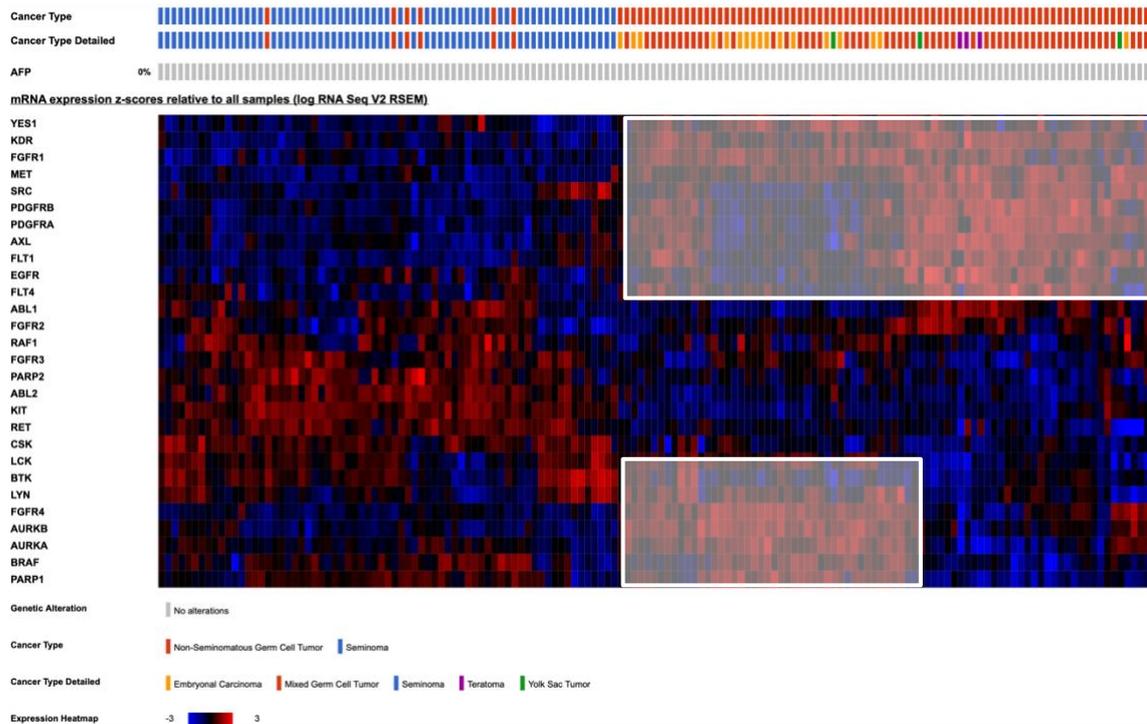


Abbildung 10: Zielgenexpression in Seminome und Nicht-Seminome anhand von TCGA-Daten als „heatmap“ dargestellt.

Abbildung 10 zeigt, dass im Vergleich zu den Seminomen in den Nicht-Seminomen vor allem die Gene *YES1*, *KDR*, *FGFR1*, *MET*, *SRC*, *PDGFRB*, *PDGFRA*, *AXL*, *FLT1*, *EGFR*, *FLT4*, *LCK*, *BTK*, *LYN*, *FGFR4*, *AURKB*, *AURKA*, *BRAF* und *PARP1* stärker exprimiert sind. Dies bedeutet für unsere Untersuchung, dass vor allem Inhibitoren dieser Zielproteine auf Dottersacktumorzellen wirksam sein könnten. Laut TCGA-Daten wird dagegen *ABL1*, *RAF1* und *FGFR2* sowohl in Seminomen als auch in Nicht-Seminomen exprimiert. Es könnte also grundsätzlich eine Wirkung auf TKZT haben, ist jedoch weniger spezifisch für Dottersacktumoren. Im Grunde kann man sagen, dass die Gene der Zielproteine, die in den RNA-seq-Daten in Dottersacktumorzellen stark exprimiert sind, auch in den TCGA-Daten vor allem in Dottersacktumorzellen exprimiert sind. Demnach bekräftigt es die Hypothese, dass Gene wie *FGFR1*, *AURKA*, *PARP1*, *YES1*, *AXL*, *AURKB* und *BRAF* in den Dottersacktumorzellen stark exprimiert werden und auch für diese Zellen spezifisch sind. Die „TCGA“-Daten zeigen eine Spezifität des *PARP1* für Nicht-Seminome, während *PARP2* auch in Seminomen exprimiert wird.

3.3 Validierung der Genexpression mittels qRT-PCR

Die bisherigen Expressionsdaten wurden mithilfe von bekannten Daten ermittelt. Um diese zu validieren, wurde die Genexpression der Gene der Zielproteine mittels qRT-PCR analysiert. Die Ergebnisse der qRT-PCR werden in **Abbildung 11** graphisch dargestellt.

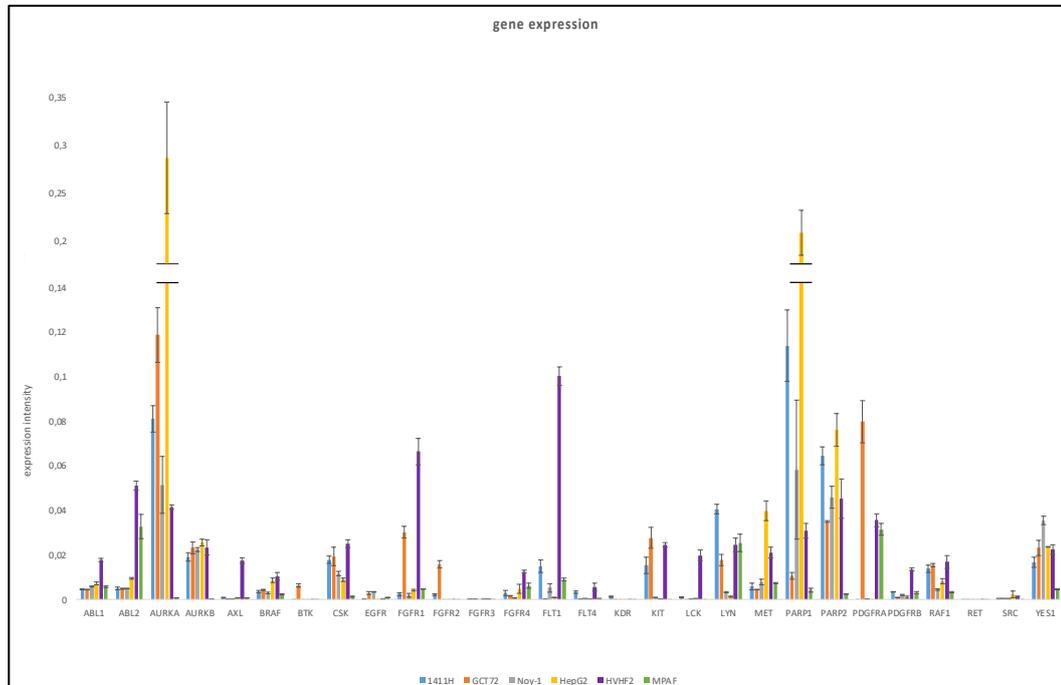


Abbildung 11: Messung der Genexpressionsintensität der Zielgene mittels qRT-PCR.

Dargestellt ist die relative Expression gegenüber dem „Housekeeper“ GAPDH. In den Dottersacktumorzellen wurden Zielgene exprimiert wie *FGFR1*, *AURKA*, *PARP1*, *YES1*, *AXL*, *AURKB*, *RAF1*, *SRC*, *KIT*, *CSK* und weitere.

FGFR1 ist ein Zielprotein der Inhibitoren AZD4547, Cabozantinib, Lenvatinib und Nintedanib. *AURKA* und *AURKB* sind Zielproteine der Inhibitoren Danusertib und SNS-314. *PARP1* ist ein Zielprotein der Inhibitoren Olaparib und Talazoparib. *YES1* und *CSK* sind Zielproteine des Inhibitors Ibrutinib. *AXL* ist ein Zielprotein des Inhibitors SNS-314. *RAF1* ist ein Zielprotein der Inhibitoren Regorafenib und Sorafenib.

Demnach wurden Inhibitoren ausgewählt, deren Gene der Zielproteine laut RNA-seq-Daten-Analyse in den Dottersacktumorzellen exprimiert sind.

Eine Testung der oben genannten Inhibitoren macht demnach Sinn und wird im folgenden Experiment untersucht.

Vor allem *FGFR1*, *AURKA*, *PARP1*, *YES1*, *AURKB*, *RAF1*, *BRAF*, *PDGFRA*, *KIT* und *CSK* waren sowohl in der qRT-PCR-Analyse als auch in den „RNA-Seq“- und „TCGA“-Daten in DST-Zellen stark exprimiert. Zudem wurde deutlich, dass diese Gene ebenfalls

in HZK-Zellen exprimiert werden. Vor allem *AURKA*, *AURKB*, *CSK*, *MET*, *PARP1*, *PARP2*, *RAF1* und *YES1* erzielten in diesen Zellen eine hohe Expressionsintensität. Zusätzlich wurden Fibroblasten (MPAF und HVHF2) untersucht. In der MPAF-Kontrollzelllinie wurden fast alle zuvor genannten Gene in geringerer Intensität exprimiert, während dagegen in der HVHF2-Kontrollzelllinie vor allem *AURKA*, *BTK*, *PDGFRA* und *FGFR2* geringer als in den DST- und HKZ-Zellen exprimiert wurden. Die qRT-PCR-Analyse zeigt eine starke Expression von PARP1 und PARP2 in HZK-Zellen. In DST-Zellen überwiegt die *PARP2*- Expression und in den Fibroblasten (HVHF2) sind beide Gene gering exprimiert.

3.4 Zellviabilitätsmessung mittels XTT-Reduktionstest

Um neue mögliche Therapieoptionen für Dottersacktumoren abzuleiten, haben wir die in **Tabelle 6** genannten Inhibitoren in vitro untersucht. Dafür wurde mittels XTT-Reduktionstest die Viabilität der Zellen 24 h, 48 h, 72 h und 96 h nach Behandlung mit den Inhibitoren gemessen. Alle 13 Inhibitoren wurden zu Beginn an der Dottersacktumorzelllinie GCT72 und Fibroblasten HVHF2 getestet. **Abbildung 12** zeigt die Ergebnisse der XTT-Untersuchung an Dottersacktumorzellen.

