

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

**Der Verlust oder die pharmakologische Inhibition von
ARID1A sensitiviert Keimzelltumorzellen für die
Behandlung mit ATR-Inhibitoren**

Dissertation

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

vorgelegt von

Lukas Kurz

2025

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
gez.:
Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker
Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Daniel Nettersheim
Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Gerhard Fritz

Auflistung der Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Kurz, L., Miklyaeva, A., Skowron, M. A., Overbeck, N., Poschmann, G., Becker, T., Eul, K., Kurz, T., Schönberger, S., Calaminus, G., Stühler, K., Dykhuizen, E., Albers, P., & Nettersheim, D. (2020). ARID1A Regulates Transcription and the Epigenetic Landscape via POLE and DMAP1 While ARID1A Deficiency or Pharmacological Inhibition Sensitizes Germ Cell Tumor Cells to ATR Inhibition. *Cancers*, 12(4), 905.

Zusammenfassung

Testikuläre Keimzelltumoren (KZT) sind die häufigste maligne Tumorerkrankung junger Männer im Alter von 17 bis 45 Jahren. Während im frühen Stadium durch die operative Tumorentfernung und Chemotherapie hohe Heilungsraten erzielt werden, bleibt die Behandlung fortgeschrittener und therapieresistenter Tumoren eine große Herausforderung. Darüber hinaus können bestehende Therapien erhebliche Nebenwirkungen wie Infertilität oder Zweitmalignome verursachen, was die Notwendigkeit neuer, gezielterer Therapieansätze verdeutlicht.

Mutationen des *ARID1A*-Gens gehören zu den häufigsten genetischen Veränderungen in soliden Tumoren. Das Protein ARID1A ist ein essenzieller Bestandteil des chromatinremodellierenden SWI/SNF-Komplexes und spielt eine zentrale Rolle in der DNA-Reparatur, der Regulation der Genexpression und der Zelldifferenzierung. In verschiedenen Tumorarten ist ein ARID1A-Verlust mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber spezifischen Inhibitoren assoziiert, darunter EZH2-, PARP-, HDAC6-, HSP90- und ATR-Inhibitoren.

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen eines ARID1A-Verlusts oder einer pharmakologischen Inhibition von ARID1A auf das Therapieansprechen in Keimzelltumoren zu untersuchen. Zudem wurde analysiert, welchen Einfluss eine ARID1A-Hemmung auf DNA-Reparaturmechanismen und das Proteom der Zellen hat. Hierzu wurden zunächst *ARID1A*-defiziente Keimzelltumorzelllinien mithilfe der CRISPR/Cas9-Technologie generiert und anschließend mit den oben genannten Inhibitoren behandelt. Dabei zeigte sich, dass der Verlust oder die pharmakologische Hemmung von ARID1A zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber ATR-Inhibitoren führte. Auf Proteinebene zeigte sich eine Herunterregulierung von POLE und DMAP1, zwei Proteine, die eine entscheidende Rolle in der Transkriptionsregulation spielen und möglicherweise durch ARID1A regulatorisch beeinflusst werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die kombinierte Inhibition von ARID1A und ATR in Keimzelltumoren zu einer verstärkten Wirksamkeit der Behandlung führt. Dies legt nahe, dass eine duale Inhibition eine vielversprechende therapeutische Strategie für therapieresistente Keimzelltumoren darstellen könnte.

Summary

Testicular germ cell tumors (GCTs) are the most common malignant tumors in young men aged 17 to 45 years. While high cure rates can be achieved in early-stage disease through surgical tumor removal and chemotherapy, the treatment of advanced and therapy-resistant tumors remains a major challenge. Moreover, existing therapies can cause significant side effects, such as infertility or secondary malignancies, highlighting the need for novel, more targeted therapeutic approaches.

Mutations in the *ARID1A* gene are among the most frequent genetic alterations in solid tumors. ARID1A is an essential component of the chromatin-remodeling SWI/SNF complex and plays a key role in DNA repair, gene regulation, and cell differentiation. In various tumor types, ARID1A loss has been associated with increased sensitivity to specific inhibitors, including EZH2, PARP, HDAC6, HSP90, and ATR inhibitors.

The aim of this study was to investigate the effects of ARID1A loss or pharmacological inhibition on therapy response in germ cell tumors. Additionally, the impact of ARID1A inhibition on DNA repair mechanisms and the cellular proteome was analyzed. To this end, *ARID1A*-deficient germ cell tumor cell lines were generated using CRISPR/Cas9 technology and subsequently treated with the aforementioned inhibitors. The results demonstrated that ARID1A loss or inhibition led to increased sensitivity to ATR inhibitors. At the protein level, this was associated with downregulation of POLE and DMAP1, two proteins that play a crucial role in transcriptional regulation and may be influenced by ARID1A.

In summary, this study showed that the combined inhibition of ARID1A and ATR enhances treatment efficacy in germ cell tumors. These findings suggest that a targeted dual inhibition strategy could represent a promising therapeutic approach for therapy-resistant germ cell tumors.

Abkürzungsverzeichnis

β-HCG	Humanes Choriongonatotropin, beta-Untereinheit
(D)PBS	(Dulbecco's) phosphate buffered saline
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ACTL6A	Actin-like protein 6A
AFP	Alpha-Fetoprotein
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARID	AT-rich-interaction-domain
ARID1A	AT-rich interactive domain-containing protein 1A
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related
BAF	BRG1- or BRM-assoziierte Faktoren
BCA	Bicinchoninacid
c-KIT	Tyrosinkinase KIT
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
CRISPR/Cas9	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/ CRISPR-associated protein
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DAVID	Engl. "Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery"
DDR	DNA-Schadensantwort, engl. "DNA damage response"
DMAP1	DNA methyltransferase 1-associated protein 1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPF2	Zinc finger protein ubi-d4
DSB	Doppelstrangbrüche
DST	Dottersacktumor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EK	Embryonalkarzinom
EZH2	Enhancer of Zeste 2
FCS	Fetal calf serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

GCNIS	Germ cell neoplasia in situ
h	Stunden
HDAC	Histone deacetylase
HR	Homologe Rekombination
HSP90	Heat shock protein 90
IGCCCG	International Germ Cell Cancer Collaboration Group
KRAS	Kirsten rat sarcoma virus
LC/MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
LD50	Mittlere letale Dosis
LDH	Laktatdehydrogenase
min	Minuten
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Messenger-RNA
NEAA	Nicht essenzielle Aminosäuren
NHEJ	Nicht-homologe Endverknüpfung
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
OCT3/4	Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor 4
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PBRM1	Protein polybromo-1
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-L1	Programmed cell death ligand-1
PGC	Primordial germ cell
pH	Potential des Wasserstoffes
PHF10	PHD finger protein 10
PI	Propidiumiodid
PMS	Phenazinmethosulfat
POLE	DNA-Polymerase Epsilon
PS	Phosphatidylserin
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotationen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
sec	Sekunden
SIR	Standardisierte Inzidenzrate
SMARCA2	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 2

SMARCA4	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 4
SOX17	Sex determining region Y (SRY)- box 17
SOX2	Sex determining region Y (SRY)- box 2
STR	Short Tandem Repeats
STRING	Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins
SWI/SNF	SWItch/Sucrose Non-Fermentable
Tab.	Tabelle
TCGA	The Cancer Genome Atlas
U/ml	Einheiten pro Milliliter
UV/VIS	Ultraviolettes/sichtbares Licht
V	Volt
WHO	Weltgesundheitsorganisation
XTT	Triphenyltetrazoliumchlorid

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
1.1 Verbreitung und Risikofaktoren der Keimzelltumoren	1
1.2 Entstehung von Keimzelltumoren und ihre molekulare Klassifizierung	2
1.3 Diagnostik, klinische Stadien und Prognose von Keimzelltumoren.....	4
1.4 Therapieoptionen der Keimzelltumoren und Nebenwirkungen	5
1.5 Der SWI/SNF-Komplex und ARID1A.....	6
1.6 ARID1A in der Onkologie.....	8
1.6.1 Mutationen und Bedeutung als Tumorsuppressor	8
1.6.2 Synthetische Letalität und therapeutische Ansätze	9
1.6.3 ARID1A in Keimzelltumoren	10
1.7 Ziele der Arbeit.....	10
2 Material und Methoden	12
2.1 Material	12
2.1.1 Humane Zelllinien	12
2.1.2 Zellkulturmedien	12
2.1.3 Materialien der Zellkultur	13
2.1.4 Verwendete pharmakologische Inhibitoren	14
2.1.5 Isolierung von genomischer DNA	15
2.1.6 RNA-Isolation	16
2.1.7 PCR und cDNA-Synthese	16
2.1.8 Agarose-Gelelektrophorese	16
2.1.9 qRT-PCR	17
2.1.10 CRISPR/Cas9-Transfektion	17
2.1.11 PCR-Klonierung und Sanger-Sequenzierung.....	18
2.1.12 XTT-Assay	18
2.1.13 Immunzytochemie	19

2.1.14	Antikörper	19
2.1.15	Oligonukleotide	20
2.1.16	Plastik- und Verbrauchsmaterialien	21
2.2	Methoden	22
2.2.1	Kultivierung und Passagieren der Zelllinien	22
2.2.2	Zellzählung	22
2.2.3	Transfektion von Zellen zur Geneditierung	23
2.2.4	Messung der Zellviabilität	23
2.2.5	Isolation von genomischer DNA	24
2.2.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	25
2.2.7	Agarose-Gelelektrophorese	26
2.2.8	Klonierung und Sanger-Sequenzierung	27
2.2.9	RNA-Isolation	27
2.2.10	cDNA-Synthese	28
2.2.11	Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)	28
2.2.12	Immunfluoreszenzfärbung	29
2.2.13	Durchflusszytometrie nach Nicoletti- oder Annexin V/PI Apoptose-Assay	30
2.2.14	Flüssigkeitschromatographie/Massenspektrometrie (LC/MS)	31
2.2.15	Onlineanalysen und Software	33
2.2.16	Statistische Auswertung	33
2.2.17	Ethikvotum	33
3	Ergebnisse	34
3.1	Analyse des SWI/SNF-Komplexes in Keimzelltumoren	34
3.2	Etablierung von <i>ARID1A</i> -defizienten Zellen mittels CRISPR/Cas9 in der Seminomzelllinie TCam-2	37
3.3	ARID1A als mögliches therapeutisches Ziel in Keimzelltumoren	41
3.3.1	Sensitivierung der <i>ARID1A</i> -defizienten Zellen gegenüber ATR-Inhibition	41
3.3.2	Doppelbehandlung mit <i>ARID1A</i> - und ATR-Inhibitoren	43
3.4	Molekulare Effekte des Verlustes oder der Inhibition von <i>ARID1A</i>	45
3.4.1	Einfluss auf den Zellzyklus und DNA-Reparaturmechanismen	45
3.4.2	Veränderungen im Proteom nach der Behandlung mit C63	47
3.4.3	Beeinflussung der Pluripotenz durch den Verlust von <i>ARID1A</i>	50
3.5	Die Kombination von Cisplatin und ATR-Inhibition	52
4	Diskussion	54
4.1	Die Rolle von <i>ARID1A</i> in Keimzelltumoren und die Etablierung von <i>ARID1A</i>-defizienten Zelllinien	54

4.2	Therapeutische Konsequenz des Verlustes von ARID1A in Keimzelltumorzellen.....	55
4.3	Molekulare Analyse der Doppelbehandlung mit ARID1A- und ATR-Inhibitoren	57
4.4	Anwendbarkeit der ATR-Inhibition in Bezug auf aktuelle Therapiestandards in Keimzelltumoren.....	59
4.5	Limitationen der Studie	59
4.6	Fazit und Ausblick.....	60
	Literaturverzeichnis	61
	Anhang.....	74
	Danksagung	76

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Epidemiologie der Keimzelltumoren in Deutschland.....	2
Abbildung 2: Entstehung der unterschiedlichen Keimzelltumorentitäten im Verlauf der Entwicklung der Urkeimzellen zu Spermien.....	4
Abbildung 3 <i>ARID1A</i> -Isoformen in Keimzelltumoren.	34
Abbildung 4 Expression der SWI/SNF-Faktoren in Keimzelltumorgeweben und -zelllinien.....	35
Abbildung 5 <i>ARID1A</i> -Expression in Keimzelltumoren	36
Abbildung 6 Genetische Veränderungen der SWI/SNF Faktoren	37
Abbildung 7 PCR-Strategie zur Validierung der Geneditierung.....	38
Abbildung 8: Genotypisierungs-PCR und Sanger-Sequenzierung der TCam-2 <i>ARID1A</i> ^{-/-} Klone.....	39
Abbildung 9 Exemplarische Darstellung der Immunfluoreszenzfärbung von <i>ARID1A</i> in TCam-2 <i>ARID1A</i> ^{+/+} und TCam-2 <i>ARID1A</i> ^{-/-} Klon #1.....	40
Abbildung 10 Genotypisierungs-PCR in Embryonalkarzinomzelllinien.	41
Abbildung 11 Dosisfindung für Inhibitoren mit einer vorbeschriebenen synthetischen Letalität nach <i>ARID1A</i> -Verlust	42
Abbildung 12 Viabilitätsmessung in TCam-2- <i>ARID1A</i> ^{+/+} und - <i>ARID1A</i> ^{-/-}	43
Abbildung 13 Dosisfindung für die <i>ARID1A</i> -Inhibitoren	44
Abbildung 14 Doppelbehandlung mit <i>ARID1A</i> - und ATR-Inhibitoren in verschiedenen Keimzelltumorzelllinien	45
Abbildung 15 Analyse der Zellzyklusverteilung und Apoptoserate nach Behandlung mit C63 und VE-822.....	46
Abbildung 16 Anteil der γH2AX-positiven Zellen in TCam-2- <i>ARID1A</i> ^{+/+} und - <i>ARID1A</i> ^{-/-} nach der Behandlung mit 10 μM VE-822.....	46
Abbildung 17 Untersuchung der Expression von <i>ATR</i> und weiteren DDR-assoziierten Genen nach <i>ARID1A</i> und ATR-Inhibition.....	47
Abbildung 18 Veränderungen im Proteom nach <i>ARID1A</i> -Inhibition in TCam-2	48
Abbildung 19 Veränderung im Proteom der TCam-2 <i>ARID1A</i> ^{-/-} -Klone.....	49
Abbildung 20 STRING-Analyse der herunterregulierten Proteine nach der Behandlung mit C63.....	50

Abbildung 21 Expressionsanalyse der Pluripotenzfaktoren <i>NANOG</i>, <i>OCT3/4</i> und respektive <i>SOX17</i> (Seminom) und <i>SOX2</i> (Embryonalkarzinom) mittels qRT-PCR.	51
Abbildung 22 Expressionsanalyse der Pluripotenzfaktoren <i>NANOG</i>, <i>OCT3/4</i> und respektive <i>SOX17</i> (Seminom) und <i>SOX2</i> (Embryonalkarzinom) nach <i>ARID1A</i>-Verlust.	52
Abbildung 23 Zellviabilität nach Doppelbehandlung mit ATR-Inhibitor und Cisplatin.	53

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten humanen Zelllinien	12
Tabelle 2: Verwendete Zellkulturmedien	13
Tabelle 3: Materialien der Zellkultur.....	13
Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete pharmakologische Inhibitoren	15
Tabelle 5: Materialien zur Isolierung genomischer DNA.....	15
Tabelle 6: Materialien zur RNA-Isolation	16
Tabelle 7: Materialien zur PCR und cDNA-Synthese.....	16
Tabelle 8: Materialien zur Agarose-Gelelektrophorese.....	17
Tabelle 9: Materialien zur qRT-PCR.....	17
Tabelle 10: Materialien zur CRIPR/Cas9 Transfektion	18
Tabelle 11: Materialien zur PCR-Klonierung und Sanger-Sequenzierung	18
Tabelle 12: Materialien für das XTT-Assay	19
Tabelle 13: Materialien für die Immunzytochemie	19
Tabelle 14: Verwendete Antikörper.....	19
Tabelle 15: Verwendete Oligonukleotide	20
Tabelle 16: Plastik- und Verbrauchsmaterialien	21
Tabelle 17: Protokoll der PCR.....	26
Tabelle 18: Ablauf der cDNA-Synthese	28
Tabelle 19: Protokoll der qPCR Messung	29
Tabelle 20 „DAVID Gene Antology“-Analyse der herunterregulierten Proteine nach Behandlung mit C63.....	74

1 Einleitung

Keimzelltumoren (KZT) stellen die häufigste Krebserkrankung des jungen Mannes dar [1], [2]. Trotz insgesamt hoher Heilungsraten existieren durch das Auftreten von Rezidiven und durch Resistenzen gegen die Behandlung mit Cisplatin weiterhin Hürden in der Patientenversorgung [3]. Dies unterstreicht die Relevanz der Erforschung neuer Therapieansätze.

1.1 Verbreitung und Risikofaktoren der Keimzelltumoren

Allgemein gehören KZT zu den selteneren Tumoren und machen zwischen 1 % und 2 % der Krebserkrankungen bei Männern aus [1], [4]. In bestimmten Subgruppen stellen die Keimzelltumore jedoch die Mehrheit der Krebsneudiagnosen. So erkrankt der Großteil der betroffenen Patienten bereits vor dem 40. Lebensjahr und in der Altersgruppe von 20 bis 45 Jahren sind Keimzelltumore mit einem Anteil von 25 % die häufigste bösartige Erkrankung (siehe Abbildung 1) [5].

In Deutschland lag die Inzidenz im Jahr 2018 bei 10 Neuerkrankungen pro 100.000 Männer mit ungefähr 4100 Fällen pro Jahr. Über die letzten Jahrzehnte wurden weltweit steigende Inzidenzen beobachtet, wobei die Ursache hiervon bisher unklar bleibt [6]. Diskutiert werden exogene hormonelle Einflüsse insbesondere während der Embryogenese. Aufgrund der heterogenen Gruppe der chemischen Substanzen, die einen hormonellen Effekt haben können, gibt es hierzu jedoch widersprüchliche Daten [7], [8].

Zu den etablierten Risikofaktoren zählt insbesondere der *Maldeszensus testis*, bei dem es aufgrund einer Entwicklungsstörung zum fehlenden Herabsteigen der Hoden ins Skrotum kommt. Patienten mit diesem Krankheitsbild tragen ein fünffach erhöhtes Risiko an einem Keimzelltumor zu erkranken [9]. Durch die operative Verlagerung und Fixierung des Hodens im Skrotum im frühen Kindesalter kann das Risiko an einem Keimzelltumor zu erkranken in diesen Fällen reduziert werden.

Patienten, die bereits an einem Keimzelltumor erkrankt sind, weisen ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Tumors im kontralateralen Hoden auf (standardisierte Inzidenzrate (SIR) 12,4). Zusätzlich haben männliche Verwandte 1. Grades von Patienten mit Keimzelltumoren ein erhöhtes Risiko selbst zu erkranken

(SIR 4) und genetische Einflüsse spielen bei mehr als 40% der Krankheitsfälle eine Rolle [10], [11], [12].

Infertile Männer und deren erstgradige Verwandte haben ebenfalls ein leicht erhöhtes Risiko an einem Keimzelltumor zu erkranken [13]. Weiterhin wird untersucht, inwiefern Umwelt- und Lebensstilfaktoren die Entwicklung von Keimzelltumoren bedingen. Epidemiologische Studien und Metaanalysen konnten bisher jedoch keinen eindeutigen Zusammenhang identifizieren [14].

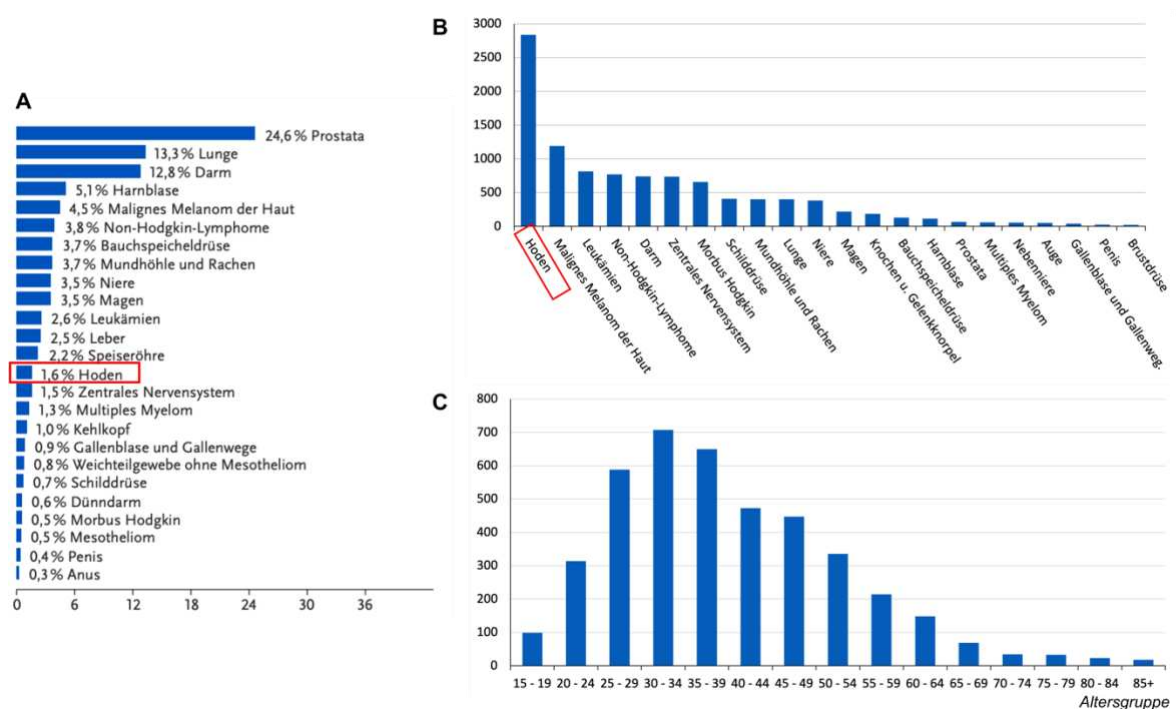


Abbildung 1: Epidemiologie der Keimzelltumoren in Deutschland

A Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorentitäten an allen Krebsneudiagnosen bei Männern in Deutschland 2018 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs). Hodentumoren rot eingrahmt. **B** Absolute Fallzahlen der häufigsten Tumorentitäten bei Männern in Deutschland für die Altersgruppe 0-44 Jahre. Hodentumoren rot eingrahmt. **C** Absolute Fallzahlen von Hodentumoren in Deutschland im Jahr 2018 altersspezifisch dargestellt. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 37 Jahren. Alle Abbildungen adaptiert nach Zentrum für Krebsregisterdaten des RKI [5].

1.2 Entstehung von Keimzelltumoren und ihre molekulare Klassifizierung

Keimzelltumoren (KZT) und deren Vorläuferläsionen entstehen zu unterschiedlichen Phasen der Entwicklung von Urkeimzellen (*primordial germ cells*

(PGC)) bis zur endgültigen Spermatogenese, wodurch sich ihre molekulare und histologische Vielfalt erklärt. Sie lassen sich anhand der WHO-Klassifikation von 2016 vornehmlich in drei Gruppen einteilen [15]. Hierunter fallen die KZT vom Typ 1 (kindliche und präpubertäre Tumore), vom Typ 2 (Seminome und Nicht-Seminome) sowie vom Typ 3 (spermatozytische Tumore). Letztere treten vor allem bei älteren Männern auf. Am häufigsten treten die KZT vom Typ 2 auf, die sich aus der Tumorstufe Keimzellneoplasie *in situ* (aus dem Englischen *germ cell neoplasia in situ* = GCNIS) entwickeln (siehe Abbildung 2).

Unter physiologischen Umständen wandern die Urkeimzellen während der Embryogenese in die Gonadenanlage und verlieren dort bei der Entwicklung zu Spermatogonien ihre pluripotenten Eigenschaften. Bei einer gestörten Progression der Entwicklung zu Spermatogonien und dem Erhalt der Pluripotenz entsteht eine transformierte Keimzelle, die sogenannte GCNIS. Bis zum Erreichen der Pubertät verbleibt sie vermutlich ähnlich den Spermatogonien im Ruhestadium. Bei postpubertären Patienten mit diagnostiziertem GCNIS kommt es innerhalb von 5 Jahren in etwa 50 % der Fälle zu einem Progress in einen invasiven Keimzelltumor [16].

Die Tumorprogression erfolgt aufgrund verschiedener chromosomaler und epigenetischer Veränderungen, sowie teilweise auch somatischer Mutationen. Als frühes Ereignis beim Übergang vom GCNIS zum invasiven Keimzelltumor gilt die Polyploidisierung, also das Auftreten einer erhöhten Chromosomenzahl. In diesem Schritt kommt es neben einer Vervielfachung des Genoms typischerweise zum Auftreten eines Isochromosom 12p (i(12p)) [17], [18], [19]. Unter einem Isochromosom versteht man eine strukturelle Chromosomenaberration, bei der entweder der kurze (p) oder der lange (q) Arm eines Chromosoms spiegelbildlich vorliegt. Durch die Amplifikation der Gene auf i(12p) kann es zur Überexpression beispielsweise von *KRAS* kommen. Punktmutationen kommen eher selten vor und betreffen dann vor allem das Gen *c-KIT* [20]. Der genaue Prozess der Entwicklung von der GCNIS zum invasiv wachsenden Keimzelltumor ist jedoch noch ungeklärt. Die KZT vom Typ 2 werden weiter in die Gruppe der Seminome und der Nicht-Seminome eingeteilt. Diese Trennung ist auch von klinischer Relevanz, da sich die Therapieoptionen, die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs und die Gesamtprognose zwischen den beiden Entitäten unterscheiden [9], [21].

Die Seminome bilden eine molekularbiologisch und histologisch homogene Gruppe und teilen zahlreiche Eigenschaften mit den PGCs und dem GCNIS, wie beispielsweise die Expression des Transkriptionsfaktors SOX17 oder eine geringe DNA-Methylierung [22], [23]. Die Nicht-Seminome hingegen sind deutlich heterogener. Ihre Stammzellpopulation, die Embryonalkarzinome, weist pluri- bis totipotente Eigenschaften auf und ähnelt in ihren Genexpressionsmustern embryonalen Stammzellen (Expression des Transkriptionsfaktors SOX2). Sie können sowohl in alle drei Keimblätter differenzieren (Teratome), als auch extraembryonales Gewebe imitieren (Dottersack- und Chorionkarzinome) [24]. Darüber hinaus existieren auch Mischformen mit Anteilen aller Tumorentitäten [15].

