

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

Klinikdirektor: Univ.-Prof. Dr. med. Peter Albers

Molekulare Analyse einer *ARID1A*-Defizienz in KZT und deren
Sensitivierung bei einer Behandlung mit Romidepsin

Dissertation

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

vorgelegt von

Alisa Miklyaeva

2026

Als Inauguraldissertation gedruckt mit 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. med. Joachim Schmitt

Auflistung der Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Kurz, L.; Miklyaeva, A.; Skowron, M.A.; Overbeck, N.; Poschmann, G.; Becker, T.; Eul, K.; Kurz, T.; Schönberger, S.; Calaminus, G.; 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* **2020**, *12*, 905.

<https://doi.org/10.3390/cancers12040905>

I. Zusammenfassung

Keimzelltumoren (KZT) stellen die häufigste Tumorerkrankung des jungen Mannes dar. Sie entwickeln sich aus entarteten primordialen Keimzellen durch (epi)genetische Aberrationen. Nach erfolgter Tumorexzision stehen Platin-basierte Chemotherapien sowie eine lokale Strahlentherapie, je nach Histologie und Tumorstadium, als Optionen zu Verfügung. Dabei lässt sich eine hohe Nebenwirkungsrate sowie ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Zweitmalignomen beobachten. Zudem erleiden ca. 30 % der Patienten ein Rezidiv oder einen Tumorprogress. Bei ca. 10 % der Patienten lässt sich nach Erstlinientherapie eine Resistenz gegen Platin-haltige Chemotherapeutika nachweisen, sodass die Erforschung neuer Therapieoptionen erforderlich ist. Vorstudien zur KZT-Entstehung zeigen, dass insbesondere epigenetische Veränderungen, wie Desoxyribonukleinsäuren (DNA)-Methylierung und Histonmodifikation, zur Tumorentwicklung beitragen. Inhibitoren der Histondeacetylasen (HDAC-Inhibitoren), wie Romidepsin, zeigten in Vorstudien zytotoxische Effekte auf KZT *in vitro* und *in vivo* und könnten somit eine therapeutische Option darstellen. Weitere Vorarbeiten konnten hierbei *ARID1A* als Schlüsselfaktor der Romidepsin-Wirkkaskade identifizieren. Dieser gehört zum Chromatin-remodellierenden, ATP-abhängigen SWI/SNF-Komplex und ist insbesondere an der DNA-Reparatur, Genexpression und der Zelldifferenzierung beteiligt. Zudem zeigt sich in Vorstudien, dass eine alleinige siRNA-vermittelte Herunterregulierung von *ARID1A* zum Zellzyklusarrest und Apoptose in KZT-Zellen führt. Ziel dieser Promotionsarbeit ist die weitere molekularbiologische Aufschlüsselung der *ARID1A*-Funktion sowie die Prüfung des therapeutischen Potenzials einer pharmakologischen *ARID1A*-Inhibierung in KZT. Hierfür erfolgte zunächst die Herstellung *ARID1A*-defizienter KZT-Zelllinien mittels CRISPR/Cas9-Geneditierung. Im Vergleich der *ARID1A*-defizienten KZT mit ihrer parentalen Zelllinie zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Morphologie und des Zellzyklus. Lediglich die Proliferationsrate war bei *ARID1A*-Verlust verlangsamt. Auf Gen-Ebene zeigte sich bei *ARID1A*-Defizienz eine Herunterregulierung der am SWI/SNF-Komplex beteiligten Gene. In der Massenspektrometrie-Analyse konnte bei *ARID1A*-Defizienz eine verminderte Proteinproduktion der DNA-Polymerase Epsilon (POLE) und des DNA-Methyltransferase-1-assoziierten-Proteins 1 (DNMT1) nachgewiesen werden. Diese sind wiederum an der Transkriptionsregulation, der DNA-Reparatur / -Methylierung, der Histon-Modifikation und Aufrechterhaltung der Pluripotenz beteiligt. Im nächsten Schritt wurde das therapeutische Potenzial einer *ARID1A*-Defizienz geprüft. Bei der Behandlung *ARID1A*-defizienter KZT mit Romidepsin kam es zu einem signifikant stärkeren Abfall der Zellviabilität im Vergleich zu der parentalen Zelllinie. Zudem führte die pharmakologische Inhibierung von *ARID1A* durch den SWI/SNF-Komplex Inhibitor Compound 63 (C63) in Kombination mit Romidepsin zu einem Vorteil gegenüber einer alleinigen Behandlung mit Romidepsin. Somit könnte die Kombination aus *ARID1A*-Inhibitoren und HDAC-Inhibitoren einen therapeutischen Nutzen in *ARID1A*-unmutierten KZT erbringen.

II. Summary

Germ cell tumors (GCT) are the most common malignancy in young men and develop from misguided primordial germ cells due to (epi)genetic aberrations. After tumor excision, platinum-based chemotherapy and local radiotherapy are available options, depending on the histology and tumor stage. However, a high rate of adverse events and an increased risk of developing secondary malignancies can be observed. In addition, around 30 % of patients suffer a recurrence or tumor progression. In around 10 % of patients resistance to platinum-containing chemotherapeutic agents after first-line therapy can be detected, meaning that research into new treatment options is required. Preliminary studies on the development of GCT have shown that epigenetic changes, such as DNA methylation and histone modification, contribute to tumor development. Inhibitors of histone deacetylases (HDAC inhibitors), such as romidepsin, showed cytotoxic effects on GCT *in vitro* and *in vivo* in preliminary studies and could therefore represent a new therapeutic option. Further studies have identified *ARID1A* as a key factor in the romidepsin pathway. *ARID1A* is part of the chromatin-remodeling, ATP-dependent SWI/SNF complex and is particularly involved in DNA repair, gene expression and cell differentiation. In addition, previous investigations have shown that siRNA-mediated downregulation of *ARID1A* alone leads to cell cycle arrest and apoptosis in GCT cells. The aim of this study was to further characterize the molecular function of *ARID1A* and to evaluate the therapeutic potential of pharmacological *ARID1A* inhibition in GCT. Therefore, *ARID1A* deficient GCT cell lines were generated by CRISPR/Cas9 gene editing. A comparison of the *ARID1A*-deficient GCT with their parental cell line showed no significant differences with regard to morphology and cell cycle. The only difference was the reduced proliferation rate upon *ARID1A* deficiency. At the gene level, *ARID1A* deficiency resulted in downregulation of the genes involved in the SWI/SNF complex. Mass spectrometry analysis revealed a reduced protein production of DNA polymerase epsilon (POLE) and DNA methyltransferase-1-associated protein 1 (DMAP1) in *ARID1A*-deficient cells. These proteins are involved in transcriptional regulation, DNA repair / methylation, histone modification and pluripotency. In the next step, we analyzed the therapeutic potential of *ARID1A* deficiency. Treatment of *ARID1A* deficient GCT with romidepsin resulted in a significantly higher decrease in cell viability compared to the parental cell line. In addition, pharmacological inhibition of *ARID1A* by the SWI/SNF complex inhibitor Compound 63 (C63) in combination with romidepsin resulted in an advantage over treatment with romidepsin only. Thus, the combination of *ARID1A* inhibitors and HDAC inhibitors may provide a potential therapeutic benefit in *ARID1A*-unmutated GCT.

III. Abkürzungsverzeichnis

(D)PBS	<i>(Dulbecco's) phosphate buffered saline</i>
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
ABP	Androgenbindungsprotein
AFP	Alpha-Fetoprotein
ARID1A	<i>AT-rich-interaction-domain 1 A</i>
ARID1B	<i>AT-rich-interaction-domain 1 B</i>
ARID2A	<i>AT-rich-interaction-domain 2 A</i>
ARID2B	<i>AT-rich-interaction-domain 2 B</i>
AS	<i>Active Surveillance</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>Ataxia Telangiectasia and Rad3 related</i>
BEP	Bleomycin, Etoposid und Cisplatin
Bp	Basenpaar
C63	Compound 63
CC	Chorionkarzinom
CDKN	<i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cm	Zentimeter
CO₂	Kohlenstoffdioxid
CRISPR/Cas9	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/ CRISPR-associated protein</i>
CT	Computertomographie
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphozyt-Antigen-4</i>
DMAP 1	DNA-Methyltransferase-1-assoziertes-Protein 1
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäure

DNMT1	DNA-Methyltransferase-1
dNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphat
DOC	Deoxycholat
DTT	Dithiothreitol
DUSP	<i>Dual-specificity phosphatases</i>
EAU	<i>European Association of Urology</i>
EC	<i>Embryonal Carcinoma</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EP	Etoposid und Cisplatin
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
g	Gramm
GADD45B	<i>Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Beta</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCNIS	<i>Germ Cell Neoplasia in Situ</i>
GCT	<i>Germ Cell Tumor</i>
GDF3	<i>Growth differentiation factor-3</i>
GnRH	<i>Gonadotropin-Releasing Hormon</i>
h	Stunden
H₂O	Wasser
HATs	Histon-Acetyl-Transferasen
HDAC	Histondeacetylasen
IC	Immun-Checkpoint
ICIs	Immun-Checkpoint Inhibitoren
IGCCCG	<i>International Germ Cell Cancer Cooperative Group</i>
IU	<i>International Unit</i>
kV	Kilovolt
KZT	Keimzelltumor bzw. Keimzelltumore bzw. Keimzelltumoren
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
LH	Luteinisierendes Hormon
M	Mol

m/z	Masse pro Ladung
min	Minute
ml	Milliliter
MM	Mastermix
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMR	<i>Mismatch Repair</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nm	Nanomol
nM	Nanomolar
NS	Nichtseminome
OCT3/4	<i>Octamer-binding Transcription Factor 3/4</i>
P/S	Penicillin / Streptomycin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD-1	<i>Programmed Cell Death-1</i>
PDL-1	<i>Programmed Cell Death Ligand-1</i>
PEI	Cisplatin, Etoposid, Ifosfamid
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PGC	<i>Primordial Germ Cell</i>
PI	Propidiumjodid
PMS	Phenazinmethosulfat
POLE	Polymerase Epsilon
POU5F1	<i>POU domain, class 5, transcription factor 1</i>
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit- Polymerasekettenreaktion
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation Assay</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RPLND	<i>Retroperitoneal Lymphnode Dissection</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>

RT	<i>Reverse Transcriptase</i>
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfate
SE	Seminome
sec	Sekunden
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SMARCA	<i>SWI/SNF Related BAF Chromatin Remodeling Complex Subunit ATPase</i>
SOX17	<i>Sex determining region Y (SRY)- box 17</i>
SOX2	<i>Sex determining region Y (SRY)- box 2</i>
ß-HCG	humanes Choriongonadotropin
STRING	<i>Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins</i>
SWI/SNF	<i>SWItch/Sucrose Non-Fermentable</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Teratom
TGCA	<i>The Cancer Genome Atlas Program</i>
TIN	testikuläre intraepitheliale Neoplasien
TIP60	Tat-aktives-Protein-60kDa
TNBC	<i>Tripple Negative Breast Cancer</i>
Tris	Trisaminomethan
U	<i>Unit</i>
U/ml	<i>Unit pro Milliliter</i>
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
WHO	<i>World Health Organization</i>
XTT	Triphenyltetrazoliumchlorid
YST	Dottersacktumor

IV. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die hormonelle Regulation der Spermatogenese.....	2
Abb. 2: Entwicklung der Keimzelltumore (WHO Typ I-III) in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Spermatogenese.	5
Abb. 3: Aufbau eines Nukleosoms und Auswirkungen einer Histon-Acetylierung und -Deacetylierung auf die Chromatinstruktur.]	12
Abb. 4: Wirkkaskade von Romidepsin mit <i>ARID1A</i> als Schlüsselfaktor.....	15
Abb. 5: <i>ARID1A</i> -Expression in 37 Tumorentitäten.	16
Abb. 6: Analyse der <i>ARID1A</i> -Expression stratifiziert nach den KZT-Subtypen.	17
Abb. 7: Protokoll des CFX384-Touch-Thermal-Cyclers (BioRad, Feldkirchen) im Rahmen der quantitativen Echtzeit-PCR.....	32
Abb. 8: CRISPR/Cas9-Methode zur Generierung <i>ARID1A</i> ^{-/-} -KZT. GuideRNA A und B zielen auf gegenüberliegende Stränge des Exon 2 ab, während guideRNA C auf das Exon 4 abziel.	36
Abb. 9: Gelelektrophorese zur Darstellung der heterozygoten <i>ARID1A</i> defizienten EC-Zelllinien 2102EP (links) und NCCIT (rechts).	37
Abb. 10: Zellmorphologie nach 24, 96 und 144 Stunden (time (h)) der einzelnen TCam-2- <i>ARID1A</i> ^{-/-} -Klone (Klon 1- 4) im Vergleich zur parentalen TCam-2- <i>ARID1A</i> ^{+/+}	38
Abb. 11: Wachstumsratenvergleich zwischen TCam-2- <i>ARID1A</i> ^{+/+} und TCam-2- <i>ARID1A</i> ^{-/-}	39
Abb. 12: Zellzyklusphasenvergleich zwischen den einzelnen TCam-2- <i>ARID1A</i> ^{+/+} und TCam-2- <i>ARID1A</i> ^{-/-} im Zeitraum von 48 h.....	40
Abb. 13: Zellzyklusphasenvergleich zwischen den gemittelten (n=4) TCam-2- <i>ARID1A</i> ^{+/+} und TCam-2- <i>ARID1A</i> ^{-/-} im Zeitraum von 48 h.	40
Abb. 14: Genexpression in den gemittelten TCam-2- <i>ARID1A</i> ^{-/-} im Vergleich zu TCam-2- <i>ARID1A</i> ^{+/+} , gegen GAPDH als Housekeeper normalisiert	42
Abb. 15: Ergebnisse der Massenspektrometrie: Übersicht der Proteine, die durch <i>ARID1A</i> -Defizienz hoch- oder runterreguliert wurden. Bei <i>ARID1A</i> -Defizienz Hochregulierung von 24 Proteinen, sowie Herunterregulierung von 42 Proteinen, u.a. von DNA-Methyltransferase 1-assoziiertes Protein (DMP) und die DNA-Polymerase Epsilon (POLE).	43
Abb. 16: Zellviabilitätsmessungen über einen Zeitraum von 96 Stunden von den gemittelten (n=4) TCam-2- <i>ARID1A</i> ^{-/-} -Klonen und TCam-2- <i>ARID1A</i> ^{+/+} nach einmaliger Behandlung mit 0,5 nM (A), 1 nM (B), 1,5 nM (C), 2 nM (D) und 5 nM (E) Romidepsin.....	45
Abb. 17: Relative Zellviabilitätsmessung mittels XTT-Analyse bei der Behandlung von TCam-2 Zellen mit 2 nM Romidepsin und 5 µM ACBI1A (A) bzw. C63 (B)	46
Abb. 18: Relative Zellviabilitätsmessung mittels XTT-Analyse bei der Behandlung von TCam-2 Zellen mit 2,5 µM C63 in Kombination mit 0,5 nM (A), 1 nM (B), 1,5 nM (C) und 2 nM (D) Romidepsin...	47

Abb. 19: Eine <i>ARID1A</i> -Defizienz durch CRISPR/Cas9 bzw. <i>ARID1A</i> -Inhibition durch Compound 63 führt über die Verminderung der Proteinmenge von POLE und DMAP1 zur Apoptose und zum Zellzyklusarrest.	51
Abb. 20: <i>ARID1A</i> -Defizienz durch CRISPR/Cas9 bzw. <i>ARID1A</i> -Inhibition durch Compound 63 führt zur Hochregulierung bestimmter Proteine, die in Verbindung zur „Protein-Bindung“, „Acetylierung“, „Chromosom“, „Metall-Bindung“, „ATP-Bindung“ und „DNA-Bindung“ stehen	51

V. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Prognoseeinteilung nach der Klassifikation der International Germ Cell Cancer Cooperative Group (IGCCCG) für nichtseminomatöse Keimzelltumoren und Seminome.	8
Tabelle 2: Übersicht der Histondeacetylasen (HDACs).	13
Tabelle 3: Überblick der HDAC-Inhibitoren.	14
Tabelle 4: Übersicht der humanen KZT-Zelllinien.	19
Tabelle 5: Übersicht der für die Zelllinien benötigten Medien und Supplemente.	19
Tabelle 6: Übersicht der Materialien für die Kultivierung von Zellen.	20
Tabelle 7: Übersicht der Materialien für die CRISPR/Cas9-Transfektion.	21
Tabelle 8: Übersicht der Materialien für den Nicoletti-Assay.	21
Tabelle 9: Übersicht der Materialien zur DNA-Isolation.	22
Tabelle 10: Übersicht der Materialien und Geräte für die PCR und cDNA-Synthese.	22
Tabelle 11: Übersicht der Materialien und Chemikalien zur RNA-Isolation und Proteinextraktion.	23
Tabelle 12: Übersicht der Materialien und Geräte für die Agarose-Gelelektrophorese.	24
Tabelle 13: Übersicht der Materialien und Geräte für die qRT-PCR.	24
Tabelle 14: Übersicht der Materialien und Datenanalyse-Systeme für die Massenspektrometrie.	25
Tabelle 15: Übersicht der Materialien für XTT-Analysen.	26
Tabelle 16: Übersicht der Oligonukleotide.	26
Tabelle 17: Übersicht der pharmakologischen Inhibitoren.	27

Inhaltsverzeichnis

I.	Zusammenfassung	I
II.	Summary	II
III.	Abkürzungsverzeichnis	III
IV.	Abbildungsverzeichnis	VII
V.	Tabellenverzeichnis	IX
1	Einleitung	1
1.1	Reifung der männlichen Keimzelle	1
1.2	Der Keimzelltumor (KZT).....	3
1.2.1	Epidemiologie, Ätiologie und Risikofaktoren.....	3
1.2.2	Einteilung und Entstehung	4
1.2.3	Symptome.....	6
1.2.4	Diagnostik	6
1.2.5	Klassifikationen.....	8
1.2.6	Therapie und Prognose.....	9
1.3	Epigenetik.....	11
1.3.1	HDAC-Inhibitoren	14
1.4	Zielsetzungen der Arbeit.....	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Ethikvotum	19
2.2	Material.....	19
2.2.1	Humane Keimzelltumorzelllinien	19
2.2.2	Zellkulturmedien und Supplemente	19
2.2.3	Materialien der Zellkultur	20
2.2.4	CRISPR/Cas9-Transfektion	21
2.2.5	Nicoletti-Assay zur Zellzyklusanalyse	21
2.2.6	DNA-Isolation.....	22
2.2.7	PCR und cDNA-Synthese	22
2.2.8	RNA-Isolation und Proteinextraktion	23
2.2.9	Agarose-Gelelektrophorese	24
2.2.10	qRT-PCR.....	24
2.2.11	Massenspektrometrie	25
2.2.12	XTT.....	26
2.2.13	Oligonukleotide.....	26
2.2.14	Pharmakologische Inhibitoren	27
2.3	Methoden.....	28
2.3.1	Kultivierung der Zellen	28

2.3.2	Bestimmung der Wachstumskurve	28
2.3.3	Transfektion von KZT-Zelllinien: TCam-2, 2102EP und NCCIT	28
2.3.4	Nicoletti Assay (Durchflusszytometrie)	29
2.3.5	Isolation genomischer DNA	29
2.3.6	PCR	30
2.3.7	RNA- und Proteinextraktion	31
2.3.8	Gelelektrophorese.....	31
2.3.9	cDNA-Synthese und qRT-PCR	31
2.3.10	Massenspektrometrie	33
2.3.11	XTT	34
2.3.12	Online-Analysen und Software	35
2.3.13	Statistische Auswertung	35
3	Ergebnisse	36
3.1	Molekulare und genomische Charakterisierung von <i>ARID1A</i>	36
3.1.1	Generierung von <i>ARID1A</i> -defizienten KZT-Zelllinien	36
3.1.2	Charakterisierung <i>ARID1A</i> -defizienter SE.....	38
3.2	Effekt einer <i>ARID1A</i> -Defizienz auf die Therapie mit Romidepsin	44
3.3	Effekt einer pharmakologischen Inhibition von <i>ARID1A</i> auf die Therapie mit Romidepsin	46
4	Diskussion	48
4.1	Homozygote <i>ARID1A</i> -Defizienz nur in Seminomen möglich.....	48
4.2	Entschlüsselung der molekularbiologischen Eigenschaften von <i>ARID1A</i>	49
4.3	<i>ARID1A</i> als therapeutisches Ziel in der Behandlung der KZT	52
4.4	Diversität der <i>ARID1A</i> -Effekte in unterschiedlichen Tumorentitäten und -subtypen.....	53
4.5	Limitierungen der Studie	54
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	56
6	Anhang	59
7	Danksagung.....	60

1 Einleitung

1.1 Reifung der männlichen Keimzelle

Die Reifung der männlichen Keimzelle, auch Spermatogenese genannt, bezeichnet den Bildungsprozess männlicher Gameten [1], findet im Keimepithel der Samenkanälchen (Tubuli seminiferi) des Hodens statt [2] und dauert etwa 74 Tage [1]. Das Keimepithel besteht aus Keimzellen sowie Sertoli-Zellen, die wiederum die Keimzellen ernähren und das endokrine Milieu für den Reifungsprozess schaffen (vergleiche Abb. 1) [3]. Der Reifungsprozess vollzieht sich von außen nach innen, beginnend an der Basalmembran des Samenkanälchens und endend im Kanallumen. Er beinhaltet drei aufeinanderfolgende Phasen: die Spermatogonienproliferation und -differenzierung mittels Mitose, die Reifeteilungen der Spermatozyten mittels Meiose, sowie die Spermiogenese, bei der es zur Differenzierung der Spermatiden zu Spermien kommt [1]. Zu Beginn stehen die Spermatogonien, die einen doppelten Chromosomensatz aufweisen und somit als diploid bezeichnet werden können [1]. Sie bilden die basale Schicht des Keimepithels, sind mitotisch aktiv [1] und lassen sich in Typ A und B unterteilen [2]. Typ A Spermatogonien stellen die Stammzellen der Samenbildung dar, während als Typ B die weiterentwickelten Zellen bezeichnet werden, die sich im weiteren Verlauf durch den Eintritt in die Meiose zu Spermatozyten des Typus I entwickeln [1, 2]. Bei der Meiose kommt es zur DNA-Verdopplung, sodass jedes Chromosom nun aus zwei Chromatiden besteht [1]. Darauf folgt die erste Reifeteilung, bei der die Chromosomen auf zwei Tochterzellen verteilt, die Chromatiden jedoch noch nicht getrennt werden, sodass aus dem primären Spermatozyt zwei Sekundäre entstehen [1] (vergleiche Abb.1). Diese wiederum vollziehen eine zweite Reifeteilung, bei der es zur vollständigen Trennung der Chromatiden jedes Chromosoms kommt [1]. Hierdurch entstehen Spermatiden, die nun einen haploiden Chromosomensatz aufweisen [1]. Im weiteren Verlauf kommt es zur Transformation der frühen Spermatiden zu Spermien. Dieser Prozess beinhaltet die Ausbildung des Spermienkopfes, des Akrosoms und der Geißel sowie die Abschnürung vom Zytoplasma [1]. Darauf folgt die Spermiation, bei der die überwiegend unbeweglichen Spermien das Keimepithel verlassen und ins Lumen der Samenkanälchen gelangen. Dort werden sie zur endgültigen Reifung über die Ductuli efferentes in den Nebenhoden ausgeschleust, wo sowohl die volle Befruchtungskompetenz als auch die Beweglichkeit erlangt wird [4].