Die 13 getesteten Inhibitoren wurden in verschiedenen Konzentrationen zwischen 0,01 μM und 30 μM angewendet. Die jeweiligen Konzentrationen erschlossen sich aus der Anwendung in anderen Studien. AZD4547 wurde zum Beispiel in Studien an Zellen des HZK (HepG2) getestet und es wurde ein LD50-Wert von 8,73 $\mu\text{mol/l}$ ermittelt. Bei einer Behandlung mit dieser Konzentration reduziert sich die Zellviabilität demnach um mehr als 50 %. Demnach testeten wir an unseren Zelllinien AZD4547 in Konzentrationen von 1, 5, 10, 15 und 20 $\mu\text{mol/l}$ (22).

Benten et al. untersuchten die Wirkung des Aurorakinaseinhibitors Danusertib (PHA-739358) auf HZK-Zellen (HepG2) in Konzentrationen von 5 nM bis 5 μM . Die Ergebnisse zeigten eine LD50 Konzentration von 0,02 $\mu\text{mol/l}$. In unserer Untersuchung verwendeten wir deshalb Konzentrationen von 0,01 - 5 $\mu\text{mol/l}$ (23).

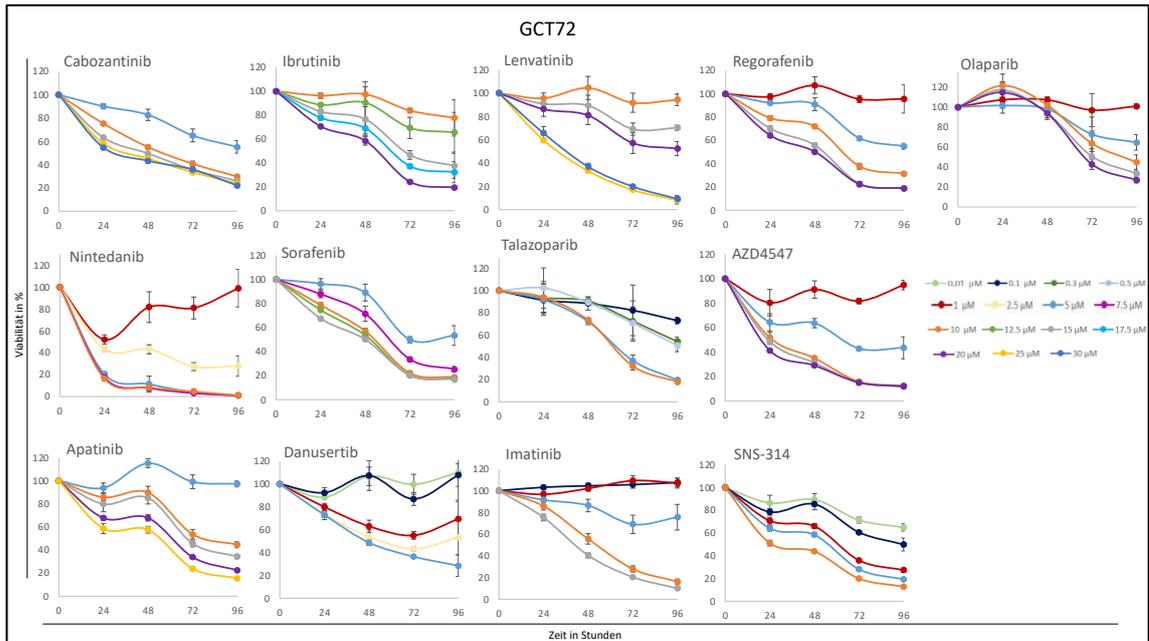


Abbildung 12: Zellviabilitätsmessung nach Behandlung mit Inhibitoren mittels XTT-Untersuchung in den Dottersacktumorzellen der Zelllinie GCT72.

Unter Behandlung mit allen 13 Inhibitoren konnte eine dosisabhängige Reduktion der Zellviabilität erreicht werden. Nach 72 Stunden konnte die Viabilität der Dottersacktumorzellen (GT72) um mehr als 50% reduziert werden.

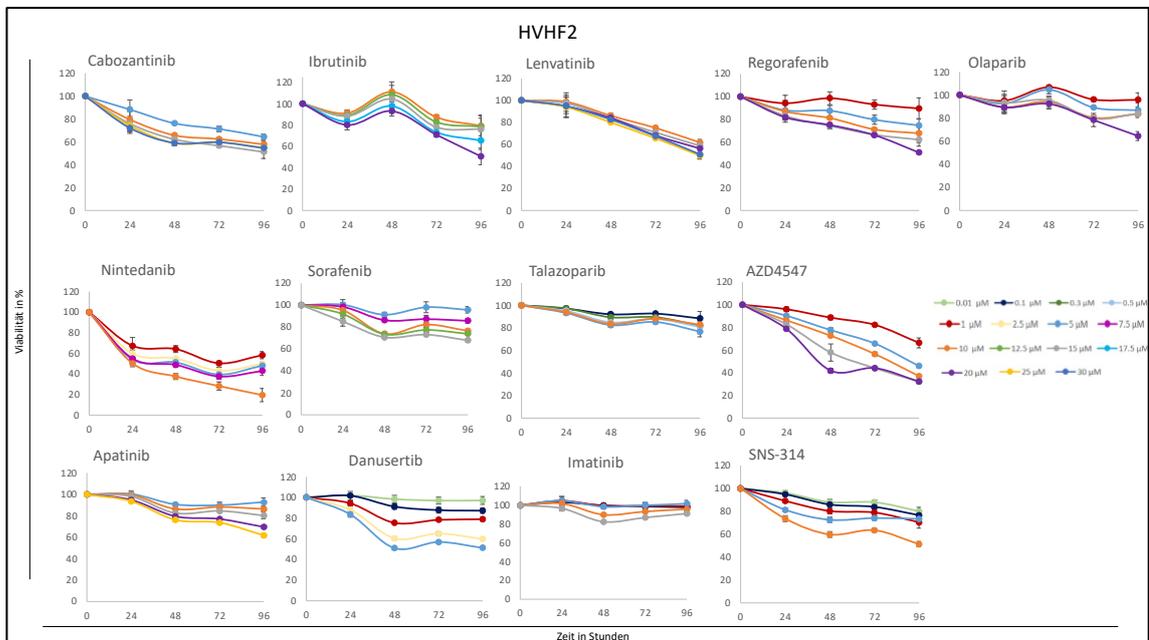


Abbildung 13: Zellviabilitätsmessung nach Behandlung mit Inhibitoren mittels XTT-Untersuchung in den Fibroblasten der Zelllinie HVHF2.

Wie in **Abbildung 13** zu sehen, konnte die Viabilität in den Fibroblasten HVHF2 kaum bzw. nur gering reduziert werden. Insbesondere die Kurvendiagramme mit Olaparib, Sorafenib, Talazoparib, Apatinib und Imatinib zeigen einen eher linearen gleichbleibenden Verlauf.

In der folgenden **Abbildung 14** ist eine Übersicht der LD50-Werte aufgelistet, die mithilfe der Software „GraphPad-Prism V8“ berechnet wurden. Diese geben die Konzentrationen an, bei der die Viabilität nach 72 h noch 50 % beträgt. Die Inhibitoren sind nach ihrer Wirkung absteigend sortiert. Am wirksamsten ist der Aurorakinaseinhibitor SNS-314. Die LD50-Konzentration beträgt nach 72 h 0,23 μM in den GCT72-Zellen. Die Zellviabilität der Fibroblasten der HVHF2-Zelllinie konnte selbst mit der höchsten der verwendeten Konzentration von 10 μM nicht unter 50 % gesenkt werden.

Insgesamt konnte die Viabilität der Fibroblasten der HVHF2-Zelllinie nur durch Nintedanib (LD50-Konz. = 1,14 μM) und AZD4547 (LD50-Konz. = 12,95 μM) unter 50 % gesenkt werden.

LD50 in μM			Targets:	
	GCT72 72h	HVHF2 72h		
SNS-314	0,23	>10	SNS-314	AURKA/B
Danusertib	1,69	>5	Danusertib	ABL1/2, AURKA/B, FGFR1, RET
Nintedanib	1,72	1,137	Nintedanib	FGFR1-4, FLT4, LYN, PDGFRA/B, SRC
Talazoparib	2,14	>10	Talazoparib	PARP1/2
AZD4547	3,55	12,95	AZD4547	FGFR1-4
Sorafenib	4,76	>15	Sorafenib	BRAF, FGFR1, KIT, PDGFRB, RAF1
Regorafenib	7,05	>20	Regorafenib	BRAF, FLT4, KIT, PDGFRB, RAF1, RET
Imatinib	7,11	>15	Imatinib	ABL1/2, KIT, PDGFRA/B
Cabozantinib	8,58	>30	Cabozantinib	AXL, KIT, MET, RET
Apatinib	13,40	>25	Apatinib	KIT, RET, SRC
Ibrutinib	15,02	>20	Ibrutinib	BTK, CSK, EGFR, ERBB2, RET, YES1
Olaparib	15,48	>20	Olaparib	PARP1/2
Lenvatinib	19,45	>30	Lenvatinib	FGFR1-4, FLT4, KIT, PDGFRA/B, RET
< 5 μM				
5-10 μM				
> 10 μM				

Abbildung 14: LD50-Werte der XTT-Untersuchung bei GCT72- und HVHF2-Zellen mit dazugehörigen Zielproteinen.

Davon ausgehend wurden die 6 wirksamsten Inhibitoren ausgewählt und an weiteren Zelllinien getestet. Wir wählten noch 3 weitere Zelllinien des Dottersacktumors aus

(1411H, NOY1 und NOY1-R), Fibroblasten (MPAF), eine Endothelzelllinie (HUVEC) und eine HZK-Zelllinie (HepG2).

Die Untersuchungen an Dottersacktumorzellen (1411H, NOY1, NOY1-R) werden in **Abbildung 15** dargestellt.