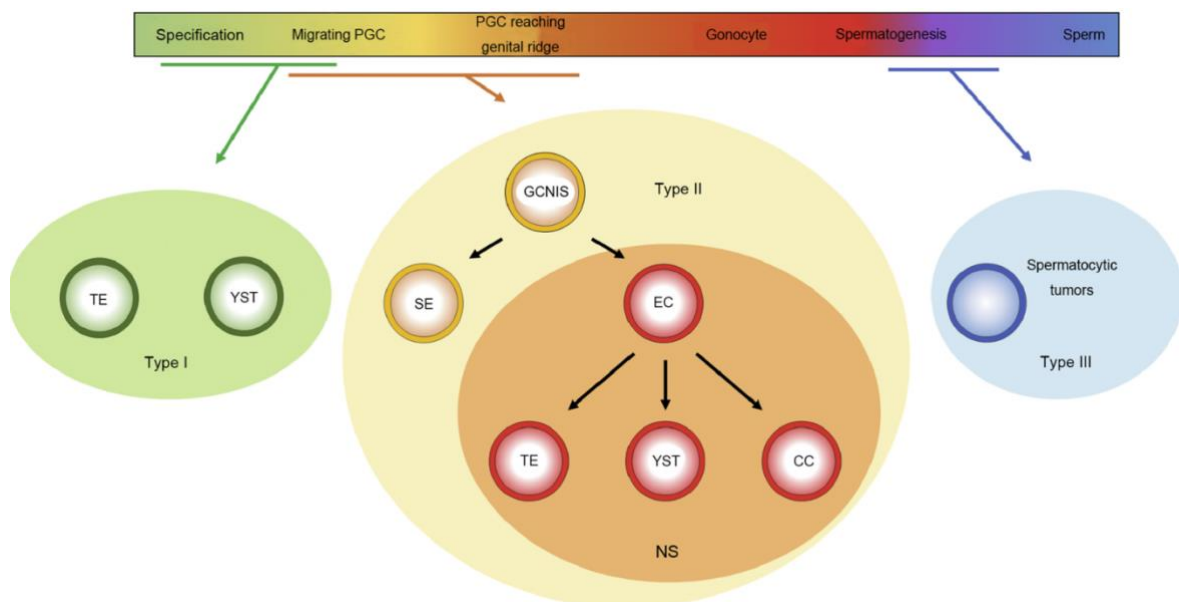


Abbildung 2: Entstehung der unterschiedlichen Keimzelltumorentitäten im Verlauf der Entwicklung der Urkeimzellen zu Spermien.

Einteilung anhand der WHO-Klassifikation von 2016 in Keimzelltumoren vom Typ I-III. (TE = Teratom, YST = Dottersacktumor, GCNIS = Keimzellneoplasie in situ, SE = Seminom, EC = Embryonalkarzinom, CC = Chorionkarzinom, NS = Nicht-Seminom). Adaptiert nach [25]

1.3 Diagnostik, klinische Stadien und Prognose von Keimzelltumoren

Meist stellen sich Patienten mit einem Keimzelltumor beim Urologen mit einer schmerzlosen Raumforderung im Hoden vor. In 10 % der Fälle erfolgt die

Erstdiagnose jedoch bei Symptomen, die durch einen primär außerhalb des Hodens gelegenen Tumor oder durch Metastasen verursacht werden.

Zu den diagnostischen Schritten zählen leitliniengerecht die Ultraschalldiagnostik des Hodens und bei dann erhärtetem Verdacht die Bestimmung der Tumormarker im Blut, sowie eine Computertomographie zur Ausbreitungsdiagnostik. Die Serumentumormarker umfassen das humane Choriongonadotropin (β -HCG), das Alpha-Fetoprotein (AFP) und die Laktatdehydrogenase (LDH).

Zur klinischen Einteilung in Erkrankungsstadien werden die TNM-Klassifikation und die Serumentumormarker als Grundlage verwendet. Bei der TNM-Klassifikation werden die Ausdehnung des Primärtumors (T), sowie das Vorliegen von Lymphknoten- (N) und Fernmetastasen (M) berücksichtigt. Unter Einbezug der Tumormarker erfolgt dann die Einteilung in die Stadien I-III (mit jeweiligen Subgruppen).

Im Stadium I ist die Erkrankung auf den Hoden begrenzt. Bei einem Befall retroperitonealer Lymphknoten liegt bereits ein Stadium II vor und bei Lymphknotenmetastasen oberhalb des Zwerchfells, sowie Fernmetastasen spricht man vom Stadium III. Die Therapieplanung erfolgt in Abhängigkeit der klinischen Stadien und der histologischen Entität (Seminom oder Nicht-Seminom).

Patienten mit Keimzelltumoren im klinischen Stadium $\geq$ II lassen sich basierend auf retrospektiven Registerstudien IGCCCG-Prognosegruppen zuordnen.

Die krebsspezifischen 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeiten liegen beim metastasierten KZT für Patienten der guten Prognosegruppe bei 96 %, für Patienten der intermediären Prognosegruppe bei 89 % und für Patienten der schlechten Prognosegruppe bei 67 %[26].

1.4 Therapieoptionen der Keimzelltumoren und Nebenwirkungen

Die initiale Therapie bei gonadalen Keimzelltumoren besteht aus der operativen Entfernung des betroffenen Hoden. Unter Berücksichtigung des histologischen Befundes und der „Staging“-Untersuchung erfolgt dann wie oben beschrieben die Einteilung in drei Stadien. Im Stadium I richtet sich das weitere Vorgehen nach der histologischen Entität und definierten Risikofaktoren (Tumorgroße, Invasion in Lymphbahnen oder Gefäße). Bei Vorliegen von Risikofaktoren kann eine adjuvante

Therapie erfolgen. Diese umfasst beim Seminom eine Bestrahlung oder platinhaltige Chemotherapie (Carboplatin) und beim Nicht-Seminom eine Kombinationstherapie aus Cisplatin, Etoposid und Bleomycin. Ab dem Stadium II und III erfolgt standardmäßig eine adjuvante Chemotherapie mit Cisplatin, Etoposid und Bleomycin [27]. Bei persistierenden Metastasen nach erfolgter Chemotherapie ist beim Nicht-Seminom zudem eine operative Entfernung der Residualtumoren notwendig [28].

Seit der Einführung der platinhaltigen Chemotherapie hat sich die Prognose für Patienten mit Keimzelltumoren deutlich verbessert. Dennoch treten bei 15 - 30 % der Patienten nach der Erstlinienchemotherapie Rezidive auf. Bei den Erkrankungen im metastasierten Stadium weisen zudem bis zu 15 % der Patienten Resistenzen gegen die erste oder die darauffolgenden platinbasierten Therapien auf, so dass diese Patienten nur noch im palliativen Sinne betreut werden können. [3], [29], [30].

Durch das junge Alter des betroffenen Patientenkollektivs müssen zudem Langzeitfolgen der Therapie, wie beispielsweise Zweitmalignome, Kardio- und Neurotoxizität, bedacht werden, weshalb die Erforschung optimaler Therapieregimen sowie nebenwirkungsärmerer Medikamente von großer Bedeutung ist [31], [32].

1.5 Der SWI/SNF-Komplex und ARID1A

Die ungefähr drei Milliarden Basenpaare des menschlichen Genoms liegen im Zellkern nicht als eine lange Kette vor, sondern bilden eng verpackt mithilfe von Histonen und anderen Proteinen das sogenannte Chromatin. Innerhalb des Chromatins sind die Nukleosomen die kleinste Verpackungsstufe und bestehen aus 147 Basenpaaren der DNA, die um ein Histonoktamer gewunden sind [33]. Zur Regulierung der Genexpression wird die Chromatinstruktur entweder aufgelockert (Euchromatin) oder enger verpackt (Heterochromatin). Dies geschieht vornehmlich über drei Mechanismen, die DNA-Methylierung, die kovalente Histonmodifikation oder die ATP-abhängige Chromatinremodellierung. Letzteres wird durch Proteinkomplexe unter Verbrauch von ATP durch das Herauslösen, Umstrukturieren oder Bewegen von Nukleosomen bewirkt [34].

Die Gruppe der SWI/SNF-Komplexe, auch bekannt als BAF-Komplexe, ist einer der bedeutenden Regulatoren auf der Ebene der Nukleosomen. In Säugetieren sind drei Subfamilien (cBAF, PBAF und ncBAF) bekannt, die jeweils lose aus mehreren Proteinen mit DNA- oder Nukleosombindedomänen zusammengesetzt sind und unter Verbrauch von ATP Nukleosomen verschieben oder entfernen können [35], [36]. Allen gemeinsam ist dementsprechend eine Untereinheit mit ATPase-Funktion (SMARCA2 oder SMARCA4) und auch weitere Untereinheiten, wie die DNA-bindenden ARID-Proteine (*AT-rich-interaction-domain*), sind sowohl in cBAF als auch PBAF vorhanden. Hierzu zählt auch das evolutionär konservierte ARID1A, welches im cBAF-Komplex für die Bindung an spezifischen Stellen der DNA verantwortlich ist. Es existiert mit ARID1B ein paraloges Protein, das jedoch an anderen DNA-Abschnitten bindet [37]. Insgesamt zeichnen sich die drei SWI/SNF-Subfamilien durch eine große strukturelle Heterogenität und diverse Funktionen und Bindungsorte am Chromatin aus.

Die genaue Analyse der Funktion der Komplexe ist aufgrund ihrer instabilen Zusammensetzung und Diversität anspruchsvoll. Es konnte jedoch in mehreren Studien gezeigt werden, dass SWI/SNF-Komplexe besonders häufig in der Nähe von *Enhancern* vorliegen, also Genabschnitten die als Bindestellen für Transkriptionsfaktoren dienen. Dies deutet auf die wichtige Rolle der Komplexe in der Beeinflussung der Erreichbarkeit von *Enhancern* und somit der Steuerung der Genexpression hin [38], [39]. Insbesondere Gene für die Zellidentität und -differenzierung scheinen auf diesem Weg in ihrer Expression moduliert zu werden [40], [41], [42], [43].

Zusätzlich sind die SWI/SNF-Komplexe auch für die Antwort der Zelle auf DNA-Schäden (*DNA-damage-response*, *DDR*) bedeutend und in diverse DNA-Reparaturmechanismen involviert. Hierzu zählen sowohl die Veränderung der Chromatinstruktur, um den Defekt für Reparaturenzyme zugänglich zu machen, als auch die direkte örtliche Rekrutierung von DNA-Reparaturproteinen bei der homologen Rekombination (*HR*) und der nicht-homologen Endverknüpfung (*NHEJ*) [44], [45], [46]. Speziell für ARID1A konnte gezeigt werden, dass es in der Nähe von Doppelstrangbrüchen nachweisbar ist und dort unter anderem mit dem DNA-Reparaturprotein ATR interagiert [47]. Des Weiteren ist der Verlust von ARID1A mit einer fehlerhaften Replikation und einer verlängerten Mitose durch die eingeschränkte Trennung von Schwesterchromatiden assoziiert [48], [49], [50].

1.6 ARID1A in der Onkologie

1.6.1 Mutationen und Bedeutung als Tumorsuppressor

Mutationen von *ARID1A* zählen zu den häufigsten genetischen Veränderungen in soliden Tumoren. Insbesondere beim Ovarialkarzinom bestehen Prävalenzen von bis zu 50 % [51]. In einer Metaanalyse von 44 Exom- und Gesamtgenom-Sequenzierungsstudien zeigte sich eine hohe Mutationsrate der Untereinheiten des SWI/SNF-Komplexes in multiplen Tumorentitäten [52]. Die Mutationslast im SWI/SNF-Komplex lag höher als bei den verglichenen etablierten Tumorsuppressorgenen. *ARID1A* war die am häufigsten mutierte Untereinheit im SWI/SNF-Komplex. Dies legt nahe, dass der Verlust von ARID1A eine zentrale Rolle in der Krebsentstehung oder beim Krankheitsprogress spielt.

Der funktionale Hintergrund von ARID1A als Tumorsuppressor ist noch nicht endgültig aufgeschlüsselt. Der Effekt eines Verlustes von ARID1A auf die Tumorentstehung oder Progression basiert am ehesten auf der eingeschränkten Regulation von Transkriptionsfaktoren und DNA-Reparaturmechanismen (siehe 1.5) [53].

Mehrere *in vivo*-Studien am Mausmodell haben die Rolle eines ARID1A-Verlustes in diesem Kontext untersucht. In einer Arbeit traten bei *ARID1A*-Defizienz im Darmepithel von Mäusen vermehrt Kolonkarzinome auf [54]. Ein wesentlicher Mechanismus bestand in der verminderten Anreicherung des SWI/SNF-Komplexes im Bereich von *Enhancern*, so dass relevante Gene für die Zellentwicklung und Differenzierung nicht exprimiert werden. In einem weiteren Mausmodell eines ARID1A-Verlustes im Epithel des Ovars zeigte sich eine deutliche Zunahme an Karzinomen nur bei zusätzlichem Verlust eines weiteren Tumorsuppressorgens [55]. Beim Leberzellkarzinom scheint die fehlende Expression von *ARID1A* vor der Tumorentstehung zu schützen, während ein ARID1A-Verlust bei bereits bestehenden Tumoren zu aggressiveren Phänotypen führt [56].

Die Bedeutung einer verminderten *ARID1A*-Expression als prognostischer Faktor für Patienten ist ebenfalls kontextabhängig. Für einige Tumore wie das Zervixkarzinom ist der Verlust mit einer schlechteren Prognose und einem verminderten Gesamtüberleben assoziiert [57]. Bei Patienten mit einem invasiven

Urothelkarzinom ist eine verminderte Expression von *ARID1A* hingegen mit einer guten Prognose und einem geringeren Progressionsrisiko assoziiert [58].

1.6.2 Synthetische Letalität und therapeutische Ansätze

Synthetische Letalität bedeutet, dass der Verlust von zwei Genen oder Signalwegen gemeinsam zum Zelluntergang führt, während der einzelne Verlust keine gravierenden Folgen hat. In der Krebstherapie wird dies genutzt, um Tumorzellen gezielt durch Hemmung eines zweiten, komplementären Signalwegs abzutöten. Aufgrund der hohen Rate an Mutationen von *ARID1A* besteht ein möglicher therapeutischer Nutzen.

In mehreren *in vitro*- und *in vivo*-Studien an *ARID1A*-defizienten Tumorzellen zeigten diese eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber verschiedenen Wirkstoffen. Hierzu zählen unter anderem Inhibitoren der DNA-Reparaturenzyme ATR und PARP [59], [60]. Zudem zeigte sich in Tumoren mit *ARID1A*-Verlust ein verbessertes Ansprechen auf Inhibitoren epigenetischer Enzyme, wie Histon-Methyltransferasen (EZH2) oder -Deacetylasen (HDAC6) [61], [62], [63]. In einer weiteren Studie zeigte sich im Mausmodell verschiedener *ARID1A*-defizienter Tumoren eine im Vergleich zur Kontrolle deutlich gesteigerte Ansprechrate auf eine Immuntherapie (PD-L1-Inhibitoren) [64], [65].

Ein weiterer therapeutischer Ansatz ist die medikamentöse Hemmung von Einheiten des SWI/SNF-Komplexes. Dies hat zur Entwicklung neuer Wirkstoffe geführt, die beispielweise *ARID1A* als Ziel haben [66], [67]. Für die Kombination von *ARID1A*- und ATR-Inhibitoren konnte ein synergistischer Effekt *in vitro* demonstriert werden [68].

Diese präklinischen Ergebnisse werden nun in klinischen Studien übertragen. So untersucht beispielsweise die ATARI-Studie den Nutzen von ATR- und PARP-Inhibitoren für Patientinnen mit *ARID1A*-defizienten Ovarial- oder Endometriumkarzinomen [69].

1.6.3 ARID1A in Keimzelltumoren

Keimzelltumoren zeigen im Vergleich zu anderen Krebserkrankungen eine geringe Mutationslast, während in der Tumorgenese vor allem Verdopplung des Genoms (Tetraploidisierung) und epigenetische Veränderungen bestimmend sind [18], [19]. Daher treten Mutationen von *ARID1A* in Keimzelltumoren eher selten auf (< 1 % in der größten Kohorte mit 631 sequenzierten Fällen) [70]. Dies betrifft auch Mutationen im paralogen Gen *ARID1B*, wobei es sich hier zudem ausschließlich um Varianten unklarer Signifikanz handelt. Somit ist unklar, ob die identifizierten Mutationen in *ARID1B* einen pathogenen Effekt haben oder benigne sind. Amplifizierungen oder Veränderungen in der Expression von *ARID1A* und weiteren Komponenten des SWI/SNF-Komplexes sind ebenfalls selten beschrieben [18].

Dennoch scheint ARID1A ein mögliches therapeutisches Ziel in der Behandlung von Keimzelltumoren zu sein. Nettersheim et al. konnten ein starkes Ansprechen von Keimzelltumoren auf den Histondeacetylase-Inhibitor Romidepsin nachweisen [71]. Hier kam es bereits bei niedrigen Wirkstoffkonzentrationen zur Apoptoseinduktion in Keimzelltumorzelllinien. In Kontrollzelllinien wurde nach der Behandlung keine erhöhte Letalität beobachtet. Bei der Untersuchung des molekularen Mechanismus *in vitro* und *in vivo* erwies sich eine Herunterregulierung von *ARID1A* als zentraler Schritt [72]. Die Herunterregulierung von *ARID1A* trat infolge einer Histon-Hypoacetylierung im Bereich des Promotors auf. Dies führte zur vermehrten Expression von Genen, die mit Stress, Apoptose und dem Zellzyklus in Zusammenhang stehen.

1.7 Ziele der Arbeit

Trotz bedeutender Fortschritte in der Behandlung von Keimzelltumoren (KZT) bleiben zentrale Herausforderungen bestehen. Dazu zählen insbesondere die Behandlung von Rezidiven, die Reduzierung von Nebenwirkungen etablierter Therapien und die Überwindung von Therapieresistenzen. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit, neue therapeutische Ansätze zu erforschen.

Vorarbeiten zu Keimzelltumoren haben gezeigt, dass die Herunterregulierung von

ARID1A eine zentrale Rolle bei der toxischen Wirkung des HDAC-Inhibitors Romidepsin spielt. Der Verlust von *ARID1A* eröffnet zudem in mehreren Tumorarten therapeutische Optionen, da *ARID1A*-defiziente Tumore sensibler auf die Hemmung von DNA-Reparaturprozessen oder epigenetischen Mechanismen reagieren. Daher erscheint es vielversprechend, zu untersuchen, ob der Effekt der synthetischen Letalität auch auf Keimzelltumoren übertragbar ist.

Das Ziel dieser Studie ist es, die Auswirkungen eines *ARID1A*-Verlustes oder -Inhibition auf das Therapieansprechen gegenüber verschiedenen Wirkstoffen in Keimzelltumoren zu untersuchen. Hierfür werden zunächst *ARID1A*-defiziente Keimzelltumorzelllinien etabliert. Diese werden mittels Viabilitätsassays, auf ein mögliches verbessertes Ansprechen gegenüber Inhibitoren von DNA-Reparaturenzymen oder epigenetischen Enzymen untersucht. Zusätzlich werden Veränderungen des Zellzyklus oder der Apoptoseraten untersucht. Darüber hinaus setzen wir in Keimzelltumor-Zelllinien zwei *ARID1A*-Inhibitoren ein, um kurzfristige pharmakologische Effekte und mögliche additive Wirkungen zu analysieren.

Ergänzend erfolgt eine molekulare Analyse der RNA-Expression und des Proteoms sowie der Auswirkungen auf die DNA-Reparatur nach Verlust oder Hemmung von *ARID1A*.

Auf Basis dieser Arbeit könnten, bei erfolgreicher Testung der Wirkstoffe, weitere Untersuchungen zur molekularen Wirkweise durchgeführt und die Ergebnisse in ein *in vivo*-Modell übertragen werden. Diese Studie legt somit den Grundstein für die potenzielle therapeutische Nutzung der *ARID1A*-Hemmung bei Keimzelltumoren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Humane Zelllinien

Übersicht über die verwendeten humanen Zelllinien. Als KZT-Zelllinien wurden in dieser Arbeit TCam-2, 2102EP, NCCIT und JAR untersucht. In den Versuchen wurden jeweils Cisplatin-resistente Subklone der Zelllinien 2102EP und NCCIT verwendet. Als Kontrolle dienten die Fibroblasten MPAF.

STR-Analysen wurden regelmäßig durchgeführt.

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten humanen Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Erhalten von
TCam-2; TCam-2 <i>ARID1A</i> ^{-/-}	Seminom	Dr. Janet Shipley (Institute of Cancer Research, Sutton, England)
2102EP	Embryonalkarzinom	Dr. Christoph Oing, II. Medizinische Klinik, UKE, Hamburg-Eppendorf
NCCIT; NCCIT-resistente	Embryonalkarzinom	Dr. Christoph Oing, II. Medizinische Klinik, UKE, Hamburg-Eppendorf
JAR	Chorionkarzinom	American Type Culture Collection (ATCC), HTB-144™
MPAF	Fibroblasten	Dr. Michael Peitz (Life & Brain, Bonn, Germany)

2.1.2 Zellkulturmedien

Die Zelllinien wurden in unterschiedlichen Zellkulturmedien mit jeweils spezifischen Supplementen kultiviert.

Zu jedem Medium wurde fetales Kälberserum (FCS; aus dem Englischen für *fetal calf serum*) hinzugegeben, um die benötigten Proteine und Wachstumsfaktoren bereitzustellen. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden 50 U/ml Penicillin/Streptomycin (P/S) beigemischt. Den Medien wurden zusätzlich 200nM L-

Glutamin und/oder nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA; aus dem Englischen für *non-essential amino acids*) supplementiert.

Übersicht der zelllinienspezifischen Medien inklusive der jeweiligen Supplemente.

Tabelle 2: Verwendete Zellkulturmedien

Zelllinie	Medium	Supplemente
TCam-2; TCam-2 <i>ARID1A</i> ^{-/-}	RPMI Medium 1640 (1X)	10 % FCS 50 U/ml P/S 200 nM L-Glutamin
2102EP NCCIT; NCCIT-resistente JAR	DMEM (1X) + GlutaMAX™-I	10 % FCS 50 U/ml P/S 200 nM L-Glutamin
MPAF	DMEM (1X) + GlutaMAX™-I	10 % FCS 50 U/ml P/S 200 nM L-Glutamin NEAA

2.1.3 Materialien der Zellkultur

Für die Zellkultur wurden die folgenden Materialien verwendet.

Tabelle 3: Materialien der Zellkultur

Kategorie	Artikel	Hersteller
Chemikalien und Reagenzien	(D)PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Gibco (Schwerte, Deutschland)
	DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
	FCS (Fetal Calf Serum)	MERCK (Darmstadt, Deutschland)
	L-Glutamin	Gibco (Schwerte, Deutschland)

Kategorie	Artikel	Hersteller
	Penicillin/Streptomycin	Gibco (Schwerte, Deutschland)
	RPMI-Medium	Gibco (Schwerte, Deutschland)
	Trypanblau 0,4 %	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
	Trypsin-EDTA 0,05 %	Gibco (Schwerte, Deutschland)
Geräte und Software	Automatischer Zellzähler TC20TM	BioRad (Feldkirchen, Deutschland)
	CO ₂ -Inkubator HeraCell 150i	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)
	Mikroskope Ts2, TE2000-S	Nikon (Düsseldorf, Deutschland)
	NIS Elements Software (Mikroskop)	Nikon (Düsseldorf, Deutschland)
	Zentrifuge 5810	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)

2.1.4 Verwendete pharmakologische Inhibitoren

Die in dieser Arbeit verwendeten ARID1A-Inhibitoren (Compound 63 und BRD-K98645985) wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. E. Dykhuizen (Purdue University, West Lafayette, USA) zur Verfügung gestellt.

Die gelösten Inhibitoren wurden bei -80°C gelagert. Cisplatin in ungelöster Form wurde bei Raumtemperatur gelagert.

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete pharmakologische Inhibitoren

Zielstruktur	Inhibitor	Hersteller	Lösungsmittel
ARID1A	Compound 63	Prof. E. Dykhuizen	DMSO
ARID1A	BRD-K98645985	Prof. E. Dykhuizen	DMSO
ATR	VE-822/VX-970	Cayman Chemical	DMSO
EZH2	GSK126	Cayman Chemical	DMSO
HDAC6	YAK61	Prof. T. Kurz	DMSO
HSP90	PU-H71	Selleckchem	DMSO
PARP	Olaparib	Cayman Chemical	DMSO
DNA	Cisplatin	Accorde Health Care	NaCl-Lösung

2.1.5 Isolierung von genomischer DNA

Für 100mL DNA-Lysis Puffer wurden 5 M NaCl (2 mL), 1M TrisHCl (pH8, 1 mL), 0,5 M EDTA (pH8, 5 mL) und 10 % SDS (5 mL) in 87 mL Millipore-Wasser gelöst.

Tabelle 5: Materialien zur Isolierung genomischer DNA

Artikel	Hersteller
Ethanol absolute	VWR Chemicals (Darmstadt, Deutschland)
Roti-Phenol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Proteinase K	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Aqua (DNase-frei) (W4502-1L)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Natriumchlorid	VWR Chemicals (Darmstadt, Deutschland)
Tris (Trisaminomethan)	VWR Chemicals (Darmstadt, Deutschland)
SDS ultra-pure (Dodecylsulfat)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	MERCK (Darmstadt, Deutschland)

2.1.6 RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation wurde das RNeasy Mini Kit von Qiagen verwendet.

Tabelle 6: Materialien zur RNA-Isolation

Artikel	Hersteller
RNeasy Mini Kit (Cat. No. 74106)	Qiagen (Hilden, Deutschland)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

2.1.7 PCR und cDNA-Synthese

Für die PCR und die cDNA-Synthese wurden die folgenden Materialien verwendet.

Tabelle 7: Materialien zur PCR und cDNA-Synthese

Artikel	Hersteller
dNTP-Mix (10mM)	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)
Oligo(dT)18 Primer	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)
RT Buffer (5x)	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)
Maxima H Minus Reverse Transcriptase	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)
10x Buffer	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)
Taq Polymerase	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)
Geräte	
S1000 cyclor	BioRad (Feldkirchen, Deutschland)
NanoDrop 2000	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)

2.1.8 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden die folgenden Materialien verwendet.

Tabelle 8: Materialien zur Agarose-Gelelektrophorese

Artikel	Hersteller
Agarose (A9539-500G)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
TAE Puffer 10x	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
GeneRuler 100bp DNA-Leiter	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)
Ethidiumbromid	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Geräte	
Gel iX II Manager	Intas (Göttingen, Deutschland)
Biometra P25/T Netzgerät	Analytik Jena (Jena, Deutschland)

2.1.9 qRT-PCR

Für die qRT-PCR wurden die folgenden Materialien verwendet.

Tabelle 9: Materialien zur qRT-PCR

Artikel	Hersteller
Luna Universal qPCR Master Mix	New England Biolabs (Frankfurt a.M., Deutschland)
FrameStar 384 Well PCR Plate	4titude (Berlin, Deutschland)
CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System	BioRad (Feldkirchen, Deutschland)

2.1.10 CRISPR/Cas9-Transfektion

Für die CRISPR/Cas9-Transfektion wurden die folgenden Materialien verwendet.