Die gonadale Hormonproduktion wird vom hypothalamischen Gonadotropin-Releasing Hormon (GnRH) über die Ausschüttung der Gonadotropine LH (luteinisierendes Hormon) und FSH (follikelstimulierendes Hormon) stimuliert (vergleiche Abb. 1) [3]. Über die Expression von Androgen- sowie FSH-Rezeptoren kommt es zur Stimulation der Sertoli-Zellen. Die Sertoli-Zellen bilden das Grundgerüst des Keimepithels und fungieren als Blut-Hoden-Schranke

[4]. Durch FSH kommt es hierbei zur Produktion von Wachstumsfaktoren, die wiederum die Proliferation differenzierter Keimzellen sicherstellen und die Gametenreifung fördern [4]. Des Weiteren produzieren sie das Androgenbindungsprotein (ABP), das Testosteron bindet und somit für hohe Hormonkonzentrationen im Interstitium sorgt [3]. Darüber hinaus bilden die Sertoli-Zellen das Proteinormon Inhibin, das wiederum die Freisetzung von FSH [4] und somit die Stimulation der Sertoli-Zellen reguliert [3].

Die Leydig-Zellen werden wiederum vom LH stimuliert, liegen im Interstitium der Samenkanälchen und sind sowohl für die Synthese und als auch für die Freisetzung von Testosteron verantwortlich [3, 4]. Über sogenannte Rückkopplungsmechanismen kann das Testosteron die LH-Sekretion regulieren, indem es bei hoher Konzentration die GnRH-Sekretion und somit die eigene Produktion hemmt (vergleiche Abb.1) [3, 4].

Somit kommt es über hypothalamische und hypophysäre Hormonfreisetzungen sowie diverse Rückkopplungsmechanismen zur Regulation der Spermatogenese und der gonadalen Hormonproduktion (vergleiche Abb. 1).

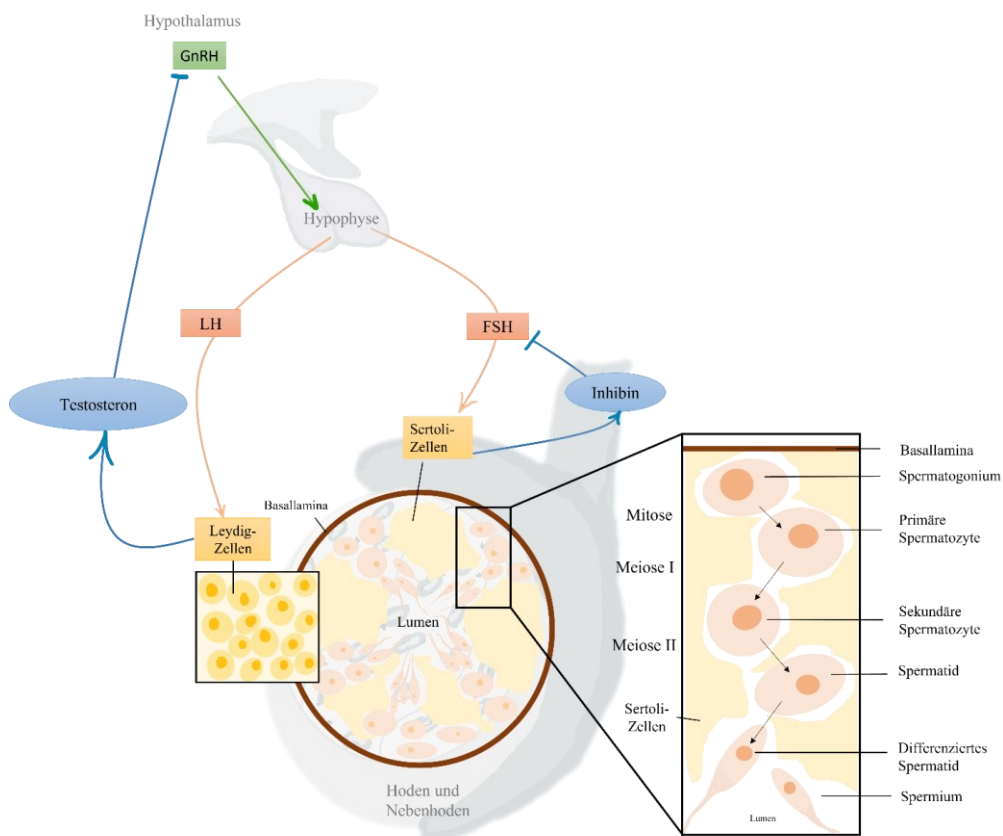


Abb. 1: Die hormonelle Regulation der Spermatogenese. Das im Hypothalamus gebildete GnRH (= Gonadotropin-Releasing Hormon) stimuliert die Hypophyse zur LH (= luteinisierendes Hormon) und FSH (= follikelstimulierendes Hormon) -Produktion. Durch die LH-Stimulation erfolgt in den Leydig-Zellen die Testosteronproduktion, die wiederum die GnRH-Produktion im Hypothalamus hemmt. Die FSH-Stimulation der Sertoli-Zellen fördert die Spermienreifung. Gleichzeitig bilden die Sertoli-Zellen Inhibin, das wiederum die FSH Freisetzung reguliert. Modifiziert nach Brandes et al. [4] und Alberts et al. [5], erstellt mit OneNote, Microsoft

1.2 Der Keimzelltumor (KZT)

1.2.1 Epidemiologie, Ätiologie und Risikofaktoren

KZT stellen die häufigste maligne Erkrankung des jungen Mannes im Alter von 25 bis 45 Jahren dar, wobei das mittlere Erkrankungsalter 38 Jahre beträgt [6]. Im Alter von 80 Jahren ist zudem ein weiterer Erkrankungsgipfel zu beobachten [7]. Mit 1,6 % gehören KZT insgesamt jedoch zu den selteneren Tumorentitäten.

Etwa 95 % der KZT des Typ II entwickeln sich im Hoden, während die restlichen 5 % extragonadal auf Höhe der Körpermittellinie, inklusive des vorderen Mediastinums und im Bereich der hypothalamischen-hypophysären Region, entstehen [8].

Die Inzidenz stieg seit dem zweiten Weltkrieg besonders in den westlichen Ländern [6]. Altersadaptierte Inzidenzraten zeigen, dass insbesondere in der Schweiz sowie in Dänemark, Norwegen und Deutschland die Erkrankungsraten hoch sind. Kohortenstudien aus Norwegen und Dänemark führen dies auf Faktoren wie Ernährung, Umweltverschmutzung und körperliche Aktivität während der Schwangerschaft zurück [7].

Etwa 70 % aller Patienten haben bei Erstdiagnose das Tumorstadium I und weisen somit keine Lymphknotenmetastasen sowie normwertige Tumormarker auf [9]. Etwa 30 % der Betroffenen befinden sich bei der Erstdiagnose bereits in einem metastasierten Zustand.

Zu den gesicherten Risikofaktoren des KZT gehören der Hodenhochstand, ein kontralateraler KZT in der Vorgeschichte, genitale Fehlbildungen der Keimdrüsen sowie genetische bzw. familiäre Faktoren [7, 10].

Der Hodenhochstand, auch Maldescensus testis, Kryptorchismus oder Hodendystopie genannt, entwickelt sich während der embryonalen Reifung des Fötus durch eine fehlerhafte, unvollständige oder nicht stattgehabte Absenkung des Hodens aus dem Bauchraum in das Skrotum. Hierdurch kann die für die Spermatogenese erforderliche Temperatur von 33°C nicht erreicht werden und es kommt zu funktionellen Störungen der Spermatogenese und der Fertilität. Das Risiko für KZT steigt hierdurch um das 2- bis 8-fache an [11], unabhängig vom Zeitpunkt der operativen Korrektur, bei nicht oder erst nach der Pubertät erfolgter Orchidopexie jedoch in höherem Maße [10]. Fallkontrollstudien zeigten, dass bei 10 % der Kinder mit Hodenhochstand es zur Entwicklung von KZT kommt [7].

Außerdem konnten familiäre Prädispositionen in mehreren Fallkontrollstudien nachgewiesen werden. Somit kommt es bei (Zwillings-)Brüdern und Söhnen von Erkrankten zu einem 2- bis 10-fach erhöhtem Risiko, ebenfalls einen KZT im Laufe ihres Lebens zu entwickeln [7]. Zudem haben Patienten mit einem Hodentumor ein 30-fach erhöhtes Risiko im Laufe ihres Lebens ein KZT an der Gegenseite zu entwickeln.

Intersexuelle Fehlbildungen spielen ebenfalls eine Rolle bei der Entstehung von testikulären intraepithelialen Neoplasien (TIN), die als Vorläufer maligner Hodentumoren gelten. Hierzu gehört zum einen die testikuläre Feminisierung, zum anderen das Klinefelter-Syndrom [12]. Die testikuläre Feminisierung bezeichnet eine Androgeninsensitivität, die auf einem Rezeptordefekt beruht. Somit kommt es beim männlichen Chromosomensatz (46, XY) und physiologischen Genitalentwicklung zu einem weiblichen Phänotyp, sodass Betroffene häufig als Mädchen aufwachsen. Das Klinefelter Syndrom beruht auf einer chromosomalen Störung, bei der die Männer den Chromosomensatz „47, XXY“ anstelle des physiologischen „46, XY“ aufweisen. Dies führt zur Infertilität und einem Hypogonadismus, der sich klinisch durch vermehrtes Brustwachstum, kleine Genitalien und weibliches Behaarungsmuster äußert [13].

Des Weiteren werden männliche Subfertilität, Hodenatrophie, regelmäßiger Marihuana-Konsum sowie pränatale Gegebenheiten wie niedriges Geburtsgewicht und Frühgeburt als wahrscheinliche Risikofaktoren diskutiert. Letzteres wird auf eine erhöhte intrauterine Östrogenkonzentration während des 1. Trimenon zurückgeführt [7, 12].

1.2.2 Einteilung und Entstehung

KZT können in fünf Subtypen unterteilt werden. Hierbei unterscheidet die Weltgesundheitsorganisation (WHO) in ihrer Klassifikation zwischen KZT die aus einer Vorläuferläsion, auch Keimzellneoplasie in situ (GCNIS), genannt, entstehen und solchen bei denen dies nicht der Fall ist [9].

Der Typ I KZT betrifft überwiegend Kinder unter 5 Jahren, entwickelt sich meist extragonadal und beinhaltet gehäuft Dottersacktumoren (YST) sowie Teratome (vergleiche Abb. 2) [14]. Der Typ II KZT entwickelt sich aus einer entarteten primordialen Keimzelle (PGC). Genetische und epigenetische Aberrationen können nach der Pubertät zu einer GCNIS führen [14]. Im weiteren Verlauf der Tumorentwicklung lassen sich histologisch Seminome (SE) von Nicht-Seminomen (NS) unterscheiden. Die NS, die ebenfalls als Embryonalkarzinome (EC) bezeichnet werden, besitzen pluri- bis totipotente Eigenschaften. Man differenziert sie in Chorionkarzinome, YST und Teratome. (vergleiche Abb. 2) [14]. Der Typ III KZT kommt gehäuft bei älteren Männern vor und entwickelt sich aus Spermatozyten, den Vorläuferzellen des Spermiums (vergleiche Abb. 2). Beim Typ IV KZT handelt es sich um Dermoidzysten der Eierstöcke, die sich aus den Vorläuferzellen der weiblichen Eizelle entwickeln, während Typ V KZT aus den weiblichen primordialen Follikeln oder den männlichen Spermien entstehen und als Blasenmole bezeichnet werden [8, 14]. Die hier vorgestellte Arbeit wird sich ausschließlich auf die Typ II KZT fokussieren, da diese die höchste Inzidenz aufweisen [9].

Es wird angenommen, dass die Vorläuferläsion des Typ II KZT bereits im Laufe der Keimzellentwicklung im Fötus entsteht. Etwa vier Wochen nach der Befruchtung kommt es zur

Entwicklung der PGC. Dieser Prozess wird durch verschiedene Signalwege des extra-embryonalen Gewebes induziert [14]. Bis zur Pubertät ruhen die Vorläuferläsionen, bis es durch hormonelle Einflüsse zur Proliferation und Differenzierung kommt [15]. Die GCNIS-Zellen besetzen die spermatogene Nische am erwachsenen Hodentubulus und stehen in enger Verbindung mit der Basalmembran und den Sertoli-Zellen, die die Spermatogonien versorgen [8]. Unter normalen Umständen müsste ein Gonozyt zu diesem Zeitpunkt seine embryonalen Eigenschaften verlieren und Marker reifender spermatogener Zellen hinzugewinnen [8]. Stattdessen weisen die GCNIS-Zellen totipotente Eigenschaften auf und exprimieren weiterhin embryonale Marker und Transkriptionsfaktoren [9]. Generell weisen viele der KZT genetische Anomalien auf. Besonders betroffen ist hierbei der kurze Arm des Chromosoms 12 (12p) [9]. An dieser Stelle kann es beispielsweise zu einem genetischen Zugewinn, einem „12p-gain“, kommen [14].

Im weiteren Verlauf kommt es bei den GCNIS-Zellen durch epigenetische und molekulare Mechanismen zur Differenzierung und Weiterentwicklung in SE und NS (vergleiche Abb. 2) [15]. Die histologischen Untergruppen der KZT unterscheiden sich ebenfalls durch molekulare Marker voneinander. Die Expression des Transkriptionsfaktors *POU5F1*, der für die Pluripotenz sowie die Differenzierung mitverantwortlich ist [14], fehlt in Chorionkarzinomen, Teratomen und YST. Jedoch ist er in GCNIS, SE und EC nachweisbar und kann somit als diagnostischer Marker genutzt werden [8]. Ebenfalls lassen sich SE von NS durch die Expression verschiedener Proteine unterscheiden. So kann SOX17 bei SE nachgewiesen werden, während die EC sich durch hohe SOX2-Level auszeichnen. Beide Proteine, sowohl SOX2 als auch SOX17, lassen sich außerdem in GCNIS-Zellen nachweisen [9].

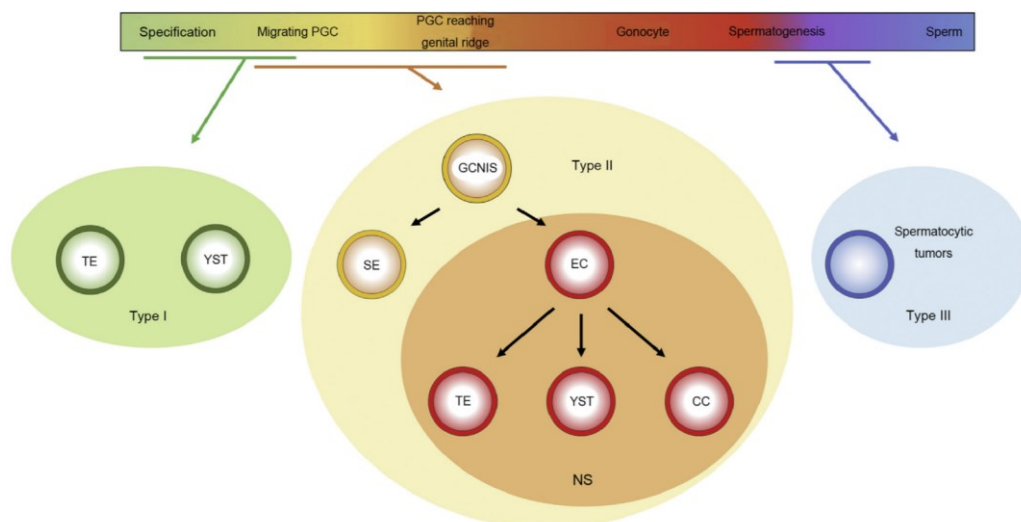


Abb. 2: Entwicklung der Keimzelltumore (WHO Typ I-III) in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Spermatogenese. Typ I beinhaltet Teratome (TE) und Dottersacktumore (YST). Typ II entwickelt sich aus einer Keimzellneoplasie (GCNIS) zu Seminomen (SE) und Embryonalkarzinomen (EC). Aus den EC können im weiteren Verlauf Chorionkarzinome (CC), TE, YST entstehen. Typ III Tumore entwickeln sich aus Spermatozyten. Aus Müller et al. [14]

1.2.3 Symptome

Klinisch präsentiert sich der KZT in der meisten Fällen mit einem initial vergrößerten Hoden. Etwa 20 % der Patienten geben an, bereits vor der Größenzunahme skrotale Schmerzen verspürt zu haben. Seltener berichten die Patienten von Gynäkomastie (Größenzunahme der Brustdrüsen), Hydrozelen (Flüssigkeitsansammlung im Skrotum) und unspezifischen Symptomen wie Rückenschmerzen [6].

Etwa ein Fünftel der Patienten zeigen initial bereits Anzeichen einer Metastasierung. So können beispielsweise Flankenschmerzen und schmerzhafte Lymphknotenvergrößerungen Hinweise auf Tumorinfiltration und retroperitoneale Lymphknotenbeteiligung liefern. Des Weiteren führen Atemnot und Husten mit blutigen Auswurf zum Verdacht auf Lungenmetastasen, während neurologische Symptome die Abklärung zerebraler Mitbeteiligung erfordern [7].

1.2.4 Diagnostik

Einer umfangreichen Anamnese der Symptome folgt die körperliche Untersuchung, die eine Hoden- sowie Lymphknotenpalpation im Seitenvergleich beinhaltet. Beim Abtasten sollte sich der gesunde Hoden homogen, schmerzlos und beweglich darstellen sowie eine Länge von 3.5 bis 5 cm aufweisen. Verhärtungen, inhomogene strukturelle Auffälligkeiten sowie nicht-verschiebbare, schmerzhafte Areale bedürfen weiterer Abklärung [10]. Wird initial ein vergrößerter Hoden festgestellt, so sollte eine Ultraschalldiagnostik durchgeführt werden. Hierdurch lässt sich das Volumen und die Größe des Hodens, sowie dessen struktureller Aufbau beurteilen. Die Sonografie ermöglicht ebenfalls eine Unterscheidung zwischen einer Raumforderung im Hoden und einer intraskrotalen Schwellung und weist eine hohe Sensitivität bei der Erkennung von Hodentumoren auf [6]. Somit können 98 % der KZT durch die sonographische Untersuchung sicher erkannt werden. Hierbei gilt, dass die Größe der Raumforderung mit der Malignität korreliert. Frühformen eines KZT zeigen sonographisch das Bild eines „Schneegestöbers“ oder „Sternhimmels“, das durch intratubuläre Mikroverkalkungen im Hoden hervorgerufen wird. Diese sind mit Sub- und Infertilität assoziiert und sollten bioptisch weiter abgeklärt werden, da in etwa 40 % der Fälle eine Vorläuferläsion des KZT vorliegt. Von großer Bedeutung ist ebenfalls die sonographische Untersuchung des kontralateralen Hodens, da bei etwa 1 % der Patienten ein Zweittumor vorliegt [7].

Wenn sonographisch ein Hodentumor bestätigt wurde, erfolgt im weiteren Prozedere ein Staging, bei dem die Ausbreitung des Tumors beurteilt wird. Da KZT zunächst lymphogen in intradiaphragmale, paraaortale und parakavale Lymphknoten metastasieren, werden insbesondere die Lymphknotenstationen, aber auch eine mögliche Organbeteiligung mit bildgebenden Verfahren beurteilt. Hierfür werden computertomographische Untersuchungen des Thorax, Abdomens und Beckens veranlasst, die im Vergleich zu Magnetresonanz-

tomographischen (MRT)- oder Positronen-Emissions-Tomographischen (PET-CT) -Untersuchungen die höchste Sensitivität aufweisen. Diese variiert je nach Größe und Form des Lymphknotens zwischen 65 bis 96 % und ist ebenfalls abhängig vom Tumorstadium [6].

Zerebrale Bildgebungen sind bei klinisch neurologischen Auffälligkeiten, die den Verdacht auf Hirnmetastasen liefern, ebenfalls indiziert. Des Weiteren empfiehlt die Leitlinie der *European Association of Urology* (EAU) die zerebrale Bildgebung bei NS, erhöhtem β -HCG (humanes Choriongonadotropin) über 10 000 IU/L und multiplen Lungenmetastasen [16].

Die Bestimmung der Tumormarker β -HCG, alpha-Fetoprotein (AFP) und Laktatdehydrogenase (LDH) sind sowohl initial als auch zur Verlaufskontrolle indiziert. Hierüber lassen sich Rückschlüsse auf Tumorentität, Ausbreitung des Tumors und ein mögliches Therapieansprechen ziehen [6]. Jedoch bleibt bei etwa 40 % der Patienten mit KZT eine Erhöhung der o.g. Tumormarker aus [17].

Das Protein β -HCG kann sowohl bei Schwangerschaft als auch bei einer Vielzahl maligner Erkrankungen erhöht sein. Es ist im Urin sowie im Blut nachweisbar und unterteilt sich in zahlreiche Untergruppen je nach Ausmaß der Glykosylierung. Studien zeigten, dass hyperglykosyliertes β -HCG ebenfalls zur Zellinvasion und Wachstum maligner Tumore beiträgt. Eine Erhöhung von β -HCG zeigen insbesondere SE, EC als auch Chorionkarzinome [17]. Jedoch kann eine Erhöhung von β -HCG ebenfalls durch Alkohol- oder Cannabiskonsum bedingt sein oder bei Hypogonadismus vorliegen [6].

Das Glykoprotein AFP wird im Darm, der Leber und im Dottersack synthetisiert. AFP kann sowohl bei nicht-neoplastischen Lebererkrankungen als auch bei hepatozellulären Karzinomen, EC und Dottersacktumoren vermehrt gebildet werden. Etwa 50 bis 70 % der Patienten, die an einem NS erkrankt sind, zeigen erhöhte AFP-Spiegel [17].

LDH ist ein zytoplasmatisches Enzym, dass von einer Vielzahl von Geweben produziert wird, unter anderem von der Leber, dem Gehirn oder den Muskeln [17]. Eine Erhöhung des LDHs wird insbesondere bei SE, aber auch bei NS und fortgeschrittenen Tumorerkrankungen beobachtet. Jedoch hat der Marker eine geringe Spezifität, da dessen Erhöhung auch auf zahlreiche andere Ursachen zurückgeführt werden kann [6]. So wird LDH beispielsweise bei allen Prozessen, die zu einer Zellschädigung führen, vermehrt produziert. Nichtsdestotrotz zeigen Studien, dass es eine Korrelation zwischen dem Gesamtüberleben eines Patienten mit KZT und dem LDH-Spiegel gibt, sodass es ebenfalls eine Rolle bei der Risikostratifizierung hinsichtlich der Prognose spielt [17].

Die Diagnose eines KZT wird anhand einer Biopsie gesichert. Hierfür erfolgt eine explorative Freilegung des betroffenen Hodens mit anschließender Schnellschnittdiagnostik. Anschließend

wird eine Absetzung des Hodens mit zugehörigem Samenstrang durchgeführt. Insbesondere bei Patienten unter 30 Jahren und einem Hodenvolumen unter 12 ml kann eine anschließende kontralaterale Hodenbiopsie sinnvoll sein, um Vorläuferläsionen oder Zweitumore auszuschließen [7]. Die histologische Untersuchung erlaubt eine genauere Spezifizierung des Tumors und gibt Rückschlüsse auf Therapieoptionen und die Prognose. In 3 bis 20% der Probenentnahmen kann es zu Komplikationen, wie Ödem- oder Hämatombildung, kommen. Seltener entwickelt sich ein meist selbstlimitierender, temporärer Hypogonadismus [6].