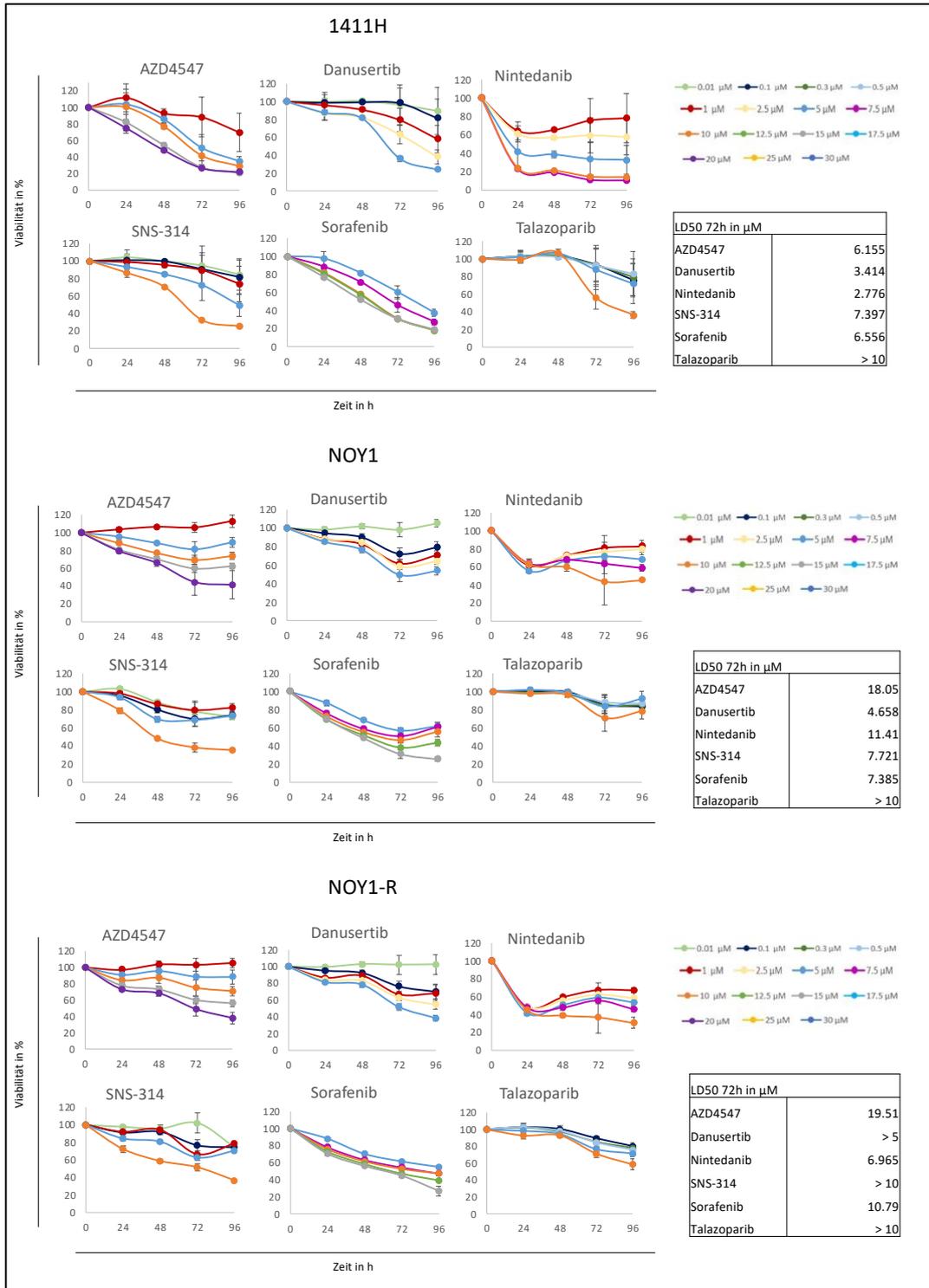


Abbildung 15: Zellviabilitätsmessung nach Behandlung mit Inhibitoren mittels XTT-Untersuchung in der Dottersacktumorzelllinie 1411H, NOY1 und NOY1-R.

In den Dottersacktumorzellen der Zelllinie 1411H zeigten vor allem Nintedanib (LD50-Konz. = 2,77 μM) und Danusertib (LD50-Konz. = 3,41 μM) eine Wirkung. Auch AZD4547 (LD50-Konz. = 6,15 μM), SNS-314 (LD50-Konz. = 7,39 μM) und Sorafenib (LD50-Konz. = 6,55 μM) konnten die Zellviabilität deutlich reduzieren. Talazoparib konnte dagegen die Zellviabilität der Dottersacktumorzellen der Zelllinie 1411H nicht um mehr als 50 % senken. Dennoch zeigte sich dort grafisch eine Abnahme der Zellviabilität über die gemessene Zeit, insbesondere nach 96 h.

Weitere XTT-Untersuchungen wurden an der Zelllinie NOY1 durchgeführt. Diese Zellen stammen aus dem weiblichen Dottersacktumor. Es resultierte eine verminderte Zellviabilität nach Behandlung mit Danusertib (LD50-Konz. = 4,65 μM), SNS-314 (LD50-Konz. = 7,72 μM) und Sorafenib (LD50-Konz. = 7,38 μM). Auch AZD4547 (LD50-Konz. = 18,05 μM) und Nintedanib (LD50-Konz. = 11,41 μM) konnten in höheren Konzentrationen die Zellviabilität reduzieren. Talazoparib zeigte nur eine geringe Wirkung und die Viabilität lag 72 h nach Behandlung noch über 50 %.

Vergleichsweise wurde die XTT-Untersuchung in der Cisplatin-resistenten Variante der NOY1-Zelllinie durchgeführt. Auf die Zellen dieser NOY1-R-Zelllinie hatten die 6 Inhibitoren eine deutlich geringere Wirkung. Nintedanib (LD50-Konz. = 6,96 μM) konnte die Zellviabilität noch deutlich reduzieren, während dagegen AZD4547 (LD50-Konz. = 19,51 μM) und Sorafenib (LD50-Konz. = 10,79 μM) erst in höheren Konzentrationen eine Wirkung erzielten. Danusertib, SNS-314 und Talazoparib konnten in den angewendeten Konzentrationen die Zellviabilität nach 72 h nicht um mehr als 50 % reduzieren. Dennoch zeigte sich dort grafisch eine Abnahme der Zellviabilität über die gemessene Zeit.

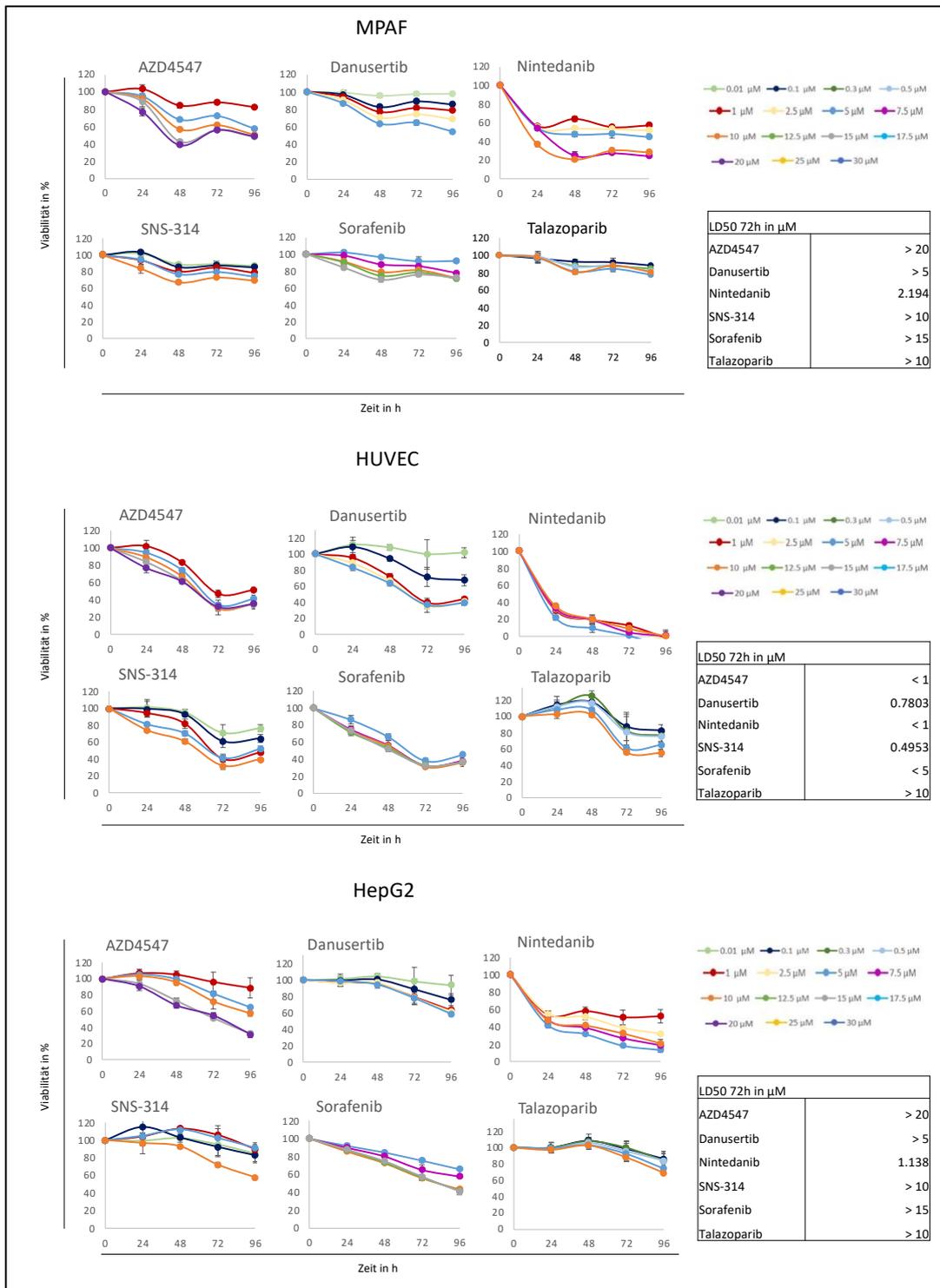


Abbildung 16: Zellviabilitätsmessung nach Behandlung mit Inhibitoren mittels XTT-Untersuchung in den Zelllinien MPAF, HUVEC und HepG2.