Tabelle 10: Materialien zur CRIPR/Cas9 Transfektion

Artikel	Hersteller
ARID1A CRISPR/Cas9 KO Plasmid (sc-400469)	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)
FuGeneHD	Promega (Walldorf, Deutschland)

2.1.11 PCR-Klonierung und Sanger-Sequenzierung

Für die Klonierung wurde das „TA Cloning® Kit“ von Thermo Fisher Scientific verwendet. Das Plasmid wurde anschließend in „One Shot™ TOP10 *E.coli*“ eingebracht.

Die Sanger-Sequenzierung wurde vom „Genomics & Transcriptomics Labor“ (GTL) des Biomedizinischen Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf als Dienstleistung durchgeführt.

Tabelle 11: Materialien zur PCR-Klonierung und Sanger-Sequenzierung

Artikel	Hersteller
The Original TA Cloning® Kit	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)
One Shot™ TOP10	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)
ZR Plasmid Miniprep™-Classic (D4016)	Zymo Research (Freiburg, Deutschland)
kelvitron®t -Inkubator	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Innova 4200 Incubator Shaker	New Brunswick Scientific (Nürtingen, Deutschland)
BD Difco LB-Agar	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)

2.1.12 XTT-Assay

Zur photospektrometrischen Messung der XTT-behandelten Platten wurde die Software „Microplate Manager 6“ genutzt.

Tabelle 12: Materialien für das XTT-Assay

Artikel	Hersteller
iMark™ Microplate Reader	BioRad (Feldkirchen, Deutschland)
XTT (1 mg/ml gelöst in RPMI-Medium)	Neofroxx (Einhausen, Deutschland)
Phenazinemethosulfat (PMS) (1,25 mM in PBS gelöst)	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)

2.1.13 Immunzytochemie

Für die Immunzytochemie wurden die folgenden Materialien verwendet.

Tabelle 13: Materialien für die Immunzytochemie

Artikel	Hersteller
Formaldehyd	BioRad (Feldkirchen, Deutschland)
Axio Imager Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
DAPI	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Triton-X	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Ziegenserum (10%)	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)
Glycin	MERCK (Darmstadt, Deutschland)

2.1.14 Antikörper

In dieser Arbeit wurden die unten genannten Antikörper verwendet.

Tabelle 14: Verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller	Konzentration
Primäre Antikörper		
ARID1A (12354)	Cell Signaling (Frankfurt a.M., Deutschland)	1:500 (WB) 1:50 (IF)
Beta-Actin (A5441)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)	1:20000
Vinculin (05-386)	MERCK	1:2000

Antikörper	Hersteller		Konzentration
	(Darmstadt, Deutschland)		
Phospho-Histon H2AX (2577)	Cell Signaling	(Frankfurt a.M., Deutschland)	1:50
Sekundäre Antikörper			
Polyclonal Rabbit Anti-Mouse HRP (P026002-2)	Dako	(Jena, Deutschland)	1:1000
Polyclonal Goat Anti-Rabbit HRP (P044801-2)	Dako	(Jena, Deutschland)	1:2000
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 488 (A11029)	Thermo Scientific	(Schwerte, Deutschland)	1:2000
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor 488 (A11034)	Thermo Scientific	(Schwerte, Deutschland)	1:2000

2.1.15 Oligonukleotide

In dieser Arbeit wurden die unten genannten Oligonukleotide verwendet.

Tabelle 15: Verwendete Oligonukleotide

Zielgen	„Forward Primer“	„Reverse Primer“
qRT-PCR		
<i>ARID1A_1</i>	TCTTGCCCATCTGATCCATT	CCAACAAAGGAGCCACCAC
<i>ARID1A_2</i>	CGCAGCAAGGACATGGGTA	ATGGAGTCTGGCCCTGTTGA
<i>ARID1A_3</i>	TCTCAGCAGTCCCAGCAAAC	AGGCAAGCTGGAGGGTCTT
<i>ARID1B</i>	CAAGGGGATCAGAGCAACCC	CTACCTGGGATACTTGCAGGA
<i>ATF3</i>	AAGAACGAGAAGCAGCATTTGAT	TTCTGAGCCCGGACAATACAC
<i>ATM</i>	TGGATCCAGCTATTTGGTTTGA	CCAAGTATGTAACCAACAATAGAAGAAGTAG
<i>ATR</i>	CAGCTTTGTGCCATTACTG	CTACCTCAATTCCAAGCACA
<i>CDKN1A</i>	CCTCATCCCGTGTCTCCTTT	GTACCACCCAGCGGACAAGT
<i>CHEK1</i>	ATATGAAGCGTGCCGTAGACT	TGCCTATGTCTGGCTCTATTCTG
<i>DUSP1</i>	GTACATCAAGTCCATCTGAC	GGTTCTTCTAGGAGTAGACA
<i>ETAA1</i>	GAGAATTTCCATACATTCCCCTTT	CTAAACAAGGAAGTAATTTGGTACAATCAA
<i>FGF4</i>	TTCTTCGGGCCATGAGCAG	CCGAAGAAAGTGCACCAAGG
<i>FOS</i>	GAGAGCTGGTAGTTAGTAGCATGTTGA	AATTCCAATAATGAACCCAATAGATTAGTTA

Zielgen	„Forward Primer“	„Reverse Primer“
<i>GADD45B</i>	GTCGGCCAAGTTGATGAAT	CACGATGTTGATGTCGTTGT
<i>GAPDH</i>	TGCCAAATATGATGACATCAAGAA	GGAGTGGGTGTCGCTGTTG
<i>ID2</i>	TCAGCCTGCATCACCAGAGA	CTGCAAGGACAGGATGCTGATA
<i>P53</i>	TTGCAATAGGTGTGCGTCAGA	AGTGCAGGCCAACTTGTTTCTCAG
<i>SMARCA4</i>	CAGCATGCCAAGGATTTCAAG	CGATCCGCTCGTTCTCTTTC
<i>SMARCB1</i>	AACGTCAGCGGGTTCAAAT	GCCTTCACCTGGAACATGAA
<i>TOP2A</i>	AGTCATTCCACGAATAACCA	TTCACACCATCTTCTTGAG
<i>TOPBP1</i>	TGTGACTGGCTTATGTGGCT	TGGCACACTCATACTTCTGACC
<i>ZMYND11</i>	TTGTTAAACGTGCCATGACC	GCATGTGTGGAGACAGAGGA
Genotypisierung-PCR		
<i>ARID1A</i> flank	GCGGTACCCGATGACCATGC	TACTGGAGGTCATTGAGGGG
guideRNA <i>ARID1A</i> CRISPR/Cas9		
gRNA_1	GCGGTACCCGATGACCATGC	
gRNA_2	ATGGTCATCGGGTACCGCTG	
gRNA_3	CCCCTCAATGACCTCCAGTA	

2.1.16 Plastik- und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 16: Plastik- und Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller
Costar® Reagenzreservoir, 50 ml	Corning (Kaiserslautern, Deutschland)
Glas-Pasteur-Pipetten	Brand (Wertheim, Deutschland)
Multikanalpipette	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Pipetten 10µl, 100µl, 1000µl	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Reaktionsgefäße 0,5µl, 1,5µl, 2µl	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Reaktionsgefäße 15ml, 50ml	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
T-75 Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Zellkultur-Platte 6-Well	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)

Artikel	Hersteller
Zählkammer für TC20 Cell Counter	BioRad (Feldkirchen, Deutschland)
Zellkultur-Mikroplatte 96-Well	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Zellschaber (39cm)	Corning (Kaiserslautern, Deutschland)
Bakterien Reaktionsgefäß (mit Belüftungsstopfen, 4,5ml)	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung und Passagieren der Zelllinien

Die humanen Keimzelltumorzelllinien wurden in DMEM- oder RPMI-Medium mit den jeweils zelllinienabhängigen Supplementen (siehe Tabelle 2) in T-75-Flaschen bei 37 °C und 7,5 % CO₂ kultiviert [73].

Abhängig von der jeweiligen Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Zelllinien bei einer Konfluenz von 70 - 90 % passagiert.

Nach dem Absaugen des Zellmediums wurden die Zellen durch Zugabe von 4 ml PBS gewaschen. Um die adhärent wachsenden Zellen anschließend vom Flaschenboden zu lösen, wurde das PBS wieder abgesaugt und 1 ml Trypsin (0,05 %) für bis zu 5 Minuten bei 37°C hinzugegeben. Im nächsten Schritt wurde die Reaktion des Trypsins durch die Zugabe von 4 ml FCS-haltigem Medium gestoppt. In eine neue T-75 Flasche wurden dann 15 ml Medium vorgelegt und abhängig vom Wachstumsverhalten der Zelllinie ein Teil der Zellsuspension dazugegeben.

2.2.2 Zellzählung

Die Zellzahl wurde nach einer Trypanblau-Färbung mithilfe eines automatischen Zellzählers (TC20TM, BioRad) bestimmt. Hierfür wurden 10 µl Trypanblau (0,4 %) mit 10 µl Zellsuspension vermengt und anschließend davon 10 µl in eine Zählkammer (BioRad) gegeben. Für die weiteren Experimente wurde die Zahl vitaler Zellen pro mL verwendet.

2.2.3 Transfektion von Zellen zur Geneditierung

Zur Generierung von *ARID1A*-defizienten Zellen wurde die CRISPR-Cas9-Methode verwendet. Hierbei bindet die Endonuklease Cas9 an synthetische guideRNA und induziert an der zur guideRNA komplementären Stelle Doppelstrangbrüche (DSB) in der genomischen DNA. Ein pX330-Vektor, der für drei verschiedene *ARID1A*-spezifische guideRNAs codiert (Santa Cruz Biotechnology) (guideRNA siehe Tabelle 15), wurde mithilfe des non-liposomalen „FuGeneHD Transfection Reagent“ (Promega) in die Zellen eingebracht.

Hierzu wurden zuerst 1×10^5 Zellen in ein 6-Well mit 2 ml in Medium ausgesät und für 24 h kultiviert. Der pX330-Vektor wurde in Medium ohne Zusätze im Verhältnis 1 µg/ 100 µl diluiert. Für den Transfektionsansatz wurde das „FuGeneHD Transfection Reagent“ für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit dem pX330-Vektor Ansatz inkubiert (Verhältnis 1:5 (µg DNA: µL „FuGENE“) [73]. Im nächsten Schritt wurden nach Wechsel auf 2 ml antibiotikafreies Medium 100 µl des beschriebenen Transfektionsansatzes zu den Zellen gegeben. Am Folgetag erfolgte der Wechsel auf das Standardmedium (2 ml) mit Pen/Strep. Wiederum 24 h später wurden die transfizierten Zellen auf 96-Well-Platten vereinzelt, expandiert und anschließend auf eine Deletion im *ARID1A*-Gen hin untersucht. Für die verwendete PCR-Strategie siehe Abbildung 7.

2.2.4 Messung der Zellviabilität

Zur Messung der Zellviabilität und der Zytotoxizität der Inhibitoren wurde die Methode des XTT-Assays genutzt.

XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide sodium salt) ist ein leicht gelber Farbstoff, der sich durch die Reduktion seines Tetrazolringes hell orange verfärbt. Der Test basiert auf der enzymatischen Aktivität von lebenden Zellen. Hier werden durch mitochondriale Dehydrogenasen ausreichend Reduktionsstoffe gebildet, welche an der Zellmembran für die Bildung des farbigen Reaktionsproduktes verantwortlich sind. PMS (N-methyl dibenzopyrazine methyl sulfate) dient bei dieser Reaktion als Elektronenüberträger.

Für den XTT-Assay wurden zuerst auf einer 96-Well-Platte 4000 Zellen pro Well in 50 µl Medium ausgesät. Zusätzlich wurden 50 µl Medium ohne Zellen als Leerwert (*blank*) in acht Wells pipettiert.

Im nächsten Schritt 24 h nach der Aussaat wurden die Zellen mit dem Inhibitor oder der jeweiligen Lösemittelkontrolle behandelt. Für jede Konzentration wurden Quadruplikate erstellt. Bei der Doppelbehandlung mit zwei Inhibitoren wurde zuerst der ARID1A-Inhibitor zu den Zellen gegeben und 24 h später der zweite Inhibitor hinzugefügt.

Um einen ausreichend langen Reaktionszeitraum zu gewährleisten wurden die Zellen für vier Stunden mit 50 µl XTT (1 mg/ml) plus 0,5 µl PMS (1,25 mM) inkubiert. Nachfolgend wurde die Absorption mit einem UV/VIS Spektrometer (BioRad) bei 450 nm (Formazan) und 650 nm (Hintergrundabsorption der Proben) gemessen. Der gemittelte Leerwert und der gemittelte Lösemittelwert wurden von jedem Probenwert subtrahiert und folgend der Mittelwert der Probenquadruplikate gebildet.

Über einen Zeitraum von 96 h wurde die Zellviabilität in Abständen von 24 h bestimmt und anschließend grafisch aufgetragen.

Es wurden jeweils drei unabhängige Experimente pro Zelllinie und Inhibitor durchgeführt.

2.2.5 Isolation von genomischer DNA

Die DNA-Isolation wurde mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließender Ethanolfällung durchgeführt.

Hierfür wurden zuerst 2×10^5 Zellen in ein 6-Well mit 2 mL Medium ausgesät und für 48 h inkubiert. Bei dicht bewachsener Platte wurde anschließend das Medium abgesaugt und die Zellen wurden mit 500 µL PBS gewaschen. Nach erneutem Absaugen wurden die adhärenenten Zellen durch zugeben von 150 µL Trypsin (0,05 %) und 5-minütiges inkubieren bei 37° C abgelöst. Die Reaktion des Trypsins wurde daraufhin mit 1 mL Medium abgestoppt und die gesamte Zellsuspension in ein 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß gefüllt. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen wurden diese nochmals mit 700 µL PBS gewaschen, wiederum abzentrifugiert und das Zellpellet entweder direkt verwendet oder bei -80° C gelagert.

Zu Beginn der Extraktion wurden 300 µl DNA-Lysis-Puffer (siehe Material 1.1.5.), 12,5 µl Proteinase K (10mg/ml) und 40 µl 10 % SDS zum Zellpellet gegeben und das Eppendorf-Reaktionsgefäß anschließend bei 45° C und 1000 rpm für eine Stunde in den Thermomixer gestellt, um das Pellet vollständig zu lösen.

Im nächsten Schritt wurden zu jeder Probe 350 µl Rotiphenol hinzugefügt und für 10 Minuten per Hand geschwenkt. Danach wurden die Proben für 10 Minuten bei 4° C und 10.000 rpm zentrifugiert, so dass sich zwei Phasen bilden. Die obere DNA-haltige Phase wurde vorsichtig in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Zum Ausfällen der DNA wurden 1/10 des Volumens an Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und das dreifache Volumen an 100 % Ethanol dazugegeben und durch Invertieren gemischt. Die Proben wurden im Anschluss bei Raumtemperatur und 12.000 rpm für fünf Minuten zentrifugiert, so dass sich ein DNA-Pellet am Boden bildete.

Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde 1 ml 70 % Ethanol auf das Pellet gegeben und die Probe wieder für fünf Minuten bei 12.000 rpm zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde ein weiteres Mal wiederholt.

Die Probe wurde dann für drei Minuten mit offenem Deckel bei 45° C in den Thermomixer gestellt, um sicherzustellen, dass kein Ethanol in der Probe verbleibt. Zum Schluss wurde die isolierte DNA in 50 µl DNase-freiem Wasser re-suspendiert und bei 4° C gelagert.

2.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) lässt sich ein DNA-Fragment *in-vitro* exponentiell vervielfältigen. Hierbei wird durch Verwendung spezifischer Oligonukleotide (Primer) und einer DNA-Polymerase der gewünschte Genabschnitt gezielt amplifiziert.

Die Konzentration und Qualität der DNA wurde mithilfe eines Spektrophotometers (NanoDrop 2000) anhand des A260/280-Verhältnisses bestimmt. Für die PCR wurden daraufhin 100 ng DNA je Ansatz verwendet.

Anschließend wurde für jede Probe ein Master Mix mit 14,8 µl DNase-freiem Wasser, 2,5 µl 10x Buffer, 0,5 µl dNTP, jeweils 1 µl „Vorwärts-“ und „Rückwärts-Primer“ und 0,2 µl Hot Star Taq Polymerase hergestellt.

Im nächsten Schritt wurden 20 µl Master Mix zu 5 µl DNA (100ng) in PCR-Reaktionsgefäße gegeben und folgendes Protokoll im „S1000-Thermal Cycler“ angewendet:

Tabelle 17: Protokoll der PCR

39x	95°C	15 min
	95°C	30 sec
	62°C	3 min
	72°C	30 sec
	72°C	5 min
	10°C	∞

Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 15 aufgelistet.

2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht ein Auftrennen der amplifizierten DNA-Fragmente nach ihrer Molekülgröße.

Zum Erstellen eines 2 %igen Gels wurden unter Erhitzen 2 g Agarose in 100 ml Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer gelöst und anschließend in eine Laufkammer gegossen. Jeweils 2 µl der PCR-Produkte wurden mit 10 µl Probenpuffer versetzt, um das Absinken der Proben in den Taschen zu gewährleisten und den pH-Wert konstant zu halten. Zur Validierung der Fragment-Größen wurde eine 100 bp DNA-Leiter mitgeführt. Nach dem Pipettieren der Proben in die Taschen wurde für 30 Minuten 120 V Spannung angelegt, so dass die negativ geladenen Nukleinsäuren bei der Wanderung in Richtung der Anode anhand ihrer Molekülgröße aufgetrennt wurden.

Zur Darstellung der Banden wurde das Gel daraufhin für zehn Minuten im Ethidiumbromid-Bad inkubiert. Durch UV-Licht wurde die Fluoreszenz-Emission angeregt und die sichtbaren Banden mit einer Kamera aufgenommen.

2.2.8 Klonierung und Sanger-Sequenzierung

Zur Bestätigung der Geneditierung der *ARID1A*-defizienten Zellen wurde ein Abschnitt des *ARID1A*-Gens mithilfe der Methode nach Sanger sequenziert.

Der durch die PCR amplifizierte Genabschnitt wurde gemäß den Herstellerangaben unter Zuhilfenahme des „TA cloning kit“ (Thermo Fisher Scientific) in den pCR2.1 Vektor geklont. Hierbei betrug das Verhältnis von eingesetzter DNA zu Vektor 3:1. Die in der PCR verwendeten flankierenden Primer sind in Tabelle 15 aufgeführt.

Daraufhin wurden TOP10 *Escherichia Coli* mit dem pCR2.1-Vektor nach Protokoll des „TA cloning kit“ transformiert und über Nacht bei 37° C auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin inkubiert. Nach der Selektion einzelner Kolonien wurden diese wiederum bei 37° C und 200 rpm über Nacht in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin im Schüttler belassen.

Zur Plasmid-Präparation wurde das „ZR plasmid miniprep kit“ (Zymo Research) verwendet.

Als nächstes wurde mithilfe eines EcoR1-HF (New England Biolabs) Restriktionsverdau die Insertion des PCR-Produktes in das Plasmid bestätigt. Hierzu wurde 1 µg Plasmid-DNA für 30 Minuten bei 37° C mit dem Restriktionsenzym in geeignetem Puffer inkubiert und anschließend eine Agar-Gelelektrophorese durchgeführt (siehe Agarose-Gelelektrophorese).

Die Proben wurden im letzten Schritt im „Genomics & Transcriptomics Laboratory“ (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) mittels M13-„Primern“ sequenziert.

2.2.9 RNA-Isolation

Für die Gewinnung des Zellpellets siehe Isolation von genomischer DNA (2.2.5).

Zur Isolation von RNA wurde das säulenbasierte RNeasy Mini-Kit der Firma Qiagen verwendet. In einem ersten Schritt wurden 10 µl β-Mercaptoethanol zu 1 ml RLT-Puffer gegeben und der RPE-Puffer mit dem vierfachen Volumen an Ethanol angesetzt.

Die anschließende Isolation der RNA erfolgte nach Protokoll des Herstellers.

Zur Eluierung der RNA wurde die Säule in ein 1,5 ml Eppendorf Tube gestellt, mit 30 µl RNase freiem Wasser aufgefüllt und für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde die Säule für 1 Minute bei 10.000 g zentrifugiert, so dass

sich RNA im Durchfluss verbleibt. Um den Ertrag an RNA zu erhöhen, wurde der Durchfluss wieder zurück auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert. Die RNA wurde anschließend bei -20° C gelagert.

2.2.10 cDNA-Synthese

Die Konzentration und Qualität der RNA wurde mithilfe eines Photospektrometers (NanoDrop 2000) anhand des A260/280-Verhältnisses bestimmt. Anschließend wurde 1 µg RNA für die reverse Transkription zu komplementärer DNA (cDNA, aus dem Englischen für *complementaryDNA*) verwendet.

Durch Verwendung des Enzyms Reverse Transkriptase wurde aus der isolierten RNA cDNA synthetisiert.

Für die Synthese der cDNA wurden pro Ansatz 7,5 µl eines Master Mix bestehend aus 1 µl dNTP-Mix (10mM), 1 µl Oligo(dT)₁₈ Primer (0,5 µg/µl), 4 µl RT Buffer (5x), 1 µl Maxima H Minus Reverse Transkriptase (200 U/µl) und 0,5 µl RiboLock RNase Inhibitor (40 U/µl) in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert.

Nach Zugabe von 1 µg RNA (12,5 µl) wurden die PCR-Reaktionsgefäße daraufhin im S1000 Thermal Cycler (BioRad) mit folgendem Protokoll inkubiert:

Tabelle 18: Ablauf der cDNA-Synthese



50°C	30min
85°C	5min
4°C	∞

2.2.11 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) ermöglicht durch Fluoreszenzmessungen in jedem PCR-Zyklus die Quantifizierung der gewonnenen DNA. Als interkalierender Fluoreszenzfarbstoff wurde SYBR Green I verwendet.

Für die qPCR wurden 19 µl der cDNA (siehe cDNA-Synthese) in 304 µl DNase-freiem Wasser verdünnt. Anschließend wurde für jedes zu untersuchende Gen ein Mastermix aus 7,5 µl SYBR-green-basiertem Luna qPCR Master Mix, sowie 0,5 µl forward und 0,5 µl reverse Primer pro Zelllinie angesetzt. Von der verdünnten cDNA

und dem Mastermix wurden dann jeweils 8,5 µl zusammen in ein PCR-Tube gegeben und daraufhin in 5 µl Triplikaten auf die 384-Well Platte pipettiert.

Die Messung wurde im CFX384 Touch Thermal Cycler (BioRad) mit folgendem Protokoll durchgeführt:

Tabelle 19: Protokoll der qPCR Messung

	95°C	2 min
39x	95°C	10 sec
	60°C	30 sec
		Plate Read
	95°C	30 sec
Schmelzkurve	95°C-65°C in 0,5°C steps	5 sec
		Plate Read

Zum Schluss erfolgte die Auswertung und Schmelzkurvenanalyse mithilfe des Programms „BioRad CFX Manager“.

Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 15 aufgelistet.

2.2.12 Immunfluoreszenzfärbung

Für den Nachweis des Verlustes von ARID1A, sowie für die Analyse von DNA-Doppelstrangbrüchen wurde die Methode der Immunfluoreszenzfärbung verwendet.

Bei der Etablierung der *ARID1A*-KO-Klone wurden sowohl von den Klonen als auch von den parenteralen Zellen 5×10^4 Zellen pro Well auf eine 96-Well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden 24 h später für 10 Minuten in 4 % Formaldehyd fixiert und im Anschluss die Zellmembranen mit 0,3 % Triton-X in PBS für die eingesetzten Antikörper permeabilisiert. Unspezifische Bindestellen wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur mittels 1,5 % BSA blockiert und der Primärantikörper (1:50) über Nacht bei 4° C auf die Zellen gegeben. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit jeweils 100 µl PBS wurden diese am Folgetag für 1 h in Dunkelheit bei

Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper (1:500) inkubiert. Zur Anfärbung des Zellkerns diente im letzten Schritt 4',6-Diamidin-2-phenylindol Dihydrochlorid (DAPI, Sigma Aldrich).

Das im Zellkern vorliegende 139S-phosphorylierte γ H2AX (γ H2AX-Herde) diente bei der Untersuchung des Effektes der ATR-Inhibition als Surrogatmarker für Doppelstrangbrüche. Zur Analyse wurden 5×10^4 Zellen pro Well auf eine 96-Well Platte ausgesät und mit dem ATR-Inhibitor VE-822 oder DMSO als Lösemittelkontrolle behandelt. Die anschließende Behandlung mit dem Primär- und Sekundärantikörper sowie DAPI fand wie oben beschrieben statt.

Die Anzahl der γ H2AX-Herde wurde ausgewertet (Axio Imager, Carl Zeiss und The Focinator v2-31) und die Daten anschließend als Mittelwert (± 1 SD) von drei unabhängigen Experimenten ≥ 50 Zellkernen dargestellt.

2.2.13 Durchflusszytometrie nach Nicoletti- oder Annexin V/PI Apoptose-Assay

Zur Untersuchung des Zellzyklus wurde der Nicoletti-Assay mit anschließender Durchflusszytometrie eingesetzt. Dabei kam der fluoreszierende Farbstoff Propidiumiodid (PI) zum Einsatz, der in Nukleinsäuren interkaliert. Zunächst wurden die Zellen fixiert, anschließend mit Nicoletti-Puffer permeabilisiert und mit PI gefärbt. Anhand des Fluoreszenzsignals in der Durchflusszytometrie, das proportional zum DNA-Gehalt ist, konnten die Zellen den verschiedenen Phasen des Zellzyklus zugeordnet werden [74].

Zur Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen wurde der Annexin V/PI-Apoptose-Assay verwendet. Das mit einem Fluorochrom gekoppelte Annexin V bindet an Phosphatidylserin (PS), das im Verlauf der Apoptose vermehrt von der Zellinnenseite zur Außenseite der Plasmamembran verlagert wird, während die Membranintegrität in der frühen Apoptose erhalten bleibt. Die gleichzeitige DNA-Färbung mit PI ermöglicht die Unterscheidung zwischen vitalen Zellen (Annexin V⁻ / PI⁻), apoptotischen Zellen (Annexin V⁺ / PI⁻) und nekrotischen Zellen (Annexin V⁺ / PI⁺) [74].

Für beide Assays wurden zunächst 4×10^5 Zellen pro Well auf einer 6-Well-Platte in 2 ml Medium ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte die Behandlung mit C63 und/oder

VE-822 bzw. der Lösemittelkontrolle. Weitere 24 Stunden später wurden die Zellen für die Assays geerntet. Hierzu wurde zunächst der Überstand (2 ml) in ein Polystyrolröhrchen überführt. Die Wells wurden anschließend mit je 1 ml PBS gewaschen, das ebenfalls im Anschluss in das Röhrchen gegeben wurde. Danach wurden die Zellen durch Inkubation mit 0,5 ml Trypsin (0,05 %) für 3–5 Minuten bei 37 °C vom Boden der Wells gelöst. Zur Neutralisation wurde 1 ml Medium hinzugefügt, bevor die gesamte Zelllösung in die Polystyrolröhrchen überführt wurde. So lagen am Ende ca. 4 ml je Probe vor, die für beide Assays aufgeteilt wurden.