1.2.5 Klassifikationen

Hodentumore können anhand verschiedener Klassifikationen unterteilt werden, die im Hinblick auf die Therapie und Prognose von großer Relevanz sind. Die Klassifizierung nach TNM der *Union internationale contre le cancer* (UICC) erfolgt anhand der Kriterien T (Ausbreitung des Tumors), N (Lymphknotenstatus), M (Metastasierung) und S (Serummarker) [16]. Die Lugano-Klassifikation baut auf dem TNM-System auf und unterteilt die Hodenkarzinome in 3 Stadien, abhängig von der Tumorausbreitung, dem Lymphknoten- und Metastasierungsstatus, sowie der Serummarker LDH, AFP und β -HCG. Nach der Klassifikation der *International Germ Cell Cancer Cooperative Group* (IGCCCG) kann die Prognose für Hodentumorpatienten mit SE als auch NS eingeschätzt werden. Hierbei wird die 5-Jahres-Überlebensrate zur Unterteilung in die Gruppen „gute Prognose“, „intermediäre Prognose“ und „schlechte Prognose“ verwendet (siehe Tabelle 1) [16, 18].

Tabelle 1: Prognoseeinteilung nach der Klassifikation der International Germ Cell Cancer Cooperative Group (IGCCCG) für nichtseminomatoöse Keimzelltumoren und Seminome. Keimzelltumor (KZT), alpha-Fetoprotein (AFP), humanes Choriongonadotropin (β -HCG), Laktatdehydrogenase (LDH), upper limit of normal (ULN). Modifiziert aus den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Urologie [16]

Gute Prognose	
Nichtseminomatoöse KZT (56 % der Fälle)	Alle folgenden Kriterien: • Primärtumor Hoden/ retroperitoneal • Keine extrapulmonalen viszeralen Metastasen • AFP < 1,000 ng/ml • β-HCG < 5,000 IU/l • LDH < 1.5 x ULN
Seminome (90 % der Fälle)	Alle folgenden Kriterien: • Jede Primärtumorlokalisation • Keine extrapulmonalen viszeralen Metastasen • Normale AFP-Werte • Alle β-HCG-Werte • Alle LDH-Werte
Intermediäre Prognose	
Nichtseminomatoöse KZT (28 % der Fälle)	• Primärtumor Hoden/ retroperitoneal • Keine extrapulmonalen viszeralen Metastasen Eines der folgenden Kriterien: • AFP 1,000 - 10,000 ng/ml • β-HCG 5,000 - 50,000 IU/l • LDH 1.5 - 10 x ULN
Seminome (10 % der Fälle)	Alle der folgenden Kriterien: • Extrapulmonale viszerale Metastasen • Normale AFP-Werte • Alle β-HCG-Werte • Alle LDH-Werte
Schlechte Prognose	
Nichtseminomatoöse KZT (16 % der Fälle)	(Mindestens) eines der folgenden Kriterien: • Primär mediastinal • Extrapulmonale viszerale Metastasen • AFP > 10,000 ng/ml • β-HCG > 50,000 IU/l • LDH > 10 x ULN
Seminome	Keine Einordnung in die schlechte Prognosegruppe

1.2.6 Therapie und Prognose

Die therapeutischen Optionen richten sich nach der Histologie, dem Tumorstadium und dem Zustand des Patienten. Sowohl operative als auch medikamentöse und strahlentherapeutische Behandlungsmöglichkeiten stehen zur Verfügung. In der Regel werden diese Optionen miteinander kombiniert, um die Chance auf ein Langzeitüberleben des Patienten zu erhöhen [6, 11].

Unabhängig vom histologischen Typ des KZT wird stets eine operative Entfernung des Tumors inklusive Absetzung des Samenstrangs angestrebt [11]. Folgend wird das Stadium nach UICC bestimmt. Bei niedrigem UICC-Stadium steht neben der Option einer aktiven Überwachung (AS) eine adjuvante Chemotherapie zur Verfügung. Im Falle von NS wird außerdem eine retroperitoneale Lymphknotendisektion durchgeführt, während bei SE eine adjuvante Strahlentherapie als Behandlungsoption angeboten werden kann. In höheren Stadien werden stets adjuvante Chemotherapien bevorzugt durchgeführt [6].

Die operative Entfernung des KZT steht insbesondere in frühen Stadien im Vordergrund. Hierbei eröffnen sich zwei Möglichkeiten: die radikale Orchiektomie und das organerhaltende operative Verfahren [6]. Bei der radikalen Orchiektomie wird der betroffene Hoden inklusive des Samenstrangs und des Nebenhodens entfernt. In fortgeschrittenen Stadien erfolgt vor der Operation eine chemotherapeutische Behandlung, um eine Tumorverkleinerung zu erzielen. Die organerhaltende Operation kann bei KZT, die weniger als 30 % des Hodens betreffen, durchgeführt werden. Insbesondere bei Patienten mit angeborenem solitärem Hoden oder bei Tumorbefall beider Hoden wird diese Methode zur Aufrechterhaltung der Testosteronproduktion präferiert [6, 12]. Jedoch ist nach Durchführung dieses operativen Verfahrens eine Bestrahlung obligat. Ziel der operativen Verfahren ist eine sogenannte R0-Resektion. Diese wird erreicht, wenn in der pathologischen Schnellschnittuntersuchung der Resektionsränder kein Tumor nachgewiesen werden kann. Die retroperitoneale Lymphknotendisektion (RPLND) ist ein nervenschonendes Verfahren zur Entfernung retroperitonealer Lymphknoten und wird insbesondere bei NS standardmäßig durchgeführt. Durch dieses Verfahren wird erreicht, dass lokale Rezidive auf unter 5 % reduziert werden können. Risiken dieses Eingriffs sind eine retrograde Ejakulation, vaskuläre Verletzungen, Aszitesbildung, Hämatome sowie Verletzungen der Harnwege oder des Darms [6].

Die Chemotherapie wird sowohl adjuvant als auch in palliativer Situation durchgeführt. Das Therapieregime unterscheidet sich je nach Tumorart.

Bei SE in frühen Stadien werden ein bis zwei Zyklen Carboplatin verabreicht [6]. Carboplatin gehört wie Cisplatin zu den Platinanaloge, die die DNA-Replikation in der G1-Phase durch Bindung an Nukleinbasen und Bildung von Intra- und Interstrang-Quervernetzungen hemmen

und somit zur Apoptose führen [18]. Im Vergleich zum Cisplatin dauert die Umwandlung von Carboplatin in seine aktive Form länger, sodass es zum verzögerten Wirkungseintritt und verminderter Substanzaktivität kommt [19].

Bei NS in frühen Stadien besteht die Erstlinien-Therapie aus ein bis zwei Zyklen der Kombination Bleomycin, Etoposid und Cisplatin (BEP) [6]. Bleomycin ist ein Antibiotikum, das die DNA-Vernetzung mittels Interkalation und Alkylierung stört [18] sowie in höheren Dosen durch die Bildung von Sauerstoffradikalen zu DNA-Strangbrüchen führt [20]. Etoposid dagegen gehört zu den Topoisomerase-II-Hemmern, die DNA-Brüche verursachen und somit die DNA-Replikation und -Transkription stören [18]. In fortgeschrittenen Stadien werden drei bis vier Zyklen BEP verabreicht.

Im palliativen Regime wird ebenfalls in der Erstlinie BEP eingesetzt. Bei Unverträglichkeiten oder Kontraindikationen gegen Bleomycin, wie beispielsweise beeinträchtigter Lungenfunktion in Form von restriktiven pulmonalen Erkrankungen [10], kann dieses abgesetzt und die Therapie um einen weiteren Zyklus EP (Etoposid und Cisplatin) verlängert werden. Alternativ kann das PEI-Therapieprotokoll, das Cisplatin, Etoposid und Ifosfamid beinhaltet, eingesetzt werden [6]. Ifosfamid gehört zur Gruppe der alkylierenden Substanzen, die durch Stickstofflostverbindungen ihre Wirkung entfalten [19]. Hierbei kommt es durch eine Chloridabspaltung zur Alkylierung der DNA sowie zu DNA-Quervernetzungen. Diese treten sowohl innerhalb eines DNA-Stranges als auch zwischen den Strängen der Doppelhelix auf [19].

Zweitlinientherapien bestehen meist aus Dreifachkombinationen und basieren stets auf Cisplatin. Manche Patienten weisen jedoch eine Platinresistenz auf [7]. In diesem Fall können Kombinationen aus Gemcitabin und Paclitaxel versucht werden. Das Pyrimidinanalogon Gemcitabin gehört zu den Antimetaboliten, die durch den Einbau falscher Nukleotide die DNA-Synthese schädigen. Paclitaxel hemmt dagegen die Mitose, indem es im Spindelapparat die Polymerisation der Mikrotubuli verstärkt und es somit zu fehlerhaften Konstruktionen kommt [6, 18].

Die sogenannte „Salvage“-Chemotherapie ist für Patienten, die bei metastasierter Situation in der Erstlinie progredient wurden, konzipiert. Diese beinhaltet eine Hochdosistherapie mit Carboplatin und Etoposid. Anschließend wird eine Stammzelltransplantation durchgeführt, die meist zu Komplettremissionen führt [6].

Durch die Cisplatin-basierte Chemotherapie steigen die Überlebenschancen für Patienten mit KZT deutlich an. Allerdings weist sie zahlreiche Nebenwirkungen auf. Hierzu gehören insbesondere renale, pulmonale und ototoxische Nebenwirkungen, Infertilität, Fatigue, Mucositis, Diarrhö und Emesis [6].

Die Strahlentherapie wird nach Orchiektomie bei SE durchgeführt [6]. Die Gesamtdosis und das Bestrahlungsfeld variieren je nach Stadium des KZT. Hierbei ist eine Abwägung zwischen den Vorteilen und den Nebenwirkungen der Bestrahlung entscheidend. Durch die lokale Bestrahlung des betroffenen Hodens und ggf. der inguinalen und abdominellen Lymphknotenregion kann die lokale Rezidivrate auf 2 bis 4 % gesenkt werden [6]. Neben akuten Nebenwirkungen wie Emesis, Diarrhö, Fatigue, Hautirritationen, Alopezie und Infektionsanfälligkeiten kann es ebenfalls zu Langzeitfolgen wie Infertilität oder Ausbildung sekundärer Malignome kommen. Aus diesem Grund sollte die Entscheidungsfindung mit dem Patienten abgestimmt werden, um beispielsweise auch eine gewünschte Sperma-Konservierung veranlassen zu können. Die EAU-Leitlinie rät ebenfalls von einer Bestrahlung von Patienten unter 40 Jahren, insbesondere aufgrund des Risikos für Zweitmalignome, ab [6].

Alle Patienten, die an einem KZT erkrankt sind, müssen nach Therapieabschluss für mindestens fünf Jahre nachbeobachtet werden. Zu diesem sogenannten Follow-Up gehören je nach Stadium und Tumorart die Bestimmung der Tumormarker im Serum, Ultraschalluntersuchungen sowie weitere bildgebende Verfahren wie CT und Röntgen [10].

1.3 Epigenetik

Vorstudien zur Entstehung von KZT zeigten, dass die Mutationslast in KZT gering ist [21] und die Tumorentwicklung ebenfalls auf epigenetische Veränderungen zurückgeführt werden kann [14, 22]. Aus diesem Grund stehen Deregulationen in der Epigenetik im Vordergrund als Erklärungsansatz für die KZT-Entstehung.

Die Epigenetik erforscht die Steuerung der Genaktivität, um die Entwicklung von Organismen und Zelldifferenzierung besser zu verstehen. Im Vordergrund stehen hierbei Mechanismen, die beeinflussen, auf welche Art und Weise DNA-Sequenzen abgelesen werden [23]. Hierzu gehören Prozesse wie DNA-Methylierung, Histon-Modifikation und RNA-Deregulation [23].

In dieser Arbeit liegt der Fokus auf der DNA-Methylierung sowie der Histon-Modifikation, da diese bei der Entstehung von KZT eine zentrale Rolle spielen [22].

Die DNA-Methylierung erfolgt durch das Anhängen von Methylgruppen ($-CH_3$) an die DNA-Nukleinbase Cytosin. An die methylierte Gensequenzen binden daraufhin Proteine, die zur Aufwicklung der DNA führen [23]. Hierdurch verändert sich die Zugänglichkeit des Gens und es kommt zur Inaktivierung, da das Gen im methylierten Zustand transkribiert werden kann [23].

Die DNA selbst wird mit Hilfe von Proteinen, den Histonen, in einen Nukleus „verpackt“ und bildet einen DNA-Protein-Komplex, der als Chromatin bezeichnet wird. Das Nukleosom, die kleinste Einheit eines Chromatins, ist ein Oktamer und besteht aus den vier Histonen H2A, H2B,

H3 und H4, auf denen ein 147 Basenpaar (bp) langes DNA-Fragment „aufgewickelt“ ist (siehe Abb. 3) [23, 24]. Die Histone können ebenfalls verändert werden und führen durch die Veränderung der Chromatinstruktur zur Regulierung von DNA-Prozessen, wie Replikation und Reparatur [23, 24]. Die Modifikation von Histonen wird durch Acetylierung und Deacetylierung mit Hilfe von Enzymen, den Histon-Acetyl-Transferasen (HATs) und Histondeacetylasen (HDACs), bewerkstelligt [24]. Hierdurch wird die Chromatinstruktur verändert und die Transkription sowie die Genexpression beeinflusst [25]. Durch die Deacetylierung mit Hilfe der HDACs kommt es zur Kondensierung der Chromatinstruktur, während eine Acetylierung durch HATs die Dekondensation fördert. Hierüber wird die Zugänglichkeit zu den jeweiligen Genen beeinflusst.

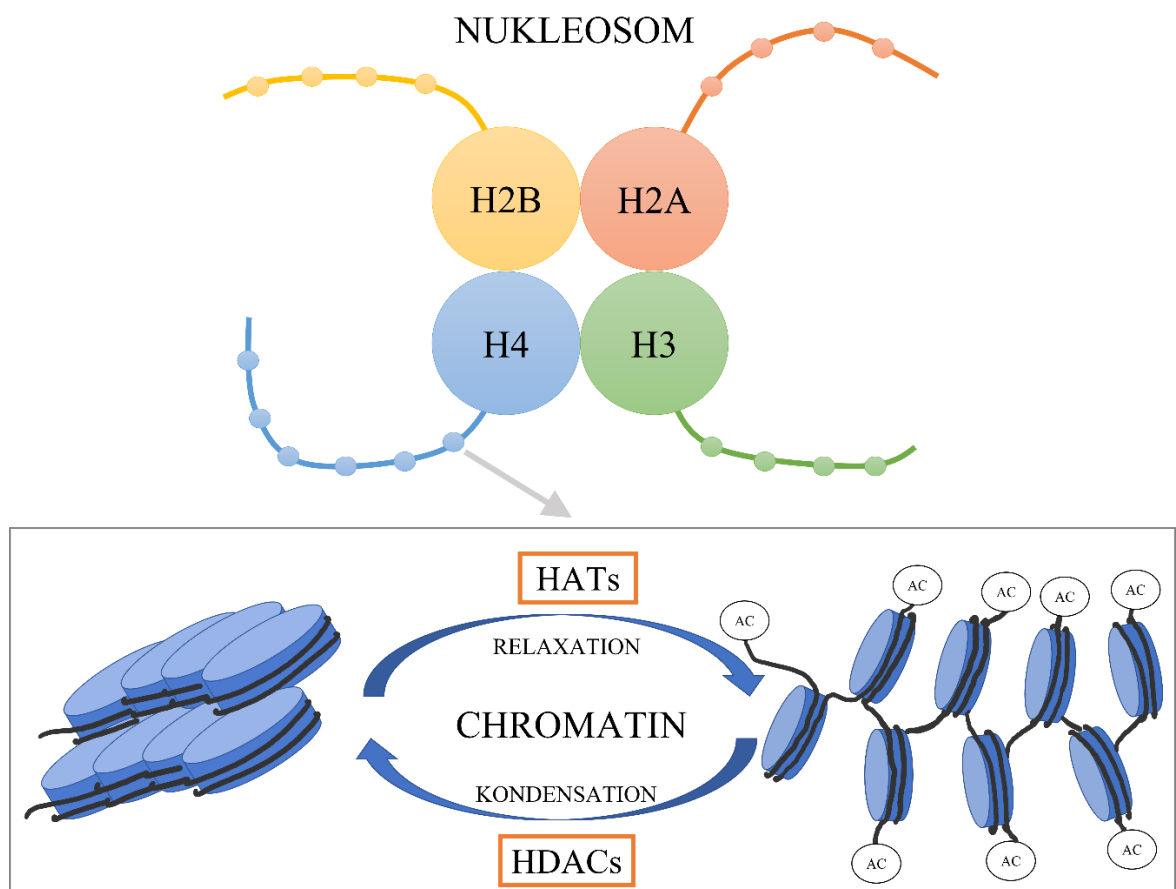


Abb. 3: Aufbau eines Nukleosoms und Auswirkungen einer Histon-Acetylierung und -Deacetylierung auf die Chromatinstruktur. Eine Histonacetylierung durch HATs (Histon-Acetyl-Transferasen) führt zu einer Chromatinrelaxation, während eine Histondeacetylierung durch HDACs (Histondeacetylasen) eine Chromatinkondensation bewirkt. Modifiziert nach Gujral et al. [24], erstellt mit OneNote, Microsoft

Es gibt 18 HDACs, die anhand ihrer Eigenschaften in vier Klassen eingeteilt werden können (vergleiche Tabelle 2) [26].

Tabelle 2: Übersicht der Histondeacetylasen (HDACs). Eingeteilt in vier Klassen mit unterschiedlicher Funktion und unterschiedlichem Vorkommen. Nach Hull et al. [26]

	HDACs	Vorkommen	Funktion
Klasse I	1, 2, 3, 8	Ubiquitär in Nucleoli aller Gewebe	Deacetylierung von Tumorsuppressoren, Steroidrezeptoren, Transkriptionsfaktoren
Klasse IIA	4, 5, 7, 9	Nucleoli und Zytosol	Deacetylierung von Non-Histon-Enzymen, Gewebespezifische Funktionen
Klasse II B	6, 10	Zytoplasma	Signaltransduktion, Motilität (Tubulin, Cortactin)
Klasse III „Sirtuins“	SIRT 1 – 7	Ubiquitär	Regulieren oxidativen Stress, DNA-Reparatur, Metabolismus und Alterungsprozesse
Klasse IV	11	Gewebespezifisch: Niere, Gehirn, Hoden, Herz, Muskulatur	Reguliert die Entwicklung von Oligodendrozyten und die Expression von Interleukin-10

Eine Deregulation der HDACs wird auch während der Karzinogenese vielfach beobachtet [27]. Beispielsweise wird im Vergleich zum Normalgewebe HDAC1 insbesondere von Prostata-, Kolon-, Lungen- und Mamma-Karzinomen gebildet, während das Enzym HDAC2 in kolorektalen und zervikalen Tumoren vermehrt produziert wird [25]. Ebenfalls konnte in Vorstudien gezeigt werden, dass KZT überwiegend *HDAC1* exprimieren [28].

Auch bei KZT wird angenommen, dass sowohl DNA-Methylierungsprozesse als auch Histonmodifikationen bei der Entstehung eine bedeutende Rolle spielen [14]. Vorstudien zeigen, dass KZT mit hohem DNA-Methylierungsstatus mit stärker differenzierten Subtypen korrelieren, sodass Unterscheidungen zwischen SE, NS und Mischtypen vorgenommen werden könnten [14, 29]. So weisen SE in der Regel eine Hypomethylierung und NS dagegen eine vermehrte Methylierung auf [21]. Außerdem konnten in Vorarbeiten unterschiedlich ausgeprägte Histon-Methylierungen wie H3K9me2, H3K4me3, H3K27me3 oder H3K4me1 in KZT, je nach Subtyp, nachgewiesen werden [21]. Dies führt zu der Annahme, dass epigenetische Prozesse zum einen zur Tumorentstehung beitragen und zum anderen einen Erklärungsansatz für die Subtypentwicklung bei KZT liefern können [21].

1.3.1 HDAC-Inhibitoren

Die Histonacetylierung und -deacetylierung gehört zu den wichtigsten Kontrollmechanismen der Gentranskription [24]. Somit kann eine Inhibierung der Histondeacetylase zur epigenetischen Regulierung der Genexpression, aber auch der zellulären Aktivität führen [26]. Vorarbeiten in KZT zeigen, dass HDAC-Inhibitoren zytotoxische Effekte auf die Zellen ausüben und somit eine therapeutische Option darstellen können [21].

HDAC-Inhibitoren können in fünf Klassen unterteilt werden und sowohl auf spezifische Histondeacetylase als auch ubiquitär wirken (vergleiche Tabelle 3) [25]. Als Folge kommt es zur vermehrten Zelldifferenzierung, Apoptose und Hemmung der Angiogenese [30].

Tabelle 3: Überblick der HDAC-Inhibitoren. Nach Eckschlagler et al. [25]

Class	HDAC Inhibitor	Target HDAC Class	Clinical Status
hydroxamic acids	Trichostatin A	pan	preclinical
	SAHA	pan	approved for cutaneous T-cell lymphoma
	Belinostat	pan	approved for peripheral T-cell lymphoma
	Panabiosat	pan	approved for multiple myeloma
	Givinostat	pan	phase II clinical trials—relapsed leukemia and multiple myeloma
	Resminostat	pan	phase I and II clinical trials—hepatocellular carcinoma
	Abexinostat	pan	phase II clinical trial—B-cell lymphoma
	Quisinostat	pan	phase I clinical trial—multiple myeloma
	Rocilinostat	II	phase I clinical trial—multiple myeloma
	Practinostat	I, II and IV	phase II clinical trial—prostate cancer
short chain fatty acids	CHR-3996	I	phase I clinical trial—advanced/metastatic solid tumors refractory to standard therapy
	Valproic acid	I, IIa	approved for epilepsy, bipolar disorders and migraine, phase II clinical trials—several studies
	Butyric acid	I, II	phase II clinical trials—several studies
benzamides	Phenylbutyric acid	I, II	phase I clinical trials—several studies
	Entinostat	I	phase II clinical trials—breast cancer, Hodgkin's lymphoma, non-small cell lung cancer, phase III clinical trial—hormone receptor positive breast cancer
	Tacedinaline	I	phase III clinical trial—non-small cell lung cancer and pancreatic cancer
	4SC202	I	phase I clinical trial—advanced hematological malignancies
cyclic tetrapeptides	Mocetinostat	I, IV	phase II clinical trials—Hodgkin's lymphoma
	Romidepsin	I	approved for cutaneous T-cell lymphoma
sirtuins inhibitors	Nicotinamide	all class III	phase III clinical trial—laryngeal cancer
	Sirtinol	SIRT 1 and 2	Preclinical
	Cambinol	SIRT 1 and 2	Preclinical
	EX-527	SIRT 1 and 2	cancer preclinical, phase I and II clinical trials—Huntington disease, glaucoma

Romidepsin gehört zur Klasse 1 der HDAC-Inhibitoren (vergleiche Tabelle 3) [25, 31] und führt außerdem zur Hyperacetylierung der Histone 3 und 4 [28].