Um die Wirkung der Inhibitoren auf Kontrollzellen genauer beurteilen zu können, wurde eine weitere Fibroblasten-Zelllinie (MPAF) für die XTT-Untersuchung hinzugezogen, welche in **Abbildung 16** zu sehen ist. Hier ist grafisch nur eine geringe Zellviabilitätsreduktion unter Behandlung mit AZD4547, Danusertib, SNS-314,

Sorafenib und Talazoparib zu beobachten. Nintedanib (LD50-Konz. = 2,19 μM) konnte dagegen die Viabilität deutlich reduzieren und zeigte eine starke Wirkung schon nach 48 h.

Weiterhin wurden die Endothelzelllinie HUVEC und die HZK-Zelllinie HepG2 untersucht. Die Ergebnisse sind ebenfalls in **Abbildung 16** zu sehen.

Die Zelllinie HUVEC stammt aus Endothelzellen und ist demnach, wie Zellen des Hepatozellulären Karzinoms, endodermalen Ursprungs. 5 Inhibitoren zeigten hier eine sehr starke Wirkung. AZD4547 und Nintedanib reduzierten die Zellviabilität nach 72 h mit der kleinsten angewendeten Konzentration um mehr als 50 %, sodass der LD50-Wert unter 1 μM lag. Gleiches gilt für den Inhibitor Sorafenib, bei dem der LD50-Wert nach 72 h unter 5 μM lag. Da bei Danusertib (LD50-Konz. = 0,78 μM) und SNS-314 (LD50-Konz. = 0,49 μM) kleinere Konzentrationen benutzt wurden, konnten hier die LD50-Werte berechnet werden. Unter Anwendung von Talazoparib konnte die Zellviabilität im zeitlichen Verlauf gesenkt werden, jedoch lag sie nach 72 h über 50 %.

Da die Inhibitoren zum Teil in der Leitlinientherapie des Hepatozellulären Karzinoms verwendet werden oder in ersten Studien gute Ergebnisse erzielten, wurde für die Beurteilung eine Zelllinie dieses Karzinoms herangezogen. Die XTT-Untersuchung zeigte hier eine Abnahme der Zellviabilität bei allen 6 Inhibitoren im zeitlichen Verlauf. Mit Ausnahme von Nintedanib (LD50-Konz. = 1,13 μM) betrug die Zellviabilität nach 72 h jedoch mehr als 50 %.

Insgesamt zeigte sich eine Varianz der Wirkung und damit der LD50-Konzentrationen. Während zum Beispiel SNS-314 auf GCT72-Zellen sehr gut wirkt, zeigen die Fibroblasten und HZK-Zellen hier nur eine geringe Sensibilität. Die LD50-Konzentration des Inhibitors SNS-314 ist demnach in den GCT72-Zellen viel geringer. Der PARP-Inhibitor Talazoparib wirkt dagegen in der angewendeten Konzentration nur auf GCT72-Zellen. Nintedanib wirkt auf alle Zelllinien mit einer Viabilitätsreduktion.

Im Folgenden werden alle LD50-Werte der Inhibitoren auf die untersuchten Zelllinien in **Abbildung 17** dargestellt.

LD50 (72h) in μM	GCT72	HVHF2	1411H	NOY1	NOY1-R	MPAF	HUVEC	HepG2
SNS-314	0,23	>10	7,40	7,72	>10	>10	0,50	>10
Danuseritib	1,69	>5	3,41	4,66	>5	>5	0,78	>5
Nintedanib	1,72	1,14	2,78	11,41	6,97	2,19	<1	1,14
Talazoparib	2,14	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
AZD4547	3,55	12,95	6,16	18,05	19,51	>20	<1	>20
Sorafenib	4,76	>15	6,56	7,39	10,79	>15	<5	>15
Regorafenib	7,05	>20						
Imatinib	7,11	>15						
Cabozantinib	8,58	>30						
Apatinib	13,40	>25						
Ibrutinib	15,02	>20						
Olaparib	15,48	>20						
Lenvatinib	19,45	>30						
< 5 μM								
5-10 μM								
> 10 μM								

Abbildung 17: LD50-Konzentrationen aller XTT-Versuche.

3.5 Untersuchung der Apoptoseinduktion

Um die Wirkung der Inhibitoren zu spezialisieren, wurde der Einfluss auf die Apoptoseinduktion untersucht. Die Wirkung der Inhibitoren auf die Apoptose wurde durchflusszytometrisch mittels Annexin V/PI-Apoptose-Assay untersucht. Hierbei wurde die Analyse 48 h nach Behandlung der Zellen durchgeführt. Die Apoptoserate wurde im Vergleich zur DMSO-Kontrolle gemessen. Für diese Untersuchung wurden eine Dottersacktumorzelllinie (GCT72,) Fibroblasten (HVHF2 und MPAF) und eine HZK-Zelllinie (HepG2) herangezogen. **Abbildung 18** zeigt die Annexin V/PI-Apoptose-Assays unter Behandlung mit AZD4547 (3.55 μM), Danuseritib (1.687 μM), Nintedanib (1.722 μM), SNS-314 (0.2255 μM), Sorafenib (4.764 μM), Talazoparib (2.141 μM).

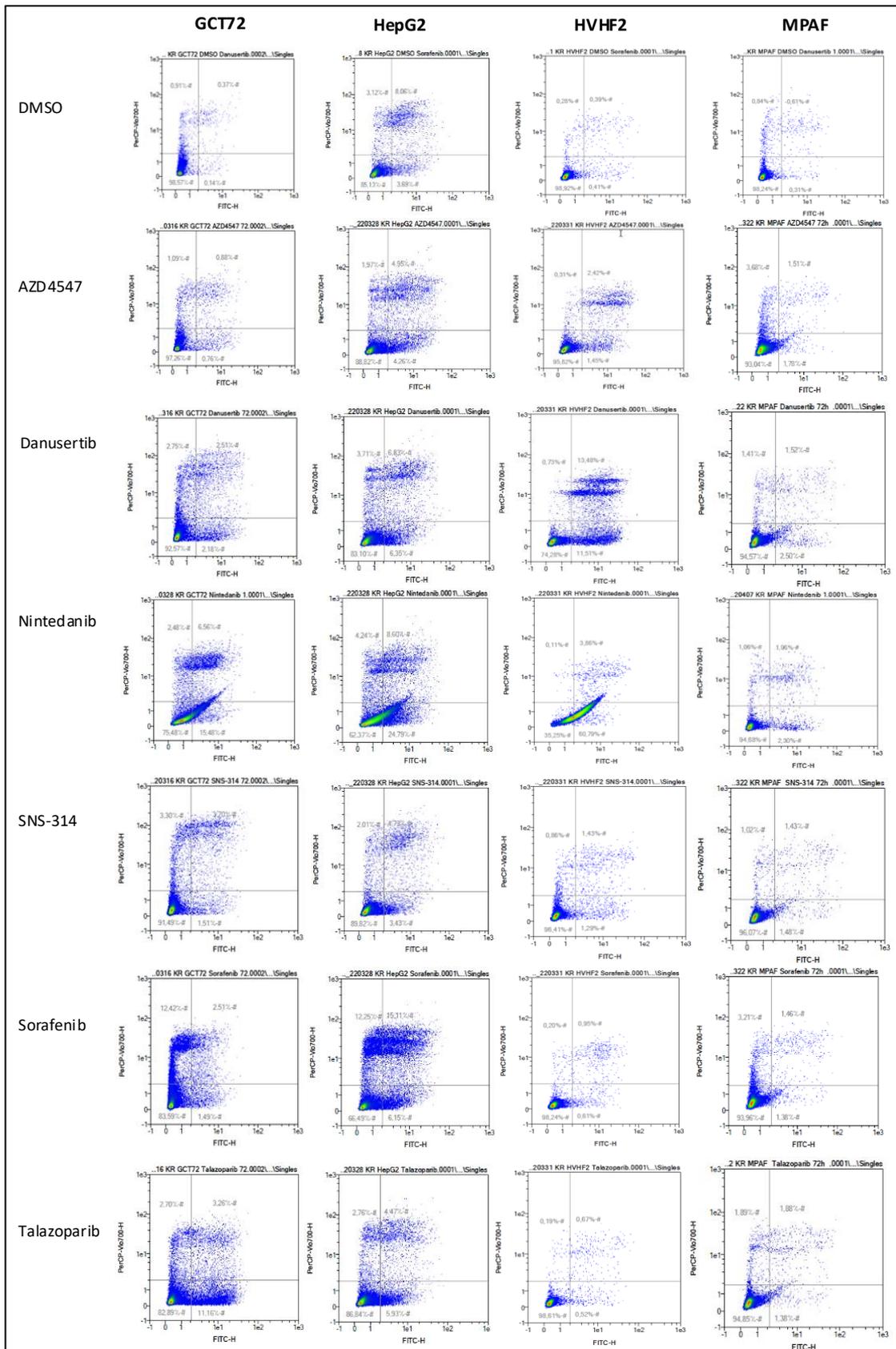


Abbildung 18: Messung der Apoptoseinduktion unter Behandlung mit Inhibitoren bei DST-, HZK-Zellen und Fibroblasten.

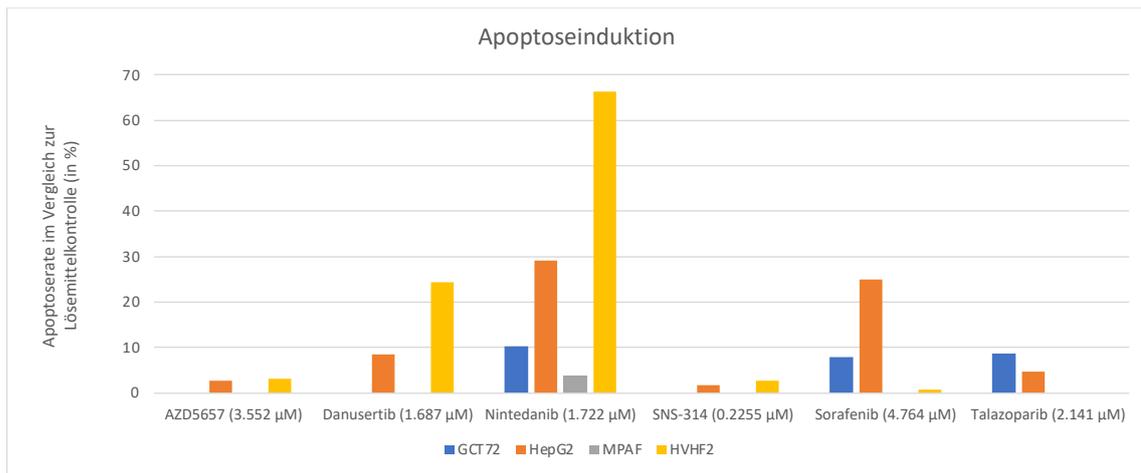


Abbildung 19: Anteil der apoptotischen Zellen nach Inhibitorbehandlung in DST-Zellen, HZK-Zellen und Fibroblasten.