Für den Nicoletti-Assay wurden die Röhrchen zweimal bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, mit einem zwischengeschalteten Waschschrift mit 1 ml PBS. Anschließend wurde der Überstand bis auf das Zellpellet abgesaugt. Pro Röhrchen wurden 500 µl Nicoletti-Puffer mit 50 µg/ml PI angesetzt, das Zellpellet resuspendiert und die Probe im Vortex-Mixer vermengt. Danach erfolgte eine 10-minütige Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur, bevor die Proben bis zur Messung auf Eis gelagert wurden. Unmittelbar vor der Messung im Durchflusszytometer wurden die Proben erneut im Vortex-Mixer vermischt.

Für den Annexin V/PI-Apoptose-Assay wurde die Zellsuspension zunächst zentrifugiert (1000 rpm für 5 Minuten), der Überstand entfernt und die Zellen in 1 ml Annexin V-Bindepuffer resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen. Pro Röhrchen wurden 82,5 µl eines Mastermixes angesetzt (70 µl Annexin V-Bindepuffer, 5 µl Annexin V-FITC-Konjugat und 7,5 µl PI), in dem die Zellpellets resuspendiert wurden. Nach einer 15-minütigen Inkubation im Dunkeln wurden weitere 500 µl Annexin V-Bindepuffer pro Probe hinzugefügt. Nach Vermischung mittels Vortex-Mixer wurden die Proben bis zur Messung im Durchflusszytometer auf Eis gelagert.

Die Messung erfolgte für beide Assays mit dem „MACSQuant® Analyzer 10“ (Version 2.13) Durchflusszytometer. Die erhobenen Daten wurden mit der „MACSQuantify Software“ (Version 2.11) analysiert.

2.2.14 Flüssigkeitschromatographie/Massenspektrometrie (LC/MS)

Für die Analyse des Proteoms nach der Inhibition von ARID1A mit Compound 63 (C63) wurden zuerst 5×10^5 Zellen auf einer T-10-Zellkulturplatte ausgesät. Sowohl

24 h als auch 48 h nach der Behandlung mit 5 μ M C63 wurden die Zellen für die Massenspektrometrie aufbereitet.

Hierzu wurde das Medium zuerst auf Eis entfernt und die Zellen anschließend zweifach mit PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mithilfe eines Zellschabers abgelöst und in ein Eppendorf-Röhrchen überführt. Nach einem weiteren Waschschrift in PBS wurden die Zellen in Urea-Puffer mit dem „TissueLyser“ (Qiagen) lysiert und homogenisiert. Aus dem Überstand nach der Zentrifugation der Proben bei 14.000 g für 15 Minuten bei 4° C wurde mithilfe des Pierce 660 nm Protein Assay (Thermo Fisher Scientific) die Proteinkonzentration bestimmt. Hiervon wurden 10 μ g Protein für den In-Gel-Verdau eingesetzt, bei dem die Proben reduziert (50 μ l, 10 mM DTT), alkyliert (50 μ l, 50 mM Iodacetamid) und enzymatisch gespalten wurden (6 μ L, 200 ng Trypsin in 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat). Die Peptide wurden im Anschluss in 0,1 % Trifluoressigsäure gelöst.

Für darauffolgende Analysen wurde ein „QExactive Plus“ Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific) und ein „Ultimate 3000“ Flüssigkeitschromatographie (LC) Schnelltrennungs-System (Thermo Fisher Scientific) ausgestattet mit einer „Acclaim PepMap“ Säule (innerer Durchmesser 75 μ M, Länge 25 cm, Partikelgröße 2 mm, Thermo Fisher Scientific) verwendet. Nach der Auftrennung der Peptide per LC wurde der Phasenwechsel und die Ionisierung der Analyten per Elektrospray-Ionisation (ESI) im Positiv-Modus durchgeführt. Die Kapillartemperatur wurde auf 250° C und die Spannungsquelle auf 1,4 kV festgesetzt. Im *Survey Scan* Modus wurden die Proben im Massebereich von 200 bis 2000 m/z bei einem Auflösungsvermögen von 14.000 untersucht.

Es wurden die zehn am stärksten geladenen Peptid-Ione isoliert, in die Ionenfalle überführt und mittels kollisionsinduzierter Dissoziation weiter aufgespalten.

Die Spektren der Peptidfragmente wurden anschließend mit der Software „Proteome Discoverer“ (version 2.3.0.532, Thermo Fisher Scientific) und der Suchmaschine „Mascot“ (version 2.4, Matrix Science, humane Datenbank in SwissProt) analysiert und identifiziert. Die Quantifizierung der Proteine fand mit der Software „Progenesis QI for Proteomics“ (Version 2.0, Nonlinear Dynamics) statt. Peptide und Proteine wurden bis zu einer Falsch-Positiv-Rate von 5 % akzeptiert und Proteine ab einem Minimum von zwei differierenden Peptiden identifiziert.

Die Daten der Massenspektrometrie wurden für das „ProteomeXChange Consortium“ (<http://proteomecentral.proteomexchange.org/>) bereitgestellt und sind unter der Identifikationsnummer PXD017898 abrufbar.

2.2.15 Onlineanalysen und Software

In dieser Arbeit wurden mithilfe des STRING-Algorithmus Interaktionen von Proteinen vorhergesagt (<https://string-db.org>). Hierbei wurden die Standardeinstellungen verwendet. Die DAVID-Datenbank diente der Zuordnung von Proteinen zu funktionellen Gruppen (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>). Um die TGCA-Daten zu analysieren, wurden der „UCSC Xena Browser“ (<https://xena.ucsc.edu>), „FireBrowse“ (<http://firebrowse.org>) und „cBioPortal“ (<https://www.cbioportal.org>) genutzt.

Die Venn-Diagramme wurden unter Verwendung von „Venny 2.1“ (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) erstellt und die statistische Analyse mittels *t*-Test für unabhängige Stichproben wurde mit dem Online-Tool „Social Sciences Statistics T-Test Calculator for 2 Independent Means“ (<https://www.socscistatistics.com/tests/studentttest/default.aspx>) durchgeführt.

2.2.16 Statistische Auswertung

Der beidseitige *t*-Test für zwei unabhängige Stichproben wurde zur Überprüfung auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Konditionen eingesetzt. Bei einem α -Fehlerniveau von 5 % wurden *p*-Werte von <0.05 als signifikant angesehen. Zusätzlich wurden die errechneten *p*-Werte anhand der post hoc Methode nach Bonferroni ($0,05/\text{Anzahl der Tests}$) auf multiples Testen korrigiert.

2.2.17 Ethikvotum

Bei der Überprüfung durch die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf ergaben sich keine ethischen oder rechtlichen Bedenken gegen die

Verwendung der Zelllinien dieser Arbeit für *in-vitro* Versuche (Ethikvotum 2019-412).

3 Ergebnisse

3.1 Analyse des SWI/SNF-Komplexes in Keimzelltumoren

Um die Expression der verschiedenen Isoformen von *ARID1A* in KZT zu untersuchen, wurde die Datenbank des *Cancer Genome Atlas* (TCGA) genutzt. Insgesamt sind neun Isoformen von *ARID1A* bekannt, von denen laut der TCGA-Datenbank vier in gesundem Hodengewebe oder in KZT vorliegen können. Ausschließlich das am häufigsten vorhandene Transkript ENST00000324856.11 kodiert in voller Länge für das ARID1A-Protein (Abbildung 3).

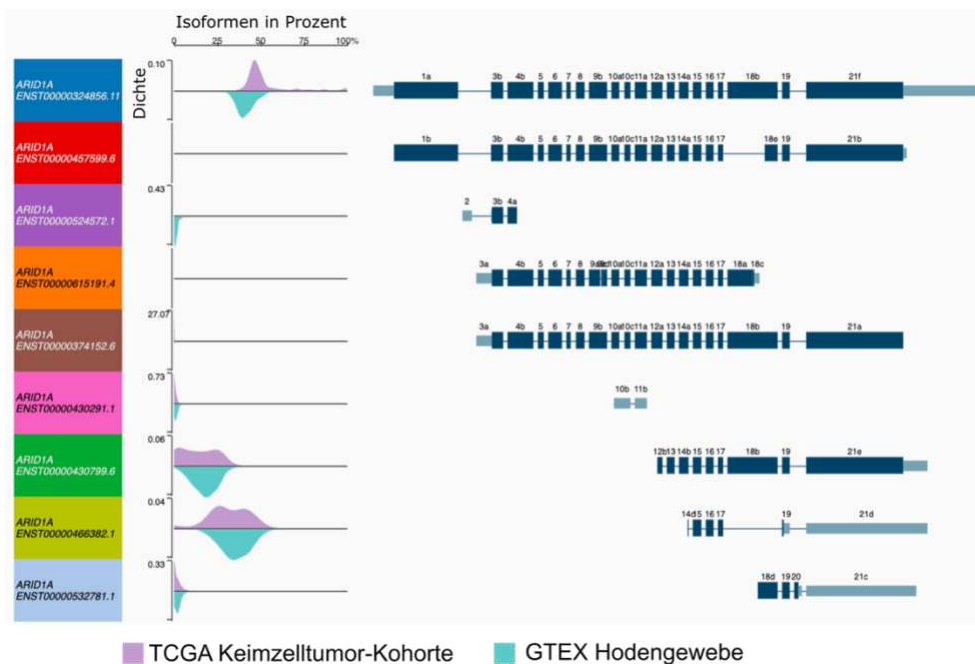


Abbildung 3 ARID1A-Isoformen in Keimzelltumoren.

Basierend auf der TCGA-Datenbank sind die in Keimzelltumoren und gesundem Hodengewebe vorhandenen Isoformen von *ARID1A* prozentual im Dichtediagramm angegeben. Die jeweiligen Transkripte sind mit nummerierten Exons schematisch dargestellt. Grafik erstellt mithilfe von <https://xenabrowser.net/transcripts>. Abk.: *The Cancer Genome Atlas* (TCGA).

Im Anschluss untersuchten wir die Expression von *ARID1A* und weiteren Mitgliedern des SWI/SNF-Komplexes in KZT-Geweben und -Zelllinien. Hierzu

verwendeten wir bereits publizierte laboreigene Daten eines Microarrays [75], [76]. Sowohl in allen Gewebeproben als auch in den Zelllinien konnte eine Expression von *ARID1A* nachgewiesen werden. Zwischen gesundem Gewebe und Tumorgewebe zeigte sich kein wesentlicher Unterschied (Abbildung 4).

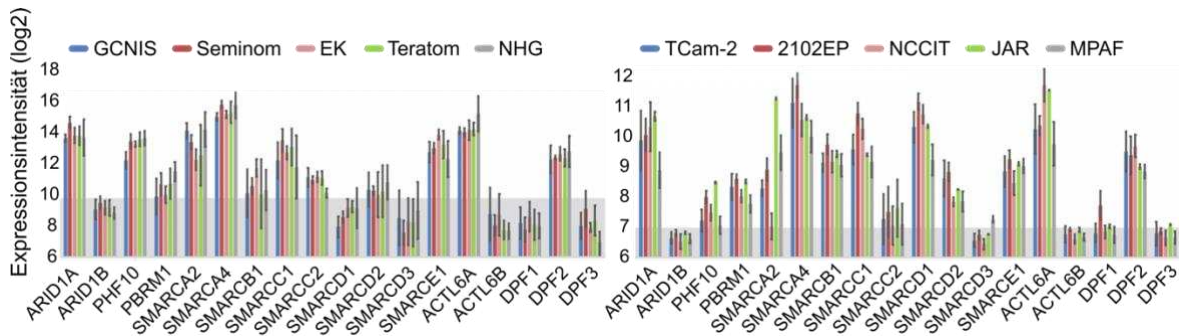


Abbildung 4 Expression der SWI/SNF-Faktoren in Keimzelltumorgeweben und -zelllinien

(links: GCNIS, Seminom, EK, Teratom) und -zelllinien (rechts: TCam-2, 2102EP, NCCIT, JAR). Als Kontrolle wurden normales Hodengewebe (NHG) und die Fibroblasten MPAF inkludiert. Die Daten des Illumina-Microarrays wurden im Rahmen dieser Arbeit re-analysiert und sind über GEO öffentlich verfügbar (ncbi.nlm.nih.gov/geo/ (GSE71239, GSE71269, GSE79065, GSE60698)). Abk.: *germ cell neoplasia in situ* (GCNIS), Embryonalkarzinomgewebe (EK), normales Hodengewebe (NHG).

Im Datensatz des Microarrays wurden zudem die wichtigsten Faktoren des SWI/SNF-Komplexes in KZT hinsichtlich ihrer Expression analysiert, um mögliche Unterschiede zwischen gesundem und Tumorgewebe zu untersuchen. Als Vergleich wurden auch gesundes Hodengewebe sowie Fibroblasten (MPAF) inkludiert. Insgesamt zeigte sich kein wesentlicher Unterschied in der Expression der Faktoren zwischen normalen Zellen und Tumorzellen. Es fiel auf, dass das zu *ARID1A* paraloge Gen *ARID1B* sowohl in allen Gewebeproben als auch in den Zelllinien im Vergleich zur *ARID1A* deutlich schwächer exprimiert wurde (Abbildung 4).

Für die restlichen Faktoren des SWI/SNF-Komplexes zeigte sich ebenso ein übereinstimmendes Bild in den Proben aus physiologischem Hodengewebe und Gewebeproben der KZT-Entitäten (Seminom, Embryonalkarzinom, Teratom). Auch im Vergleich von KZT-Zelllinien mit Fibroblasten zeigte sich kein wesentlicher Unterschied bei der Analyse der einzelnen SWI/SNF-Faktoren: Neben *ARID1A* gehörten *ACTL6A*, *DPF2*, *PHF10*, *PBRM1*, und *SMARCA2/A4/C1/E1* sowohl in den Fibroblasten und dem gesunden Hodengewebe als auch in den KZT-Gewebeproben und -Zelllinien zu den vornehmlich exprimierten Faktoren des

SWI/SNF-Komplexes. In den KZT-Zelllinien waren aufgrund ihrer hohen Expression im Vergleich zu den Fibroblasten vermutlich zusätzlich *SMARCB1* und *SMARCD1* an der Bildung des Komplexes beteiligt (Abbildung 4).

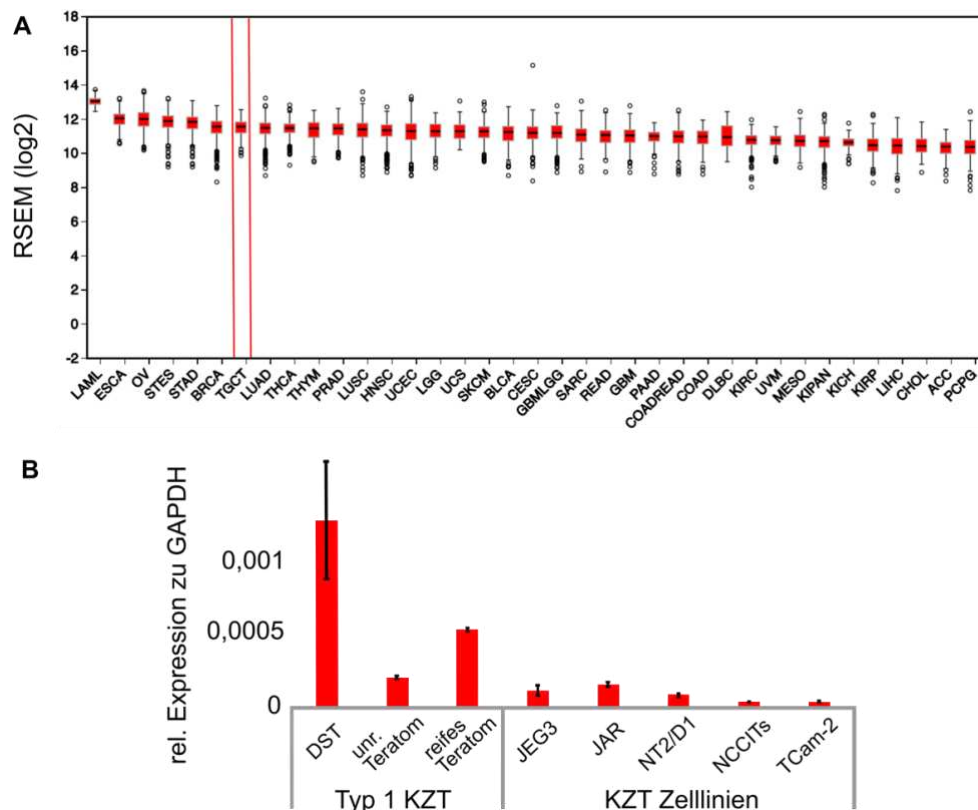


Abbildung 5 *ARID1A*-Expression in Keimzelltumoren

A Vergleich der Expression von *ARID1A* in verschiedenen Tumorentitäten anhand von FireBrowse (firebrowse.org). Testikuläre Keimzelltumoren (TGCT, aus dem Englischen „Testicular germ cell tumor“) sind rot eingerahmt. **B** Analyse der *ARID1A*-Expression mittels qRT-PCR in Gewebeproben von Typ I KZT und Typ II KZT Zelllinien. Verwendung von *GAPDH* als Haushaltsgen. Abk.: Dottersacktumore (DST), unreifes Teratom (unr. Teratom).

Beim Vergleich von Keimzelltumoren mit anderen Tumorentitäten in der TCGA-Datenbank zeigte sich eine ähnliche Expression von *ARID1A* in allen 37 analysierten Entitäten (Abbildung 5 A). In Gewebeproben von kindlichen KZT vom Typ 1 (Teratome und Dottersacktumoren) konnten wir mittels qPCR eine starke *ARID1A*-Expression im Vergleich zu den Typ-2-KZT-Zelllinien nachweisen (Abbildung 5 B).

Die über unser Microarray identifizierten Faktoren des SWI/SNF-Komplexes in Keimzelltumoren wurden anschließend in Hinblick auf molekulare Veränderungen

in KZT-Patientenproben der TCGA-Datenbank (n = 144) mittels „cBioPortal“ untersucht. Die inkludierten Proben wiesen kaum Mutationen auf, zeigten allerdings mehrfach erhöhte mRNA-Level einiger SWI/SNF-Faktoren (siehe Abbildung 6).

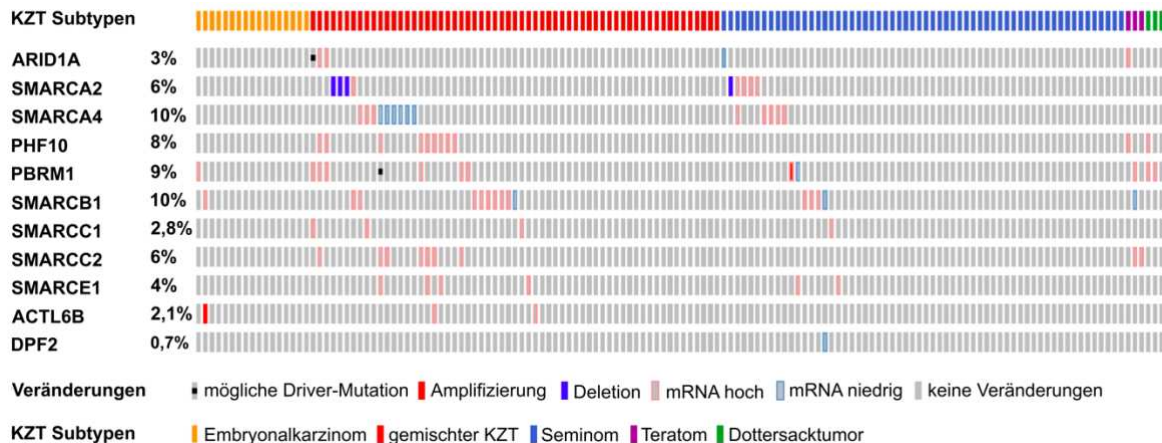


Abbildung 6 Genetische Veränderungen der SWI/SNF Faktoren

Die in Keimzelltumoren (KZT) vornehmlich exprimierten Faktoren des SWI/SNF-Komplexes (siehe Abbildung 4) wurden in der TCGA-Datenbank mithilfe von cBioPortal (cbioportal.org) hinsichtlich Mutationen und Veränderungen auf Ebene der mRNA untersucht.

Zusammenfassend lässt sich formulieren, dass in KZT *ARID1A* in ähnlichem Maße wie in gesundem Hodengewebe exprimiert wird und der gesamte SWI/SNF Komplex selten von Mutationen betroffen ist. Das zu *ARID1A* paraloge Gen *ARID1B* zeigte sowohl im Keimzelltumorgewebe als auch in den Zelllinien eine deutlich geringere Expressionsrate als *ARID1A*. Die vornehmlich exprimierten Faktoren des SWI/SNF-Komplexes waren zudem im Gewebe und den Zelllinien größtenteils deckungsgleich.

3.2 Etablierung von *ARID1A*-defizienten Zellen mittels CRISPR/Cas9 in der Seminomzelllinie TCam-2

Um die molekulare Funktion von *ARID1A* in Keimzelltumoren genauer zu untersuchen, nutzten wir die CRISPR/Cas9-Methode zur Geneditierung der Zellen. Zuerst wurde die Seminomzelllinie TCam-2 als Pilotmodell für die Generierung von *ARID1A*-defizienten Klonen verwendet.

In TCam-2 wurden drei verschiedene guideRNAs transfiziert und damit ein Fragment von 2920 bp Länge aus dem *ARID1A*-Gen herausgeschnitten. Die

applizierten guideRNAs A und B waren komplementär zu einer Sequenz auf Exon 2 des Gens und die guideRNA C zielte auf eine Sequenz auf Exon 4. Hierbei waren guideRNA A und B auf denselben Locus ausgerichtet, allerdings auf die gegenüberliegenden DNA-Einzelstränge.

Mithilfe einer PCR-Strategie (siehe Abbildung 7) wurde die Deletion auf dem *ARID1A*-Gen in den Zellen (TCam-2 *ARID1A*^{-/-}) validiert.

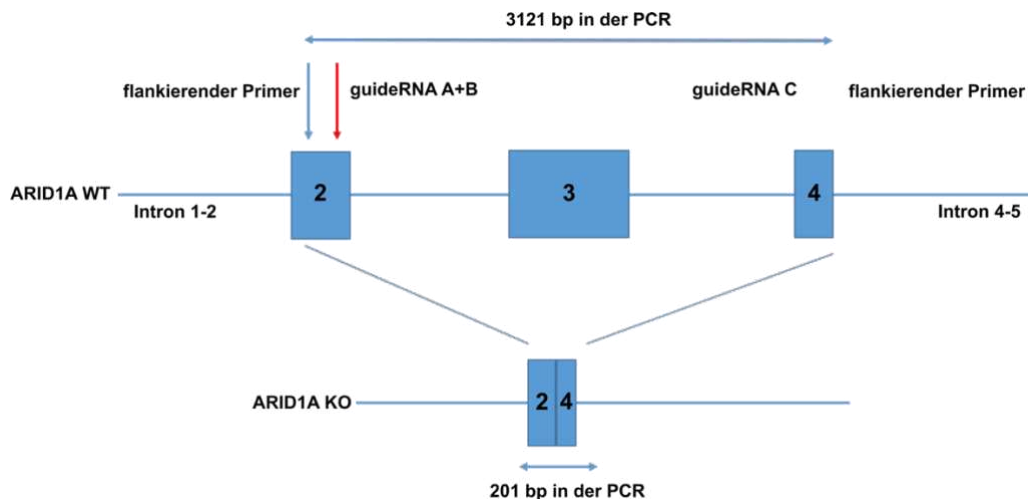


Abbildung 7 PCR-Strategie zur Validierung der Geneditierung

Zur Überprüfung der CRISPR/Cas9-Methode auf genomischer Ebene wurden flankierende Primer verwendet. So wurde in der PCR bei TCam-2 *ARID1A*^{-/-} ein Fragment von 201 bp amplifiziert, bei TCam-2 *ARID1A*^{+/+} betrug die Länge 3121 bp. Im Falle von TCam-2 *ARID1A*^{+/-} wurden sowohl das längere als auch das kürzere Fragment amplifiziert.

Die flankierenden Primer lagen jeweils außerhalb der guideRNAs, so dass bei einer homozygoten *ARID1A*-Defizienz in der PCR ein Fragment von 201 bp amplifiziert wurde und bei intaktem *ARID1A*-Genabschnitt ein Fragment von 3121 bp. Auf diese Weise wurden aus etwa 100 isolierten Klonen acht homozygote TCam-2 *ARID1A*^{-/-} Klone identifiziert (siehe Abbildung 8A). Zusätzlich haben wir mittels Sanger-Sequenzierung auf DNA-Ebene den Verlust des 2920 bp DNA-Abschnitts exemplarisch in drei TCam-2 *ARID1A*^{-/-} Klonen nachgewiesen. Hierbei zeigten sich jeweils minimal unterschiedliche Stellen in der Basensequenz, an denen die DNA-Doppelstrangbrüche wieder repariert wurde. In allen drei Fällen konnte so der Verlust des Genabschnitts bestätigt werden (siehe Abbildung 8B).

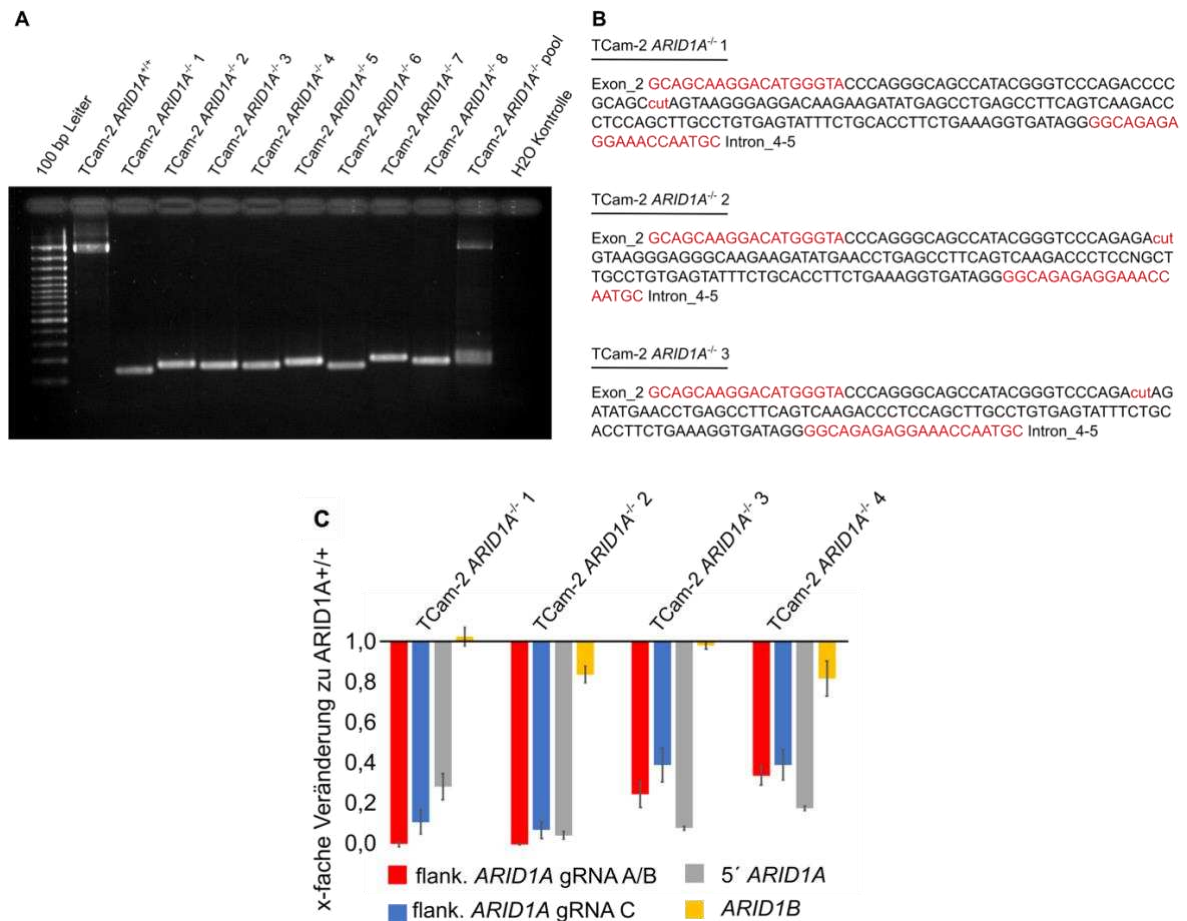


Abbildung 8: Genotypisierungs-PCR und Sanger-Sequenzierung der TCam-2 *ARID1A*^{-/-} Klone.