Romidepsin ist bereits zur Therapie von peripheren und kutanen T-Zell-Lymphomen zugelassen [32, 33] und wird für weitere Tumorentitäten, wie Brust-, Kolon- und Gallenblasenkarzinome, experimentell und klinisch erprobt [34-36]. Vorstudien konnten außerdem zeigen, dass KZT, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, sensitiv auf Romidepsin reagierten [28]. Hierbei wurde nach Romidepsin-Behandlung ausschließlich in den Tumorzellen ein Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase sowie der Übergang in die Apoptose induziert [28, 37]. Dieser Effekt konnte in Fibroblasten und Sertoli-Zellen, die als Kontrollzellen dienten, nicht beobachtet werden [28].

Durch die Romidepsin vermittelte Inhibierung der HDAC-Enzyme konnte in Vorarbeiten eine Hypoacetylierung in der *ARID1A*-Promoter-Region nachgewiesen werden [28]. *ARID1A* gehört zur ARID-Gen-Familie und stellt eine Untereinheit des SWI/SNF-Komplexes dar [38]. Der Chromatin-remodellierende, ATP-abhängige SWI/SNF-Komplex ist zum einen an der Regulierung der Genexpression und der Zelldifferenzierung beteiligt [38]. Dies geschieht über die ATPase aktiven, katalysierenden Untereinheiten BRG1 (*SMARCA4*) oder BRM (*SMARCA2*) [39]. Zum anderen ist er an der DNA-Reparatur beteiligt [38]. Seine Untereinheiten fungieren außerdem als Tumorsuppressorgene [38] und weisen in etwa 20 % aller Tumore eine Mutation auf [39]. Somit wurde der Verlust einzelner Untereinheiten des SWI/SNF-Komplexes bei zahlreichen Tumorentstehungsprozessen beobachtet [38]. So konnte beispielsweise in 30 bis 40 % der Lungenkarzinome der Verlust der Untereinheiten BRG1 (*SMARCA4*) und BRM (*SMARCA2*) nachgewiesen werden [38]. Die Untereinheit BAF250A (*ARID1A*) zeigte sich wiederum in 10 % der Brustkarzinome und in 30 % der renalen Tumore im Vergleich zu normalem Gewebe vermindert [40].

Vorstudien zeigten, dass es durch die Herunterregulierung von *ARID1A* (durch Romidepsin) zur Hochregulierung der Stress- und Apoptosefaktoren *GADD45B*, *DUSP1* und *CDKN1A* kam [28]. Somit konnte *ARID1A* als Schlüsselenzym der Romidepsin-Wirkkaskade identifiziert werden (vergleiche Abb. 4).

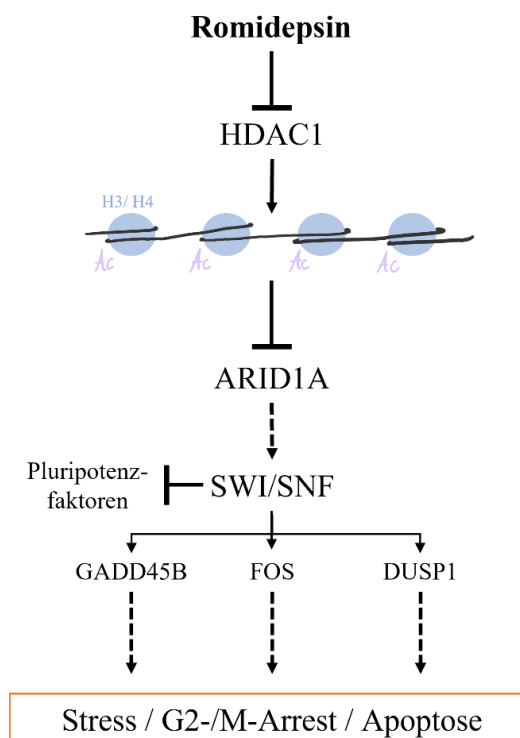


Abb. 4: Wirkkaskade von Romidepsin mit ARID1A als Schlüsselfaktor. ARID1A bewirkt die Induktion von Stressfaktoren, Apoptose und Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase. HDAC1 (Histondeacetylase 1). Modifiziert nach Nettersheim et al. [28]

Weitere Vorarbeiten wiesen nach, dass die alleinige siRNA-vermittelte Herunterregulierung von *ARID1A* zu ähnlichen pharmakologischen Effekten wie Romidepsin führte [28]: niedrige *ARID1A*-Level bewirkten eine Hochregulierung zahlreicher Stressfaktoren, sowie Zellzyklus- und Apoptose-Regulatoren, wie beispielsweise *GADD45B*, *DUSP1* und *FOS*. Im Gegensatz hierzu wurde gleichzeitig eine Herunterregulierung von Pluripotenzfaktoren wie *NANOG*, *OCT3/4*, *LIN28* und *GDF3* beobachtet [28]. Dies führte zur Annahme, dass *ARID1A* Pluripotenz-fördernde Eigenschaften aufweist.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es durch die Herunterregulierung von *ARID1A* zur Apoptose und einem Zellzyklusarrest in Tumorzellen kommt [28]. Somit lässt sich annehmen, dass eine pharmakologische Inhibition von *ARID1A* ebenfalls zum Zelltod in KZT führen könnte.

ARID1A selbst wird in zahlreichen Tumorentitäten exprimiert, neben KZT, auch bei akuter myeloischer Leukämie, Ösophagus-Karzinomen, Ovarial-Karzinomen und zahlreichen anderen (vergleiche Abb. 5) [41].

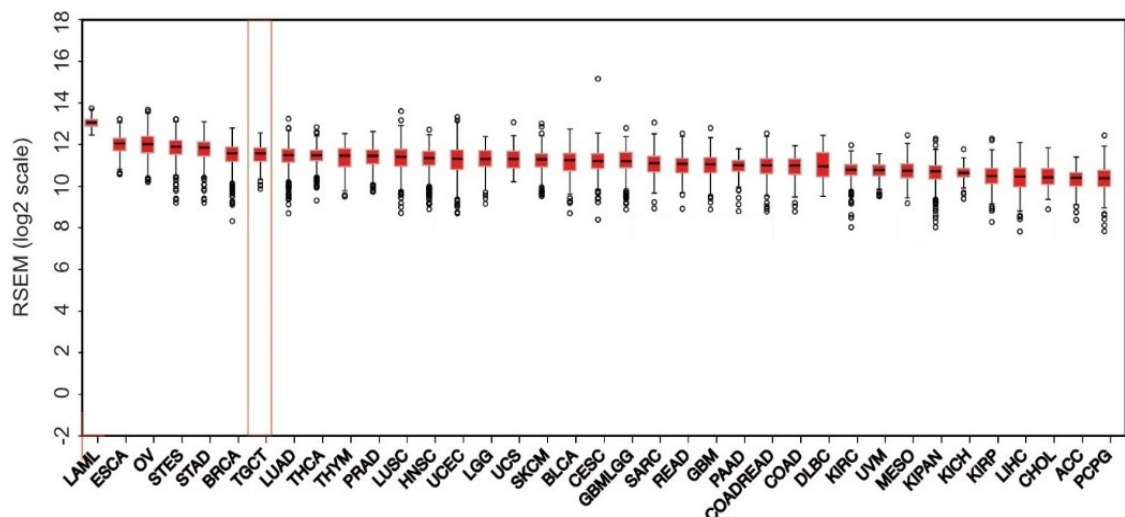


Abb. 5: *ARID1A*-Expression in 37 Tumorentitäten. Firebrowse-Analyse aus Daten des *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). Aus Kurz et al. [41]

Das *ARID1A*-Gen liegt in neun Isoformen vor. Vier davon werden sowohl in KZT, als auch im Hodengewebe exprimiert. Die Isoform *EST000000324856.11* kodiert als einzige in voller Länge das ARID1A Protein [41].

Mittels Xena-Browser-Analysen konnten sowohl die Genexpression als auch der DNA-Methylierungsstatus von *ARID1A* dargestellt werden (vergleiche Abb. 6F und 6G) [41]. Dafür wurden die KZT zunächst in ihre Subtypen anhand der Genexpression unterteilt. *SOX17*-positive KZT konnten den SE zugeordnet werden (vergleiche Abb. 6B), während die *SOX2*-postiven den NS zugeteilt werden konnten (vergleiche Abb. 6C). Mittels *AFP* konnten

Dottersacktumoren identifiziert werden (vergleiche Abb. 6D). Dagegen konnten mittels der β -HCG-Expression Chorionkarzinome und SE mit Trophoblastendifferenzierung ermittelt werden (vergleiche Abb. 6E).

Im nächsten Schritt konnte die Genexpression von *ARID1A* in den KZT dargestellt werden (vergleiche Abb. 6F). Hierbei zeigte sich, dass *ARID1A* in allen Subtypen der KZT exprimiert wird und somit keiner einzelnen Unterform zugeordnet werden kann.

Daran anknüpfend wurde der DNA-Methylierungsstatus von *ARID1A* dargestellt (vergleiche Abb. 6G). Hierdurch konnte gezeigt werden, dass sowohl in der Promoter-Region als auch am 3'-Ende die DNA-Methylierungslevel von *ARID1A* erhöht waren (vergleiche Abb. 6G) [41].

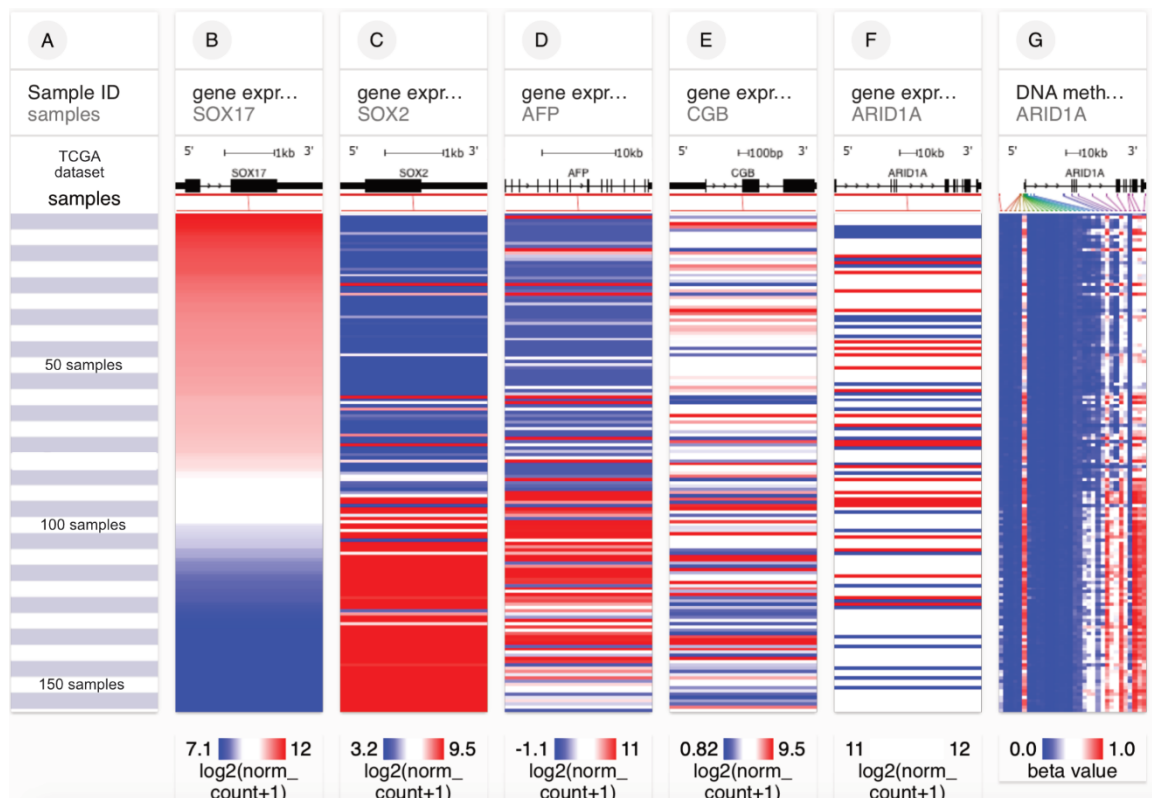


Abb. 6: Analyse der *ARID1A*-Expression stratifiziert nach den KZT-Subtypen. Die *ARID1A*-Expression (Spalte F) stratifiziert nach SE (SOX17 positiv, Spalte B), EC (SOX2 positiv, Spalte C), Dottersacktumore (AFP positiv, Spalte D) und Chorionkarzinome, sowie SE mit Trophoblastendifferenzierung (BCG positiv, Spalte E) basierend auf der KZT-Kohorte aus *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). Spalte G verdeutlicht den DNA-Methylierungsstatus von *ARID1A*. Seminom SE), Embryonalkarzinom (EC), alpha-Fetoprotein (AFP), humanes Choriongonadotropin (β -HCG). Aus Kurz et al. veröffentlicht [41]

1.4 Zielsetzungen der Arbeit

Der Keimzelltumor als häufigste maligne Erkrankung des jungen Mannes wird mittels einer operativen Entfernung, Cisplatin-basierter Chemotherapie sowie strahlentherapeutischen Maßnahmen behandelt [6].

Trotz vielfältiger Therapieoptionen erleiden etwa 30 % der Patienten ein Rezidiv oder entwickeln einen Tumorprogress. Etwa 10 % der metastasierten Patienten zeigen nach Erstlinientherapie zudem eine Resistenz gegen Cisplatin, sodass die Lebenserwartung und die Prognose dieser Patienten erheblich sinkt [42]. Aus diesem Grund ist die Erforschung neuer Therapieoptionen erforderlich.

HDAC-Inhibitoren wie Romidepsin greifen in die epigenetische Tumorerkrankung ein und konnten sich bereits bei anderen Tumorentitäten als Erstlinientherapie beweisen [33]. Vorstudien zeigten auch in KZT eine Induktion von Apoptose und Zellzyklusarrest [28]. Hierbei konnte *ARID1A*, eine Untereinheit des Chromatin-remodellierenden SWI/SNF Komplexes, als Schlüsselenzym identifiziert werden [28]. Eine spezifische siRNA-vermittelte Herunterregulierung von *ARID1A* bestätigte diese Schlüsselrolle [28] und gibt Anlass zur Annahme, dass eine *ARID1A*-Defizienz oder eine spezifische pharmakologische Inhibition von *ARID1A* ebenfalls zum Zelltod in KZT-Zellen führen könnte.

Ziel dieser Arbeit war die weitere molekularbiologische Aufschlüsselung der *ARID1A*-Funktion als Regulator für Stress- und Apoptosefaktoren, sowie als Induktor für die Pluripotenz. Hierfür sollten *ARID1A*-defiziente KZT-Zelllinien mittels CRISPR/Cas9-Geneditierung hergestellt werden. Im nächsten Schritt sollten *ARID1A*-defiziente KZT mit ihren parentalen Zellen hinsichtlich ihrer Morphologie, ihres Wachstumsverhaltens und ihres Zellzyklus miteinander verglichen werden, um festzustellen welche Rolle *ARID1A* in den KZT-Zellen erfüllt. Des Weiteren sollten die *ARID1A*-defizienten KZT sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene untersucht werden, um die Auswirkungen der Geneditierung zu analysieren und somit auf die Funktion von *ARID1A* zu schließen.

Darüber hinaus soll das therapeutische Potenzial einer pharmakologischen *ARID1A*-Inhibition in KZT erforscht werden. Zunächst sollten hierfür die *ARID1A*-defizienten KZT-Sublinien, als auch ihre parentalen Zellen mit dem HDAC-Inhibitor Romidepsin behandelt und die Zellviabilität mittels XTT-Analysen ermittelt werden. Im nächsten Schritt sollte die *ARID1A*-Defizienz pharmakologisch mit einem SWI/SNF-Komplex-Inhibitor nachgeahmt werden. Hierbei stand die Fragestellung im Vordergrund, ob die Herunterregulierung von *ARID1A* in Kombination mit Romidepsin eine möglich Behandlungsoption für KZT darstellen könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Ethikvotum

Die Studiennummer des Ethikvotums lautet 2019-412.

Die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf stellte bei der Überprüfung des Ethikvotums keine ethischen oder rechtlichen Bedenken gegen die Verwendung der Zelllinien dieser Arbeit für *in-vitro*-Versuche fest.

2.2 Material

2.2.1 Humane Keimzelltumorzelllinien

Tabelle 4 zeigt eine Übersicht der verwendeten humanen KZT-Zelllinien mit Ursprung des Gewebes sowie dem Patientengeschlecht, aus dem die jeweilige Zelllinie gewonnen wurde.

Tabelle 4: Übersicht der humanen KZT-Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Geschlecht	Erhalten von
TCam-2; TCam-2 <i>ARID1A</i> ^{-/-}	Seminom	männlich	Dr. Janet Shipley, Institute of Cancer Research, Sutton, England
NCCIT	Embryonalkarzinom	männlich	Dr. Christoph Oing, II. Medizinische Klinik, UKE, Hamburg-Eppendorf
2102EP	Embryonalkarzinom	männlich	Dr. Christoph Oing, II. Medizinische Klinik, UKE, Hamburg-Eppendorf

2.2.2 Zellkulturmedien und Supplemente

Zur Kultivierung der KZT-Zelllinien wurden unterschiedliche Zellmedien und Supplemente verwendet. Zunächst wurde zu jedem Medium Fetales Kälberserum (FCS) hinzugefügt, da es sowohl Wachstumsfaktoren als auch Proteine, die für die Zellkultivierung essenziell sind, enthält. Des Weiteren wurden zur Vermeidung von Kontaminationen zu jedem Medium 50 U/ml Penicillin / Streptomycin (P/S) supplementiert. Darüber hinaus benötigen einige Zelllinien nicht-essentielle Aminosäuren oder L-Glutamin, da sie diese selbst nicht synthetisieren können. In Tabelle 5 wird eine Übersicht über die Medien und Supplemente, die jede verwendete Zelllinie benötigt, aufgeführt.

Tabelle 5: Übersicht der für die Zelllinien benötigten Medien und Supplemente

Zelllinie	Medium	Supplemente
TCam-2	RPMI Medium 1640 (1X)	10 % FCS
NCCIT		50 U/ml P/S
2102EP	DMEM (1X) + GlutaMAX™-I	200 nM L-Glutamin

2.2.3 Materialien der Zellkultur

In Tabelle 6 wird eine Übersicht der einzelnen Komponenten, die für die Standard-Kultivierung von KZT-Zelllinien in der Zellkultur benötigt wurden, mit Angaben zum Hersteller und dessen Hauptsitz aufgeführt.

Tabelle 6: Übersicht der Materialien für die Kultivierung von Zellen

Material	Hersteller	Hauptsitz
6-Well Kulturplatte	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
96-Well Kulturplatte	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Automatischer Zellzähler TC20TM	BioRad	Feldkirchen, Deutschland
CO ₂ -Inkubator HeraCell 150i	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
DMEM Medium	Gibco	Schwerte, Deutschland
(D)PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Dimethyl sulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
FCS	Biochrom/ MERCK	Darmstadt, Deutschland
Glas-Pasteur-Pipetten	Brand	Wertheim, Deutschland
Kühlzentrifuge Allegra 21R Centrifuge	Beckmann Coulter	Krefeld, Deutschland
L-Glutamin	Gibco	Schwerte, Deutschland
Mikroskope Ts2, TE2000-S	Nikon	Düsseldorf, Deutschland
Nicht-essenzielle Aminosäuren	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
NIS Elements Software (Mikroskop)	Nikon	Düsseldorf, Deutschland
Penicillin / Streptomycin (P/S)	Gibco	Schwerte, Deutschland
Pipetten 0,5 µl/ 20 µl/ 100 µl/ 1000 µl	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 10 /100	Nerbe plus	Winsen, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,5 ml/ 2,0 ml	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Röhrchen 15 ml/ 50 ml	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
RPMI Medium	Gibco	Schwerte, Deutschland
Sterile Pipetten 5 ml/ 10 ml/ 25 ml	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
T-75 Zellkultur-Flaschen	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Trypanblau 0,4 %	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Trypsin-EDTA 0,05 %	Gibco	Schwerte, Deutschland
Vortex Mixer	Scientific Industries	Bohemia, NC, USA
Zählkammern	BioRad	Feldkirchen, Deutschland
Zentrifuge 5810	Eppendorf	Hamburg, Deutschland

2.2.4 CRISPR/Cas9-Transfektion

In Tabelle 7 werden die Materialien zur CRISPR/Cas9-Transfektion, die zur Herstellung *ARID1A*-defizienter Zellen aus den KZT-Zelllinien TCam-2, 2102EP und NCCIT benötigt wurden, aufgelistet.

Tabelle 7: Übersicht der Materialien für die CRISPR/Cas9-Transfektion

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

2.2.5 Nicoletti-Assay zur Zellzyklusanalyse

Zur Herstellung des Nicoletti-Puffers wurden 0,1 % Triton X-100 und 0,1 % Natriumzitat in PBS gelöst. In Tabelle 8 wird eine Übersicht der Materialien, die zur Durchführung des Nicoletti-Assays zur Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie benötigt werden, aufgeführt.

Tabelle 8: Übersicht der Materialien für den Nicoletti-Assay

Material	Hersteller	Hauptsitz
6-Well-Platten	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
MACSQuant® und MACSQuant Analyzer 10, Version 2.13.0 Durchflusszytometer	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
MACSQuantify Software Version 2.11 zur Datenauswertung	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
Natriumzitat	MERCK	Darmstadt, Deutschland
PBS	Sigma- Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
PI (2 mg/ml gelöst in PBS, gelagert bei 4°C)	Sigma- Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Polystyrol-Röhrchen	VWR Chemicals	Radnor, PA, USA
Triton X-100	Sigma- Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Trypsin-EDTA 0,05 % Phenolrot	Gibco	Schwarte, Deutschland
Vortex Mixer	Scientific Industries	Bohemia, NC, USA

2.2.6 DNA-Isolation

Für die Herstellung von 100 ml DNA-Lysis Puffer werden 5 M NaCl (2 ml), 1 M TrisHCl (pH 8; 1 ml), 0,5 M EDTA (pH 8; 5 ml) und 10 % SDS (5 ml) in 87 ml Millipore-Wasser gelöst. In Tabelle 9 werden die für die Isolierung genomischer DNA benötigten Materialien, inklusive Hersteller und deren Hauptsitz aufgeführt.

Tabelle 9: Übersicht der Materialien zur DNA-Isolation

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

2.2.7 PCR und cDNA-Synthese

In Tabelle 10 wird eine Übersicht der für die PCR und cDNA-Synthese verwendeten Materialien inklusive Angaben zum Hersteller und dessen Hauptsitz aufgeführt.

Tabelle 10: Übersicht der Materialien und Geräte für die PCR und cDNA-Synthese

Material	Hersteller	Hauptsitz
dNTP-Mix (10 mM)	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		
S100 cyclor	BioRad	Feldkirchen, Deutschland
NanoDrop 2000	Thermo Scientific	Schwerte, Deutschland

2.2.8 RNA-Isolation und Proteinextraktion

Zur Herstellung des RIPA-Puffers wurden 110 mM Natriumchlorid, 1 % Triton X-100, 0,5 % Sodium Deoxycholat (DOC), 0,1 % SDS, 50 mM Trisaminomethan (Tris) verwendet und ein pH-Wert von 8 eingestellt. Für die Aufbereitung der RNA wurde das RNeasy Mini Kit von Qiagen verwendet. In Tabelle 11 wird eine Übersicht der für den Versuch verwendeten Materialien und Chemikalien inklusive Angaben zum Hersteller und dessen Hauptsitz aufgeführt.