Abbildung 19 zeigt den Anteil der apoptotischen Zellen unter Inhibitorbehandlung im Vergleich zur Lösemittelkontrolle. Bei den Dottersacktumorzellen ist die Apoptoserate im Vergleich zur DMSO-Kontrolle unter Behandlung mit Nintedanib, Sorafenib und Talazoparib deutlich erhöht. AZD4547, Danusertib und SNS-314 haben im Vergleich zur Lösemittelkontrolle jedoch kaum einen Einfluss auf die Apoptoseinduktion.

Der Anteil der apoptotischen Zellen der Fibroblasten (HVHF2) lag nach Behandlung mit AZD4547, SNS-314, Sorafenib und Talazoparib unter 5 %. Nach Behandlung mit Danusertib war die Apoptoserate über 20 % und nach Behandlung mit Nintedanib über 60 %.

Die weitere Untersuchung in Fibroblasten (MPAF) wies andere Ergebnisse auf. Hier lag der Anteil der apoptotischen Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle 48 h nach Behandlung mit allen 6 Inhibitoren unter 5 %.

Da die Inhibitoren zum einen in der Leitlinientherapie des Hepatozellulären Karzinoms verwendet werden und zum anderen in ersten Studien gute Ergebnisse erzielten, wurde eine HZK-Zelllinie (HepG2) für die Untersuchung der Apoptose hinzugezogen. Hierbei zeigte sich eine niedrige Apoptoserate unter 5 % bei Behandlung mit AZD4547, SNS-314 und Talazoparib. Danusertib bewirkte eine Apoptoserate über 5 %. Eine hohe Apoptoserate über 15 % wurde nach Behandlung mit Nintedanib und Sorafenib sichtbar.

3.6 Zellzyklusanalyse

Um die Wirkung der Inhibitoren auf den Zellzyklus zu untersuchen, wurde eine Zellzyklusanalyse mit Propidiumiodid durchflusszytometrisch durchgeführt. Dabei wurde der DNA-Gehalt in Dottersacktumorzellen (GCT72), Fibroblasten (HVHF2 und MPAF) und HZK-Zellen (HepG2) untersucht. Die Zellen wurden 24 h nach Behandlung mit AZD4547 (3.552 μM), Danusertib (1.687 μM), Nintedanib (1.722 μM), SNS-314 (0.2255 μM), Sorafenib (4.764 μM) und Talazoparib (2.141 μM) vermessen.

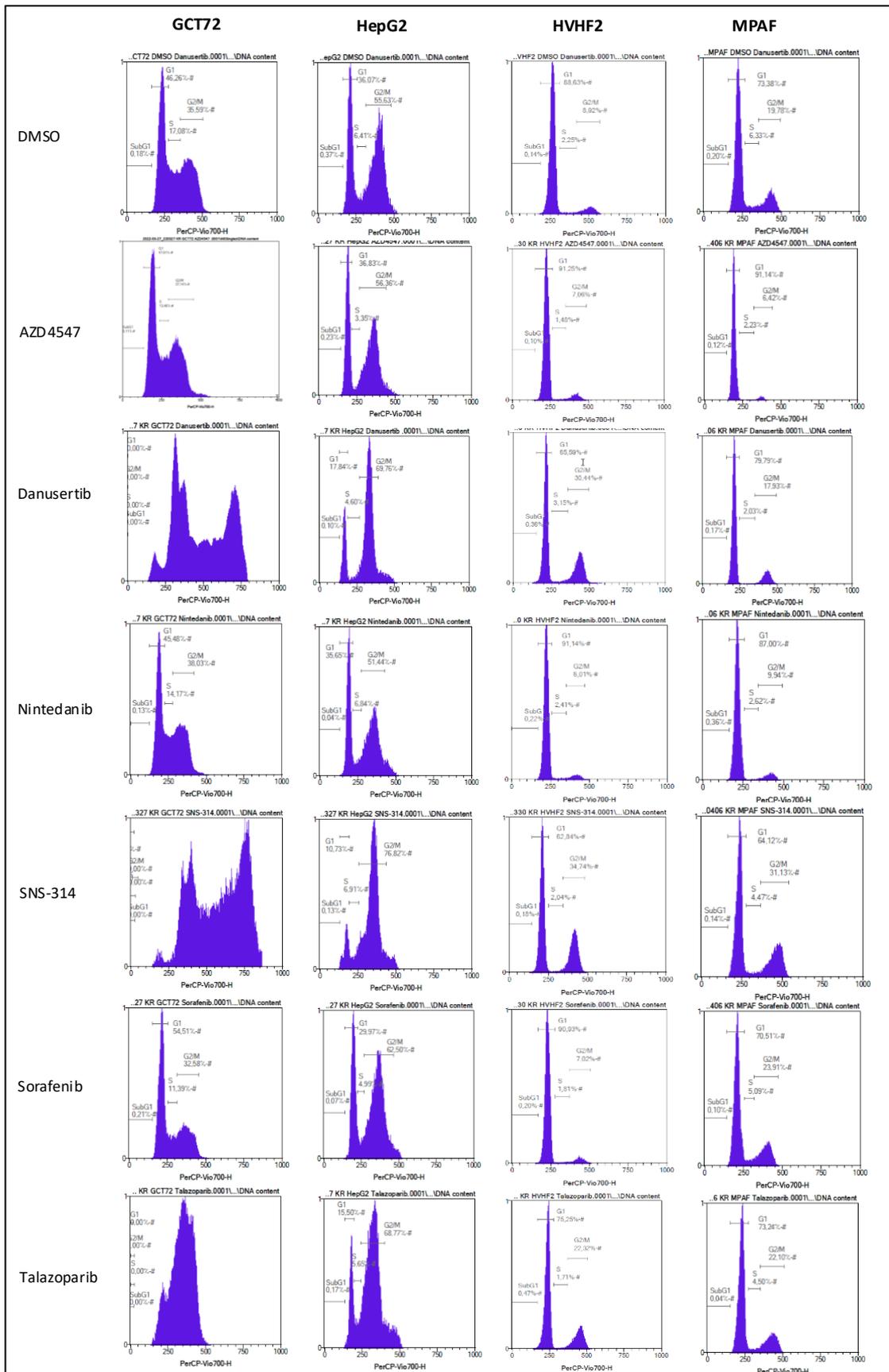


Abbildung 20: Zellzyklusanalyse.

Abbildung 20 zeigt die Zellzyklusveränderungen in Dottersacktumorzellen (GCT72). Die DMSO Kontrollen zeigen eine regelrechte Verteilung der Zellen in den 4 Zellzyklusphasen. Auch die GCT72-Zellen unter Behandlung mit AZD4547, Nintedanib und Sorafenib lassen einen physiologischen Zellzyklus erkennen. In den Versuchen mit Danusertib, SNS-314 und Talazoparib können die einzelnen Zellzyklusphasen jedoch nicht mehr voneinander abgegrenzt werden.

Bei den Fibroblasten (HVHF2) sind sowohl in den DMSO-Kontrollen als auch in den behandelten Zellen klar abgrenzbare Zellzyklusphasen sichtbar. Nur unter Behandlung mit Danusertib, SNS-314 und Talazoparib zeigte sich eine erhöhte Zellanzahl in der G2/M-Phase.

In der Zellzyklus-Analyse der Fibroblasten (MPAF) zeigen sich in der DMSO-Kontrolle und unter Behandlung mit Inhibitoren abgrenzbare Zellzyklusphasen. Unter Behandlung mit AZD4547, Danusertib und Nintedanib zeigen sich anteilig weniger Zellen in der S-Phase.

In der Zellzyklusanalyse der HZK-Zellen (HepG2) zeigte vor allem die Behandlung mit Danusertib, SNS-314, Sorafenib und Talazoparib einen Einfluss auf die Verteilung der Zellen in den Zellzyklusphasen. Es wurden deutlich weniger Zellen in der G1-Phase und S-Phase gemessen, während dagegen der Anteil der Zellen in der G2-Phase erhöht war.

4 Diskussion

Der Dottersacktumour gehört zu den aggressiven Tumorentitäten und es entstehen immer mehr Resistenzen gegen die Cisplatin-basierte Chemotherapie. Daher war es das Ziel dieser Arbeit, neue Therapieoptionen für refraktäre Dottersacktumoren *in vitro* abzuleiten. Dafür wurde die Wirkung molekular zielgerichteter Inhibitoren an Dottersacktumorzellen sowie Fibroblasten und HZK-Zellen untersucht und mögliche Angriffspunkte identifiziert.

Wir haben zunächst eine Auswahl an Inhibitoren getroffen. Dafür wählten wir Substanzen aus, die am molekular ähnlichen Hepatozellulären Karzinom angewendet werden oder in ersten Studien gute Ergebnisse erzielten. Wie bereits in Studien gezeigt wurde, haben Dottersacktumoren Ähnlichkeiten zum Hepatozellulären Karzinom. Bei letzterer Karzinomart werden in Leitlinientherapien sowie in Studien Tyrosinkinase-, Aurorakinase- und PARP-Inhibitoren verwendet. Wir wählten die Tyrosinkinase-Inhibitoren Apatinib, AZD4547, Cabozantinib, Ibrutinib, Imatinib, Lenvatinib, Nintedanib, Regorafenib und Sorafenib, die Aurorakinase-Inhibitoren Danusertib und SNS-314 und die PARP-Inhibitoren Olaparib und Talazoparib aus.