A Mithilfe der Genotypisierungsstrategie konnten acht homozygote *ARID1A*^{-/-}-Klone in der Agar-Gelelektrophorese bei ca. 200bp identifiziert werden. TCam-2 *ARID1A*^{+/+} und der unselektierte Pool dienten jeweils als Kontrolle. **B** Zusätzlich wurde der Verlust des DNA-Abschnitts im *ARID1A*-Gen in drei Klone exemplarisch mittels Sanger-Sequenzierung bestätigt. In Rot sind die flankierenden Primer hervorgehoben. Der Basenverlust wird durch *cut* symbolisiert. **C** Untersuchung der Expression von *ARID1A* und *ARID1B* mittels qRT-PCR. In den TCam-2 *ARID1A*^{-/-} Klone 1 - 4 zeigte sich eine Herunterregulierung von *ARID1A* und eine unveränderte Expression von *ARID1B* im Vergleich zu TCam-2 *ARID1A*^{+/+}. Als Haushaltsgen und zur Datennormalisierung wurde *GAPDH* verwendet. Abk.: guideRNA (gRNA)

Auch auf mRNA-Ebene zeigte sich in der qPCR eine starke Reduktion der *ARID1A*-Expression. Sowohl beim Einsatz von flankierenden „Primern“ um die guideRNAs, als auch bei „Primern“, die in 5' Richtung vor der Schnittstelle liegen, wurde im Vergleich zu TCam-2 *ARID1A*^{+/+}-Zellen eine stark verminderte Expression von *ARID1A* beobachtet (siehe Abbildung 8C). Zusätzlich zeigte sich in den untersuchten Klone keine Zunahme der Expression von *ARID1B* nach *ARID1A*-Verlust.

Zum Nachweis des Verlustes des ARID1A-Proteins und somit auf der funktionalen Ebene wurde eine Immunfluoreszenzfärbung von ARID1A durchgeführt (Abbildung 9). Hier zeigte sich ein starkes Signal im Zellkern bei TCam-2-*ARID1A*^{+/+}. Die Lokalisation wurde durch Gegenfärbung mit DAPI bestätigt. Die TCam-2-*ARID1A*^{-/-}-Zellen hingegen wiesen kein Signal auf Proteinebene auf.

Vier der acht in diesen Versuchen identifizierten TCam-2-*ARID1A*^{-/-}-Klone (1 - 4) wurden für alle darauffolgenden Experimente verwendet.

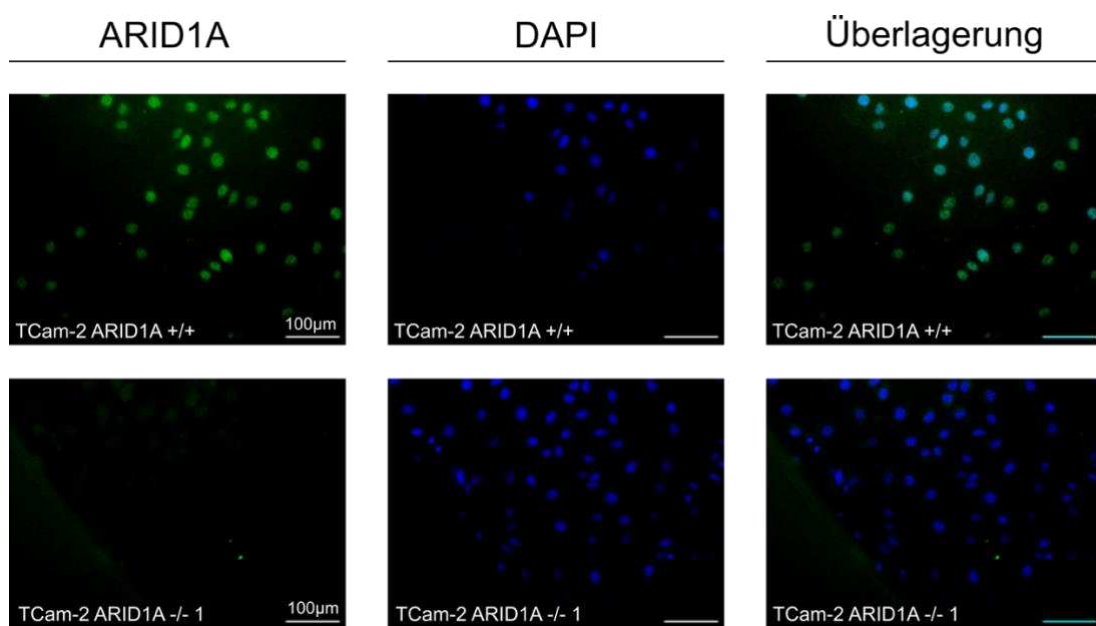


Abbildung 9 Exemplarische Darstellung der Immunfluoreszenzfärbung von ARID1A in TCam-2 *ARID1A*^{+/+} und TCam-2 *ARID1A*^{-/-} Klon #1.

Im TCam-2 *ARID1A*^{-/-} Klon zeigte sich ein Signalverlust von ARID1A. DAPI wurde als Kontrollfärbung der DNA verwendet.

Zusätzlich erfolgte die Transfektion mit der guideRNA analog zu TCam-2 in den Embryonalkarzinomzelllinien 2102EP und NCCIT. Im anschließenden PCR-Screening von jeweils 100 Klonen fanden sich im Gegensatz zu TCam-2 lediglich heterozygote Klone (*ARID1A*^{+/-}) (Abbildung 10).

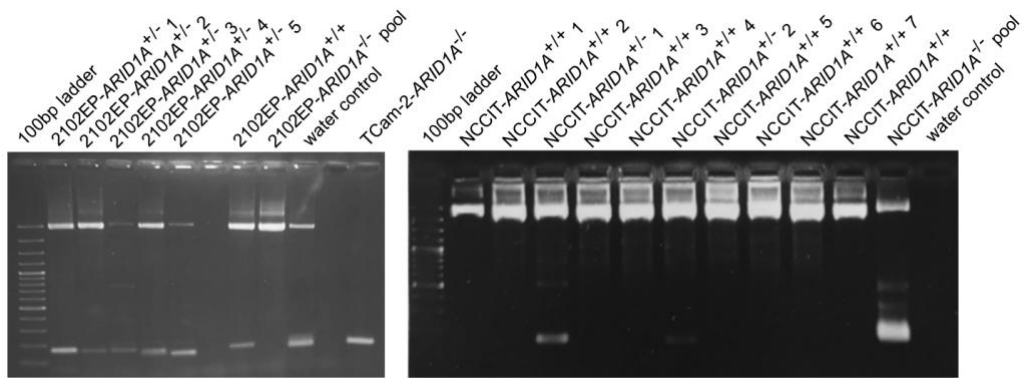


Abbildung 10 Genotypisierungs-PCR in Embryonalkarzinomzelllinien.

In 2102EP und NCCIT wurden lediglich heterozygote ($ARID1A^{+/-}$) Klone identifiziert. (Adaptiert nach [77])

3.3 $ARID1A$ als mögliches therapeutisches Ziel in Keimzelltumoren

3.3.1 Sensitivierung der $ARID1A$ -defizienten Zellen gegenüber ATR-Inhibition

In mehreren Arbeiten konnte bereits in anderen Tumorentitäten gezeigt werden, dass eine *loss of function*-Mutation von $ARID1A$ zu einer Wirkverstärkung bei der pharmakologischen Inhibition verschiedener Proteine (EZH2, ATR, PARP, HDAC6 und HSP90) führt [47], [78], [79], [80], [81]. Zur Untersuchung eines möglichen ähnlichen Effekts in KZT-Zellen nach der Inhibition der oben genannten Ziele testeten wir die entsprechenden Substanzen zuerst in TCam-2- $ARID1A^{+/+}$. Mithilfe des XTT-Assays wurde nach der Behandlung mit den einzelnen Wirkstoffen über 96 Stunden die Zellviabilität bestimmt, um die LD_{50} -Werte für jede Substanz in Monobehandlung zu berechnen (Abbildung 11). Für jeden Wirkstoff wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Hierbei kamen die oben erwähnten Wirkstoffe, gerichtet gegen DNA-Reparaturproteine ATR (VE-822) und PARP (Olaparib), die DNA-Methyltransferase EZH2 (GSK126), die Histon-Deacetylase 6 (YAK61) und das Heat Shock Protein 90 (PU-H71), zum Einsatz. Zusätzlich zu den oben genannten Substanzen wurde darüber hinaus Cisplatin inkludiert, da es Teil der Standardbehandlung bei KZT ist.

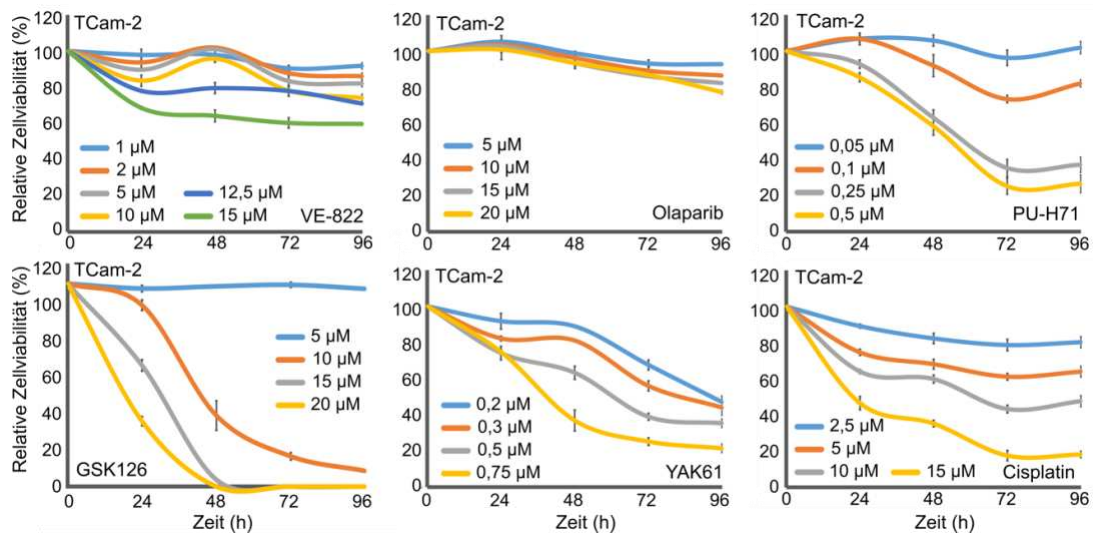


Abbildung 11 Dosisfindung für Inhibitoren mit einer vorbeschriebenen synthetischen Letalität nach *ARID1A*-Verlust

Messung der Zellviabilität von TCam-2 *ARID1A*^{+/+} mittels XTT-Assay über 96 Stunden nach einmaliger Behandlung mit den angegebenen Dosierungen. Eingesetzt wurden die Inhibitoren der DDR-Proteine ATR (VE-822) und PARP (Olaparib), der DNA-Methyltransferase EZH2 (GSK126), des HSP90 (PU-H71), der Histondeacetylase 6 (YAK61) und Cisplatin. Abk.: *DNA damage response* (DDR).

Die Inhibitoren wurden nach der Testung in TCam-2-*ARID1A*^{+/+} (Abbildung 11) ebenso in TCam-2-*ARID1A*^{-/-} eingesetzt. Anschließend wurden die Effekte der Behandlung der beiden Gruppen verglichen, um eine mögliche Sensitivierung durch den *ARID1A*-Verlust zu untersuchen.

Beim Einsatz von PARP- (20 µM Olaparib), EZH2- (10 µM GSK126), HDAC6- (0,4 µM YAK61) und HSP90-Inhibitoren (0,25 µM PU-H71) kam es zu keiner zusätzlichen Abnahme der Zellviabilität nach dem Verlust von *ARID1A*. Auch bei der Behandlung mit Cisplatin (9 µM) konnten wir keine zusätzliche Sensitivierung in den TCam-2-*ARID1A*^{-/-} beobachten (Abbildung 12).

Bei der Inhibition des DNA-Reparaturproteins ATR mit VE-822 hingegen zeigte sich eine deutlich stärkere Viabilitätsabnahme in den Zellen nach *ARID1A*-Verlust. So ergab sich eine LD₅₀ nach 48 Stunden von 14,8 µM in den parental Zellen und eine LD₅₀ von 10,4 µM in TCam-2-*ARID1A*^{-/-}.

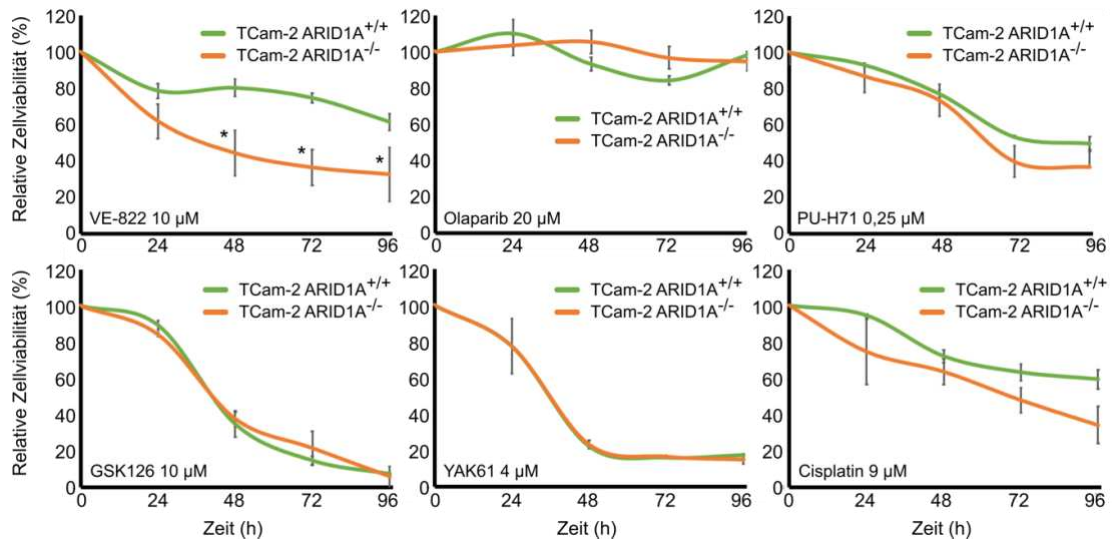


Abbildung 12 Viabilitätsmessung in TCam-2-*ARID1A*^{+/+} und -*ARID1A*^{-/-}

Messung der Zellviabilität von TCam-2-*ARID1A*^{+/+} und -*ARID1A*^{-/-} mittels XTT-Assay über 96 Stunden nach einmaliger Behandlung mit den angegebenen Dosierungen. Eingesetzt wurden die Inhibitoren der DDR-Proteine ATR (VE-822) und PARP (Olaparib), der DNA-Methyltransferase EZH2 (GSK126), des HSP90 (PU-H71), der Histondeacetylase 6 (YAK61) und Cisplatin. Abk.: *DNA damage response* (DDR). * p-Wert < 0,05.

3.3.2 Doppelbehandlung mit *ARID1A*- und ATR-Inhibitoren

Basierend auf den Ergebnissen in TCam-2-*ARID1A*^{-/-} (siehe 3.3.1) untersuchten wir, ob auch die kurzfristige pharmakologische Inhibition von *ARID1A* zu einer additiven Wirkung mit ATR-Inhibition führt. Hierzu standen uns mit C63 und BRD-K98 zwei Wirkstoffe zur Verfügung, die den SWI/SNF-Komplex und *ARID1A* als Ziel haben. Zuerst erfolgte eine alleinige Inhibition von *ARID1A* in der Zelllinie TCam-2, um die optimalen Wirkstoffkonzentrationen zu ermitteln (Abbildung 13). Bei der Behandlung von TCam-2-*ARID1A*^{+/+} mit C63 zeigte sich eine LD₅₀ von 5,7 µM, während sich nach der Behandlung mit BRD-K98 eine LD₅₀ von 19,4 µM ergab. Dies geht einher mit Voruntersuchungen, die für BRD-K98 eine geringe Toxizität beschreiben [68].

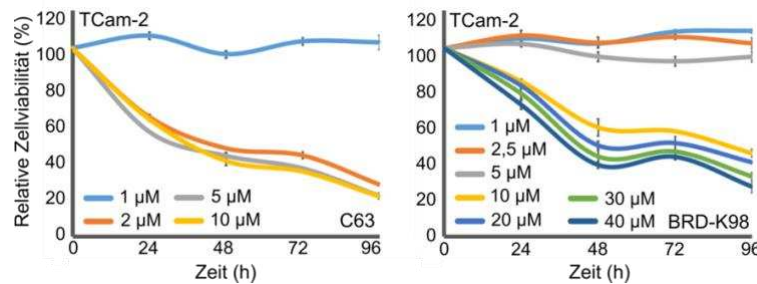


Abbildung 13 Dosisfindung für die ARID1A-Inhibitoren

Messung der Zellviabilität von TCam-2-*ARID1A*^{+/+} mittels XTT-Assay über 96 Stunden nach einmaliger Behandlung mit den ARID1A-Inhibitoren C63 und BRD-K98 in den angegebenen Dosierungen.

Anschließend wurden die beiden ARID1A-Inhibitoren jeweils in Kombination mit dem ATR-Inhibitor VE-822 eingesetzt. Dabei zeigte sich in beiden Fällen eine zusätzliche Reduktion der Zellviabilität nach der Doppelbehandlung, so dass von einem additiven Effekt auszugehen ist (Abbildung 14 A).

Zur Überprüfung, ob der beobachtete additive Effekt von ATR- und SWI/SNF-Inhibition auch in anderen KZT-Entitäten auftritt, weiteten wir die Untersuchung auf die Embryonalkarzinom-Zelllinie NCCIT sowie dessen Cisplatin-resistenten Subklon (NCCIT-R) und die Chorionkarzinom-Zelllinie JAR aus (Abbildung 14 B). Auch in diesen Experimenten konnten wir eine verminderte Zellviabilität bei der kombinierten Applikation von C63 und VE-822 im Vergleich zur Einzelbehandlung beobachten.

Dahingegen ließ sich nach der Behandlung mit den eingesetzten Konzentrationen in den Fibroblasten (MPAF) kein relevanter Effekt auf die Zellviabilität nachweisen. Somit scheinen die Kontrollzellen robuster gegenüber den verwendeten Wirkstoffen zu sein.

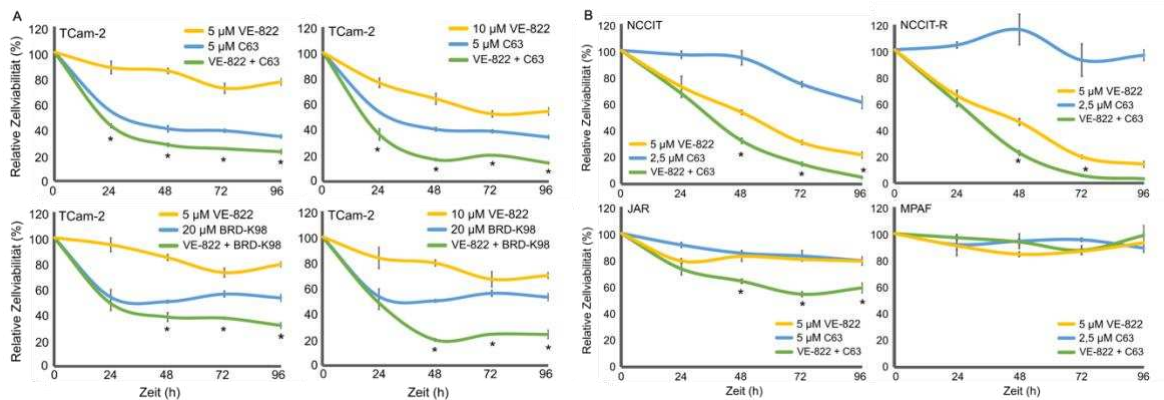


Abbildung 14 Doppelbehandlung mit ARID1A- und ATR-Inhibitoren in verschiedenen Keimzelltumorzelllinien

A Messung der Zellviabilität von TCam-2-*ARID1A*^{+/+} mittels XTT-Assay über 96 Stunden nach Doppelbehandlung mit den ARID1A-Inhibitoren C63 und BRD-K98 sowie dem ATR-Inhibitor VE-822 in den angegebenen Dosierungen. **B** Die (Cisplatin-resistente) Embryonalkarzinom-Zelllinie NCCIT(-R), die Chorionkarzinom-Zelllinie JAR sowie als Kontrolle die humanen Fibroblasten MPAF wurden mit dem ATR-Inhibitor VE-822 und dem ARID1A-Inhibitor C63 behandelt. Anschließend wurde die Zellviabilität über 96 Stunden mittels XTT-Assay gemessen. * *p*-Wert < 0,05.

3.4 Molekulare Effekte des Verlustes oder der Inhibition von ARID1A

3.4.1 Einfluss auf den Zellzyklus und DNA-Reparaturmechanismen

Zur Untersuchung des Zellzyklus nach der Behandlung mit C63 und VE-822 wurden die Zellen nach Propidiumiodidfärbung mittels Durchflusszytometrie analysiert. Hier zeigte sich nach der Einzelbehandlung mit beiden Inhibitoren eine leichte Abnahme des Anteils der Zellen in der G2/M-Phase, während die Kombinationsbehandlung zu einer deutlichen Reduktion der Zellen in der G2/M-Phase führte (Abbildung 15 A). In der Durchflusszytometrie nach dem Annexin V/PI-Apoptoseassay wurde 24 Stunden nach Behandlung mit C63 und VE-822 bei einer Kombination der Inhibitoren eine höhere Apoptoserate im Vergleich zur Einzelbehandlung nachgewiesen (Abbildung 15 B).

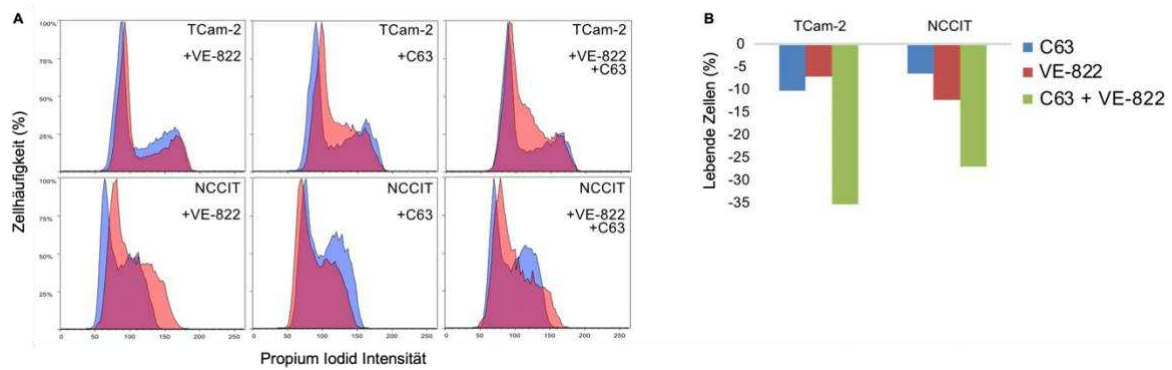


Abbildung 15 Analyse der Zellzyklusverteilung und Apoptoserate nach Behandlung mit C63 und VE-822

Durchflusszytometrie-Analyse der Zellzyklusverteilung (A) und Apoptoserate (B) mittels Propidiumiodid (PI) und Annexin V-Assays in TCam-2 und NCCIT 24 h nach der Behandlung mit C63 und/oder VE-822. Mit der Lösemittelkontrolle behandelte Zellen in A in blau dargestellt. (adaptiert nach [77])

Da die Inhibition von ATR in den Ablauf der DNA-Reparatur eingreift haben wir diese in den TCam-2-*ARID1A*^{-/-}-Klonen sowie nach der Behandlung mit C63 genauer analysiert.

Zuerst wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung von γ H2AX untersucht, ob in den *ARID1A*-defizienten Zellen nach der Behandlung mit VE-822 Doppelstrangbrüche in vermehrter Zahl auftraten. Zwar konnten wir insgesamt eine Zunahme an γ H2AX-Signalen in TCam-2-*ARID1A*^{-/-} im Vergleich zum Wildtyp beobachten, diese erwies sich jedoch als statistisch nicht signifikant (Abbildung 16).