Tabelle 11: Übersicht der Materialien und Chemikalien zur RNA-Isolation und Proteinextraktion

Material	Hersteller	Hauptsitz
β-Mercaptoethanol	Sigma- Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
PBS	Sigma- Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Phosphatase-Inhibitor	Sigma- Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Protease-Inhibitor	Sigma- Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
QIAzol® Lysis Reagent	QIAGEN	Hilden, Deutschland
Röhrchen 15 ml	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
RNeasy Mini Kit (Cat. No. 74106)	QIAGEN	Hilden, Deutschland
Trypsin-EDTA 0,05 % Phneolrot	Gibco	Schwerte, Deutschland
Zellkultur Schale, PS, 100/20 mm	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Zentrifuge 5810	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Chemikalien für RIPA-Puffer		
Sodium Deoxycholat (DOC)	Sigma- Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Natriumchlorid	VWR Chemicals	Darmstadt, Deutschland
Dodecylsulfat (SDS ultra pure)	CARL ROTH	Karlsruhe, Deutschland
Trisaminomethan (Tris)	VWR Chemicals	Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Sigma- Aldrich	Taufkirchen, Deutschland

2.2.9 Agarose-Gelelektrophorese

In Tabelle 12 wird eine Übersicht der für die Agarose-Gelelektrophorese verwendeten Materialien und Geräte inklusive Angaben zum Hersteller und dessen Hauptsitz aufgeführt.

Tabelle 12: Übersicht der Materialien und Geräte für die Agarose-Gelelektrophorese

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

2.2.10 qRT-PCR

In Tabelle 13 wird eine Übersicht der für die Durchführung einer qRT-PCR verwendeten Materialien und Geräte inklusive Angaben zum Hersteller und dessen Hauptsitz aufgeführt.

Tabelle 13: Übersicht der Materialien und Geräte für die qRT-PCR

Material	Hersteller	Hauptsitz
FrameStar 384 Well PCR Platte	4titude	Berlin, Deutschland
Luna Universal qPCR Master Mix	New England Biolabs	Frankfurt am Main, Deutschland
Geräte		
CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System	BioRad	Feldkirchen, Deutschland

2.2.11 Massenspektrometrie

In Tabelle 14 wird eine Übersicht der für die Massenspektrometrie verwendeten Materialien und Datenanalyse-Systeme inklusive Angaben zum Hersteller und dessen Hauptsitz aufgeführt.

Tabelle 14: Übersicht der Materialien und Datenanalyse-Systeme für die Massenspektrometrie

Material	Hersteller	Hauptsitz
TissueLyser	Qiagen	Venlo, Niederlande
Kühlzentrifuge Allergra 2IR Centrifuge	Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland
Pierce 660 nm Protein Assay	Thermo Fischer Scientific	Schwerte, Deutschland
QExactive plus Massenspektrometer	Thermo Fischer Scientific	Schwerte, Deutschland
Ultimate 3000 Rapid Separation Flüssigkeitschromatographie	Dionex/ Thermo Fischer Scientific	Schwerte, Deutschland
Datenanalyse		
Proteome Discoverer Version 2.3.0.532	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Mascot Version 2.4	Matrix Science	London, UK
Progenesis QI for Proteomics Version 2.0	Nonlinear Dynamics, Waters Corporation	Newcastle upon Tyne, UK

2.2.12 XTT

In Tabelle 15 folgt eine Übersicht über die Materialien, inklusive Angaben zum Hersteller und dessen Hauptsitz, die für die Durchführung von XTT-Analysen benötigt wurden. Die photospektrometrischen Messungen der XTT-behandelten Platten erfolgen mit der Software Microplate Manager 6 (BioRad, Feldkirchen).

Tabelle 15: Übersicht der Materialien für XTT-Analysen

Material	Hersteller	Hauptsitz
96-Well-Platte	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Costar® Reagenzreservoir 50 ml	Corning	Krailling, Deutschland
ELISA Platten-Lesegerät „FLUOstarOptima“	BMG Labtech	Ortenberg, Deutschland
iMark™ Microplate Reader	BioRad	Feldkirchen, Deutschland
Multikanalpipette	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Multipette® stream	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Phenazinemethosulfat (PMS) (1,25 mM in PBS gelöst)	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
XTT-Natriumsalz	BIOFROXX	Einhausen, Deutschland

2.2.13 Oligonukleotide

In Tabelle 16 wird eine Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide aufgeführt.

Tabelle 16: Übersicht der Oligonukleotide

Zielgen	Forward Primer	Reverse Primer
<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>	A AGAACGAGAAGCAGCATTTGAT	TTCTGAGCCCGGACAATACAC
<i>DUSP1</i>	GTACATCAAGTCCATCTGAC	GGTCTTCTAGGAGTAGACA
<i>FOS</i>	GAGAGCTGGTAGTTAGTAGCATGTTGA	AATTCCAATAATGAACCCAATAGATTAGTTA
<i>GADD45B</i>	GTCGGCCAAGTTGATGAAT	CACGATGTTGATGTCGTTGT
<i>GAPDH</i>	TGCCAAATATGATGACATCAAGAA	GGAGTGGGTGTCGCTGTTG
<i>ID2</i>	TCAGCCTGCATCACCAGAGA	CTGCAAGGACAGGATGCTGATA
<i>P21 (CDKN1A)</i>	CCTCATCCCGTGTTCTCCTTT	GTACCACCCAGCGGACAAGT
<i>P53</i>	TTGCAATAGGTGTGCGTCAGA	AGTGCAGGCCAACTTGTTTCAG
<i>SMARCA4</i>	CAGCATGCCAAGATTTC AAG	CGATCCGCTCGTTCTCTTTC
<i>SMARCB1</i>	AACGTCAGCGGGTTCAAAT	GCCTTCACCTGGAACATGAA
<i>ZMYND11</i>	TTGTTAAACGTGCCATGACC	GCATGTGTGGAGACAGAGGA

2.2.14 Pharmakologische Inhibitoren

In Tabelle 17 wird eine Übersicht der verwendeten pharmakologischen Inhibitoren, inklusive Angaben zum Hersteller und dessen Hauptsitz, aufgeführt.

Tabelle 17: Übersicht der pharmakologischen Inhibitoren

Zielgen	Inhibitor	Hersteller	Lösungsmittel
ARID1A	Compound 63	Prof. E. Dykhuizen	DMSO
ARID1A	ACBI1	Prof. E. Dykhuizen	DMSO

2.3 Methoden

2.3.1 Kultivierung der Zellen

Die humanen KZT-Zelllinien wurden unter den in Tabelle 5 dargestellten Bedingungen in T-75-Flaschen bei 37 °C und einem 5 %igem CO₂-Gehalt kultiviert.

Das Passagieren der jeweiligen Zelllinien erfolgte abhängig von ihrer Wachstumsgeschwindigkeit alle zwei bis vier Tage bei einer Konfluenz von 70 bis 90 %. Zunächst wurde das Zellmedium der T-75-Flasche abgesaugt und die adhärennten Zellen mit Hilfe von PBS gewaschen. Zur Lösung der Zelladhärenz wurde, nach Absaugen des PBS, 1 ml 0.05 % Trypsin-EDTA hinzugegeben und die T-75-Flasche für 3 bis 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Um die enzymatische Reaktion des Trypsins abzustoppen, wurde FCS-haltiges Medium hinzugefügt. Anschließend wurde eine neue T-75-Flasche mit 15 ml Zellmedium vorbereitet. Je nachdem, wie schnell die entsprechende Zelllinie wuchs, wurde ein Teil der Zellsuspension in die neue Flasche überführt.

2.3.2 Bestimmung der Wachstumskurve

Die Zellzählung zur Bestimmung einer Wachstumskurve wurde alle 24 Stunden durchgeführt. Hierfür wurden die KZT-Zellen, wie in Kapitel 1.2.1 beschrieben, enzymatisch abgelöst und in ein 15-ml-Röhrchen überführt. Zur Zellzählung wurde Trypanblau mit der Zellsuspension in einem Verhältnis von 1:1 in einem 0.5-ml-Tube vermischt und anschließend 10 µl in eine Zählkammer pipettiert. Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer oder einem automatischen Zellzähler (TC20TM, BioRad) bestimmt.

2.3.3 Transfektion von KZT-Zelllinien: TCam-2, 2102EP und NCCIT

Eine Transfektion von KZT-Zelllinien mittels CRISPR/Cas9 wird zum Gene-Editing durchgeführt. Hierbei sollen bestimmte Genabschnitte, in diesem Fall *ARID1A*, modifiziert werden, indem an der Zielstelle im Genom DNA-Doppelstrangbrüche erzeugt werden. Hierdurch wird erreicht, dass am Zielort präzise Veränderungen vorgenommen werden können [43].

Für die Transfektion wurden die KZT-Zelllinien TCam-2, 2102EP und NCCIT zuvor in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen pro 6-Well im Standard-Zellkulturmedium (Tabelle 5) auf einer 6-Well-Platte ausgesät. Am Folgetag wurde ein Reaktionsgemisch, bestehend aus 90 µl RPMI Medium ohne Zusätze, 10 µl ARID1A CRISPR/Cas-9-KO-Plasmid (0.1 µg/µl) und 5 µl FuGene, in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß für die Transfektion angesetzt und 20 Minuten auf Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Medium der KZT (TCam-2, 2102EP und NCCIT) aus der 6-Well-Platte zu RPMI mit 10 % FCS und L-Glutamin (ohne P/S) gewechselt. Nach der Inkubationszeit wurden 100 µl des Reaktionsgemisches auf die 6-Well-

Platte langsam und vorsichtig in kreisenden Bewegungen pipettiert. Die 6-Well-Platte wurde im Folgenden für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurde ein Mediumwechsel auf das Standard-Zellkulturmedium vorgenommen.

Sobald die Platten mit den transfizierten Keimzelltumorzellen dicht bewachsen waren, wurden diese vereinzelt. Hierfür musste zunächst die Zellzahl bestimmt werden, um danach die Tumorzellen mit ausreichend Medium auf 1 Zelle/ 96-Well in 100 µl zu verdünnen und mit einer Multikanalpipette auf 96-Well-Platten auszusäen.

2.3.4 Nicoletti-Assay (Durchflusszytometrie)

Der Nicoletti-Assay diente zur Analyse der Zellzyklusphasen. Dafür wurden die Zellen mit dem Nicoletti-Puffer fixiert und permeabilisiert. Durch die Zugabe des fluoreszierenden Farbstoffes Propidiumiodid (PI), der als Nukleinsäure-Interkalator fungiert, kann man die verschiedenen Zellzyklusphasen zuordnen. Hierbei gilt, dass die ausgehende Fluoreszenzstärke sich direkt proportional zur DNA-Menge der Zelle verhält.

Nach Herstellung des Nicoletti Puffers (gemäß Tabelle 8), erfolgte die Hinzugabe von 50 µg/ml des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes PI.

Ziel der Durchflusszytometrie war der Vergleich der Zellzyklen zwischen der *ARID1A*-defizienten KZT-Zelllinie und der parentalen Zelllinie. Hierfür wurden zunächst beide Zelllinien mit 5×10^3 Zellen pro Well in 2 ml Medium auf einer 6-Well-Platte ausgesät und 48 Stunden später geerntet. Zunächst wurde aus dem jeweiligen Well der Überstand in ein Polystyrol-Röhrchen überführt. Danach wurden die Wells mit je 1 ml PBS gewaschen und ebenfalls in die Röhrchen überführt. Die in den Wells verbliebenen adhärenen Zellen wurden in 0,5 ml Trypsin-EDTA-0,05 % für 3 bis 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Das Ablösen der adhärenen Zellen wurde anschließend mit 1 ml Standard-Zellkultur-Medium gestoppt und der Überstand in die jeweiligen Polystyrol-Röhrchen überführt. Diese wurden dann für 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde der Überstand aus den Röhrchen verworfen und der Nicoletti-Puffer durch Zugabe von 50 µg/ml PI komplettiert. In jedem Röhrchen wurden nun die Zellpellets in 0,5 ml Nicoletti-Puffer resuspendiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit zur Inkubation gelassen. Anschließend wurden die Röhrchen zur Messung auf Eis gelagert und vor jeder Analyse kurz gevortext. Die Messung erfolgte mit dem MACSQuant Analyzer 10 und deren Auswertung mit der MACSQuantify Software Version X.

2.3.5 Isolation genomischer DNA

Zur Isolation genomischer DNA wurden Zell-Pellets in 300 µl DNA-Lysis-Puffer, 40 µl 10%-SDS und 12,5 µl Proteinase-K lysiert. Nachdem die Proben für 30 Minuten bei 45 °C und

1000 rpm im Heizblock geschüttelt wurden, erfolgte die Hinzugabe von 350 µl Rotiphenol. Anschließend wurden diese 10 Minuten per Hand invertiert und für 10 Minuten bei 4 °C und 10000 rpm zentrifugiert, sodass sich zwei Phasen bildeten: die obere RNA-haltige Phase und die untere organische Phase, die Proteine beinhaltet. Im nächsten Schritt wurde die obere Phase in ein neues Reagenzgefäß überführt. Zum Gesamtvolumen der oberen Phase wurde die dreifache Menge an 100%igem Ethanol und ein Zehntel des Volumens an Natriumacetat (3 M; 5,2 pH) dazugegeben, um die Nukleinsäuren zu fällen. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten bei Raumtemperatur und 10000 rpm zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde der Überstand abgenommen, 1000 µl vom 70%igen Ethanol hinzugefügt und die Proben erneut für 5 Minuten bei Raumtemperatur und 10000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Proben bei offenem Deckel und 45 °C für 5 Minuten zum Trocknen gelassen, um zu gewährleisten, dass kein Ethanol in den Proben verblieb. Anschließend wurde die DNA in 35 µl DNase-freiem Wasser gelöst, sodass die Proben bei 4 °C gelagert werden konnten.

2.3.6 PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung von DNA und wird mit Hilfe der DNA-Polymerase durchgeführt. Dabei kann über Oligonukleotide (Primer) ein genau definierter Teil der DNA gezielt amplifiziert werden.

Hierfür wurde die DNA-Konzentration mit Hilfe eines NanoDrops spektralphotometrisch bestimmt. Hierbei wird die UV-Absorption der Nukleinsäuren bei den Wellenlängen 260 nm (= A₂₆₀) und 280 nm (= A₂₈₀) gemessen. Dadurch lässt sich die Nukleinsäurenkonzentration sowie die Reinheit der Probe feststellen.

Für die Durchführung der PCR wurde die DNA zunächst auf 100 ng/ 25 µl in DNase-freien Wasser verdünnt.

Danach wurde im jeweilig benötigtem Ansatz ein Master Mix, bestehend aus 14,8 µl H₂O, 2,5 µl 10 x Buffer, 0,5 µl dNTP, 1 µl Primer-forward, 1 µl Primer-reverse und 0,2 µl Hot-Star-Taq-Polymerase vorbereitet und gevortext. Anschließend wurden die PCR-Reaktionsgefäße mit 20 µl des Mastermixes und 5 µl der verdünnten DNA-Lösung befüllt. Die PCR wurde unter den folgenden Bedingungen durchgeführt: eine initiale Denaturierung bei 95 °C für 15 Minuten, 40 Amplifikationszyklen mit 30 Sekunden Denaturierung bei 95 °C, 3 Minuten Primer-Anlagerung bei 62 °C und 30 Sekunden Extension bei 72 °C sowie eine abschließende Extension bei 72 °C für 5 Minuten.

2.3.7 RNA- und Proteinextraktion

Für die RNA-Extraktion aus den KZT-Zellen wurden die Zellsuspensionen bei 700 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und erneut bei den oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Im Anschluss erfolgte die Aufbereitung der RNA mit dem RNeasy-Mini-Kit nach dem Protokoll des Herstellers, während das Zellpellet in 75 µl RIPA-Puffer (mit Phosphatase und Protease Inhibitor) vermengt wurde. Anschließend wurden die Protein-Lysate für 20 Minuten auf Eis inkubiert und danach für 15 Minuten mit 12000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand, der die Proteine enthielt, wurde in ein neues Reagenzgefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

2.3.8 Gelelektrophorese

Die Durchführung einer Agarose-Gelelektrophorese diente der Auftrennung von DNA in DNA-Fragmente nach ihrer jeweiligen Größe. Hierfür wurden die Nukleinsäuren mit Hilfe eines elektrischen Feldes aufgetrennt. Zum Nachweis des CRISPR/Cas-9-Defizienz von *ARID1A* in den KZT-Zelllinien TCam-2, 2102EP und NNCIT wurde eine genomische PCR durchgeführt, die zeigen sollte, ob die jeweilige Probe eines transfizierten KZT-Klons dem parenteralen KZT oder einem homo- bzw. heterozygoten Klon entsprach.

Nach Bereitstellung der Laufkammer, wurde ein 2%-Gel (2 g Agarose in 100 ml 1 x Tris-Acetat-EDTA-Puffer) vorbereitet. Hierfür wurde die Lösung für 4 Minuten in der Mikrowelle erhitzt, sodass die Agarose sich im Puffer gut lösen konnte. Danach wurde die Lösung in die Laufkammer eingegossen, der Kamm eingesetzt und das Gel für 30 Minuten zum Aushärten bei Raumtemperatur gelassen. Im Folgenden wurde der Kamm, der die Geltaschen bildete, entfernt und die Kammer mit 1 x TAE-Puffer aufgefüllt.

Die erste Geltasche wurde mit 5 µl einer DNA-Leiter (100 bps) befüllt. Im nächsten Schritt wurden zu 10 µl des PCR-Produkts 2 µl des 6 x Ladepuffers hinzugegeben und in die vorbereiteten Geltaschen überführt.

Danach wurde das Gel für etwa 45 Minuten einer Spannung von 120 V ausgesetzt. Um die DNA-Fragmente sichtbar zu machen, wurde das Gel anschließend für 10 Minuten in eine Lösung überführt, die den interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid enthielt. Zum Schluss wurde das Gel in eine Fotokammer mit UV-Licht gelegt, sodass die aufgetrennten Banden sichtbar wurden.

2.3.9 cDNA-Synthese und qRT-PCR

Die quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR) diente der Vervielfältigung und Quantifizierung von DNA. Hierbei wurden interkalierende fluoreszierende Farbstoffe, wie SYBR Green, verwendet. Diese markierten die PCR-Produkte, sodass deren Anreicherung mit einer erhöhten Fluoreszenz

einhergingen, die quantifiziert werden konnten. Somit diente die Methode ebenfalls zur Genexpressionsanalyse.

Zur Durchführung der qRT-PCR muss zunächst cDNA mittels des Enzyms reverse Transkriptase aus RNA hergestellt werden.

Im ersten Schritt der cDNA-Synthese wurde der RNA-Gehalt, sowie die Qualität jeder Probe mit einem Photospektrometer (NanoDrop 2000/2000c Software) anhand des A260/280-Verhältnisses gemessen. Nach Berechnung der Nukleinsäuren-Konzentration und -Verteilung auf PCR-Reagenzgefäße wurde für jeden cDNA-Ansatz 7,5 µl eines Mastermixes vorbereitet. Dieser bestand aus 1 µl dNTP-Mix (10 mM), 1 µl Oligo-(dT)₁₈-Primer (0,5 µg/µl), 4 µl RT-Buffer (5 x), 1 µl Maxima-H-Minus-Reverse-Transcriptase (200 U/l) und 0,5 µl RiboLock-RNase-Inhibitor (40 U/µl). Anschließend wurden, nach Zugabe von 12,5 µl der RNA, die Proben im S1000-Thermal-Cycler (BioRad) inkubiert, das folgende Schritte umfasste: 30 minütige Inkubation bei 50 °C, 5 minütige Inkubation bei 85 °C und anschließender Verbleib bei 4 °C bis zur weiteren Verarbeitung.

Im nächsten Schritt wurden für die qRT-PCR zwei Mastermixe pro Triplikat angesetzt. Mastermix 1 (MM1) wurde für jede Zelllinie hergestellt und bestand aus 0,5 µl cDNA (1000 ng / 20 µl) und 8 µl H₂O. Hierbei wurde das MM1-Volumen mit der Genanzahl multipliziert. Mastermix 2 (MM2) wurde für jedes Gen hergestellt, bestehend aus 7,5 µl Luna-qPCR-Mastermix, 0,5 µl des jeweiligen Primers-forward und 0,5 µl des jeweiligen Primers-reverse. Hierbei wurde das MM2-Volumen mit der Anzahl der Zelllinien multipliziert. Im nächsten Schritt wurden 8,5 µl des MM1 und 8,5 µl des MM2 in PCR-Reagenzgefäße pipettiert. Anschließend wurden 5 µl pro Well nach einem vorbereiteten Pipettierschema auf eine 384-Well-Platte in Triplikaten überführt. Dieser Vorgang wurde auf Eis ausgeführt. Im nächsten Schritt wurde die fertig pipettierte 384-Well-Platte abgeklebt, für 2 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert und im CFX384-Touch-Thermal-Cycler (BioRad, Feldkirchen) die Messung nach dem Protokoll entsprechend der Abbildung 7 durchgeführt.

39 x	95 °C	2 min
	95 °C	10 sec
	60 °C	30 sec
		Auslesen der Platte
Schmelzkurve	95 °C	30 sec
	95 °C- 65°C in 0.5 °C Schritten	5 sec

Abb. 7: Protokoll des CFX384-Touch-Thermal-Cyclers (BioRad, Feldkirchen) im Rahmen der quantitativen Echtzeit-PCR

Die relative Gen-Expression der Zelllinien wurde anschließend mit der Delta-Delta-CT-Methode ausgewertet. Zur Auswertung und Schmelzkurvenanalyse wurde das Programm BioRad CFX Manager (BioRad, Feldkirchen) verwendet.

2.3.10 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie dient zur Bestimmung der Molekülmasse und charakteristischer Fragmentmuster. Anhand dieser Analyse können Peptide und hierüber Proteine identifiziert werden [44].

Hierfür wurden zunächst 5×10^5 Zellen auf einer 10 cm-Platte ausgesät. Im nächsten Schritt wurde das Medium auf Eis entfernt und die Zellen zweifach mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Zellkulturplatte abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die weiteren Schritte der Massenspektrometrie wurden im Biologisch-Medizinischem Forschungszentrum Düsseldorf durchgeführt. Im Anschluss an einen weiteren Waschschrift mit PBS wurden die Zellen in Urea-Puffer mit dem TissueLyser (Qiagen, Venlo) lysiert und homogenisiert. Danach wurden die Zellen bei 14000 rpm für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Aus dem Überstand, der nach der Zentrifugation entstanden war, wurde die Proteinkonzentration durch Hinzunahme des Pierce-660-nm-Protein-Assay (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) bestimmt. Im nächsten Schritt wurden 10 µg Protein pro Probe auf eine SDS-PAGE für den In-Gel-Verdau geladen. Anschließend wurden sie reduziert (50 µl, 10 mM DTT), alkyliert (50 µl, 50 mM Iodacetamid) und dem tryptischen Verdau unterzogen (6 µl, 200 ng Trypsin in 100 mM Ammoniumbicarbonat). Danach erfolgte die Auflösung der Peptide in 0,1%iger Trifluoressigsäure zur Durchführung der anschließenden Flüssigkeitschromatographie.