Mittels Datenanalyse aus „RNA-seq“ und „TCGA“-Daten und einer qRT-PCR-Untersuchung konnten wir zeigen, dass die Gene der Zielproteine der Inhibitoren vor allem in den DST- und HKZ-Zellen zu finden sind, wenig jedoch in Fibroblasten. Eine Anwendung der Inhibitoren hätte demnach wenig Nebenwirkungen auf gesunde Fibroblasten in der Tumorumgebung.

AURKA und *AURKB* sind Gene der Zielproteine der Inhibitoren Danusertib und SNS-314. Diese Gene sind in DST-Zellen in den „RNA-Seq“-Daten stark exprimiert, für Nicht-Seminome in den „TCGA“-Daten spezifisch und auch in der qRT-PCR-Analyse stark exprimiert. Im Vergleich dazu weisen diese Gene in den Fibroblasten eine viel geringere Expressionsintensität auf. Aurorakinaseinhibitoren könnten gute Inhibitoren sein, die DST hemmen und Fibroblasten nicht beeinflussen. Denn wenn *AURKA* und *AURKB* im DST exprimiert sind, werden vermehrt diese Aurorakinasen transkribiert. An diesen Zielproteinen können dann Danusertib und SNS-314 binden und diese hemmen. Da Aurorakinasen Serin/Threonin-Kinasen sind, die eine wichtige Rolle beim Zellwachstum spielen, kann somit die Viabilität der Zellen reduziert werden. In unserer Studie sind Inhibitoren effektiv, wenn sie das Wachstum der DST-Zellen hemmen und

die Viabilität der Fibroblasten nicht reduzieren. Denn dann könnte es auch in vivo eine Therapiemöglichkeit beim DST sein ohne starke Nebenwirkungen auszulösen.

Die Gene der Zielproteine der PARP-Inhibitoren Olaparib und Talazoparib sind in DST-Zellen im Vergleich zu Fibroblasten stark exprimiert. Demnach scheinen beide Inhibitoren einen Einfluss auf DST-Zellen zu haben und sind für weitere Untersuchungen ebenfalls vielversprechend.

Zusätzlich führten wir eine Analyse mittels „Human-Phospho-Kinase-Array“ durch, um noch weitere mögliche Therapieansätze zu identifizieren. Es wurde ersichtlich, dass in Dottersacktumorzellen vor allem Proteine detektiert wurden, die mit dem MAPK-Signalweg assoziiert sind. Da dieser zudem eine Rolle bei der Tumorzellprogression des Hepatozellulären Karzinoms spielt, wird die molekulare Ähnlichkeit zwischen dem DST und dem HZK deutlich. Die Fibroblasten dagegen wiesen eine geringe Menge der MAPK-assoziierten Proteine auf. Dies könnte bei der Behandlung mit Inhibitoren eine geringere Toxizität auf umliegendes gesundes Gewebe bedeuten. Denn dadurch würden Fibroblasten durch Inhibitoren dieses Signalwegs nicht beeinflusst werden.

In der XTT-Untersuchung wurde die Viabilität der DST-, HZK- Zellen und Fibroblasten unter Inhibitorbehandlung untersucht. Alle 13 getesteten Inhibitoren Apatinib, AZD4547, Cabozantinib, Ibrutinib, Imatinib, Lenvatinib, Nintedanib, Regorafenib, Sorafenib, Danusertib, SNS-314, Olaparib und Talazoparib reduzierten die Zellviabilität im Test der DST-Zellen und wären ein möglicher Therapieansatz für die Behandlung refraktärer DST in vitro. Um ebenfalls eine nebenwirkungsarme Therapie abzuleiten, wurde die Toxizität auf Fibroblasten (HVHF2) untersucht. Hier reduzierten die Inhibitoren Olaparib, Sorafenib, Talazoparib, Apatinib und Imatinib die Zellviabilität der Fibroblasten (HVHF2) kaum. Dies könnte für einen nebenwirkungsarmen Therapieansatz zur Behandlung refraktärer DST in vitro sprechen. Bei Nintedanib und AZD4547 ist jedoch mit einer erhöhten Toxizität auf Fibroblasten zu rechnen, da diese ebenfalls die Viabilität der Fibroblasten reduzierten.

Um die Effektivität der Inhibitoren vergleichen zu können, wurde jeweils der LD50 Wert berechnet. Am effektivsten waren die Aurorakinaseinhibitoren SNS-314 und Danusertib, gefolgt von dem Tyrosinkinaseinhibitor Nintedanib und dem PARP-Inhibitor Talazoparib. Unter den sechs effektivsten Inhibitoren waren zudem AZD4547 sowie Sorafenib. Diese sechs Inhibitoren zeigten bei der Behandlung der Dottersacktumorzellen 1411H ebenfalls eine Wirkung, da die Viabilität der Zellen gesenkt werden konnte. Der PARP-Inhibitor Talazoparib scheint hier schlechter zu wirken, da er die Viabilität nur

gering reduziert. Bei der weiblichen Dottersacktumorzelllinie NOY1 zeigte sich vor allem bei Danusertib, SNS-314 und Sorafenib eine Wirkung. Insgesamt lagen die LD50-Werte höher, sodass hier die Inhibitoren zwar angewendet werden könnten, jedoch mit einer höheren Konzentration. Zudem testeten wir die sechs effektivsten Inhibitoren an der Cisplatin-resistenten NOY1-R-Zelllinie. Hier konnte vor allem Nintedanib eine gute Wirkung erzielen, da dieser die Zellviabilität deutlich reduzieren konnte. Auch bei den anderen fünf Inhibitoren ist eine Abnahme der Zellviabilität zu beobachten. Jedoch konnte diese erst später beziehungsweise unter höheren Konzentrationen reduziert werden. Demnach sind die Inhibitoren wirksam gegen die Cisplatinresistenz der NOY1-Zellen, es wird jedoch eine höhere Konzentration oder eine längere Therapieanwendungszeit benötigt.

In den Viabilitätsuntersuchungen verwendeten wir eine weitere Fibroblasten-Kontrollzelllinie (MPAF). Nur Nintedanib konnte deren Viabilität senken. Folglich lässt sich sagen, dass fünf der sechs Inhibitoren eine geringe Toxizität auf Fibroblasten aufweisen und demnach eine gute Therapieoption wären. Nintedanib dagegen ist zwar sehr effektiv, jedoch hat dieser Inhibitor auch eine toxische Wirkung auf gesunde Zellen. Wir weiteten die Untersuchung auf eine Endothelzelllinie (HUVEC) aus, die ähnlich wie HZK-Zellen endodermalen Ursprungs ist. Talazoparib konnte hier die Zellviabilität zwar reduzieren, jedoch nicht nur gering. Die übrigen fünf Inhibitoren erzielten diese Wirkung jedoch schon in geringen Konzentrationen. Daher reduzieren alle sechs Inhibitoren die Viabilität. Für Talazoparib wird jedoch eine höhere Dosis oder längere Therapieanwendung benötigt.

Auch eine HZK-Zelllinie (HepG2) wurde miteinbezogen. Hier zeigte sich eine Abnahme der Zellviabilität unter den sechs Inhibitoren. Um die Viabilität deutlich zu senken, müsste jedoch eine höhere Konzentration eingesetzt werden oder eine längere Therapieanwendung erfolgen. Die Viabilität der HZK-Zellen konnte demnach durch alle sechs Inhibitoren reduziert werden. Die Toxizität der Nintedanib-Behandlung auf Fibroblasten darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden und spricht eher gegen die Anwendung dieses Tyrosinkinaseinhibitors.

Die XTT-Messungen zeigten eine Viabilitätsreduktion unter Inhibitorbehandlung. Anschließend untersuchten wir den Anteil der apoptotischen Zellen nach dieser Behandlung, um eine spezifische Wirkung zu identifizieren. Dabei stellten wir eine Apoptoseinduktion in der Durchflusszytometrie bei den Dottersacktumorzellen vor allem unter Behandlung mit dem PARP-Inhibitor Talazoparib und den

Tyrosinkinaseinhibitoren Sorafenib und Nintedanib fest. Die Aurorakinaseinhibitoren SNS-314 und Danusertib bewirkten ebenfalls eine Apoptoseinduktion, jedoch war der Anteil der apoptotischen Zellen geringer. AZD4547 wies dagegen nur einen sehr geringen Anteil apoptotischer Zellen auf. Eventuell kommt es also bei AZD4547, Danusertib und SNS-314 nicht nur durch eine Apoptoseinduktion zu einer Zellviabilitätsreduktion, sondern durch eine Störung des Zellzyklus. Weitere Untersuchungen, wie eine Zellzyklusanalyse, wären dafür nötig, um eine genauere Vermutung zu stellen.

Weiterhin sieht man bei Behandlung der Fibroblasten (HVHF2) eine Apoptoseinduktion unter Behandlung mit Nintedanib und Danusertib. Bereits in XTT-Messungen konnte eine starke Wirkung von Nintedanib auf Fibroblasten gezeigt werden. Diese lässt sich demnach durch eine Apoptoseinduktion erklären. Auch unter AZD4547 Behandlung konnte in den XTT-Messungen eine Wirkung auf Fibroblasten (HVHF2) erzielt werden. Im Apoptose-Assay zeigt sich jedoch nur eine geringe Apoptoseinduktion. Dies könnte erneut dafürsprechen, dass es sich bei der Wirkung von AZD4547 um eine andere Art des Zelltods oder-arrests handelt als eine Apoptose, wie zum Beispiel Zellzyklusstörungen oder Nekrose. Der PARP-Inhibitor Talazoparib, der Tyrosinkinaseinhibitor Sorafenib und der Aurorakinaseinhibitor SNS-314 führten bei Behandlung der Fibroblasten (HVHF2) zu keiner Apoptoseinduktion. Da diese Inhibitoren ebenfalls kaum einen Einfluss in den XTT-Untersuchungen auf HVHF2-Zellen hatten, ist von einer generell geringen toxischen Wirkung auf Fibroblasten auszugehen. Auch bei den Fibroblasten MPAF zeigte sich bis auf Nintedanib kaum eine Apoptoseinduktion unter Inhibitorbehandlung.