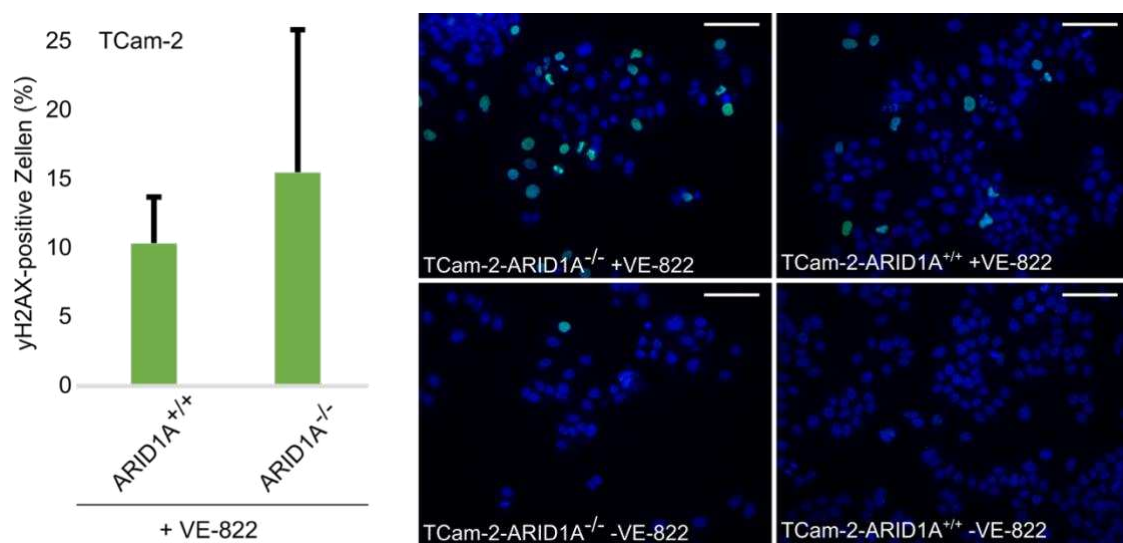


Abbildung 16 Anteil der γ H2AX-positiven Zellen in TCam-2-*ARID1A*^{+/+} und -*ARID1A*^{-/-} nach der Behandlung mit 10 μ M VE-822

Lediglich ein Trend, aber kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und ARID1A^{-/-}. Exemplarische Darstellung der Immunfluoreszenzfärbung von γ H2AX. DAPI wurde als Kontrollfärbung der DNA verwendet. (Skalierungsbalken: 100 μ m)

Nach der Behandlung mit C63 untersuchten wir zusätzlich die Expression von *ATR* und anderen Genen, die mit der DNA-Reparatur in Verbindung stehen. Die bereits mit ARID1A und der Antwort auf DNA-Schäden assoziierten Faktoren *ATR*, *ATM*, *ETAA1*, *TOP2A*, *TOPBP1* und *CHEK1* waren allesamt 24 Stunden nach der Gabe von C63 herunterreguliert (Abbildung 17). Auch bei der Behandlung mit VE-822 sowie nach der Doppelbehandlung zeigte sich eine Herunterregulation dieser Faktoren. Ein additiver Effekt trat nicht auf.

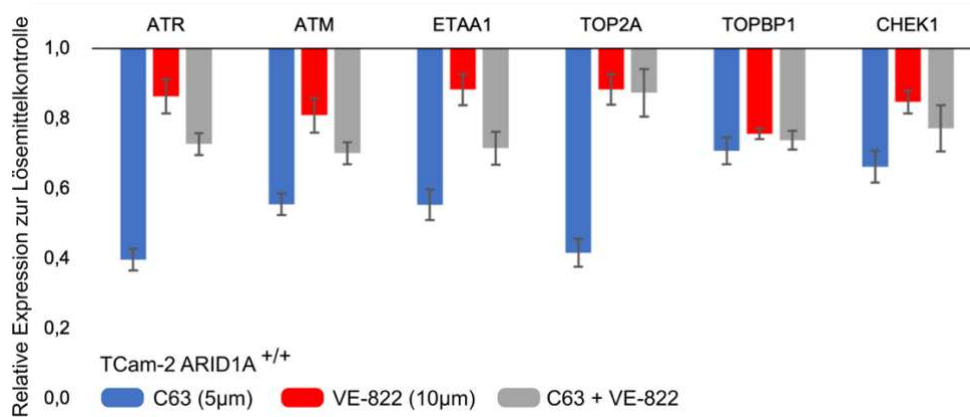


Abbildung 17 Untersuchung der Expression von *ATR* und weiteren DDR-assoziierten Genen nach ARID1A und ATR-Inhibition.

Es zeigte sich eine Herunterregulierung aller Gene, sowohl nach der Inhibition von ARID1A als auch von ATR. Eine Doppelbehandlung führte nicht zur Verstärkung des Effekts. Als Haushaltsgen und zur Datennormalisierung wurde *GAPDH* verwendet. Abk.: DNA damage response (DDR).

3.4.2 Veränderungen im Proteom nach der Behandlung mit C63

Um die Auswirkungen der C63-Behandlung genauer zu untersuchen, wurde mithilfe der Massenspektrometrie eine Analyse des Proteoms von TCam-2-ARID1A^{+/+} 24 und 48 Stunden nach der Applikation von C63 durchgeführt. Für jeden der beiden Zeitpunkte wurden fünf technische Replikate untersucht. Die Veränderungen wurden ab einer zweifachen Zu- oder Abnahme der Expression und bei einem *p*-Wert $\leq 0,05$ in der Varianzanalyse als signifikant gewertet.

24 Stunden nach der Behandlung lagen 19 Proteine vermehrt und 41 Proteine weniger häufig im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle vor. Nach 48 Stunden

konnten verglichen mit den Kontrollzellen 34 Proteine vermehrt und 34 Proteine vermindert nachgewiesen werden (Abbildung 18A/B). Über beide Zeitpunkte hinweg lagen zehn gemeinsame Proteine häufiger und zwanzig weniger häufig im Vergleich zur Kontrolle vor.

Die in der Massenspektrometrie über beide Zeitpunkte hinweg verändert exprimierten Gene konnten wir auf Ebene der mRNA mittels qRT-PCR bestätigen (Abbildung 18C). Eingeschlossen wurden hier die Gene *FA2H*, *SKP2*, *NAMT*, *DMAP1*, *POLE* und *DPPA4*.

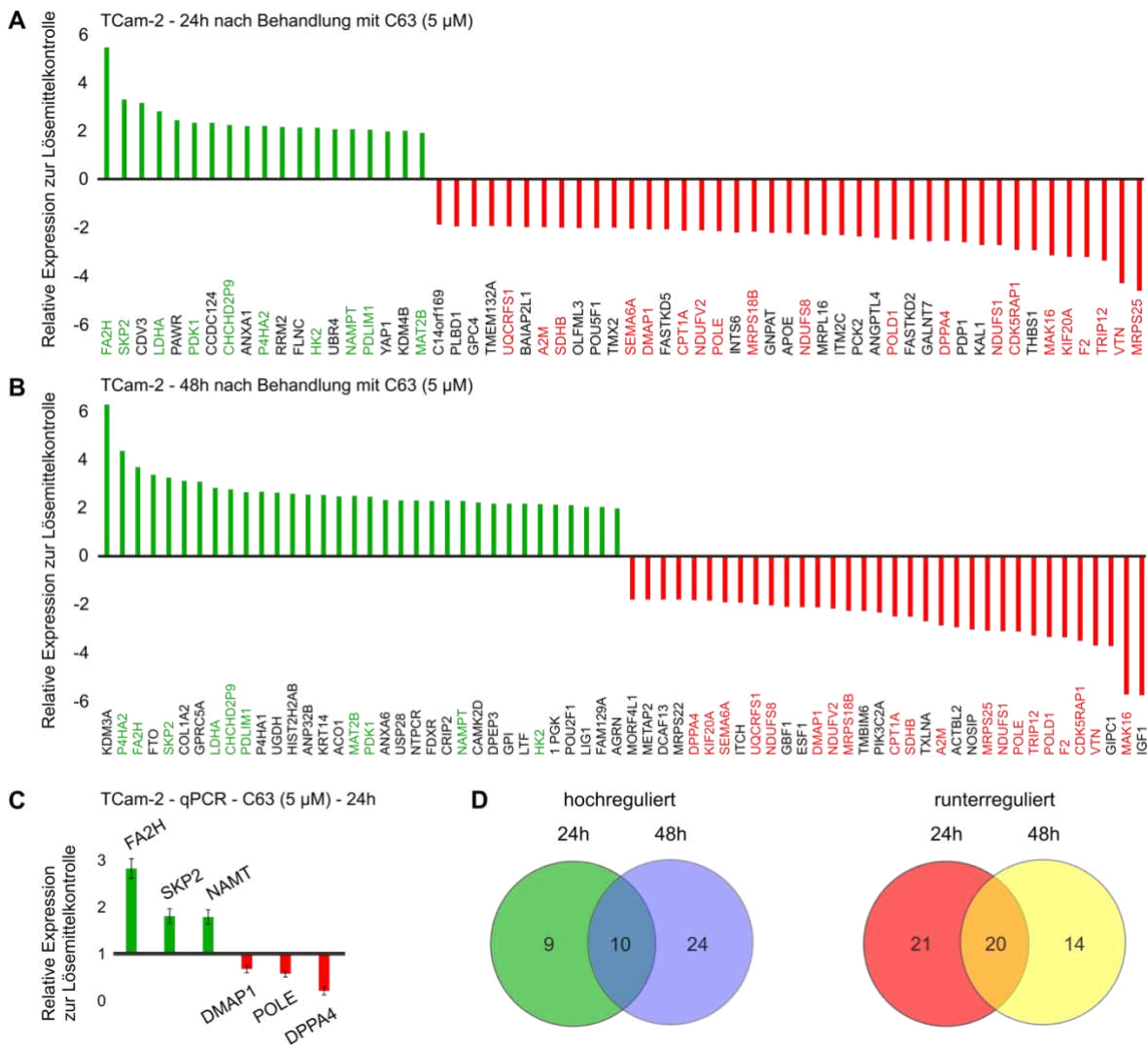


Abbildung 18 Veränderungen im Proteom nach ARID1A-Inhibition in TCam-2

A und **B** In der Massenspektrometrie verstärkt oder vermindert nachgewiesenen Proteine in TCam-2-*ARID1A*^{+/+} 24 und 48 Stunden nach der Behandlung mit C63 (5 µM). Die Proteine farblich markierter Gennamen sind zu beiden Zeitpunkten (24 und 48 h) vermehrt (grün) oder vermindert (rot) nachgewiesen. **C** qRT-PCR von *FA2H*, *SKP2*, *DMAP1*, *POLE* und *DPPA4* zur Bestätigung der Ergebnisse der Massenspektrometrie auf mRNA-Ebene. Untersucht wurde TCam-2-*ARID1A*^{+/+} 24 Stunden nach der Behandlung mit C63 (5 µM). Als Haushaltsgen und zur Datennormalisierung

wurde *GAPDH* verwendet. **D** Venn-Diagramm zur Darstellung der Veränderungen im Proteom nach Behandlung mit C63 in der Massenspektrometrie.

Zur Untersuchung der Auswirkung eines langfristigen *ARID1A*-Verlustes analysierten wir ebenfalls mittels Massenspektrometrie das Proteom in TCam-2-*ARID1A*^{-/-} und der parentalen Zelllinie TCam-2. Es wurden im Vergleich zu den parentalen Zellen 24 Proteine vermehrt, sowie 42 Proteine vermindert nachgewiesen (Abbildung 19A). Sowohl nach der Behandlung mit C63 in TCam-2 als auch in den *ARID1A*-defizienten Zellen waren die Gene *DMAP1* und *POLE* vermindert exprimiert. Dies wurde zusätzlich in TCam-2-*ARID1A*^{-/-} auf Ebene der mRNA mittels qRT-PCR bestätigt (Abbildung 19B).

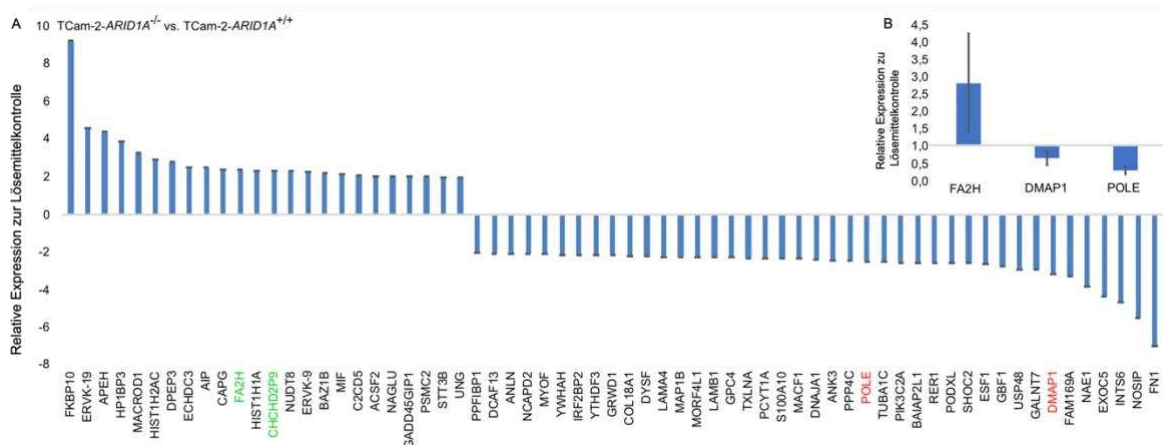


Abbildung 19 Veränderung im Proteom der TCam-2 *ARID1A*^{-/-}-Klone.

A In der Massenspektrometrie verstärkt oder vermindert nachgewiesenen Proteine in TCam-2-*ARID1A*^{-/-} gegenüber den parentalen Zellen. Die Proteine farblich markierter Gennamen sind ebenfalls nach Behandlung mit C63 vermehrt (grün) oder vermindert (rot) nachgewiesen. **B** qRT-PCR von *FA2H*, *SKP2*, *DMAP1*, *POLE* und *DPPA4* zur Bestätigung der Ergebnisse der Massenspektrometrie auf mRNA-Ebene in TCam-2-*ARID1A*^{-/-}. (Adaptiert nach [77])

Anhand der STRING Protein-Interaktionsnetzwerkanalyse (<https://string-db.org>) untersuchten wir die nach der Behandlung mit C63 kollektiv deregulierten Proteine in Hinblick auf mögliche interaktive Netzwerke. Diese Vorhersage basiert auf der Recherche in funktionalen Enzyklopädien (u.a. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG), *Gene Ontology* (GO)). Mittels KEGG werden auf Basis von mehreren molekularbiologischen Datenbanken Assoziationen von Genen zu bestimmten Zellsignalwegen prognostiziert. Bei der *Gene Ontology* (GO) werden Genen konkrete Annotationen zugeordnet.

Für die vermehrt nach der Behandlung vorliegenden Proteine ließen sich mit der STRING-Analyse keine Interaktionen feststellen. Bei den vermindert nachgewiesenen Proteinen hingegen wurden vier mögliche Netzwerke vorhergesagt, so dass eventuelle Interaktionen in Hinblick auf einen therapeutischen Nutzen untersucht werden könnten (Abbildung 20). Zusätzlich wurden die entsprechenden Proteine mithilfe der DAVID Genset-Anreicherungsanalyse, die unter anderem mit GO-Annotationen arbeitet, ausgewertet und funktionellen Gruppen zugeordnet. Die häufigsten Annotationen bei den vermehrt nachgewiesenen Proteinen betrafen die Bereiche *acetylation*, *protein-binding* und *metal-binding*. Die Gruppen *DNA damage repair*, *transferase activity* und *NADH activity* waren insbesondere bei der Analyse der vermindert vorliegenden Proteine vertreten (siehe Tabelle 20).

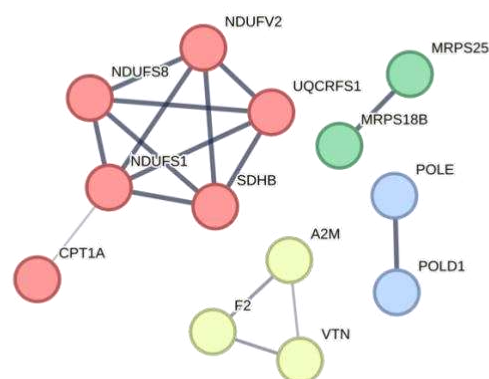


Abbildung 20 STRING-Analyse der herunterregulierten Proteine nach der Behandlung mit C63

STRING-Analyse der vermindert nachgewiesenen Proteine nach der Behandlung von TCam-2 mit C63 (24 und 48 h). Es werden vier Netzwerke mit den GO-Annotationen Atmungskette (rot), DNA-Replikation/Basenexzisionsreparatur (blau), mitochondriales Ribosom (grün) und Fibrinolyse (gelb) vorhergesagt.

3.4.3 Beeinflussung der Pluripotenz durch den Verlust von *ARID1A*

Da der SWI/SNF-Komplex im Allgemeinen und auch ARID1A als Untereinheit bei der Regulation von Pluripotenzfaktoren involviert ist, haben wir den Effekt des Verlustes oder der Inhibition von ARID1A auf das Pluripotenzprogramm der Keimzelltumorzellen untersucht [40], [82], [83].

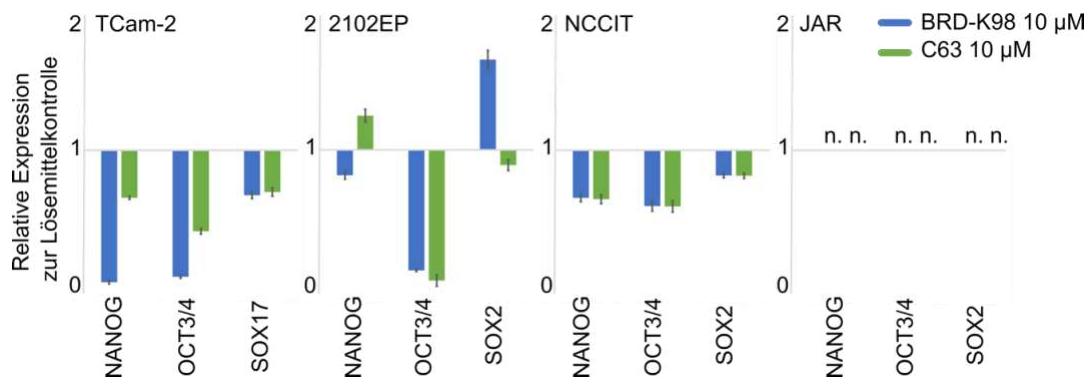


Abbildung 21 Expressionsanalyse der Pluripotenzfaktoren *NANOG*, *OCT3/4* und respektive *SOX17* (Seminom) und *SOX2* (Embryonalkarzinom) mittels qRT-PCR.

Untersucht wurden die Zelllinien TCam-2 (Seminom), 2102EP und NCCIT (Embryonalkarzinom) sowie JAR (Chorionkarzinom) 24 h nach der Behandlung mit dem ARID1A-Inhibitor C63 (10 µM) und BRD-K98 (10 µM). Als Haushaltsgen und zur Datennormalisierung wurde *GAPDH* verwendet.

Die untersuchten Pluripotenzfaktoren *NANOG* und *OCT3/4* werden sowohl in Seminomen als auch in Embryonalkarzinomen exprimiert. *SOX2* diente als spezifischer Marker für Embryonalkarzinome und *SOX17* für die Seminome [84].

Bei der kurzfristigen Inhibition von ARID1A durch die Behandlung mit den ARID1A-Inhibitoren C63 oder BRD-K in parenteralen Zellen kam es nach 24 Stunden zu einer starken Herunterregulierung der Pluripotenzfaktoren. In TCam-2 und NCCIT waren sowohl *NANOG* und *OCT3/4*, als auch *SOX17* in TCam-2 und *SOX2* in NCCIT betroffen. In 2102EP hingegen war die verminderte Expression nur bei *OCT3/4* eindeutig ausgeprägt. In der Chorionkarzinom-Zelllinie JAR konnten erwartungsgemäß keine Pluripotenzmarker nachgewiesen werden.

In den über mehrere Passagen kultivierten TCam-2-*ARID1A*^{-/-}, 2102EP-*ARID1A*^{+/-} und NCCIT-*ARID1A*^{+/-} zeigte sich hingegen keine Deregulierung der oben genannten Faktoren (Abbildung 22).

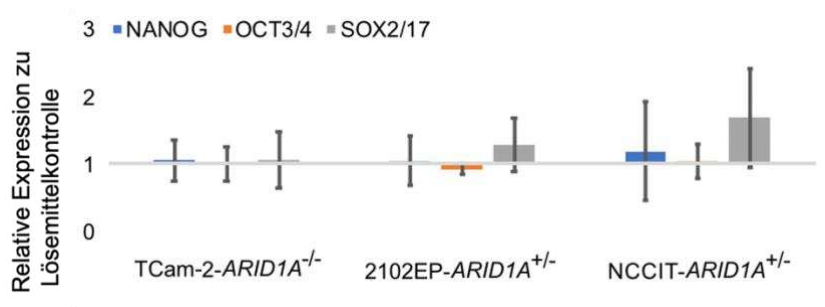


Abbildung 22 Expressionsanalyse der Pluripotenzfaktoren *NANOG*, *OCT3/4* und respektive *SOX17* (Seminom) und *SOX2* (Embryonalkarzinom) nach *ARID1A*-Verlust

Expressionsanalyse der o. g. Pluripotenzfaktoren in TCam-2-*ARID1A*^{-/-}, 2102EP-*ARID1A*^{+/-} und NCCIT-*ARID1A*^{+/-} mittels qRT-PCR (adaptiert nach [77]). Als Haushaltsgen und zur Datennormalisierung wurde *GAPDH* verwendet.

3.5 Die Kombination von Cisplatin und ATR-Inhibition

In der Therapie der Keimzelltumoren gehört Cisplatin zur Standardbehandlung, die in der Regel eine hohe Heilungsrate erreicht. Dennoch treten auch platinresistente Tumoren auf und die Therapie mit Cisplatin kann Langzeitnebenwirkungen wie Nervenschäden oder Nierenschäden verursachen. Eine Kombination von Cisplatin mit der Inhibition von ATR könnte eine weitere Therapiemöglichkeit für platinresistente Tumoren darstellen oder eine Dosisreduzierung von Cisplatin in der Standardbehandlung ermöglichen.

In TCam-2 Zellen wurde in dieser Arbeit daher zusätzlich die Kombination von Cisplatin mit der Inhibition von ATR durch VE-822 untersucht. Die verwendete LD₅₀ Konzentration von Cisplatin in der Monotherapie orientierte sich an den Vorversuchen (siehe Abbildung 11).

Hier wurde die Viabilität der Zellen nach der Behandlung mit verschiedenen Dosierungen über 96 h mittels XTT-Zellviabilitäts-Assays untersucht und es zeigte sich eine deutliche Wirkungssteigerung bei der Kombination der beiden Substanzen im Vergleich zur Monotherapie (siehe

Messung der Zellviabilität von TCam-2-*ARID1A*^{+/-} mittels XTT-Assay über 96 Stunden nach Doppelbehandlung mit Cisplatin sowie dem ATR-Inhibitor VE-822 in den angegebenen Dosierungen. So führte die zusätzliche Applikation von VE-822 im nanomolaren Bereich bereits zu einem erheblichen Abfall der Viabilität in TCam-2 nach nur 24 Stunden.

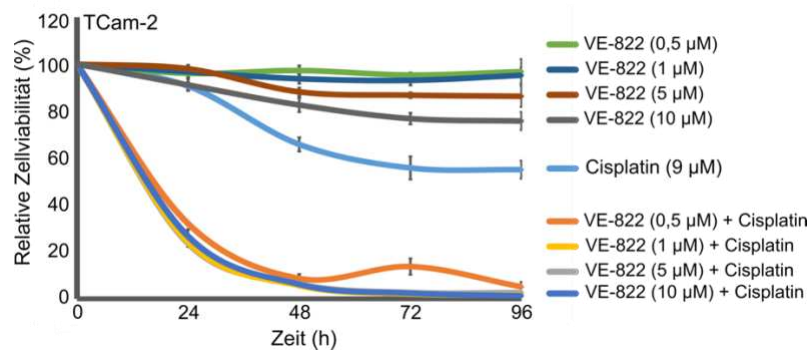


Abbildung 23 Zellviabilität nach Doppelbehandlung mit ATR-Inhibitor und Cisplatin

Messung der Zellviabilität von TCam-2-*ARID1A*^{+/+} mittels XTT-Assay über 96 Stunden nach Doppelbehandlung mit Cisplatin sowie dem ATR-Inhibitor VE-822 in den angegebenen Dosierungen.

4 Diskussion

Die Rolle von ARID1A in Keimzelltumoren war vor dieser Studie kaum untersucht. Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen eines ARID1A-Verlusts auf das Therapieansprechen gegenüber verschiedenen Wirkstoffen in Keimzelltumoren zu untersuchen.

4.1 Die Rolle von ARID1A in Keimzelltumoren und die Etablierung von ARID1A-defizienten Zelllinien

In der Auswertung der TCGA-Datenbank zeigt sich eine vergleichbare Expression von *ARID1A* in den meisten Tumorentitäten und somit ebenfalls eine vorhandene Expression in der Kohorte der Keimzelltumoren (Abbildung 5). Diese Ergebnisse ließen sich in der Auswertung von laboreigenen Microarraydaten aus Gewebeproben und Zelllinien von Keimzelltumoren reproduzieren, so dass *ARID1A* ein therapeutisches Ziel in Keimzelltumoren darstellen könnte.

Interessanterweise wurde in der Analyse mittels qRT-PCR in den kindlichen Keimzelltumoren (Typ I) eine erhöhte Expression von *ARID1A* im Vergleich zu den Typ II Keimzelltumoren nachgewiesen. Der funktionelle Hintergrund ist jedoch unklar und bedürfte weiterer Untersuchungen.

Vorarbeiten des Labors zeigten, dass die Herunterregulierung von *ARID1A* einen entscheidenden Schritt in der Signaltransduktionskaskade nach Behandlung mit dem HDAC-Inhibitor Romidepsin darstellt [72]. Nach einem kurzfristigen Verlust von *ARID1A* mittels siRNA und shRNA in TCam-2 kam es zudem zu einer vermehrten Anreicherung der Zellen in der G2/M-Phase, sowie zu einer verminderten Expression von Pluripotenzfaktoren. Dies deckt sich mit Vorarbeiten zu murinen Embryonalkarzinomzelllinien, die nach einem Verlust von *ARID1A* ihre Stammzeleigenschaften verlieren und nur eine eingeschränkte Differenzierungsfähigkeit besitzen [85]. Die Anreicherung der Zellen in der G2/M Phase wurde zudem in *ARID1A*-defizienten Kolonkarzinomzelllinien beschrieben [86].

Für die Analyse der Auswirkungen eines *ARID1A*-Verlustes in Keimzelltumoren generiertem wir für alle weiteren Versuche zunächst *ARID1A*-defiziente Klone in der

Seminomzelllinie TCam-2 (siehe Abbildung 7). Von insgesamt acht identifizierten *ARID1A*^{-/-} Klonen wurden vier in den weiteren Versuchen verwendet.

In der qRT-PCR zeigte sich in TCam-2 *ARID1A*^{-/-}-Klonen keine konsekutive Hochregulierung der Expression von *ARID1B*. In Voruntersuchungen werden die beiden paraloge Gene mit unterschiedlichen Funktionen assoziiert [87], ein kombinierter Funktionsverlust scheint in einigen Entitäten jedoch zu aggressiveren Tumoren zu führen [88]. Die Expression von Pluripotenzfaktoren (*NANOG*, *OCT3/4*) zeigte sich in den TCam-2-*ARID1A*^{-/-}-Klonen nicht verändert. Die kurzfristige pharmakologische Inhibition von *ARID1A* hingegen führte analog zur Herunterregulierung mit shRNA zu einer verminderten Expression der Pluripotenzfaktoren in den Zelllinien 2102EP, NCCIT und TCam-2. Dies deutet darauf hin, dass die TCam-2 *ARID1A*^{-/-}-Klone das Pluripotenzprogramm trotz *ARID1A* Verlustes aufrechterhalten können [72].