Zur Durchführung weiterer Analysen wurde ein QExactive plus (Thermo Fisher Scientific, Idstein) mit einem Ultimate-3000-Rapid-Separation-Flüssigchromatographiesystem (Dionex, Thermo Fisher Scientific, Idstein) benutzt. Die Flüssigkeitschromatographie ist eine physikalische Trennmethode, die dem Sortierprozess nach Moleküleigenschaften dient. Die Länge des Flüssigkeitschromatographie-Gradienten betrug bei diesem Verfahren 120 Minuten. Das System war zudem mit einer Acclaim-PepMap-100-C18-Säule (75 µm Innendurchmesser, 25 cm Länge, 2 mm Partikelgröße von Thermo Fisher Scientific) ausgestattet. Nach der Peptidauftrennung erfolgte die Massenspektrometrie, welche im positiven Modus betrieben und mit einer Nano-Elektrospray-Ionisationsquelle gekoppelt wurde, um Ionen zur weiteren Analyse und Sequenzierung der Proteine zu erzeugen. Hierbei wurde die Kapillartemperatur auf 250 °C und die Spannungsquelle auf 1,4 kV eingestellt. Zur Erstellung von „survey scans“ wurde ein Massebereich von 200 bis 2000 m/z bei einer Auflösung von 140000 verwendet. Hierdurch

konnten zehn der intensivsten Peptid-Ionen isoliert und mittels hochenergetischer Kollisionsdissoziation aufgespalten werden.

Zur Peptid-/Protein-Identifikation wurde das Proteome-Discoverer-System (Version 2.3.0.532, Thermo Fisher Scientific) unter Verwendung der Mascot-Suchmaschine (Version 2.4, Matrix Science, London, UK), die wiederum Zugriff auf die humane Datenbank hat, verwendet. Auf Peptid-Ebene wurde die Falscherkennungsrate von 1 % gelegt. Zur Protein-Quantifizierung wurde das Programm Progenesis QI for Proteomics (Version 2.0, Nonlinear Dynamics, Waters Corporation, Newcastle upon Tyne, UK) benutzt. Hierbei wurden lediglich Proteine, die mindestens zwei einzigartige Peptide beinhalten, eingeschlossen. Die Falscherkennungsrate wurde auf Protein-Ebene auf 5 % festgesetzt. Die massenspektrometrischen Proteom-Daten wurden mit der Datensatzkennung „PXD017898“ beim ProteomeXchange-Konsortium über das PRIDE-Partner-Repository hinterlegt.

2.3.11 XTT

Mittels der XTT-Assays wurde die Zellviabilität der TCam-2-Zellreihen nach Behandlung mit Romidepsin und weiteren Inhibitoren (Compound 63 und ACBI1) gemessen. Somit ließ sich auch die Zytotoxizität der verwendeten Inhibitoren quantifizieren.

Bei diesem kolorimetrischem Assay wird die Reduktion des gelben Tetrazoliumsalzes zu einem orange-farbenen Formazan-Farbstoff durch die enzymatische Aktivität der Zellen gemessen und durch einen Spektrophotometer quantifiziert.

Zunächst erfolgt die Aussaat der Zellen auf einer 96-Well-Platte: pro Well 4000 Zellen in 50 µl Medium. Zur Kontrolle werden zudem 8 Wells mit 50 µl Medium als Leerwert pipettiert.

24 Stunden nach Aussaat erfolgte die Behandlung der Zellen mit dem jeweiligen Inhibitor in unterschiedlichen Konzentrationen. Hierbei erfolgten stets Quadruplikate, um mögliche Messfehler zu minimieren.

Im Anschluss wurden die Zellen für vier Stunden mit 50 µl XTT (1 mg/ml) und 0,5 µl PMS (1,25 mM) inkubiert. Mittels iMark-Microplate-Reader (BioRad) wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm und von 650 nm gemessen. Hierbei konnte bei der Wellenlänge von 450 nm der Formazan Farbstoff und bei 650 nm die Hintergrundabsorption der Proben quantifiziert werden.

Anschließend erfolgte die Verrechnung der gemittelten Lösemittel- und Leerwerte eines jeden Probenwertes sowie die Mittelwertbestimmung der Quadruplikate.

Somit wurde die Zellviabilität über einen Zeitraum von 96 Stunden in 24-Stunden-Abständen bestimmt und konnte grafisch dargestellt werden.

2.3.12 Online-Analysen und Software

Zur Darstellung der Interaktionen zwischen Proteinen wurde der STRING-Algorithmus unter Anwendung der Standardeinstellungen benutzt (<https://string-db.org/>) [45]. Mit Hilfe der Datenbank DAVID konnte die Zuordnung von Proteinen zu funktionellen Gruppen erfolgen (<https://davidbioinformatics.nih.gov/>) [46]. Zur Analyse der Daten des *The Cancer Genome Atlas Program* wurde der UCSC Xena Browser (<https://xena.ucsc.edu>) [47] verwendet.

2.3.13 Statistische Auswertung

Mit Hilfe des Online-Tools „Social Sciences Statistics T-Test Calculator for 2 Independent Means“ (<https://www.socscistatistics.com/tests/studentttest/default.aspx>) wurden die statistischen Analysen mittels t-Test durchgeführt. Hierbei wurde der zweiseitige t-Test für die Analyse auf statistisch signifikante Unterschiede verwendet. Als signifikant galt ein p-Wert von $\leq 0,05$, entsprechend einem alpha-Fehler von 5 %. Darüber hinaus wurde bei multiplen Testen der berechnete p-Wert nach Bonferroni ($0,05$ geteilt durch die Anzahl der Tests) korrigiert.

3 Ergebnisse

3.1 Molekulare und genomische Charakterisierung von *ARID1A*

3.1.1 Generierung von *ARID1A*-defizienten KZT-Zelllinien

Um die molekulare Funktion von *ARID1A* in KZT zu entschlüsseln, wurden mittels CRISPR/Cas9-Gen-Editierung *ARID1A*-defiziente Zellen aus den KZT-Zelllinie TCam-2 (SE), 2102EP (EC) und NCCIT (EC) erzeugt. Hierfür wurde ein Pool bestehend aus drei guideRNAs transfiziert, um ein Fragment von 2920 Basenpaaren aus dem *ARID1A*-Genlocus zu entfernen.

Zur Validierung einer erfolgreichen Deletion von *ARID1A* wurden PCR-Analysen mit Primern der guideRNA durchgeführt. Hierbei sollte sich bei einer homozygoten *ARID1A*-Deletion (TCam-2-*ARID1A*^{-/-}) in der Gelelektrophorese ein PCR-Fragment von etwa 201 Basenpaaren ergeben, während der Wildtyp (TCam-2-*ARID1A*^{+/+}) sich als Fragment von 3121 Basenpaaren darstellen sollte (vergleiche Abb. 8). Bei der SE-Zelllinie TCam-2 konnte Lukas Kurz im Rahmen seiner Dissertation durch dieses Verfahren acht TCam-2-*ARID1A*^{-/-} Klone generieren (vergleiche Anhang 1).

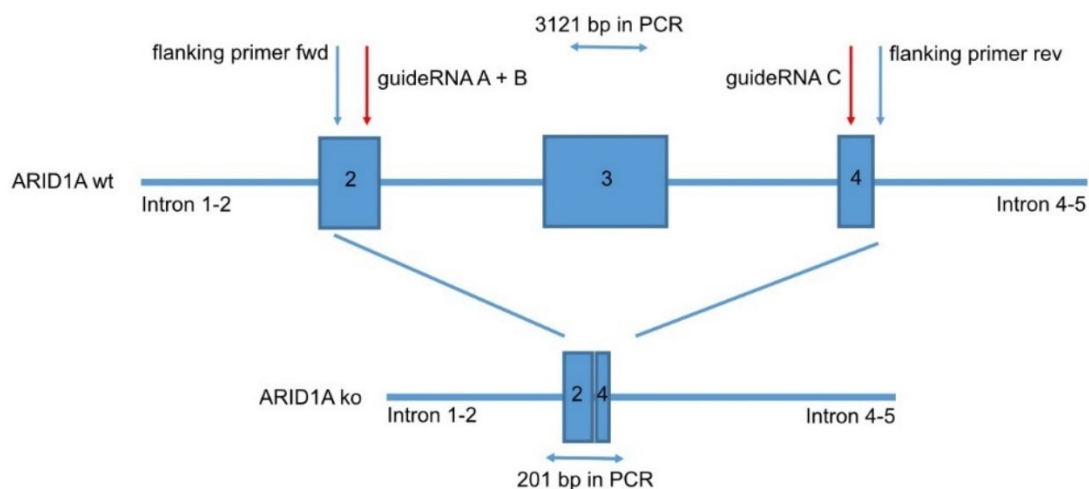


Abb. 8: CRISPR/Cas9-Methode zur Generierung *ARID1A*^{-/-}-KZT. GuideRNA A und B zielen auf gegenüberliegende Stränge des Exon 2 ab, während guideRNA C auf das Exon 4 abzielt (wt = Wildtyp, bp = Basenpaare, fwd = forward, rev = reverse, ko = knock-out). Diese Abbildung wurde von Lukas Kurz im Rahmen seiner medizinischen Dissertation kreiert und wird mit seinem erfolgtem Einverständnis hier veröffentlicht. Zusätzlich wurden die Daten in Kurz et. al, 2020 publiziert [42]

Zur weiteren Verifizierung einer erfolgreichen *ARID1A*-Deletion wurden darüber hinaus im Rahmen der Dissertation von Lukas Kurz qRT-PCR-Analysen sowie Western-Blot-Untersuchungen durchgeführt. Beide Verfahren zeigten, dass die *ARID1A*-Transkription und auch die Proteinproduktion vermindert waren (vergleiche für die Zelllinie TCam-2-*ARID1A*^{-/-} Anhang 2A und 2B).

Dasselbe Verfahren wurde im Rahmen der dieser Dissertation zur Grunde liegenden Studie zur Generierung von *ARID1A*-defizienten KZT aus den EC-Zelllinien 2102EP und NCCIT angewandt. Mittels Gelelektrophorese konnte verifiziert werden, dass die Geneditierung gelungen und *ARID1A*-defiziente KZT im gesamten Pool enthalten waren. Jedoch konnten im weiteren Verlauf lediglich heterozygote 2102EP-*ARID1A*^{+/-} und NCCIT-*ARID1A*^{+/-} als einzelne Klone identifiziert werden (vergleiche Abb. 9). Eine homozygote *ARID1A*-Defizienz konnte in NS, anders als in der SE-Zelllinie TCam-2, somit nicht erzeugt werden.

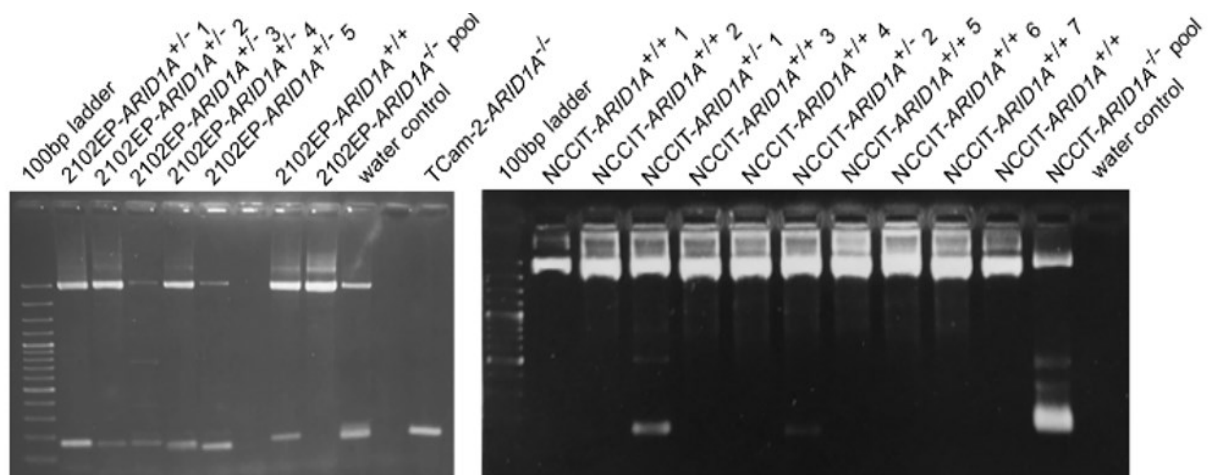


Abb. 9: Gelelektrophorese zur Darstellung der heterozygoten *ARID1A*-defizienten EC-Zelllinien 2102EP (links) und NCCIT (rechts). Veröffentlicht in Kurz et al. [42]

3.1.2 Charakterisierung *ARID1A*-defizienter SE

Im nächsten Schritt wurden vier der acht generierten TCam-2-*ARID1A*^{-/-} im Hinblick auf ihre Morphologie über einen Zeitraum von einer Woche mit der parentalen Zelllinie verglichen. Hierfür wurden die einzelnen TCam-2-*ARID1A*^{-/-}-Klone, sowie die parentalen TCam-2-*ARID1A*^{+/+}-Zellen alle 24 Stunden unter einem Lichtmikroskop untersucht und fotografiert. Es ließ sich beobachten, dass die einzelnen Zellen in ihrer Größe, ihrer Form sowie in ihrem Wachstumsverhalten morphologisch keine Unterschiede aufwiesen und somit keine morphologischen Auffälligkeiten gegenüber der parentalen Zelllinie zeigten (vergleiche Abb. 10).

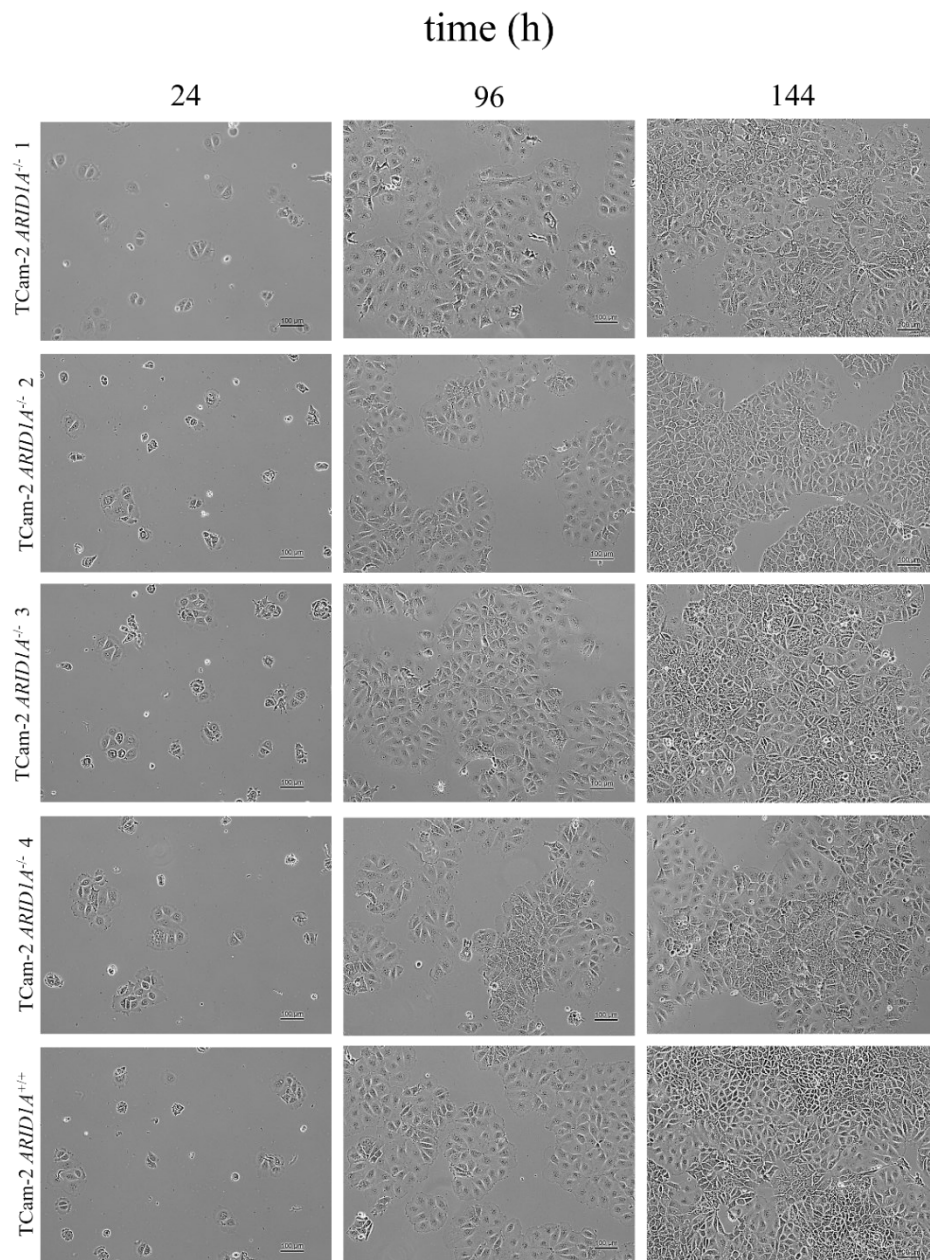


Abb. 10: Zellmorphologie nach 24, 96 und 144 Stunden (time (h)) der einzelnen TCam-2-*ARID1A*^{-/-}-Klone (Klon 1-4) im Vergleich zur parentalen TCam-2-*ARID1A*^{+/+}

Im Folgenden wurde das Wachstumsverhalten durch tägliche Zellzählungen über einen Zeitraum von 168 Stunden dokumentiert. Die *ARID1A*-defizienten SE-Zelllinien wurden hierbei in ihrer Zellzahl gemittelt und mit der parentalen SE-Zelllinie verglichen. Hierbei konnte zwischen den Zeitpunkten 120 Stunden und 168 Stunden eine verminderte Proliferation der TCam-2-*ARID1A*^{-/-} beobachtet werden (vergleiche Abb. 11). Über einen t-Test konnte ein signifikanter Unterschied zu TCam-2-*ARID1A*^{+/+} bestätigt werden (p-Wert bei 120 Stunden < 0,05; p-Wert bei 144 und 168 Stunden < 0,005).

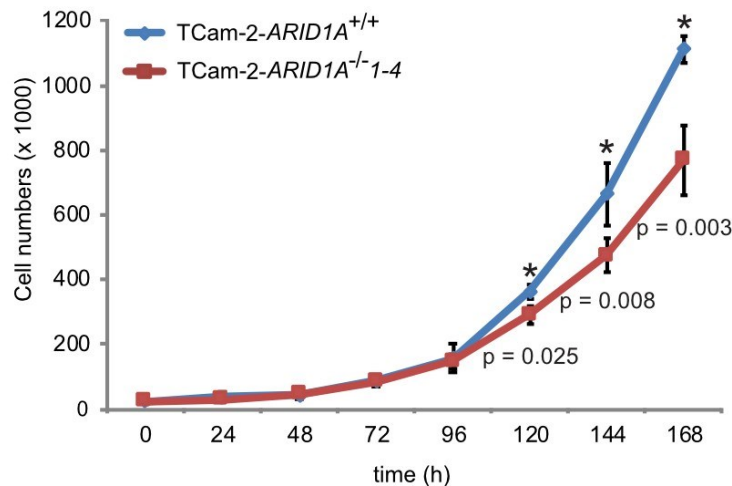


Abb. 11: Wachstumsratenvergleich zwischen TCam-2-*ARID1A*^{+/+} und TCam-2-*ARID1A*^{-/-}. Veröffentlicht in Kurz et al. [42]. p-Werte * < 0,05, ** < 0,005

Darüber hinaus wurde der Zellzyklus in beiden Zelllinien analysiert, um festzustellen, ob und inwiefern sich die *ARID1A*-Defizienz auf diesen auswirkt. Hierfür wurde die Zellverteilung in den einzelnen Zellzyklusphasen mittels Propidiumiodid-basierter Färbung und anschließender Durchflusszytometrie über einen Zeitraum von 48 Stunden untersucht. Hierbei wurden die Ergebnisse der vier TCam-2-*ARID1A*^{-/-}-Zelllinien zum einen einzeln und zum anderen gemittelt mit der parentalen Zelllinie verglichen. Es zeigte sich, dass sich die Verteilung in den einzelnen Zellzyklusphasen ähnlich verhielt: etwa 70 % der TCam-2-*ARID1A*^{-/-}- und TCam-2-*ARID1A*^{+/+}-Zellen befanden sich in der G1/G0-Phase, die ebenfalls als Wachstums- und Ruhephase bezeichnet werden kann [48]. In dieser Phase kommt es zur Proteinsynthese sowie zur Bildung von Histonen und Nichthistonproteinen, die zur DNA-Verpackung dienen [48]. Etwa 20 % der Zellen beider Gruppen befanden sich in der G2/M-Phase. In dieser Phase kommt es zur Reparatur von Replikationsfehlern [48]. 5 bis 10 % der TCam-2-*ARID1A*^{-/-}- und TCam-2-*ARID1A*^{+/+}-Zellen konnten in der Synthese-, bzw. „S“-Phase, bei der es zur DNA-Verdopplung kommt [48], detektiert werden. Zusammenfassend wurden die meisten Zellen, unabhängig vom

ARID1A-Gehalt, in der G1/G0-Phase detektiert. Dabei wurde kein signifikanter Unterschied im Zellzyklusverhalten der untersuchten Zelllinien festgestellt (vergleiche Abb. 12 und 13).

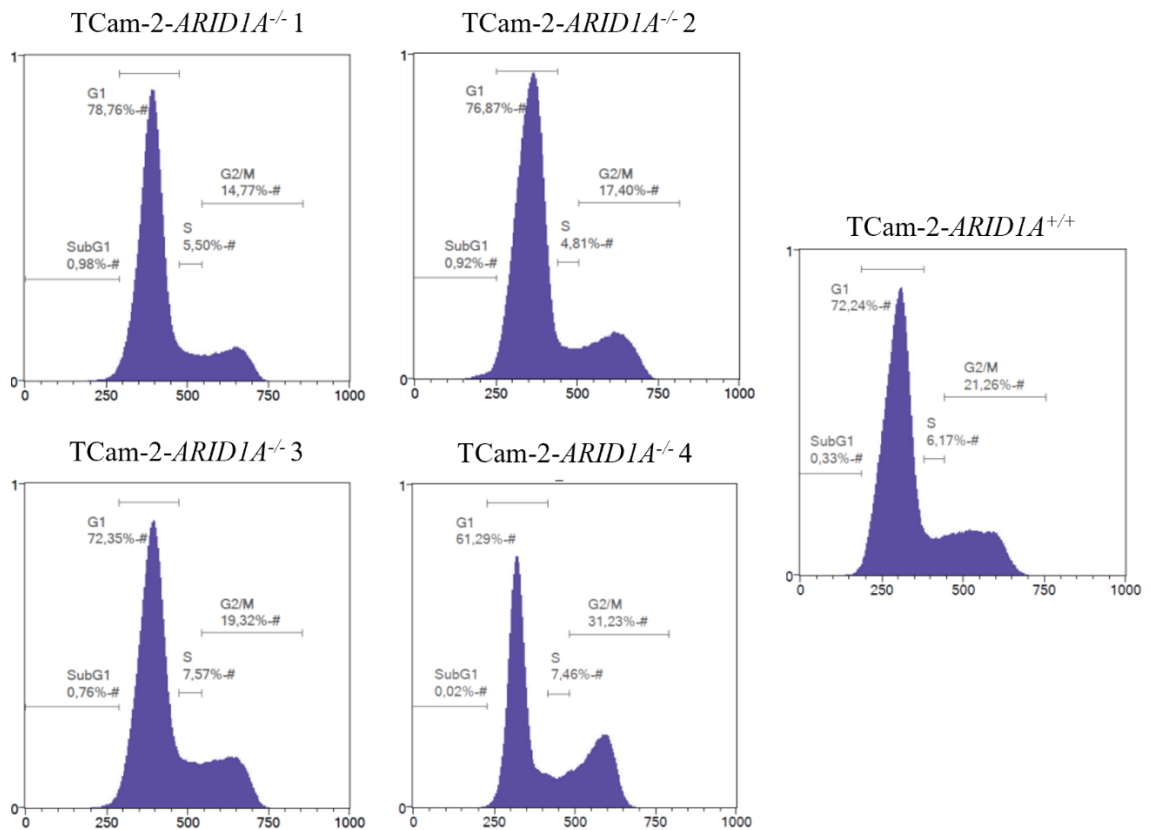


Abb. 12: Zellzyklusphasenvergleich zwischen den einzelnen TCam-2-*ARID1A*^{+/+} und TCam-2-*ARID1A*^{-/-} im Zeitraum von 48 h

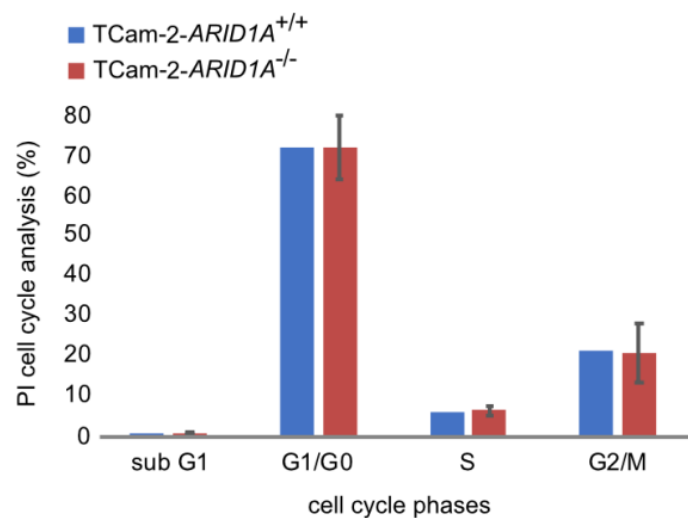


Abb. 13: Zellzyklusphasenvergleich zwischen den gemittelten (n=4) TCam-2-*ARID1A*^{+/+} und TCam-2-*ARID1A*^{-/-} im Zeitraum von 48 h. Veröffentlicht in Kurz et al. [42]

Im nächsten Schritt erfolgte die Charakterisierung auf RNA- und Proteinebene, um zu ermitteln, welche Auswirkungen eine *ARID1A*-Defizienz auf molekularer Ebene aufweist.