In der Behandlung der HZK-Zellen (HepG2) konnten wir unter Sorafenib und Nintedanib einen hohen Anteil apoptotischer Zellen messen. Sorafenib ist als Tyrosinkinaseinhibitor bereits in der Systemtherapie des Hepatozellulären Karzinoms in der Leitlinie verankert. Um eine weitere mögliche Wirkweise der Inhibitoren zu untersuchen, führten wir eine Zellzyklusanalyse durch. Die Zellzyklusanalyse, lässt die Vermutung zu, dass Danusertib, SNS-314 und Talazoparib bestimmte Zielproteine inhibieren, die für den Zellzyklus der Dottersacktumorzellen relevant sind. Zielproteine dieser Inhibitoren sind AURKA/B, ABL1/2, FGFR1, RET und PARP1/2. AURKA/B spielen bei der Zellteilung eine Rolle. Die Inhibition dieser Proteine führte bereits in Studien zum Hepatozellulären Karzinom zu einem Zellzyklus-Arrest und scheint eine effektive molekular zielgerichtete Therapiemöglichkeit in der Krebstherapie zu sein (24). *AURKA/B*, *ABL1/2*, *FGFR1* und *PARP1/2* sind in Dottersacktumorzellen stark exprimiert. Die Inhibitorwirkung auf den

Zellzyklus hat demnach einen Zusammenhang mit der Expressionsstärke der Gene der Zielproteine.

Eine geringe Wirkung der drei zuvor genannten Inhibitoren besteht auch bei den Fibroblasten (HVHF2). Im Vergleich zu den Dottersacktumorzellen lassen sich hier jedoch immer noch verschiedene Zellzyklusphasen abgrenzen.

Der Zellzyklus der Fibroblasten (MPAF) lässt sich in geringem Maße durch AZD4547, Danusertib und Nintedanib beeinflussen. AZD4547 und Nintedanib inhibieren vor allem *FGFR1-4*. Diese ‚Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptoren‘ befinden sich nicht nur in Tumorzellen, sondern auch in gesundem Gewebe, was die Wirkung der Inhibitoren erklärt.

Auch auf den Zellzyklus der HZK-Zellen (HepG2) haben Danusertib, SNS-314 und Talazoparib eine Wirkung. Zudem zeigt sich hier auch eine Wirkung des Inhibitors Sorafenib. Dieser inhibiert vor allem Tyrosinkinase wie BRAF, FGFR1, KIT, PDGFRB und RAF1, neben den zuvor genannten Zielproteinen also auch Proteine des RAS-RAF-MAPK-Signalwegs. Dieser Signalweg spielt sowohl beim Hepatozellulären Karzinom als auch beim Dottersacktumor eine Rolle.

Insgesamt zeigen vor allem SNS-314, Danusertib und Talazoparib eine starke Wirkung auf den Zellzyklus der Dottersacktumorzellen und eine leichte auf Fibroblasten, während zusätzlich Sorafenib auch eine starke Wirkung auf Zellen des Hepatozellulären Karzinoms hat.

Abbildung 21 zeigt eine Übersicht der Ergebnisse der XTT-, Apoptose- und Zellzyklusuntersuchungen. Die Abbildung zeigt die sechs wirksamsten Inhibitoren SNS-314, Danusertib, Nintedanib, Talazoparib, AZD4547 und Sorafenib nach ihrer Wirksamkeit von oben nach unten angeordnet.

	LD50 (72 h) in µM								Apoptoseinduktion				Zellzyklusveränderung			
	GCT72	HVHF2	1411H	NOY1	NOY1-R	MPAF	HUVEC	HepG2	GCT72	HVHF2	MPAF	HepG2	GCT72	HVHF2	MPAF	HepG2
SNS-314	0,23	>10	7,40	7,72	>10	>10	0,50	>10	nein	nein	nein	nein	ja	ja	nein	ja
Danusertib	1,69	>5	3,41	4,66	>5	>5	0,78	>5	nein	ja	nein	ja	ja	ja	ja	ja
Nintedanib	1,72	1,14	2,78	11,41	6,97	2,19	<1	1,14	ja	ja	nein	ja	nein	nein	ja	nein
Talazoparib	2,14	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	ja	nein	nein	nein	ja	ja	nein	ja
AZD4547	3,55	12,95	6,16	18,05	19,51	>20	<1	>20	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein
Sorafenib	4,76	>15	6,56	7,39	10,79	>15	<5	>15	ja	nein	nein	ja	nein	nein	nein	ja
< 5 µM																
5-10 µM																
> 10 µM																
ja																
nein																

Abb. 21: Übersicht der LD50-Werte, Apoptoseinduktion und Zellzyklusveränderung unter Behandlung mit den sechs wirksamsten Inhibitoren.

5 Schlussfolgerung

Insgesamt können alle 13 getesteten Inhibitoren eine mögliche Therapieoption für den Dottersacktumors sein. Nintedanib reduziert auch die Viabilität der Fibroblasten stark, sodass dieser Inhibitor möglicherweise mehr Nebenwirkungen aufweisen würde und daher für eine Therapieoption beim DST eher nicht in Frage kommt. Die übrigen fünf Inhibitoren könnten jedoch vielversprechende Therapieempfehlungen sein.

Die Aurorakinaseinhibitoren SNS-314 und Danusertib scheinen die effektivste Therapieoption zu sein, da sie die Viabilität der DST-Zellen am wirksamsten reduzieren. Sie bewirken beide kaum Apoptose, aber stören den Zellzyklus. Vor allem SNS-314 scheint dabei eine nebenwirkungsarme Therapieoption zu sein, da er wenig Einfluss auf Fibroblasten hat.

Der PARP-Inhibitor Talazoparib und der Tyrosinkinaseinhibitor Sorafenib stellen eine vielversprechende Therapieoptionen für den DST dar, da sie die Viabilität der DST-Zellen reduzieren und eine Apoptose induzieren. Sie könnten eine nebenwirkungsarme Therapieoption sein, da sie die Viabilität der Fibroblasten kaum reduzieren. Talazoparib verändert zusätzlich den Zellzyklus. Daher scheint dieser eine sehr gute Therapieoption zu sein, die auf verschiedene Weise die Viabilität des DSTs reduziert.

Basierend auf einer molekularen Ähnlichkeit zu HZK, konnten in dieser Studie Tyrosinkinase-, Aurorakinase- und PARP-Inhibitoren (TAPi) als mögliche Therapieoption für Patienten mit DST identifiziert werden.

6 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. **Anja Lorch, Peter Albers, Jörg Beyer, Richard Cathomas, Christoph Oing, Rainer Souchon, Herbert Stöger, Carsten Bokemeyer.** *Keimzelltumoren des Mannes.* s.l. : © 2021 Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V. , 2020.
2. **Liang Cheng, Peter Albers, Daniel M. Berney, Darren R. Feldman, Gedske Daugaard, Timothy Gilligan, Leendert H.J. Looijenga.** *Testicular Cancer.* s.l. : Nature Reviews, 2018. DOI:10.1038/s41572-018-0029-0.
3. **A. Heidenreich, R. Knüchel-Clarke, D. Pfister.** *Bedeutung der Pathologie für die Therapieplanung testikulärer Keimzelltumoren.* Aachen : © Springer-Verlag Berlin Heidelberg , 2014. DOI:10.1007/s00292-014-1903-5.
4. **Stephen W. Leslie, Hussain Sajjad, Carlos A. Villanueva.** *Cryptorchidism.* s.l. : The Korean Pediatric Society, 2020. PMID:29261861.
5. **Michael J. Garner, Michelle C. Turner, Parviz Ghadirian, Daniel Krewski.** *Epidemiology of testicular cancer: an overview.* Kanada : Publication of the International Union Against Cancer, 2005. DOI:10.1002/ijc.21032.
6. **Wasco Wruck, Felix Bremmer, Mara Kotthoff, Alexander Fichtner, Margaretha A. Skowron, Stefan Schönberger, Gabriele Calaminus, Christian Vokuhl, David Pfister, Axel Heidenreich, Peter Albers, James Adjaye, Daniel Nettersheim.** *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.* Düsseldorf : Journal of Cellular and Molecular Medicine , 2020. DOI:10.1111/jcmm.16222.
7. **Aalia Batool, Najmeh Karimi, Xiang-Nan Wu, Su-Ren Chen, Yi-Xun Liu.** *Testicular germ cell tumor: a comprehensive review.* Schweiz : © Springer Nature Switzerland AG, 2019. DOI:10.1007/s00018-019-03022-7.
8. **Carsten Bokemeyer, Margaretha A. Skowron, Mia-Carlotta Peters, Daniel Nettersheim, Christoph Oing.** *Cisplatinrefraktäre Keimzelltumoren - molekulare Grundlagen und klinische Konzepte.* Hamburg, Düsseldorf : © Springer Medizin Verlag GmbH,, 2020. DOI:10.1007/s00761-020-00881-9.
9. **J. Beyer, C. Bokemeyer.** *Chemotherapie von Keimzelltumoren.* Marburg, Tübingen : © Springer Medizin Verlag , 2004. DOI:10.1007/s00120-004-0704-5