Parallel zur Seminomzelllinie TCam-2 erfolgte der Versuch der Etablierung von *ARID1A*-defizienten Embryonalkarzinomzelllinien (2102EP, NCCIT) (Abbildung 10). In beiden Zelllinien konnten beim PCR-Screening jedoch nur heterozygote Klone identifiziert werden. Dies deutet darauf hin, dass *ARID1A* ein essenzielles Gen in Embryonalkarzinomzelllinien zu sein scheint. Ein homozygoter Verlust von *ARID1A* in 2102EP und NCCIT wird offenbar nicht toleriert, so dass die Zellen die multiplen Passagen in unserer „Screening“-Strategie nicht überleben. Dies stimmt mit weiteren Arbeiten überein, bei denen eine *ARID1A*-Defizienz in embryonalen Stammzellen (ESCs) teilweise nicht möglich war und zu einem Verlust der Stammzeleigenschaften führte [85], [89], [90].

4.2 Therapeutische Konsequenz des Verlustes von ARID1A in Keimzelltumorzellen

Der Funktionsverlust von *ARID1A* führt in einigen Tumoren zu einer Sensitivierung gegenüber mehreren Wirkstoffen (EZH2, ATR, PARP, HDAC6 und HSP90) [59], [60], [61], [62], [63]. Wir haben untersucht, ob ein CRISPR/Cas9 vermittelter Verlust oder die pharmakologische Inhibition von *ARID1A* zu einer ähnlichen Wirkverstärkung der Inhibitoren in Keimzelltumorzellen führt.

In der Seminomzelllinie TCam-2 zeigte sich nach dem Verlust von *ARID1A* eine signifikante Zunahme der Sensitivität gegenüber der Inhibition von ATR (Abbildung 12). Hieraus lässt sich die Möglichkeit einer Kombinationstherapie ableiten. Dieses Erkenntnis stimmt mit vorherigen Studien überein, die in anderen Tumorentitäten einen funktionellen Zusammenhang zwischen *ARID1A*-Verlust und erhöhter Abhängigkeit von DNA-Reparaturmechanismen beschrieben haben. Nach der Behandlung mit weiteren Wirkstoffen (PARPi, HDACi, EHZ2i, HSPi) kam es jedoch zu keinem zusätzlichen Ansprechen durch den *ARID1A*-Verlust. Von den eingangs erwähnten Inhibitoren ist der Mechanismus der synthetischen Letalität von *ARID1A* und ATR bisher am ausführlichsten untersucht. So hat dieses Wirkkonzept bereits Einzug in klinische Studien für Tumore mit *ARID1A*-Defizienz erhalten [91], [92], [93]. Da Mutationen in *ARID1A* in Keimzelltumoren selten sind, haben wir die Übertragbarkeit der synthetischen Letalität auf die pharmakologische Inhibition von *ARID1A* und ATR untersucht. Hier zeigte sich ein additiver Effekt durch die Doppelbehandlung mit *ARID1A*-Inhibitoren (BD-98 und C63) in mehreren Keimzelltumorzelllinien (Abbildung 14). Interessanterweise trat dieser Effekt auch beim cisplatinresistenten Subklon der Embryonalkarzinomzelllinie NCCIT auf, was die mögliche Rolle dieses Ansatzes als Alternative bei therapierefraktären Tumoren unterstützt. In den angewandten Dosierungen hatten die Inhibitoren keinen nennenswerten Effekt auf die Viabilität der Fibroblastenzelllinie MPAF. Dies deutet auf eine geringere Toxizität in den Kontrollzellen hin, sollte jedoch mit weiteren Zelllinien bestätigt werden. An Kolonkarzinomzellen war in einer vorherigen Studie ein synergistischer Effekt der Doppelbehandlung nachweisbar [68]. Der Vorteil der Kombinationsbehandlung lässt sich durch unsere Ergebnisse auch auf Keimzelltumoren übertragen. Um nachzuweisen, dass es sich ebenfalls um einen synergistischen Effekt handelt, sind jedoch Behandlungen in weiteren Dosierungen und beispielsweise die Berechnung eines Kombinationsindexes notwendig. Limitierend ist zudem zu sagen, dass die verwendeten Inhibitoren von *ARID1A* bisher nicht in klinischer Prüfung sind und somit eine weitere in vivo und klinische Validierung notwendig ist [66], [67].

4.3 Molekulare Analyse der Doppelbehandlung mit ARID1A- und ATR-Inhibitoren

In vorherigen Studien wurde als eine Hauptursache der synthetischen Letalität von ARID1A und ATR die eingeschränkte DNA-Entwicklung durch die Topoisomerase II nach *ARID1A*-Verlust ausgemacht [94]. Nach der ATR-Inhibition in *ARID1A*-defizienten Kolonkarzinomzellen kam es zu einer signifikant höheren Anzahl von Doppelstrangbrüchen [86]. Dieser Effekt trat auch nach der Doppelbehandlung mit dem ARID1A-Inhibitor BD98 und einem ATR-Inhibitor auf [68]. In unserer Untersuchung in TCam-2-*ARID1A*^{-/-} zeigte sich nach der ATR-Inhibition eine erhöhte Anzahl von γH2AX-positiven Zellen im Vergleich zum Wildtyp als Hinweis auf vermehrte Doppelstrangbrüche, jedoch ohne statistisch signifikanten Unterschied.

In der zuvor erwähnten Studie zeigte sich nach ARID1A-Verlust oder Inhibition auch ein synergistischer Effekt von BD98 und dem Topoisomerase II Hemmstoff Etoposid [68]. Es wäre interessant zu untersuchen, ob ein solcher Effekt ebenfalls Keimzelltumoren übertragbar ist, da Etoposid zur aktuellen Standardbehandlung der metastasierten Keimzelltumoren zählt.

Nach der Behandlung mit C63 in TCam-2 kam es zu einer Herunterregulierung von DDR-assoziierten Genen. Auch in Vorstudien zeigten sich die Gene nach *ARID1A* Verlust teilweise herunterreguliert [60]. Dieser Effekt war in den TCam-2-*ARID1A*^{-/-}-Klonen nicht nachweisbar, so dass die Zellen bei einem langfristigen Verlust vermutlich über alternative Mechanismen verfügen, um den *ARID1A*-Verlust zu kompensieren (Anhang 2).

So scheint der Verlust oder die Inhibition von *ARID1A* auf mehreren Ebenen einen Einfluss auf die DNA-Reparaturmechanismen zu haben. Es bedarf jedoch zusätzlicher funktioneller Analysen der Signalkaskaden der DNA-Reparatur zur genaueren Aufschlüsselung des Wirkmechanismus.

Für die weitere molekulare Analyse untersuchten wir mittels Massenspektrometrie die Veränderungen im Proteom von TCam-2-Zellen 24 und 48 Stunden nach Behandlung mit C63, sowie in den *ARID1A*-defizienten TCam-2-Zellen. In allen Konstellationen zeigte sich im Vergleich zum unbehandelten Wildtyp eine verminderte Expression von *DNA-PKcs* und *POLE* (Abbildung 18). Es zeigte sich

ebenfalls eine veränderte Expression in TCam-2-*ARID1A*^{-/-} und somit bei langfristigem ARID1A-Verlust (Abbildung 19).

Das DNA-Methyltransferase-1(DNMT1)-assoziierte Protein 1 (DMAP1) ist über verschiedene Mechanismen in die epigenetische Transkriptionsregulation und die DNA-Reparatur involviert. Initial wurde es als Transkriptionskorepressor der DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1) identifiziert und ist somit an der Aufrechterhaltung von DNA-Methylierungsmustern während der Zellteilung beteiligt [95]. Zudem wurde eine Rolle von DMAP1 bei der DNA-Reparatur und der Aufrechterhaltung eines Stammzellphänotyps beschrieben [96], [97]. In dieser Funktion scheint DMAP1 als Teil des TIP60-Acetyltransferase und Chromatin-remodellierenden Komplex (TIP60-C) zu wirken [98]. TIP60-C besteht ähnlich wie der SWI/SNF Komplex aus multiplen Proteinen, die allerdings neben der ATP-abhängigen Chromatin-Remodellierung auch über Histonmodifikationen Einfluss auf die Transkription und Zugänglichkeit der DNA nehmen [99], [100], [101]. Der Verlust von DMAP1 oder von TIP60 führte zu einer eingeschränkten Aktivierung von ATM und damit zu einer inadäquaten Zellantwort auf Doppelstrangbrüche [102], [103].

Die DNA Polymerase Epsilon (POLE) ist während der DNA-Replikation für die kontinuierliche Synthetisierung des Leitstrangs verantwortlich und besitzt zudem eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität [104]. Somit hat POLE nicht nur eine Replikationsfunktion, sondern kann bei Replikationsfehlern das falsche Nukleotid austauschen. Im Zusammenhang mit Krebserkrankungen ist POLE vor allem bei Endometrium- und Kolonkarzinomen teilweise mutiert, was zu einer hohen Mutationslast führt und mit einem verbesserten Ansprechen auf eine Immuntherapie assoziiert ist [105], [106]. Zudem gelten Keimbahnmutationen in *POLE* als Tumorprädisposition [107]. Nach der Behandlung mit C63 in TCam-2 kam es zudem zu einer verminderten Expression von *POLD1*. Dieser Effekt trat nicht in den *ARID1A*-defizienten Klonen auf. Bei dem Verlust von *POLD1* wurde *in vitro* zuvor eine synthetische Letalität mit ATR-Inhibitoren beschrieben [108].

In Keimzelltumoren ist bisher weder für DMAP1 noch für POLE eine Rolle in der Tumorentstehung oder -progression bekannt.

Zusammenfassend lässt sich postulieren, dass der Verlust oder die pharmakologische Inhibition von ARID1A zu einer verringerten Expression von *DMAP1* und *POLE* in Seminomzelllinien führt, wodurch es zu einer veränderten Transkriptionsregulation und DNA-Schadensantwort kommt. Diese könnten auch

potenzielle Mediatoren für eine Vulnerabilität der Zellen gegenüber ATR-Inhibitoren sein. Um den Einfluss von ARID1A auf DMAP1 und POLE genauer zu untersuchen sind jedoch weitere funktionelle Experimente notwendig.

4.4 Anwendbarkeit der ATR-Inhibition in Bezug auf aktuelle Therapiestandards in Keimzelltumoren

In präklinischen und klinischen Studien an verschiedenen soliden Tumoren wurde gezeigt, dass die Inhibition von ATR zu einer Wirkverstärkung von Cisplatin und anderen Chemotherapeutika führen kann [109], [110]. In platinresistenten Lungenkrebszellen wurde ein wachstumshemmender Effekt der ATR-Inhibition mit VE-822 in Kombination mit Cisplatin *in vitro* beobachtet [111]. In einer aktuellen Phase II Studie zeigte sich nach der Gabe von VE-822 zusätzlich zur Chemotherapie eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens bei Patientinnen mit Ovarialkarzinomen [112]. Dieser Effekt konnte bei Patienten mit fortgeschrittenem Urothelkarzinom in einer weiteren Phase II Studie nicht beobachtet werden [113]. Da Cisplatin ein zentraler Bestandteil der Therapie des metastasierten Keimzelltumors ist, haben wir den Effekt einer Doppelbehandlung mit Cisplatin und ATR in Keimzelltumorzellen untersucht. Es zeigte sich eine deutliche additive Wirkung in der Abnahme der Zellviabilität nach Doppelbehandlung (Abbildung 23). Hier wäre eine weitergehende Untersuchung an platinresistenten Zelllinien und *in vivo* interessant, um eine mögliche Resensitivierung für eine platinhaltige Therapie mit ATR-Inhibitoren zu untersuchen.

4.5 Limitationen der Studie

Diese Studie weist einige Limitationen auf, die in diesem Abschnitt zusammengefasst werden.

Da ARID1A-Mutationen in Keimzelltumoren selten vorkommen, könnte eine klinische Anwendung der synthetischen Letalität nur durch eine Kombinationstherapie erreicht werden, die potenziell verstärkte Nebenwirkungen mit sich bringen könnte. Die verwendeten ARID1A-Inhibitoren wurden bislang ausschließlich *in vitro* getestet und sind klinisch noch nicht untersucht worden.

Zudem bleibt aufgrund der variablen Zusammensetzung des SWI/SNF-Komplexes und seiner vielfältigen Funktionen in der Chromatinregulation unklar, welche spezifische Funktion von ARID1A durch die Inhibition beeinträchtigt wird. Zur Validierung der synthetischen Letalität von ARID1A und ATR sind daher weiterführende Untersuchungen an zusätzlichen Keimzelltumor- und Kontrollzelllinien erforderlich, ebenso wie die Übertragung auf ein Xenograft-Modell *in vivo*.

Die genauen molekularen Effekte der ARID1A-Inhibition oder des ARID1A-Verlusts in Keimzelltumoren konnten in dieser Studie noch nicht vollständig entschlüsselt werden. Die bisherigen Ergebnisse deuten jedoch auf einen möglichen Einfluss auf die DNA-Reparaturmechanismen sowie eine Beteiligung von DMAP1 und POLE hin. Um die zugrunde liegende Signalkaskade zu identifizieren oder neue beteiligte Proteine zu entdecken, sind weitere funktionelle Analysen über die Massenspektrometrie hinaus erforderlich.

4.6 Fazit und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich formulieren, dass es durch den Verlust oder die Inhibition von ARID1A in Keimzelltumorzelllinien *in vitro* zu einer Sensitivierung gegenüber ATR-Inhibitoren kommt. Dies deckt sich mit Vorarbeiten zu anderen Tumorentitäten und könnte somit auch für Keimzelltumoren einen neuen Therapieansatz darstellen. Es bedarf jedoch weiterer Untersuchungen zur genaueren Aufschlüsselung der molekularen Wirkkaskade. Der Fokus sollte hier insbesondere auf DMAP1 oder POLE liegen, um deren mögliche Interaktion mit dem SWI/SNF-Komplex besser zu verstehen.

Diese Arbeit legt die Grundlage für die weitere Validierung der synthetischen Letalität von ARID1A und ATR in Keimzelltumoren mittels *in vivo* Versuchen. Anschließende klinische Studien könnten zunächst vor allem Patienten mit fortgeschrittenen und platinresistenten Tumoren zugutekommen. Hier gilt der Fokus neben dem onkologischen Ansprechen zusätzlich den Nebenwirkungen und Langzeitfolgen, die durch die aktuelle Therapie bestehen.

Literaturverzeichnis

- [1] J. S. Park, J. Kim, A. Elghiaty, and W. S. Ham, "Recent global trends in testicular cancer incidence and mortality," *Medicine*, vol. 97, no. 37, Sep. 2018, doi: 10.1097/MD.00000000000012390.
- [2] A. A. Ghazarian, S. P. Kelly, S. F. Altekruse, P. S. Rosenberg, and K. A. McGlynn, "Future of testicular germ cell tumor incidence in the United States: Forecast through 2026," *Cancer*, vol. 123, no. 12, pp. 2320–2328, Jun. 2017, doi: 10.1002/CNCR.30597.
- [3] J. C. Allen, A. Kirschner, K. R. Scarpato, and A. K. Morgans, "Current Management of Refractory Germ Cell Tumors and Future Directions," *Curr Oncol Rep*, vol. 19, no. 2, Feb. 2017, doi: 10.1007/S11912-017-0572-Y.
- [4] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, and A. Jemal, "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries," *CA Cancer J Clin*, vol. 68, no. 6, pp. 394–424, Nov. 2018, doi: 10.3322/CAAC.21492.
- [5] G. der epidemiologischen K. in D. e. V. (Hrsg) Robert Koch-Institut, "Krebs in Deutschland für 2017/2018 (13. Ausgabe)," 2021.
- [6] J. K. Gurney *et al.*, "International Trends in the Incidence of Testicular Cancer: Lessons from 35 Years and 41 Countries," *Eur Urol*, vol. 76, no. 5, pp. 615–623, Nov. 2019, doi: 10.1016/J.EURURO.2019.07.002.
- [7] N. E. Skakkebak *et al.*, "Testicular dysgenesis syndrome: An increasingly common developmental disorder with environmental aspects," *APMIS, Supplement*, vol. 109, no. 103, 2001, doi: 10.1111/J.1600-0463.2001.TB05770.X.
- [8] S. Lympéri and A. Giwercman, "Endocrine disruptors and testicular function," *Metabolism*, vol. 86, pp. 79–90, Sep. 2018, doi: 10.1016/J.METABOL.2018.03.022.
- [9] L. Cheng *et al.*, "Testicular cancer," *Nat Rev Dis Primers*, vol. 4, no. 1, 2018, doi: 10.1038/s41572-018-0029-0.
- [10] H. Møller, A. Prener, and N. E. Skakkebak, "Testicular cancer, cryptorchidism, inguinal hernia, testicular atrophy, and genital malformations: case-control studies in Denmark," *Cancer Causes Control*, vol. 7, no. 2, pp. 264–274, 1996, doi: 10.1007/BF00051302.

- [11] E. Kharazmi *et al.*, “Cancer Risk in Relatives of Testicular Cancer Patients by Histology Type and Age at Diagnosis: A Joint Study from Five Nordic Countries,” *Eur Urol*, vol. 68, no. 2, pp. 283–289, Aug. 2015, doi: 10.1016/j.eururo.2014.12.031.
- [12] S. D. Fosså *et al.*, “Risk of Contralateral Testicular Cancer: A Population-based Study of 29 515 U.S. Men,” *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, vol. 97, no. 14, pp. 1056–1066, Jul. 2005, doi: 10.1093/JNCI/DJI185.
- [13] R. E. Anderson *et al.*, “Cancer risk in first- and second-degree relatives of men with poor semen quality,” *Fertil Steril*, vol. 106, no. 3, p. 731, Sep. 2016, doi: 10.1016/J.FERTNSTERT.2016.05.021.
- [14] J. P. Bonde *et al.*, “The epidemiologic evidence linking prenatal and postnatal exposure to endocrine disrupting chemicals with male reproductive disorders: a systematic review and meta-analysis,” *Hum Reprod Update*, vol. 23, no. 1, p. 104, 2017, doi: 10.1093/HUMUPD/DMW036.
- [15] H. Moch, A. L. Cubilla, P. A. Humphrey, V. E. Reuter, and T. M. Ulbright, “The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours,” *Eur Urol*, vol. 70, no. 1, pp. 93–105, 2016, doi: 10.1016/J.EURURO.2016.02.029.
- [16] von der M. H *et al.*, “Carcinoma in situ of contralateral testis in patients with testicular germ cell cancer: study of 27 cases in 500 patients,” *Br Med J (Clin Res Ed)*, vol. 293, no. 6559, pp. 1398–1401, 1986, doi: 10.1136/BMJ.293.6559.1398.
- [17] J. van Echten *et al.*, “No recurrent structural abnormalities apart from i(12p) in primary germ cell tumors of the adult testis,” *Genes Chromosomes Cancer*, vol. 14, no. 2, pp. 133–144, 1995, doi: 10.1002/GCC.2870140208.
- [18] H. Shen *et al.*, “Integrated Molecular Characterization of Testicular Germ Cell Tumors,” *Cell Rep*, vol. 23, no. 11, pp. 3392–3406, Jun. 2018, doi: 10.1016/J.CELREP.2018.05.039/ATTACHMENT/8C58EDFE-E888-4C80-94B5-91623514588F/MMC8.PDF.
- [19] M. Ní Leathlobhair *et al.*, “Genomic landscape of adult testicular germ cell tumours in the 100,000 Genomes Project,” *Nature Communications* 2024 15:1, vol. 15, no. 1, pp. 1–13, Oct. 2024, doi: 10.1038/s41467-024-53193-6.

- [20] K. Litchfield *et al.*, “Whole-exome sequencing reveals the mutational spectrum of testicular germ cell tumours,” *Nat Commun*, vol. 6, Jan. 2015, doi: 10.1038/NCOMMS6973.
- [21] E. Rajpert-De Meyts, K. A. McGlynn, K. Okamoto, M. A. S. Jewett, and C. Bokemeyer, “Testicular germ cell tumours,” *Lancet*, vol. 387, no. 10029, pp. 1762–1774, Apr. 2016, doi: 10.1016/S0140-6736(15)00991-5.
- [22] J. De Jong *et al.*, “Differential expression of SOX17 and SOX2 in germ cells and stem cells has biological and clinical implications,” *J Pathol*, vol. 215, no. 1, pp. 21–30, May 2008, doi: 10.1002/PATH.2332.
- [23] M. R. Müller, M. A. Skowron, P. Albers, and D. Nettersheim, “Molecular and epigenetic pathogenesis of germ cell tumors,” *Asian J Urol*, vol. 8, no. 2, pp. 144–154, Apr. 2021, doi: 10.1016/J.AJUR.2020.05.009.
- [24] J. W. Oosterhuis and L. H. J. Looijenga, “Human germ cell tumours from a developmental perspective,” *Nat Rev Cancer*, vol. 19, no. 9, pp. 522–537, Sep. 2019, doi: 10.1038/S41568-019-0178-9.
- [25] M. R. Müller, M. A. Skowron, P. Albers, and D. Nettersheim, “Molecular and epigenetic pathogenesis of germ cell tumors,” *Asian J Urol*, vol. 8, no. 2, pp. 144–154, Apr. 2021, doi: 10.1016/J.AJUR.2020.05.009.
- [26] S. Gillissen *et al.*, “Predicting outcomes in men with metastatic nonseminomatous germ cell tumors (NSGCT): Results from the IGCCCG update consortium,” *Journal of Clinical Oncology*, vol. 39, no. 14, pp. 1563–1574, May 2021, doi: 10.1200/JCO.20.03296/SUPPL_FILE/PROTOCOL_JCO.20.03296.PDF.
- [27] S. D. Williams, R. Birch, L. H. Einhorn, L. Irwin, F. A. Greco, and P. J. Loehrer, “Treatment of Disseminated Germ-Cell Tumors with Cisplatin, Bleomycin, and either Vinblastine or Etoposide,” *New England Journal of Medicine*, vol. 316, no. 23, pp. 1435–1440, Jun. 1987, doi: 10.1056/NEJM198706043162302.
- [28] W. F. Hendry *et al.*, “Metastatic nonseminomatous germ cell tumors of the testis,” *Cancer*, vol. 94, no. 6, pp. 1668–1676, Mar. 2002, doi: 10.1002/CNCR.10440.
- [29] C. Oing, P. Giannatempo, F. Honecker, K. Oechsle, C. Bokemeyer, and J. Beyer, “Palliative treatment of germ cell cancer,” *Cancer Treat Rev*, vol. 71, pp. 102–107, Dec. 2018, doi: 10.1016/J.CTRV.2018.10.007.

- [30] M. A. Skowron *et al.*, “The developmental origin of cancers defines basic principles of cisplatin resistance,” *Cancer Lett*, vol. 519, pp. 199–210, Oct. 2021, doi: 10.1016/J.CANLET.2021.07.037.
- [31] C. Fung, P. C. Dinh, S. D. Fossa, and L. B. Travis, “Testicular Cancer Survivorship,” *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, vol. 17, no. 12, pp. 1557–1568, Dec. 2019, doi: 10.6004/JNCCN.2019.7369.
- [32] J. Lauritsen *et al.*, “Long-term neurotoxicity and quality of life in testicular cancer survivors—a nationwide cohort study,” *Journal of Cancer Survivorship*, vol. 15, no. 4, pp. 509–517, Aug. 2021, doi: 10.1007/S11764-020-00944-1/FIGURES/2.
- [33] T. Kouzarides, “Chromatin Modifications and Their Function,” *Cell*, vol. 128, no. 4, pp. 693–705, Feb. 2007, doi: 10.1016/J.CELL.2007.02.005.
- [34] A. Saha, J. Wittmeyer, and B. R. Cairns, “Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones,” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2006 7:6, vol. 7, no. 6, pp. 437–447, Jun. 2006, doi: 10.1038/nrm1945.
- [35] H. Kwon, A. N. Imbalzano, P. A. Khavari, R. E. Kingston, and M. R. Green, “Nucleosome disruption and enhancement of activator binding by a human SW1/SNF complex,” *Nature*, vol. 370, no. 6489, pp. 477–481, 1994, doi: 10.1038/370477A0.
- [36] N. Mashtalir *et al.*, “Modular Organization and Assembly of SWI/SNF Family Chromatin Remodeling Complexes,” *Cell*, vol. 175, no. 5, pp. 1272–1288.e20, Nov. 2018, doi: 10.1016/J.CELL.2018.09.032.
- [37] L. Pagliaroli and M. Trizzino, “The Evolutionary Conserved SWI/SNF Subunits ARID1A and ARID1B Are Key Modulators of Pluripotency and Cell-Fate Determination,” *Front Cell Dev Biol*, vol. 9, p. 449, Mar. 2021, doi: 10.3389/FCELL.2021.643361/BIBTEX.
- [38] X. Wang *et al.*, “SMARCB1-mediated SWI/SNF complex function is essential for enhancer regulation,” *Nature Genetics* 2016 49:2, vol. 49, no. 2, pp. 289–295, Dec. 2016, doi: 10.1038/ng.3746.
- [39] B. H. Alver *et al.*, “The SWI/SNF chromatin remodelling complex is required for maintenance of lineage specific enhancers,” *Nature Communications* 2017 8:1, vol. 8, no. 1, pp. 1–10, Mar. 2017, doi: 10.1038/ncomms14648.

- [40] I. Lei *et al.*, “BAF250a Protein Regulates Nucleosome Occupancy and Histone Modifications in Priming Embryonic Stem Cell Differentiation,” *J Biol Chem*, vol. 290, no. 31, pp. 19343–19352, Jul. 2015, doi: 10.1074/JBC.M115.637389.
- [41] C. Bossen, C. S. Murre, A. N. Chang, R. Mansson, H. R. Rodewald, and C. Murre, “The chromatin remodeler Brg1 activates enhancer repertoires to establish B cell identity and modulate cell growth,” *Nat Immunol*, vol. 16, no. 7, pp. 775–784, Jul. 2015, doi: 10.1038/NI.3170.
- [42] J. M. Alexander *et al.*, “Brg1 modulates enhancer activation in mesoderm lineage commitment,” *Development*, vol. 142, no. 8, pp. 1418–1430, 2015, doi: 10.1242/DEV.109496.
- [43] I. Lei, S. Tian, V. Chen, Y. Zhao, and Z. Wang, “SWI/SNF Component BAF250a Coordinates OCT4 and WNT Signaling Pathway to Control Cardiac Lineage Differentiation,” *Front Cell Dev Biol*, vol. 7, Jan. 2020, doi: 10.3389/fcell.2019.00358.
- [44] S. L. Smith-Roe *et al.*, “SWI/SNF complexes are required for full activation of the DNA-damage response,” *Oncotarget*, vol. 6, no. 2, pp. 732–745, 2015, doi: 10.18632/ONCOTARGET.2715.
- [45] Y. Chen *et al.*, “A PARP1-BRG1-SIRT1 axis promotes HR repair by reducing nucleosome density at DNA damage sites,” *Nucleic Acids Res*, vol. 47, no. 16, pp. 8563–8580, Sep. 2019, doi: 10.1093/NAR/GKZ592.
- [46] A. Harrod, K. A. Lane, and J. A. Downs, “The role of the SWI/SNF chromatin remodelling complex in the response to DNA double strand breaks,” *DNA Repair (Amst)*, vol. 93, Sep. 2020, doi: 10.1016/J.DNAREP.2020.102919.
- [47] J. Shen *et al.*, “ARID1A Deficiency Impairs the DNA Damage Checkpoint and Sensitizes Cells to PARP Inhibitors,” *Cancer Discov*, vol. 5, no. 7, pp. 752–767, Jul. 2015, doi: 10.1158/2159-8290.CD-14-0849.
- [48] E. C. Dykhuizen *et al.*, “BAF complexes facilitate decatenation of DNA by topoisomerase II α ,” *Nature*, vol. 497, no. 7451, pp. 624–627, May 2013, doi: 10.1038/nature12146.
- [49] B. Zhao *et al.*, “ARID1A promotes genomic stability through protecting telomere cohesion,” *Nat Commun*, vol. 10, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-12037-4.