Der in Vorarbeiten erprobte siRNA-vermittelte *ARID1A*-Expressionsreduktion zeigte, dass durch die *ARID1A*-Defizienz sowohl die einzelnen Komponenten des SWI/SNF-Komplexes als auch Stress- und Apoptosefaktoren herunterreguliert wurden [28]. Dieser Effekt sollte im Folgenden bei den durch CRISPR/Cas9-Gen-Editierung erschaffenen *ARID1A*-defiziente Zellen geprüft werden.

Zunächst wurde die Genexpression der Bestandteile des SWI/SNF-Komplexes und verschiedener Zellzyklusregulatoren, Tumorsuppressoren und Stressfaktoren in den Zelllinien TCam-2-*ARID1A*^{+/+} und TCam-2-*ARID1A*^{-/-} mittels qRT-PCR analysiert. Hierbei wurde die Abweichung der Genexpression in TCam-2-*ARID1A*^{-/-} ins Verhältnis zu der Genexpression in der parentalen Zelllinie gesetzt. Zum Analysepanel gehörten unter anderem die SWI/SNF-Komplex-Untereinheiten *ARID1A*, *ARID1B*, *SMARCA4* und *SMARCB1* [28]. Diese zeigten sich im Vergleich zur parentalen Zelllinie herunterreguliert, was erneut die *ARID1A*-Defizienz in den Zelllinien TCam-2-*ARID1A*^{-/-} bestätigte (vergleiche Dissertation „Der Verlust oder die pharmakologische Inhibition von ARID1A sensitiviert Keimzelltumorzellen für die Behandlung mit ATR-Inhibitoren“ von Lukas Kurz). Das Tumorsuppressorgen *ZMYND11*, das ebenfalls an der Histonmodifizierung beteiligt ist und bereits in Vorstudien durch Romidepsin herunterreguliert wurde [28], zeigte beim Verlust von *ARID1A* im Vergleich zur parentalen TCam-2-*ARID1A*^{+/+} ebenfalls leicht verminderte Expressionslevel. Die Stressfaktoren *GADD45B*, *DUSP1*, *ATF3* sowie Zellzyklusregulatoren *ID2* und *FOS*, die in einer Vorstudie in der SE-Zelllinie TCam-2 nach siRNA-vermittelten *ARID1A*-knockdown hochreguliert wurden [28], zeigten keine signifikante Expressionserhöhung in *ARID1A*-defizienten SE im Vergleich zur parentalen Zelllinie. Der Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitor *CDKN1A/ p21*, der unter anderem an der Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin-basierten Chemotherapien in EC beteiligt sein soll [49], zeigte gegenüber der parentalen Zelllinie keine Expressionsveränderung. Dagegen zeigte sich eine leicht verminderte Expression des Tumorsuppressorgens *TP53*. Somit deckt sich dieses Ergebnis mit den Erkenntnissen aus Vorstudien, die zeigten, dass *TP53* nach Behandlung mit Romidepsin herunterreguliert wird [28]. Das SE-assoziierte Gen *SOX17* sowie die Pluripotenzfaktoren *NANOG* und *OCT3/4*, die ebenfalls in Vorarbeiten nach Romidepsingabe verminderte Expressionslevel aufwiesen [28], zeigten sich im Vergleich zur parentalen Zelllinie nicht signifikant verändert (vergleiche Abb. 14).

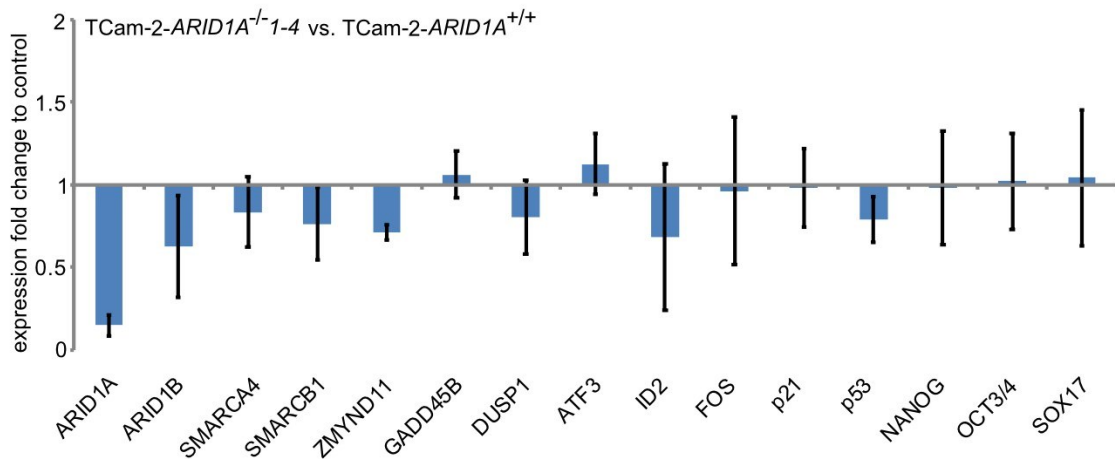


Abb. 14: Genexpression der Bestandteile des SWI/SNF-Komplexes und verschiedener Zellzyklusregulatoren, Tumorsuppressoren und Stressfaktoren in den gemittelten TCam-2-*ARID1A*^{-/-} im Vergleich zu TCam-2-*ARID1A*^{+/+}, gegen *GAPDH* als Housekeeper normalisiert

Um die molekulare Funktion von *ARID1A* in KZT weiter aufzuschlüsseln, wurde eine Massenspektrometrie-Analyse durchgeführt, bei der die Charakterisierung auf Proteinebene erfolgte. Hierfür wurden die Proteine der vier TCam-2-*ARID1A*^{-/-}, sowie der parental Zelllinie TCam-2-*ARID1A*^{+/+} aus gefrorenen Zellpellets extrahiert und für die weitere Analyse vorbereitet. Erneut wurde bei der Analyse die Proteinexpression in allen TCam-2-*ARID1A*^{-/-} gemittelt und die Abweichung ins Verhältnis zu der Proteinexpression in der parental Zelllinie gesetzt. Es konnten 24 Proteine detektiert werden, die im Vergleich zur parental Zelllinie bei *ARID1A* - Defizienz (p-Wert < 0,5) hochreguliert sind. Dagegen kam es bei 42 Proteinen zur Herunterregulierung (vergleiche Abb. 15). Hierbei konnten unter anderem das *DNA-Methyltransferase 1-assoziiertes Protein (DMP)* und die *DNA-Polymerase Epsilon (POLE)* identifiziert werden. Beide Proteine sind an der DNA-Replikation [50], der Transkriptionsregulation und an der Chromatinorganisation beteiligt [51, 52].

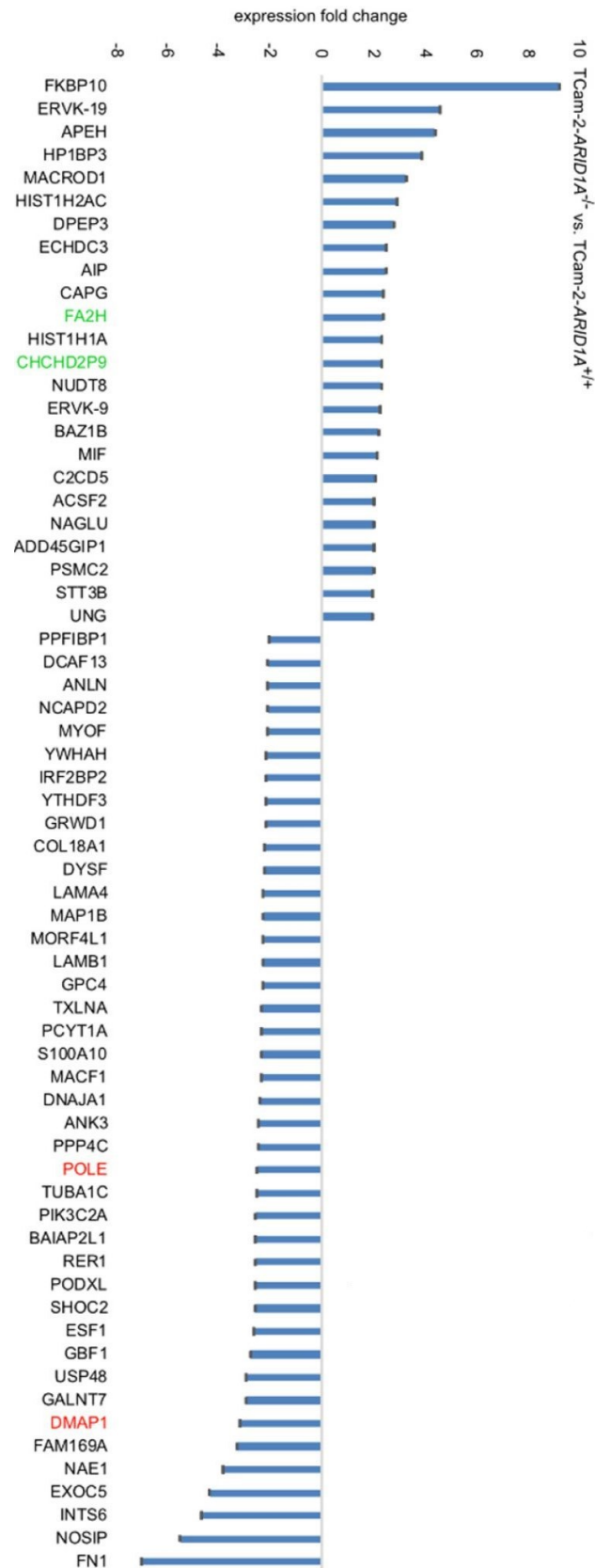


Abb. 15: Ergebnisse der Massenspektrometrie: Übersicht der Proteine, die durch *ARID1A*-Defizienz hoch- oder runterreguliert wurden. Bei *ARID1A*-Defizienz Hochregulierung von 24 Proteinen sowie Herunterregulierung von 42 Proteinen, u.a. von *DNA-Methyltransferase 1-assoziiertes Protein (DMAP)* und *DNA-Polymerase Epsilon (POLE)*. Veröffentlicht in Kurz et al. [42]

3.2 Effekt einer *ARID1A*-Defizienz auf die Therapie mit Romidepsin

Vorarbeiten zeigten, dass *ARID1A* als Schlüsselfaktor der Romidepsin-Wirkkaskade eine potenzielle Therapieoption zur Behandlung von KZT darstellen könnte, da es in KZT zur Apoptose und Zellzyklusarrest führt [28]. Zuvor konnte nachgewiesen werden, dass Romidepsin in Konzentrationen von > 2 nM zum Zelltod in KZT führt [28], sodass nun geprüft werden sollte, ob die Effektivität von Romidepsin-Applikation durch eine *ARID1A*-Defizienz gesteigert werden könnte. Hierfür wurde die *ARID1A*-defiziente SE-Zelllinie TCam-2 einmalig mit Romidepsin behandelt und über einen Zeitraum von 96 Stunden untersucht. Hierbei wurden die Dosierungen 0,5 nM, 1 nM, 1,5 nM, 2 nM und 5 nM Romidepsin evaluiert. Zum Vergleich wurde die parentale Zelllinie nach dem gleichen Schema behandelt. Zur Validierung wurde die relative Zellviabilität alle 24 Stunden mittels XTT-Analysen durchgeführt. Die Ergebnisse der einzelnen TCam-2-*ARID1A*^{-/-} wurden zur Analyse erneut gemittelt und mit der Zellviabilität der parentalen Zelllinie verglichen.

Bei der Behandlung mit 0,5 nM Romidepsin konnte beim Zeitpunkt von 96 Stunden ein signifikanter Unterschied (p-Wert = 0,0002) zwischen den zu vergleichenden Zelllinien festgestellt werden. Hierbei fiel die relative Zellviabilität der TCam-2-*ARID1A*^{-/-} um 25 % höher als die relative Zellviabilität der parentalen Zelllinie ab (vergleiche Abb. 16 A).

Die Behandlung mit 1 nM Romidepsin zeigte nach 72 Stunden (p-Wert = 0,00002) und nach 96 Stunden (p-Wert = 0,000003) einen signifikanten Unterschied der Zellviabilität zwischen TCam-2-*ARID1A*^{-/-} und TCam-2-*ARID1A*^{+/+}. Nach 72 Stunden sank die Zellviabilität der *ARID1A*-defizienten Klone im Vergleich zu den parentalen Zellen um 20 % stärker ab. Nach 96 Stunden betrug die Differenz in der relativen Zellviabilität zwischen den TCam-2-*ARID1A*^{-/-}-Klonen und der parentalen TCam-2-*ARID1A*^{+/+} 37 % (vergleiche Abb. 16 B).

Nach der Behandlung mit 1,5 nM Romidepsin konnten bereits nach 48 Stunden signifikante Unterschiede in der relativen Zellviabilitätsmessung festgestellt werden. Nach 48 Stunden betrug die Differenz der relativen Zellviabilität zwischen den zu vergleichenden Zelllinien 17 %, nach 72 Stunden 16 % und nach 96 Stunden 12 %. Somit konnte nach 48 Stunden (p-Wert = 0,0016), nach 72 Stunden (p-Wert = 0,00005) als auch nach 96 Stunden (p-Wert = 0,0001) ein signifikanter Unterschied zwischen TCam-2-*ARID1A*^{-/-}-Klonen und TCam-2-*ARID1A*^{+/+} gemessen werden (vergleiche Abb. 16 C).

In höheren Konzentrationen kam es sowohl bei der parentalen Zelllinie als auch bei den TCam-2-*ARID1A*^{-/-}-Klonen zu einer Minderung der Zellviabilität (vergleiche Abb. 16 D, E).

Zusammenfassend zeigten die XTT-Analysen, dass nach der Behandlung mit Romidepsin in den Konzentrationen 0,5 nM, 1 nM und 1,5 nM in TCam-2-*ARID1A*^{-/-}-Klonen einen signifikant stärkeren Abfall der Zellviabilität im Vergleich zu der parentalen Zelllinie aufwiesen.

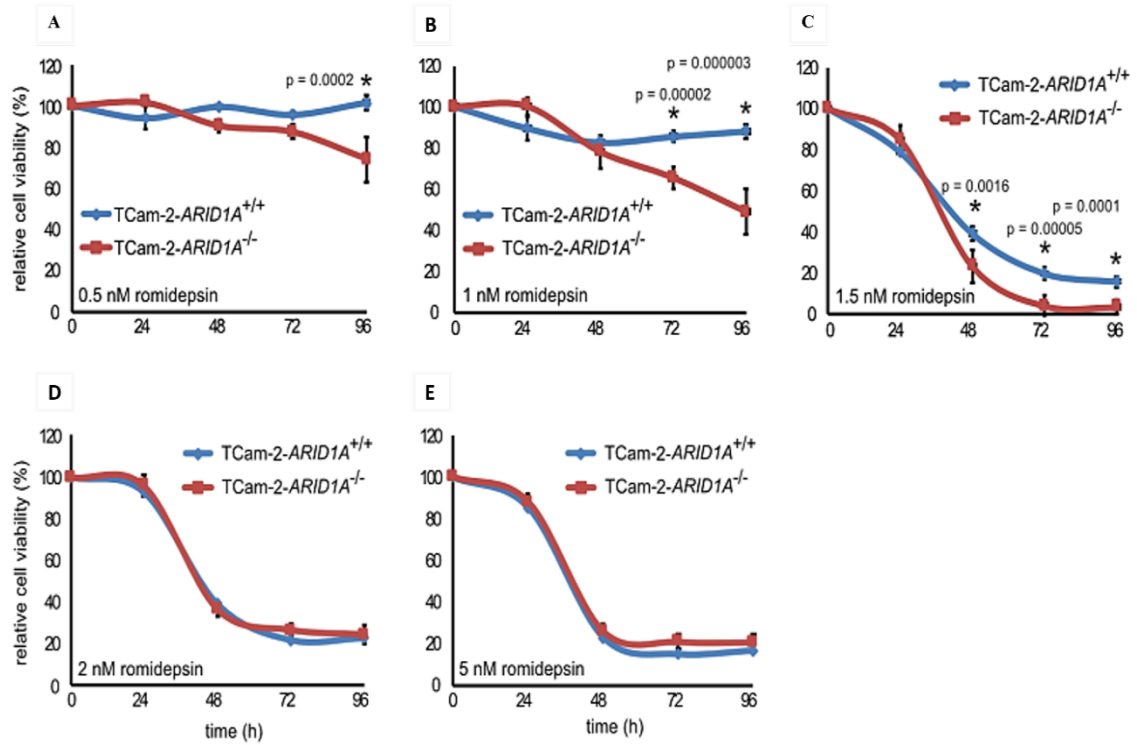


Abb. 16: Zellviabilitätsmessungen über einen Zeitraum von 96 Stunden von den gemittelten (n=4) TCam-2-*ARID1A*^{-/-}-Klonen und TCam-2-*ARID1A*^{+/+} nach einmaliger Behandlung mit 0,5 nM (A), 1 nM (B), 1,5 nM (C), 2 nM (D) und 5 nM (E) Romidepsin

3.3 Effekt einer pharmakologischen Inhibition von *ARID1A* auf die Therapie mit Romidepsin

Im nächsten Schritt sollte geprüft werden, ob der Effekt einer mittels CRISPR/Cas9-Gen-Editierung geschaffenen *ARID1A*-Defizienz pharmakologisch nachgeahmt werden könnte. Hierfür wurden zunächst die beiden SWI/SNF-Komplex-Inhibitoren ACBI1 und Compound 63 auf ihre Wirksamkeit getestet.

Die alleinige Behandlung der TCam-2 Zelllinie mit 2 nM Romidepsin führte im Vergleich zur Kombinationsbehandlung 2 nM Romidepsin mit 5 μ M ACBIA zu einer stärkeren Absenkung der Zellviabilität, sodass kein Vorteil aus der Doppelbehandlung mit ACBIA nachgewiesen werden konnte (vergleiche Abb. 17 A).

Bei der Behandlung der TCam-2 Zelllinie mit 2 nM Romidepsin und 5 μ M C63 fiel die relative Zellviabilität nach 24 Stunden stärker ab als während der alleinigen Behandlung mit 2 nM Romidepsin (vergleiche Abb. 17 B). Somit konnte zu diesem Zeitpunkt ein Vorteil der Doppelbehandlung nachgewiesen werden, sodass C63 als vielversprechender ARID1A-Inhibitor für weitere Analysen herangezogen wurde.

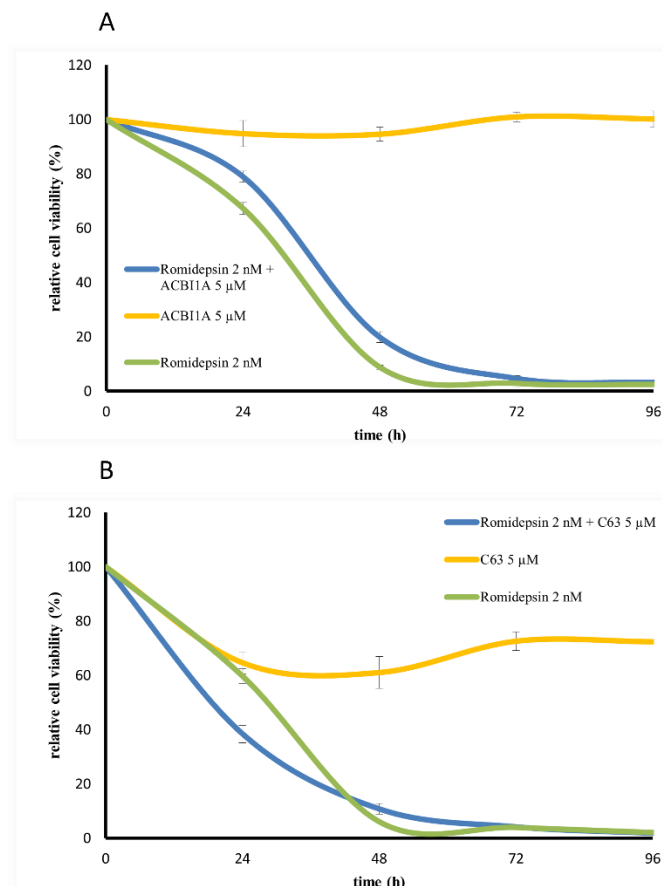


Abb. 17: Relative Zellviabilitätsmessung mittels XTT-Analyse bei der Behandlung von TCam-2 Zellen mit 2 nM Romidepsin und 5 μ M ACBI1A (A) bzw. C63 (B)

Als nächstes wurde der Fragestellung nachgegangen, welche Dosis-Kombination von Romidepsin und C63 zu optimalen Ergebnissen führen könnte. Hierfür wurde die TCam-2-Zelllinie mit Romidepsin in den Dosen von 0,5 nM, 1 nM, 1,5 nM und 2 nM in der Kombination mit 2,5 μ M C63 behandelt. Bei der Behandlung der SE-Zelllinie TCam-2 mit 0,5 nM Romidepsin und 2,5 μ M C63 fiel die relative Zellviabilität im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit 0,5 nM Romidepsin erst nach 48 Stunden stärker ab. In den ersten 24 Stunden ergab die Doppelbehandlung somit keinen Vorteil gegenüber der Einzelbehandlung (vergleiche Abb. 18 A). Ähnlich verhielt es sich bei der Behandlung der TCam-2-Zellen mit 1,5 nM Romidepsin und 2,5 μ M C63. Hier sank die relative Zellviabilität bei der alleinigen Behandlung mit Romidepsin in den ersten 24 Stunden stärker ab, anschließend fielen beide Zellviabilitätskurven gleichermaßen ab (vergleiche Abb. 18 C). Dagegen zeigte die Behandlung mit 1 nM Romidepsin und 2,5 μ M C63 im Verlauf der 96 Stunden einen stärkeren Abfall der relativen Zellviabilität der TCam-2-Zellen im Vergleich zur Einzelbehandlung mit Romidepsin (vergleiche Abb. 18 B). Bei der Kombination aus 2 nM Romidepsin und 2,5 μ M C63 sank die relative Zellviabilität der TCam-2-Zellen in den ersten 24 Stunden minimal stärker im Vergleich zur alleinigen Romidepsinbehandlung. Nach 48 Stunden fielen beide Zellviabilitätskurven gleichermaßen ab (vergleiche Abb. 18 D).