10. **C. Kollmannsberger, K. Oechsle, F. Honecker, F. Mayer, C. Bokemeyer.** *Behandlung von Patienten mit metastasierten Keimzelltumoren.* Kanada, Hamburg, Tübingen : © Springer Medizin Verlag, 2008. DOI:10.1007/s00761-008-1366-5
11. **A. Heidenreich, P. Albers.** *Primärtherapie des Hodentumors und Prognosefaktoren nicht-seminomatöser Keimzelltumoren im klinischen Stadium I.* Marburg, Kassel : Der Onkologe, 2003. DOI:10.1007/s00761-003-0556-4
12. **Ruf, Christian.** *Diagnostik, Therapie und Nachsorge der Keimzelltumoren des Hodens.* Ulm : springermedizin, 2019. DOI:10.1007/s00092-019-3019-y
13. **Xuzhen Wang, Shaojie Zhao, Min Zhao, Dandan Wang, Haixia Chen, Liping Jiang.** *Use of targeted therapy and immunotherapy for the treatment of yolk sac tumors in extragonadal pelvic sites: two case reports.* China : © Gland Surgery, 2021. DOI:10.21037/ga-21-663
14. **M. Heimbrodt, G. Seitz, S. Schönberger, G. Calaminus.** *Extrakranielle Keimzelltumoren.* s.l. : AWMF, 2021.
15. **Matthew J. Murray, Robert A. Huddart, Nicholas Coleman.** *The present and future of serum diagnostic tests for testicular germ cell tumours.* Cambridge : Nature Reviews , 2016. DOI:10.1038/nrurol.2016.170
16. **Prof. Dr. Nisar P. Malek, Prof. Dr. Michael Bitzer, Prof. Dr. Peter R. Galle, Sabrina Voesch.** *Leitlinie zur Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms.* s.l. : Leitlinienprogramm Onkologie, 2021. DOI:10.1055/a-1589-7585
17. **Rosa Quiles-Perez, Jose Antonio Munoz-Gamez, Angeles Ruiz-Extremera, Francisco O'Valle, Laura Sanjuan-Nunez, Ana Belen Martin-Alvarez, David Martin-Oliva, Trinidad Caballero, Paloma Munoz de Rueda, Josefa Leon, Raul Gonzalez, Jordi Muntane et al.** *Inhibition of Poly Adenosine Diphosphate-Ribose Polymerase Decreases Hepatocellular Carcinoma Growth by Modulation of Tumor-Related Gene Expression.* Granada, Spain : American Association for the Study of Liver Diseases; Wiley InterScience , 2010. DOI:10.1002/hep.23249
18. **Fuchen Liu, Guangyong Wang, Xiaoqiang Wang, Zhihui Che, Wei Dong, Xinggang Guo, Zhenguang Wang, Ping Chen, Daisen Hou, Qi Zhang, Wenli Zhang, Yida Pan, Dongqin Yang, Hui Liu.** *Targeting high Aurora kinases expression as an innovative therapy for hepatocellular carcinoma.* Shanghai, China : oncotarget, 2017. DOI:10.18632/oncotarget.15853

19. **Marios Lampros, Nikolaos Vlachos, Spyridon Voulgaris and George A. Alexiou.** *The Role of Hsp27 in Chemotherapy Resistance.* Ioannina : Biomedicines, 2022. DOI:10.3390/biomedicines10040897
20. **Chia-Ying Hou, Chung-Yung Ma, Chiou-Hwa Yuh.** *WNK1 kinase signaling in metastasis and angiogenesis.* Taiwan : Cellular Signalling, 2022. DOI:10.1016/j.cellsig.2022.110371
21. **Fang Wang, Xianxia Yan, Guangyan Shi, Lei Zhang, Xu Jing.** *Loss of WNK1 Suppressed the Malignant Behaviors of Hepatocellular Carcinoma Cells by Promoting Autophagy and Activating AMPK Pathway.* China : Hindawi-Disease Markers, 2022. DOI:10.1155/2022/6831224
22. **Jae-Cheol Jo, Eun Kyoung Choi, Jae-Sik Shin, Jai-Hee Moon, Seung-Woo Hong, Ha-Reum Lee, Seung-Mi Kim, Soo-A Jung, Dae-Hee Lee, Seang Hwan Jung, Sun-Hye Lee, Jeong Eun Kim, Kyu-pyo Kim, Yong Sang Hong.** *Targeting FGFR Pathway in Human Hepatocellular Carcinoma: Expressing pFGFR and pMET for Antitumor Activity.* Korea : American Association for Cancer Research, 2015. DOI:10.1158/1535-7163.MCT-14-0780
23. **Daniel Benten, Gunhild Keller, Alexander Quaas, Jorg Schrader, Artur Gontarewicz, Stefan Balabanov, Melanie Braig, Henning Wege, Jurgen Moll, Ansgar W. Lohse, Tim H. Brummendorf.** *Aurora Kinase Inhibitor PHA-739358 Suppresses Growth of Hepatocellular Carcinoma In Vitro and in a Xenograft Mouse Model.* Hamburg, Germany : Neoplasia, 2009. DOI:10.1593/neo.09664
24. **You-Liang Lai, Kai-Hung Wang, Hsing-Pang Hsieh, Wan-Ching Yen.** *Novel FLT3/AURK multikinase inhibitor is efficacious against sorafenib-refractory and sorafenib-resistant hepatocellular carcinoma.* Taiwan : Journal of Biomedical Science, 2022. DOI:10.1186/s12929-022-00788-0
25. **Jee Soo Park, Jongchan Kim, Ahmed Elghiaty, Won Sik Ham.** *Recent global trends in testicular cancer incidence and mortality.* s.l. : Wolters Kluwer Health Inc., 2018. DOI:10.1097/MD.00000000000012390
26. **Venkata S. Katabathina, Daniel Vargas-Zapata, Roberto A. Monge, Alia Nazarullah, Dhakshina Ganeshan, Varaha Tammisetti, Srinivasa R. Prasad.** *Testicular Germ Cell Tumors: Classification, Pathologic Features, Imaging Findings, and Management.* s.l. : ©RSNA, 2021. DOI:10.1148/rg.2021210024
27. **Sabine Schmitz, Christine Desel.** *Der Experimentator: Zellbiologie.* s.l. : © Springer-Verlag GmbH Deutschland, 2018. DOI:10.1007/978-3-662-56111-9

28. **Schmitz, Sabine.** *Der Experimentator: Zellkultur.* s.l. : © Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg , 2011. DOI:10.1007/978-3-662-58951-9
29. **Juan D. Cedeno, Dawn E. Light, Stephen W. Leslie.** *Testicular Seminoma* s.l. : StatPearls Publishing LLC, 2021. PMID:28846234
30. **George J. Bosl, Robert J. Motzer.** *Testicular Germ-Cell Cancer.* New England : The New England Journal of Medicine, 1997. DOI:10.1056/NEJM199707243370406
31. **Tallen, PD Dr. med. Gesche.** *Keimzelltumor.* 2012.
32. **Yasuo Kubota, Masafumi Seki, Tomoko Kawai, Tomoya Isobe, Misa Yoshida, Masahiro Sekiguchi, Shunsuke Kimura, Kentaro Watanabe, Aiko Sato-Otsubo, Kenichi Yoshida, Hiromichi Suzuki, Keisuke Kataoka, Yoichi Fujii, Yuichi Shiraishi, Kenichi Chiba, Hiroko Tanak.** *Comprehensive genetic analysis of pediatric germ cell tumors identifies potential drug targets.* Japan : Nature, 2020. DOI:10.1038/s42003-020-01267-8
33. **Nader N. Massarweh, Hashem B. El-Serag.** *Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma and Intrahepatic Cholangiocarcinoma.* Houston, TX, USA : Cancer Control, 2017. DOI:10.1177/1073274817729245
34. **Freddie Bray, Jacques Ferlay, Isabelle Soerjomataram, Rebecca L. Siegel, Lindsey A. Torre, Ahmedin Jemal.** *Global Cancer Statistics 2018: Globocan Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries.* Lyon, France : Ca: A Cancer Journal for Clinicians, 2018. DOI:10.3322/caac.21492
35. **Cyriac A. Philips, Sasidharan Rajesh, Dinu C. Nair, Rizwan Ahamed, Jinsha K. Abduljaleel, Philip Augustine.** *Hepatocellular Carcinoma in 2021: An Exhaustive Update.* s.l. : Cureus, 2021. DOI:10.7759/cureus.19274
36. **Marcello Maida, Emanuele Orlando, Calogero Camma, Giuseppe Cabibbo.** *Staging systems of hepatocellular carcinoma: A review of literature.* Palermo : Baishideng Publishing Group Co. - World of Journal Gastroenterology, 2014. DOI:10.3748/wjg.v20.i15.4141
37. **A.M. Gressner, O.A. Gressner.** *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik.* s.l. : Springer Verlag, 2019. DOI:10.1007/978-3-662-48986-4
38. **Mika Sok, Miha Zavrl, Boris Greif, Metvz Srpcic.** *Objective assessment of WHO/ECOG performance status.* s.l. : Supportive Care in Cancer - Springer Verlag, 2019. DOI:10.1007/s00520-018-4597-z

39. **Ahmed W Moawad, Janio Szklaruk, Chandana Lall, Katherine J Blair, Ahmed O Kaseb, Amita Kamath, Scott A Rohren, Khaled M Elsayes.** *Angiogenesis in hepatocellular carcinoma; pathophysiology, targeted therapy, and role of imaging.* s.l. : Journal of Hepatocellular Carcinoma , 2020. DOI:10.2147/JHC.S224471
40. **Jennifer Berumen, Jacopo Baglieri, Tatiana Kisseleva, Kristin Mekeel.** *Liver fibrosis: pathophysiology and clinical implications.* s.l. : Wiley Interdisciplinary reviews, 2020. DOI:10.1002/wsbm.1499
41. **Ralf Weiskirchen, Sabine Weiskirchen, Frank Tacke.** *Recent advances in understanding liver fibrosis: bridging basic science and individualized treatment concepts.* Deutschland : F1000Research, 2018. DOI:10.12688/f1000research.14841.1
42. **T. Knittel, B. Saile, G. Ramadori.** *Fibrogenese, Pathophysiologie und therapeutische Ansätze.* Deutschland : Der Internist, 1998.
DOI:10.1007/s001080050165
43. **Qun Yang, Hongyun Liu, Yani Liu.** *Multimodal imaging changed clinical decision-making: A rare mediastinal yolk sac tumor infiltrating the heart and follow-up.* China : Wiley Periodicals LLC, 2021. DOI:10.1111/echo.15180

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen Personen bedanken, die mich bei meiner Dissertation unterstützt haben.

Lieber Daniel, vielen Dank, dass du mir von Beginn an bis zur Fertigstellung zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden bist. Du hast mich immer sehr motiviert und mit deiner fachlichen Expertise gut angeleitet. Ich habe mich stets sehr gut betreut gefühlt und danke dir für deine unermüdliche Unterstützung!

Liebe Maggi, auch dir möchte ich direkt danken. Du hast mir den Laboralltag nahegebracht und hattest für mich immer ein offenes Ohr.

Liebe Mara, vielen Dank für deine Geduld. Du hast mir alles Schritt für Schritt erklärt und ich konnte immer auf deine Hilfe setzen.

Liebe Anna, liebe Alexa, lieber Christian, lieber Aaron, lieber Gamal, liebe Melli, lieber David, auch bei euch möchte ich mich herzlich bedanken.

Ich denke gerne an die Zeit bei euch zurück und bin dankbar für alle gesammelten Erfahrungen!

Zudem möchte ich mich bei meinem Zweitprüfer Prof. Dr. Stork für die Co-Betreuung und der Medical Research School für die gute Unterstützung bedanken.