- [50] A. Bayona-Feliu, S. Barroso, S. Muñoz, and A. Aguilera, "The SWI/SNF chromatin remodeling complex helps resolve R-loop-mediated transcription–replication conflicts," *Nature Genetics* 2021 53:7, vol. 53, no. 7, pp. 1050–1063, May 2021, doi: 10.1038/s41588-021-00867-2.
- [51] S. Jones *et al.*, "Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma," *Science* (1979), vol. 330, no. 6001, pp. 228–231, Oct. 2010, doi: 10.1126/SCIENCE.1196333/SUPPL_FILE/JONES_SOM.PDF.
- [52] C. Kadoch *et al.*, "Proteomic and bioinformatic analysis of mammalian SWI/SNF complexes identifies extensive roles in human malignancy," *Nature Genetics* 2013 45:6, vol. 45, no. 6, pp. 592–601, May 2013, doi: 10.1038/ng.2628.
- [53] P. Mittal and C. W. M. Roberts, "The SWI/SNF complex in cancer — biology, biomarkers and therapy," *Nature Reviews Clinical Oncology* 2020 17:7, vol. 17, no. 7, pp. 435–448, Apr. 2020, doi: 10.1038/s41571-020-0357-3.
- [54] R. Mathur *et al.*, "ARID1A loss impairs enhancer-mediated gene regulation and drives colon cancer in mice," *Nature Genetics* 2016 49:2, vol. 49, no. 2, pp. 296–302, Dec. 2016, doi: 10.1038/ng.3744.
- [55] B. Guan *et al.*, "Roles of Deletion of Arid1a, a Tumor Suppressor, in Mouse Ovarian Tumorigenesis," *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, vol. 106, no. 7, Jul. 2014, doi: 10.1093/JNCI/DJU146.
- [56] X. Sun *et al.*, "Arid1a Has Context-Dependent Oncogenic and Tumor Suppressor Functions in Liver Cancer," *Cancer Cell*, vol. 32, no. 5, pp. 574-589.e6, Nov. 2017, doi: 10.1016/J.CCELL.2017.10.007.
- [57] H. Cho, J. S. Y. Kim, H. Chung, C. Perry, H. Lee, and J. H. Kim, "Loss of ARID1A/BAF250a expression is linked to tumor progression and adverse prognosis in cervical cancer," *Hum Pathol*, vol. 44, no. 7, pp. 1365–1374, Jul. 2013, doi: 10.1016/J.HUMPATH.2012.11.007.
- [58] S. F. Faraj *et al.*, "ARID1A immunohistochemistry improves outcome prediction in invasive urothelial carcinoma of urinary bladder," *Hum Pathol*, vol. 45, no. 11, pp. 2233–2239, Nov. 2014, doi: 10.1016/J.HUMPATH.2014.07.003.

- [59] J. Shen *et al.*, “ARID1A Deficiency Impairs the DNA Damage Checkpoint and Sensitizes Cells to PARP Inhibitors,” *Cancer Discov*, vol. 5, no. 7, pp. 752–767, Jul. 2015, doi: 10.1158/2159-8290.CD-14-0849.
- [60] C. T. Williamson *et al.*, “ATR inhibitors as a synthetic lethal therapy for tumours deficient in ARID1A,” *Nature Communications* 2016 7:1, vol. 7, no. 1, pp. 1–13, Dec. 2016, doi: 10.1038/ncomms13837.
- [61] B. G. Bitler *et al.*, “Synthetic lethality by targeting EZH2 methyltransferase activity in ARID1A-mutated cancers,” *Nat Med*, vol. 21, no. 3, pp. 231–238, 2015, doi: 10.1038/NM.3799.
- [62] B. G. Bitler *et al.*, “ARID1A-mutated ovarian cancers depend on HDAC6 activity,” *Nature Cell Biology* 2017 19:8, vol. 19, no. 8, pp. 962–973, Jul. 2017, doi: 10.1038/ncb3582.
- [63] H. Rehman *et al.*, “ARID1A-deficient bladder cancer is dependent on PI3K signaling and sensitive to EZH2 and PI3K inhibitors,” *JCI Insight*, Jul. 2022, doi: 10.1172/JCI.INSIGHT.155899.
- [64] J. Shen *et al.*, “ARID1A deficiency promotes mutability and potentiates therapeutic antitumor immunity unleashed by immune checkpoint blockade,” *Nature Medicine* 2018 24:5, vol. 24, no. 5, pp. 556–562, May 2018, doi: 10.1038/s41591-018-0012-z.
- [65] M. B. Maxwell *et al.*, “ARID1A suppresses R-loop-mediated STING-type I interferon pathway activation of anti-tumor immunity,” *Cell*, vol. 187, no. 13, pp. 3390–3408.e19, Jun. 2024, doi: 10.1016/J.CELL.2024.04.025/ATTACHMENT/2FFC2887-7697-479A-A3DC-9BBBE59DCF95/MMC1.PDF.
- [66] E. C. Dykhuizen, L. C. Carmody, N. Tolliday, G. R. Crabtree, and M. A. J. Palmer, “Screening for inhibitors of an essential chromatin remodeler in mouse embryonic stem cells by monitoring transcriptional regulation,” *J Biomol Screen*, vol. 17, no. 9, pp. 1221–1230, Oct. 2012, doi: 10.1177/1087057112455060/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_1087057112455060-FIG6.JPEG.
- [67] C. A. Marian *et al.*, “Small Molecule Targeting of Specific BAF (mSWI/SNF) Complexes for HIV Latency Reversal,” *Cell Chem Biol*, vol. 25, no. 12, pp. 1443–1455.e14, Dec. 2018, doi:

10.1016/J.CHEMBIOL.2018.08.004/ASSET/B82E4DB3-4369-4962-AAD4-D6EE1EC452CF/MAIN.ASSETS/FX6_LRG.JPG.

- [68] E. J. Chory *et al.*, “Chemical Inhibitors of a Selective SWI/SNF Function Synergize with ATR Inhibition in Cancer Cell Killing,” *ACS Chem Biol*, vol. 15, no. 6, pp. 1685–1696, 2020, doi: 10.1021/acscchembio.0c00312.
- [69] S. Banerjee *et al.*, “ATARI trial: ATR inhibitor in combination with olaparib in gynecological cancers with ARID1A loss or no loss (ENGOT/GYN1/NCRI),” *Int J Gynecol Cancer*, vol. 31, no. 11, pp. 1471–1475, Nov. 2021, doi: 10.1136/IJGC-2021-002973.
- [70] C. Loveday *et al.*, “Genomic landscape of platinum resistant and sensitive testicular cancers,” *Nature Communications* 2020 11:1, vol. 11, no. 1, pp. 1–12, May 2020, doi: 10.1038/s41467-020-15768-x.
- [71] D. Nettersheim, A. Gillis, K. Biermann, L. H. J. Looijenga, and H. Schorle, “The seminoma cell line TCam-2 is sensitive to HDAC inhibitor depsipeptide but tolerates various other chemotherapeutic drugs and loss of NANOG expression,” *Genes Chromosomes Cancer*, vol. 50, no. 12, pp. 1033–1042, Dec. 2011, doi: 10.1002/GCC.20918.
- [72] D. Nettersheim *et al.*, “A signaling cascade including ARID1A, GADD45B and DUSP1 induces apoptosis and affects the cell cycle of germ cell cancers after romidepsin treatment,” *Oncotarget*, vol. 7, no. 46, pp. 74931–74946, 2016, doi: 10.18632/ONCOTARGET.11647.
- [73] S. Jostes, D. Nettersheim, S. Schneider, and H. Schorle, “Cultivation of Testicular Germ Cell Cancer Cell Lines and Establishment of Gene-Edited Subclones Using CRISPR/Cas9,” *Methods in Molecular Biology*, vol. 2195, pp. 85–97, 2021, doi: 10.1007/978-1-0716-0860-9_7.
- [74] M. A. Skowron, M. J. Hoffmann, M. M. Watolla, and D. Nettersheim, “Evaluation of Chemotherapeutic Drugs for Treatment of (Cisplatin-Resistant) Germ Cell Cancer Cell Lines,” *Methods Mol Biol*, vol. 2195, pp. 99–111, 2021, doi: 10.1007/978-1-0716-0860-9_8.
- [75] D. Eckert, D. Nettersheim, L. C. Heukamp, S. Kitazawa, K. Biermann, and H. Schorle, “TCam-2 but not JKT-1 cells resemble seminoma in cell culture,” *Cell Tissue Res*, vol. 331, no. 2, pp. 529–538, Feb. 2008, doi: 10.1007/S00441-007-0527-Y.

- [76] D. Nettersheim *et al.*, “The cancer/testis-antigen PRAME supports the pluripotency network and represses somatic and germ cell differentiation programs in seminomas,” *Br J Cancer*, vol. 115, no. 4, p. 454, Aug. 2016, doi: 10.1038/BJC.2016.187.
- [77] L. Kurz *et al.*, “ARID1A Regulates Transcription and the Epigenetic Landscape via POLE and DMAP1 While ARID1A Deficiency or Pharmacological Inhibition Sensitizes Germ Cell Tumor Cells to ATR Inhibition,” *Cancers (Basel)*, vol. 12, p. 905, 2020, doi: 10.3390/cancers12040905.
- [78] B. G. Bitler *et al.*, “ARID1A-mutated ovarian cancers depend on HDAC6 activity,” *Nature Cell Biology* 2017 19:8, vol. 19, no. 8, pp. 962–973, Jul. 2017, doi: 10.1038/ncb3582.
- [79] B. G. Bitler *et al.*, “Synthetic lethality by targeting EZH2 methyltransferase activity in ARID1A-mutated cancers,” *Nat Med*, vol. 21, no. 3, pp. 231–238, 2015, doi: 10.1038/NM.3799.
- [80] H. Tomihara *et al.*, “Loss of ARID1A Promotes Epithelial–Mesenchymal Transition and Sensitizes Pancreatic Tumors to Proteotoxic Stress A C,” *Cancer Res*, vol. 81, no. 2, pp. 332–343, Jan. 2021, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-3922/654017/AM/LOSS-OF-ARID1A-PROMOTES-EPITHELIAL-MESENCHYMAL.
- [81] C. T. Williamson *et al.*, “ATR inhibitors as a synthetic lethal therapy for tumours deficient in ARID1A,” *Nature Communications* 2016 7:1, vol. 7, no. 1, pp. 1–13, Dec. 2016, doi: 10.1038/ncomms13837.
- [82] X. Gao, P. Tate, P. Hu, R. Tjian, W. C. Skarnes, and Z. Wang, “ES cell pluripotency and germ-layer formation require the SWI/SNF chromatin remodeling component BAF250a,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 105, no. 18, pp. 6656–6661, May 2008, doi: 10.1073/pnas.0801802105.
- [83] J. Liu *et al.*, “Genome-wide studies reveal the essential and opposite roles of ARID1A in controlling human cardiogenesis and neurogenesis from pluripotent stem cells,” *Genome Biol*, vol. 21, no. 1, Jul. 2020, doi: 10.1186/S13059-020-02082-4.
- [84] S. V. Jostes *et al.*, “Unique and redundant roles of SOX2 and SOX17 in regulating the germ cell tumor fate,” *Int J Cancer*, vol. 146, no. 6, pp. 1592–1605, Mar. 2020, doi: 10.1002/IJC.32714.

- [85] X. Gao, P. Tate, P. Hu, R. Tjian, W. C. Skarnes, and Z. Wang, "ES cell pluripotency and germ-layer formation require the SWI/SNF chromatin remodeling component BAF250a," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 105, no. 18, pp. 6656–6661, May 2008, doi: 10.1073/PNAS.0801802105/SUPPL_FILE/0801802105SI.PDF.
- [86] C. T. Williamson *et al.*, "ATR inhibitors as a synthetic lethal therapy for tumours deficient in ARID1A," *Nature Communications* 2016 7:1, vol. 7, no. 1, pp. 1–13, Dec. 2016, doi: 10.1038/ncomms13837.
- [87] J. R. Raab, S. Resnick, and T. Magnuson, "Genome-Wide Transcriptional Regulation Mediated by Biochemically Distinct SWI/SNF Complexes," *PLoS Genet*, vol. 11, no. 12, p. e1005748, 2015, doi: 10.1371/JOURNAL.PGEN.1005748.
- [88] Z. Wang *et al.*, "Dual ARID1A/ARID1B loss leads to rapid carcinogenesis and disruptive redistribution of BAF complexes," *Nature Cancer* 2020 1:9, vol. 1, no. 9, pp. 909–922, Sep. 2020, doi: 10.1038/s43018-020-00109-0.
- [89] L. Han *et al.*, "ARID1A Is Critical for Maintaining Normal Hematopoiesis in Mice," *Blood*, vol. 132, no. Supplement 1, p. 3833, Nov. 2018, doi: 10.1182/BLOOD-2018-99-117993.
- [90] L. Ho *et al.*, "An embryonic stem cell chromatin remodeling complex, esBAF, is essential for embryonic stem cell self-renewal and pluripotency," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 106, no. 13, pp. 5181–5186, Mar. 2009, doi: 10.1073/PNAS.0812889106/SUPPL_FILE/0812889106SI.PDF.
- [91] "Study Details | ATR Inhibitor in Combination With Olaparib/Durvalumab (MED14736) in Gynaecological Cancers With ARID1A Loss or no Loss | ClinicalTrials.gov." Accessed: Jan. 28, 2025. [Online]. Available: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04065269>
- [92] T. A. Yap *et al.*, "First-in-Human Study of the Ataxia Telangiectasia and Rad3-Related (ATR) Inhibitor Tuvusertib (M1774) as Monotherapy in Patients with Solid Tumors," *Clinical Cancer Research*, vol. 30, no. 10, pp. 2057–2067, May 2024, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-23-2409/734921/AM/FIRST-IN-HUMAN-STUDY-OF-THE-ATAXIA-TELANGIECTASIA.
- [93] M. T. Dillon *et al.*, "Durable responses to ATR inhibition with ceralasertib in tumors with genomic defects and high inflammation," *J Clin Invest*, vol. 134, no. 2, Jan. 2024, doi: 10.1172/JCI175369.

- [94] E. C. Dykhuizen *et al.*, “BAF complexes facilitate decatenation of DNA by topoisomerase II α ,” *Nature*, vol. 497, no. 7451, pp. 624–627, May 2013, doi: 10.1038/nature12146.
- [95] M. R. Rountree, K. E. Bachman, and S. B. Baylin, “DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci,” *Nature Genetics* 2000 25:3, vol. 25, no. 3, pp. 269–277, Jul. 2000, doi: 10.1038/77023.
- [96] G. E. Lee, J. H. Kim, M. Taylor, and M. T. Muller, “DNA methyltransferase 1-associated protein (DMAP1) is a co-repressor that stimulates DNA methylation globally and locally at sites of double strand break repair,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 48, pp. 37630–37640, Nov. 2010, doi: 10.1074/jbc.M110.148536.
- [97] M. Negishi, T. Chiba, A. Saraya, S. Miyagi, and A. Iwama, “Dmap1 plays an essential role in the maintenance of genome integrity through the DNA repair process,” *Genes to Cells*, vol. 14, no. 11, pp. 1347–1357, Nov. 2009, doi: 10.1111/J.1365-2443.2009.01352.X.
- [98] Y. Cai *et al.*, “Identification of New Subunits of the Multiprotein Mammalian TRRAP/TIP60-containing Histone Acetyltransferase Complex,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 44, pp. 42733–42736, Oct. 2003, doi: 10.1074/jbc.C300389200.
- [99] C. Li *et al.*, “Structure of the human TIP60-C histone exchange and acetyltransferase complex,” *Nature* 2024 635:8039, vol. 635, no. 8039, pp. 764–769, Sep. 2024, doi: 10.1038/s41586-024-08011-w.
- [100] K. Chen *et al.*, “Structure of the human TIP60 complex,” *Nature Communications* 2024 15:1, vol. 15, no. 1, pp. 1–14, Aug. 2024, doi: 10.1038/s41467-024-51259-z.
- [101] Z. Yang *et al.*, “Structural insights into the human NuA4/TIP60 acetyltransferase and chromatin remodeling complex,” *Science*, vol. 385, no. 6711, p. ead15816, Aug. 2024, doi: 10.1126/SCIENCE.ADL5816/SUPPL_FILE/SCIENCE.ADL5816_SM.PDF.
- [102] K. Penicud and A. Behrens, “DMAP1 is an essential regulator of ATM activity and function,” *Oncogene* 2014 33:4, vol. 33, no. 4, pp. 525–531, Jan. 2013, doi: 10.1038/onc.2012.597.

- [103] Y. Yamaguchi *et al.*, “Novel 1p tumour suppressor Dnmt1-associated protein 1 regulates MYCN/ataxia telangiectasia mutated/p53 pathway,” *Eur J Cancer*, vol. 50, no. 8, pp. 1555–1565, May 2014, doi: 10.1016/j.ejca.2014.01.023.
- [104] Z. F. Pursell, I. Isoz, E. B. Lundström, E. Johansson, and T. A. Kunkel, “Yeast DNA polymerase ϵ participates in leading-strand DNA replication,” *Science* (1979), vol. 317, no. 5834, pp. 127–130, Jul. 2007, doi: 10.1126/SCIENCE.1144067/SUPPL_FILE/PURSELL_SOM.PDF.
- [105] B. Garmezzy *et al.*, “Clinical and Molecular Characterization of POLE Mutations as Predictive Biomarkers of Response to Immune Checkpoint Inhibitors in Advanced Cancers,” *JCO Precis Oncol*, no. 6, May 2022, doi: 10.1200/PO.21.00267/ASSET/839F9D1A-AB69-4AA0-92FF-C1A931907639/ASSETS/IMAGES/LARGE/PO.21.00267TA1.JPG.
- [106] M. Ambrosini *et al.*, “Immune checkpoint inhibitors for POLE or POLD1 proofreading-deficient metastatic colorectal cancer,” *Annals of Oncology*, vol. 35, no. 7, pp. 643–655, Jul. 2024, doi: 10.1016/j.annonc.2024.03.009.
- [107] L. Magrin *et al.*, “POLE, POLD1, and NTHL1: the last but not the least hereditary cancer-predisposing genes,” *Oncogene 2021 40:40*, vol. 40, no. 40, pp. 5893–5901, Aug. 2021, doi: 10.1038/s41388-021-01984-2.
- [108] S. Hocke *et al.*, “A synthetic lethal screen identifies ATR-inhibition as a novel therapeutic approach for POLD1-deficient cancers,” *Oncotarget*, vol. 7, no. 6, pp. 7080–7095, Jan. 2016, doi: 10.18632/ONCOTARGET.6857.
- [109] A. M. Weber and A. J. Ryan, “ATM and ATR as therapeutic targets in cancer,” *Pharmacol Ther*, vol. 149, pp. 124–138, 2015, doi: 10.1016/J.PHARMTHERA.2014.12.001.
- [110] M. R. Middleton *et al.*, “Phase 1 study of the ATR inhibitor berzosertib (formerly M6620, VX-970) combined with gemcitabine $\pm$ cisplatin in patients with advanced solid tumours,” *British Journal of Cancer 2021 125:4*, vol. 125, no. 4, pp. 510–519, May 2021, doi: 10.1038/s41416-021-01405-x.
- [111] A. B. Hall *et al.*, “Potentiation of tumor responses to DNA damaging therapy by the selective ATR inhibitor VX-970,” *Oncotarget*, vol. 5, no. 14, pp. 5674–5685, Jul. 2014, doi: 10.18632/ONCOTARGET.2158.
- [112] P. A. Konstantinopoulos *et al.*, “Berzosertib plus gemcitabine versus gemcitabine alone in platinum-resistant high-grade serous ovarian cancer: a

- multicentre, open-label, randomised, phase 2 trial," *Lancet Oncol*, vol. 21, no. 7, pp. 957–968, Jul. 2020, doi: 10.1016/S1470-2045(20)30180-7.
- [113] S. K. Pal *et al.*, "Effect of Cisplatin and Gemcitabine With or Without Berzosertib in Patients With Advanced Urothelial Carcinoma: A Phase 2 Randomized Clinical Trial," *JAMA Oncol*, vol. 7, no. 10, pp. 1536–1543, Oct. 2021, doi: 10.1001/JAMAONCOL.2021.3441.

Anhang

Tabelle 20 „DAVID Gene Antology“-Analyse der herunterregulierten Proteine nach Behandlung mit C63

Herunterregulierte Proteine in TCam-2 + C63 im Vergleich zur Kontrolle, nach 24 h und 48 h					
			counts	P_Value	Benjamini
Annotation Cluster 1	UP_KEYWORDS	Iron-sulfur	8	6.1E-14	5.6E-12
	UP_KEYWORDS	4Fe-4S	6	1.6E-10	7.4E-9
	GOTERM_MF_DIRECT	4 iron, 4 sulfur cluster binding	6	8.4E-10	6.0E-8
	UP_KEYWORDS	Iron	8	9.6E-9	3.0E-7
	UP_KEYWORDS	2Fe-2S	4	5.4E-7	1.2E-5
	UP_KEYWORDS	Electron transport	5	2.6E-6	4.8E-5
	GOTERM_MF_DIRECT	2 iron, 2 sulfur cluster binding	4	2.7E-6	9.7E-5
	UP_KEYWORDS	Respiratory chain	4	2.6E-5	3.9E-4
	UP_KEYWORDS	Mitochondrion	8	3.9E-5	5.1E-4
	KEGG_PATHWAY	Oxidative phosphorylation	5	8.3E-5	2.9E-3
	UP_KEYWORDS	Transit peptide	6	1.0E-4	1.2E-3
	KEGG_PATHWAY	Parkinson's disease	5	1.1E-4	1.9E-3
	KEGG_PATHWAY	Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)	5	1.4E-4	1.6E-3
	KEGG_PATHWAY	Alzheimer's disease	5	2.1E-4	1.8E-3
	KEGG_PATHWAY	Huntington's disease	5	3.5E-4	2.4E-3
	UP_KEYWORDS	Ubiquinone	3	4.7E-4	4.8E-3
	GOTERM_MF_DIRECT	NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity	3	1.3E-3	3.1E-2
	GOTERM_BP_DIRECT	mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone	3	1.4E-3	2.1E-1
	UP_KEYWORDS	Oxidoreductase	5	1.7E-3	1.6E-2
	UP_KEYWORDS	Mitochondrion inner membrane	4	1.9E-3	1.5E-2
	GOTERM_BP_DIRECT	mitochondrial respiratory chain complex I assembly	3	2.3E-3	1.2E-1
	GOTERM_MF_DIRECT	electron carrier activity	3	4.5E-3	7.7E-2
	UP_KEYWORDS	Transport	7	7.1E-3	5.3E-2
	UP_KEYWORDS	NAD	3	1.1E-2	7.6E-2
	KEGG_PATHWAY	Metabolic pathways	7	1.7E-2	9.5E-2
	GOTERM_MF_DIRECT	metal ion binding	7	2.2E-2	2.7E-1
	UP_KEYWORDS	Disease mutation	7	2.3E-2	1.4E-1
	UP_KEYWORDS	Metal-binding	8	3.8E-2	2.1E-1
	UP_KEYWORDS	Membrane	6	8.8E-1	1.0E0
Annotation Cluster 2	GOTERM_BP_DIRECT	DNA repair	4	2.2E-3	1.7E-1

	UP_KEYWORDS	Transferase	4	2.1E-1	6.7E-1
	UP_KEYWORDS	Nucleus	6	5.5E-1	9.7E-1
Annotation Cluster 3	UP_KEYWORDS	Disulfide bond	5	3.9E-1	9.0E-1
	UP_KEYWORDS	Secreted	3	5.5E-1	9.7E-1
	UP_KEYWORDS	Signal	5	5.5E-1	9.6E-1
	UP_KEYWORDS	Glycoprotein	4	8.3E-1	1.0E0
Annotation Cluster 4	UP_KEYWORDS	Membrane	6	8.8E-1	1.0E0
	UP_KEYWORDS	Transmembrane helix	3	9.8E-1	1.0E0
	UP_KEYWORDS	Transmembrane	3	9.8E-1	1.0E0

Danksagung

Am Ende dieser Arbeit möchte ich die Gelegenheit nutzen, all denjenigen von Herzen zu danken, die mich auf meinem Weg begleitet und unterstützt haben. Ohne eure Hilfe, Vertrauen und Geduld wäre diese Promotion in dieser Form nicht möglich gewesen.

Mein besonderer Dank gilt Professor Daniel Nettersheim für die herausragende Betreuung. Deine fachliche Expertise, Verlässlichkeit und die stets konstruktiven Diskussionen haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ich verdanke dir nicht nur wissenschaftliche Förderung, sondern auch wichtige Impulse für meine persönliche und berufliche Weiterentwicklung.

Zu deinen Kernfähigkeiten gehört aber auch die Zusammenstellung eines hervorragenden Teams, dem ich hier in Gesamtheit danken möchte. Die gemeinsame Zeit war nicht nur fachlich bereichernd, sondern auch abseits der Laborräume eine wertvolle Erfahrung, an die ich gerne zurückdenke. Bedanken möchte ich mich insbesondere bei PD Margaretha Skowron, Anna Pehlke, Alissa Mikljaeva, Gillian Ludwig, Melanie Müller, Mara Kotthoff, Aaron Burmeister und Alexa Stephan.

Mein tief empfundener Dank gilt meiner Familie, meinen vier Brüdern David, Tobias, Valentin und Benjamin, die mich in all den Jahren immer ermutigt und begleitet haben. Ganz besonders danke ich meinen Eltern Bettina und Martin, die mir durch ihre beständige Unterstützung, ihre Liebe und ihr Vertrauen die Grundlage für diesen Weg geschaffen haben. Sie haben mich gelehrt, neugierig zu sein, Verantwortung zu übernehmen, mit Ausdauer meine Ziele zu verfolgen, aber auch immer mal wieder auf die Bremse zu treten.

Mein größter Dank gilt dir Rebecca. Du hast mich in Höhen und Tiefen begleitet, mir stets den Rücken gestärkt und mich mit deiner wachen und klaren Art immer inspiriert.