Zusammenfassend kann man lediglich bei der Kombination aus 1 nM Romidepsin und 2,5 μ M C63 einen Vorteil gegenüber einer alleinigen Behandlung mit 1 nM Romidepsin feststellen.

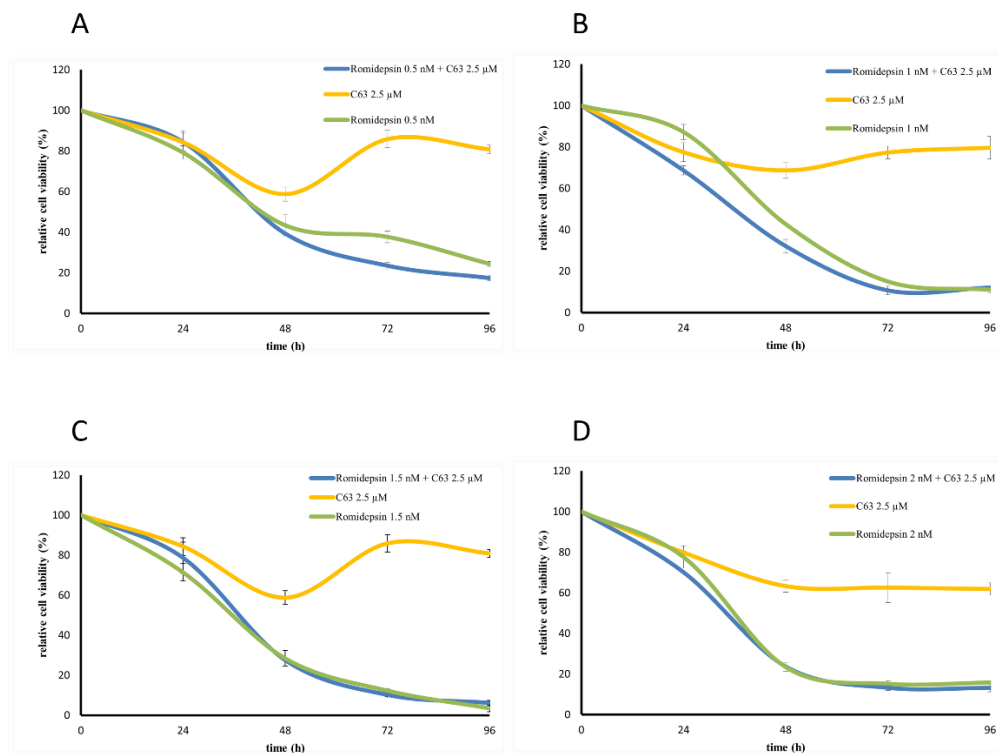


Abb. 18: Relative Zellviabilitätsmessung mittels XTT-Analyse bei der Behandlung von TCam-2 Zellen mit 2,5 μ M C63 in Kombination mit 0,5 nM (A), 1 nM (B), 1,5 nM (C) und 2 nM (D) Romidepsin

4 Diskussion

Die Entstehung des KZT, der die häufigste Tumorentität des jungen Mannes bildet, wird unter anderem durch epigenetische Veränderungen erklärt [14, 22]. Hierbei spielt die Modifikation von Histonen während der Karzinogenese eine bedeutende Rolle [22]. Bereits in Vorstudien konnte nachgewiesen werden, dass Inhibitoren der HDACs, wie beispielsweise Romidepsin, in KZT zytotoxische Effekte entfalten und sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zum Zellzyklusarrest und Zelltod führen [28]. Zudem zeigte sich, dass *ARID1A* als Schlüsselfaktor zur Hochregulation von Stress- und Apoptosefaktoren führt [28].

Im Rahmen dieser Dissertation zugrunde liegenden Studie wurde das Ziel verfolgt, die molekularbiologische Funktion von *ARID1A* zu entschlüsseln, in dem die Effekte einer *ARID1A*-Defizienz sowie einer *ARID1A*-Inhibition in KZT geprüft wurden. Zudem wurde das therapeutische Potenzial einer pharmakologischen *ARID1A*-Inhibition in KZT, unter anderem in Kombination mit einer HDAC-Inhibition, geprüft.

4.1 Homozygote *ARID1A*-Defizienz nur in Seminomen möglich

Bei der Generierung von *ARID1A*-defizienten KZT-Zelllinien durch die CRISPR/Cas9-Geneditierung war es lediglich möglich aus der SE-Zelllinie homozygote *ARID1A*-defiziente Klone zu generieren. Bei dem Versuch der Generierung von *ARID1A*-defizienten KZT aus den EC-Zelllinien 2102EP und NCCIT zeigte die Gelelektrophorese zwar, dass die Geneditierung gelang und *ARID1A*-defiziente KZT generiert werden konnten, jedoch war es im weiteren Verlauf lediglich möglich, heterozygote Klone hervorzubringen. Dies führte zur Frage, weshalb gewisse Tumorentitäten eine homozygote Gen-Defizienz tolerieren und andere wiederum nicht. Hierbei spielen Anpassungsmechanismen der Tumorzelle sowie die Funktion des defizienten Gens eine Rolle in der Frage der Überlebensfähigkeit. So sind beispielsweise Mechanismen wie die der genetischen Redundanz bekannt, die das Überleben der Zelle trotz Defizienz eines bestimmten Gens ermöglichen. Hierbei kommt es im Falle einer Genmutation zu einem Kompensationsmechanismus, der die Expression von Genen mit homologen Sequenzen anregt und somit dafür sorgt, dass die Funktion des mutierten oder fehlenden Gens ersetzt wird [53]. In weiteren Studien konnte beispielsweise gezeigt werden, dass im Falle einer *ARID1A*-Mutation in Tumorzellen kompensatorisch *ARID1B* essenziell zu sein scheint [54]. Hierfür wurden Daten aus dem Projekt Achilles untersucht. Dieses beschäftigt sich mit der Identifizierung essenzieller Gene in Krebszelllinien [55]. Hierbei zeigte sich, dass *ARID1B* in *ARID1A*-mutierten und -supprimierten Tumorzellen vermehrt exprimiert und insbesondere für das Zellwachstum benötigt wurde. In weiterführenden Versuchen führte dann ein *ARID1B*-Knockdown zur Destabilisierung des SWI/SNF-Komplexes, sodass folgend eine verminderte

Zellproliferation beobachtet werden konnte [54]. Dieses Erkenntnis führte zu der Annahme, dass *ARID1B* in *ARID1A*-mutierten Tumorzellen ein therapeutischer Ansatzpunkt sein könnte [54].

Darüber hinaus spielt es eine entscheidende Rolle, ob das defiziente Gen essenziell oder nicht-essenziell für das Überleben dieser spezifischen Tumorzelle ist. Somit ist ein möglicher Erklärungsansatz, dass EC-Zellen nicht in der Lage sind, eine *ARID1A*-vermittelte Deregulierung zu kompensieren. Die damit verbundenen Konsequenzen auf Ebene der Transkriptionsregulation, Zelladhäsion und DNA-Reparatur können ohne *ARID1A* nicht ausgeglichen werden, sodass ein Überleben der Zelle ohne *ARID1A* nicht möglich ist. Sie benötigen hierfür mindestens 50% der normalen *ARID1A*-Expression.

4.2 Entschlüsselung der molekularbiologischen Eigenschaften von *ARID1A*

Ziel dieser Arbeit zugrunde liegenden Studie war es, die molekularbiologischen Eigenschaften und daraus resultierend, die molekularbiologische Rolle von *ARID1A* zu erforschen. Die Grundlage hierfür war eine Vorstudie, die *ARID1A* als Schlüsselfaktor der Wirkungskaskade des HDAC-Inhibitors Romidepsin identifizierte. Durch die Herunterregulation der *ARID1A*-Expression kam es zu einer Stressinduktion sowie zu einem Zellzyklusarrest und einer Apoptose [28]. Dabei zeigte sich, dass hinsichtlich der Morphologie und des Zellzyklus keine signifikanten Unterschiede zwischen *ARID1A*-defizienten TCam-2-Zellen und der parenteralen Zelllinie feststellbar waren. Lediglich die Proliferationsrate zeigte sich bei einem *ARID1A*-Verlust verlangsamt. Dies führte zur Annahme, dass *ARID1A* eine bedeutende Rolle in der Zellproliferation einnimmt. Bei der Untersuchung der molekularbiologischen Rolle von *ARID1A* in KZT zeigte sich, dass die Schlüsselfunktionen in der Transkriptionsregulation, Zelladhäsion und DNA-Reparatur lagen. Auf RNA-Ebene konnte bei *ARID1A*-Defizienz eine Herunterregulierung der am SWI/SNF-Komplex beteiligten Gene (*ARID1A*, *ARID1B*, *SMARCA4*, *SMARCB1*) beobachtet werden. Dies spiegelt ebenfalls die Rolle von *ARID1A* als Teil des SWI/SNF-Komplex wider. Vorstudien zu der Wirkungsweise von Romidepsin zeigten, dass es durch die Herunterregulierung von *ARID1A* kurzfristig zur Hochregulierung der Stress- und Apoptosefaktoren *GADD45B*, *DUSP1* und *CDKN1A* kommt [28]. Im Unterschied zur Vorstudie zeigte sich in *ARID1A*-defizienten TCam-2-Zellen keine signifikante Veränderung dieser Stressfaktoren. Dies könnte einen gewissen Anpassungsprozess der SE-Zellen widerspiegeln, die langfristig Mechanismen entwickeln, um die *ARID1A*-Defizienz auszugleichen. In der Massenspektrometrie-Analyse zeigte sich, dass durch die Herunterregulation von *ARID1A*, im Rahmen der CRISPR/Cas9-Gen-Editierung oder durch die pharmakologische Inhibition mittels C63, die Proteine DNA-Polymerase Epsilon (POLE) und DMAP1 ebenfalls herunterreguliert wurden (vergleiche Abb. 18). Beide Proteine spielen eine signifikante Rolle sowohl in der Aktivierung / Inaktivierung der Transkription als auch in der

Chromatinorganisation. Das DMAP1 ist mit der N-terminalen Domäne von DNMT1 assoziiert und fungiert durch seine Interaktion mit Histon-Deacetylasen als Transkriptionskorepressor. DNMT1 ist wiederum für die Zellproliferation durch die Aufrechterhaltung von DNA-Methylierungsmustern verantwortlich sowie an der Herunterregulation von Tumorsuppressorgenen in menschlichen Krebszellen beteiligt. Daraus lässt sich schließend, dass DNMT1 an der Tumorgenese verschiedener Krebsarten mitwirkt [56]. DMAP1 ist zudem Teil des TIP60-p400-Histon-Acetyltransferase-Komplexes, der mittels Histonacetylierung die Chromatinrelaxation beeinflusst und für den Erhalt der Pluripotenz von embryonalen Stammzellen mitverantwortlich ist [52, 57]. Das Tat-aktive-Protein-60kDa (TIP60) ist wiederum bei der Reparatur von DNA-Schäden und bei der Kontrolle des Zellzyklus, der Checkpoints und der Apoptose involviert. Zudem wird es bei DNA-Doppelstrandbrüchen an DNA-Läsionen rekrutiert und ist sowohl an Anfangs- und Endphasen beteiligt [58]. Somit ist DMAP1 als Transkriptionskorepressor von DNMT1, als auch als Teil des TIP60-p400-Histon-Acetyltransferase-Komplexes in der Gestaltung der epigenetischen Landschaft auf DNA- und Histon-Ebene involviert. Die Polymerase Epsilon (POLE), als Teil der DNA-Polymerase-B-Familie, besitzt eine Polymerase-, sowie eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität. Dies bedeutet, dass POLE Synthesereaktionen katalysiert, Replikationsfehler der DNA erkennt und im Falle einer Fehlpaarung das „falsche“ Nukleotid durch das „Richtige“ ersetzen kann. Auch beim Vorliegen von DNA-Doppelstrangbrüchen erfolgt durch POLE die DNA-Reparatur [59]. Da durch die Herunterregulation von ARID1A es ebenfalls zu einer verminderten Proteinmenge von DMAP1 und POLE kam, leitet sich die Hypothese ab, dass *ARID1A* seine molekulare Funktion mit Hilfe der Enzyme POLE und DMAP1 entfaltet, so beispielsweise in der Transkriptionsregulation, DNA-Reparatur und -Methylierung, als auch bei der Histon-Modifikation und Aufrechterhaltung der Pluripotenz (vergleiche Abb. 18). Kommt es also auf Grund einer pharmakologischen Inhibition von ARID1A zur Herunterregulation von POLE und DMAP, können die o. g. molekularen Funktionen nicht bzw. nur vermindert ausgeführt werden, was folglich zum Zellzyklus-Arrest und Apoptose führt (vergleiche Abb. 18).

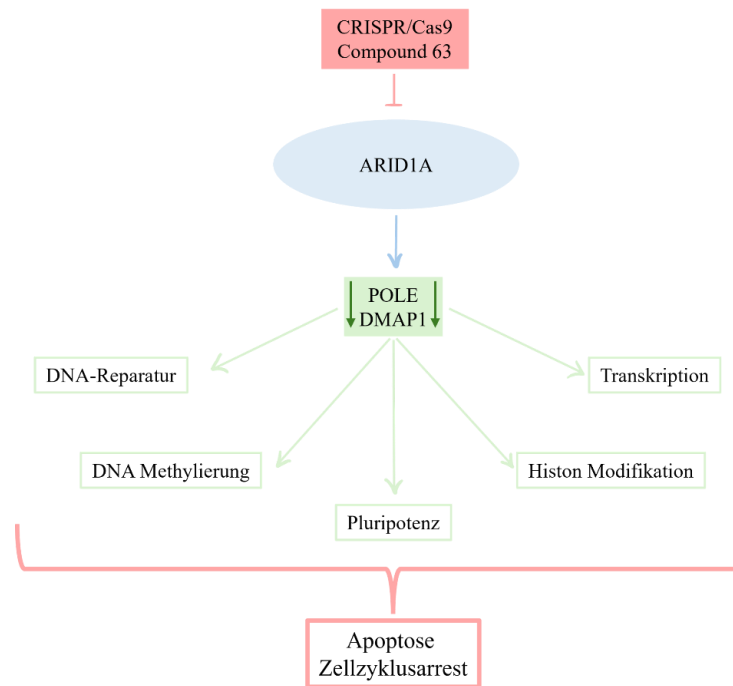


Abb. 19: Eine *ARID1A*-Defizienz durch CRISPR/Cas9 bzw. *ARID1A*-Inhibition durch Compound 63 führt über die Verminderung der Proteinmenge von POLE und DMAP1 zur Apoptose und zum Zellzyklusarrest. Modifiziert nach Kurz et al., 2020

Die Proteine, die bei einer *ARID1A*-Defizienz hochreguliert waren, konnten durch eine „Gene-Ontology“-Analyse in Verbindung zu „Acetylierung“, „Chromosom“ und „DNA- / Nukleotid-/ Nukleinsäure- / Metall- / ATP- / Protein-Bindung“ gebracht werden (vergleiche Abb. 19). Dies legt die Hypothese nah, dass durch *ARID1A* jene oben genannten molekularen Eigenschaften in TCam-2 reprimiert werden.

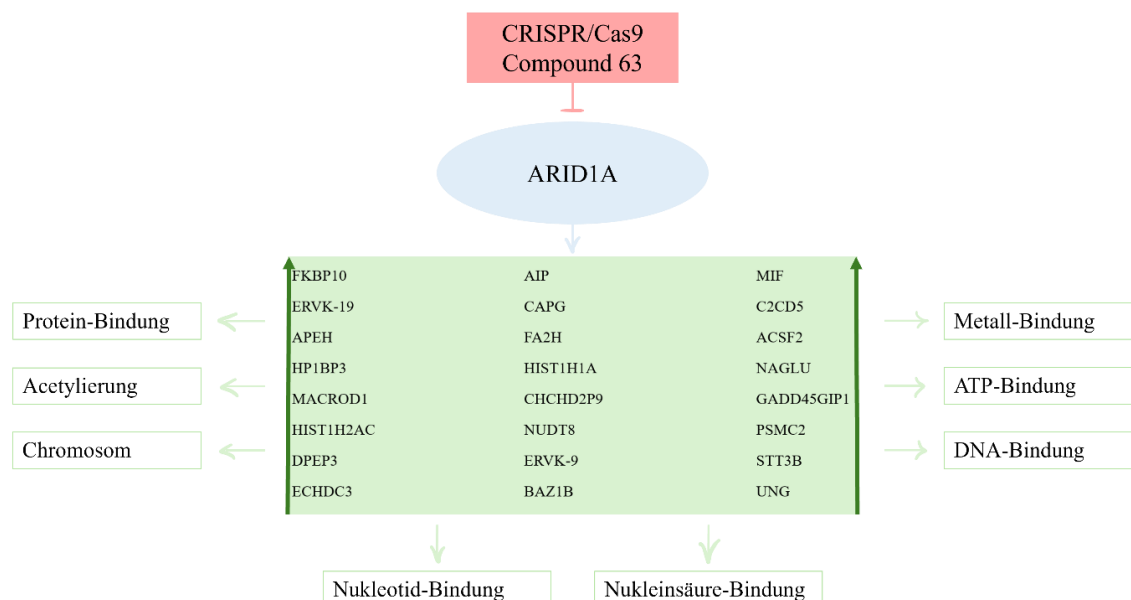


Abb. 20: *ARID1A*-Defizienz durch CRISPR/Cas9 bzw. *ARID1A*-Inhibition durch Compound 63 führt zur Hochregulierung bestimmter Proteine, die in Verbindung zur „Protein-Bindung“, „Acetylierung“, „Chromosom“, „Metall-Bindung“, „ATP-Bindung“ und „DNA-Bindung“ stehen

4.3 *ARID1A* als therapeutisches Ziel in der Behandlung der KZT

ARID1A sollte als therapeutisches Ziel in der Behandlung der KZT geprüft werden. Bereits für andere Krebsarten konnte gezeigt werden, dass ein mutationsbedingter Verlust der *ARID1A*-Funktion die Tumorzellen für eine Therapie mit EZH2-, PARP-, ATR-, HSP90- und HDAC9-Inhibitoren sensitivierte [60, 61]. Da eine *ARID1A*-Mutation in KZT sehr selten auftritt, lässt sich vermuten, dass eine Romidepsin-induzierte Herunterregulierung von *ARID1A*, eine CRISPR/Cas9-generierte *ARID1A*-Defizienz oder aber auch eine pharmakologische Inhibition von *ARID1A* (zum Beispiel durch C63) einen ähnlichen Effekt generieren könnte und die KZT-Zellen gegenüber den o. g. Inhibitoren sensitiviert. In der dieser Arbeit zugrunde liegenden Studie konnte die Effektivität der pharmakologischen Inhibition von *ARID1A* durch C63 in Kombination mit Romidepsin nachgewiesen werden.

Es zeigte sich, dass bei der Behandlung der Seminom-Zelllinie TCam-2 mit 1 nM Romidepsin in Kombination mit 2,5 µM C63 die relative Zellviabilität im Verlauf von 96 Stunden stärker abfiel als durch die alleinige Behandlung mit 1 nM Romidepsin.

Somit könnte die Kombination aus *ARID1A*-Inhibitoren und HDAC-Inhibitoren der 1. Klasse (so beispielsweise Romidepsin) einen potenziellen therapeutischen Nutzen in *ARID1A*-unmutierten KZT erbringen.

In der weiterführenden Studie konnte zudem gezeigt werden, dass eine Kombination aus pharmakologischen *ARID1A*-Inhibitoren, so beispielsweise C63, und ATR-Inhibitoren (VE-822) ebenfalls einen additiven Effekt aufwies und somit eine therapeutische Option im Rahmen der Behandlung von KZT darstellen könnte [41].

Auch in anderen Tumorentitäten gewinnt *ARID1A* als therapeutisches Angriffsziel zunehmend an Bedeutung, insbesondere in der Kombination mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren (ICI).

ICI nehmen im Laufe der letzten Jahre zunehmend an Bedeutung in der Behandlung solider Tumore zu.

Hierbei sind die Immun-Checkpoints Moleküle, die sich in der Mikroumgebung des Tumors befinden und für die Regulierung der T-Zell-Funktion verantwortlich sind. Hierzu gehören beispielsweise der „programmierte Zelltod-1“ (PD-1) / „programmierte Zelltod-Ligand-1“ (PD-L1) und das „zytotoxisches T-Lymphozyten-Antigen-4“ (CTLA-4) [62, 63].

ICIs sind monoklonale Antikörper, die gezielt hemmende Signalwege in T-Zellen blockieren, sodass hierdurch eine verstärkte, T-Zell-gerichtete, Immunantwort auf Tumorzellen aktiviert wird.

Es konnte gezeigt werden, dass *ARID1A*-defiziente Ovarialkarzinom-Zelllinien im Rahmen einer immuntherapeutischen Behandlung ein besseres Gesamtüberleben als die *ARID1A*-Wildtyp-Ovarialtumoren aufwiesen [64]. Dies wurde insbesondere darauf zurückgeführt, dass

ARID1A unter anderem mit dem Mismatch-Repair-Protein MSH2 interagiert [64]. Somit kommt es bei Inaktivierung von *ARID1A* zu erhöhter Mutationslast und Zunahme der Mikrosatelliteninstabilität, und somit auch zu erhöhter Sensibilität gegenüber einer, beispielsweise PDL1-gerichteten, Immuntherapie [64].

Auch in tripple-negativen Mammakarzinomen (TNBC) konnte bereits nachgewiesen werden, dass eine *ARID1A*-Defizienz zur besseren Ansprechrate auf ICIs führte. Hierbei führte eine verminderte *ARID1A*-Expression zu einer immunsuppressiven Mikroumgebung und PD-L1-Hochregulierung [65]. In weiterführenden Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass Patienten mit TNBC mit verminderter *ARID1A*-Expression stärker von einer PDL1-gerichteten Therapie profitierten als Patienten mit hohem *ARID1A*-Gehalt [65].

Anders verhält es sich bei einer Behandlung von TNBC mit Paclitaxel-basierter Chemotherapie. Es konnte nachgewiesen werden, dass in Paclitaxel-sensitiven TNBC-Zellen *ARID1A* hochreguliert war. Umgekehrt korrelierte bei TNBC eine *ARID1A*-Herunterregulierung mit einem schlechteren Therapieansprechen und einer Paclitaxel-Resistenz [66]. Somit wurde *ARID1A* als prognostischer Marker zur Abschätzung eines Therapieansprechens auf Paclitaxel-basierte Behandlungskonzepte diskutiert [66].

Zusammenfassend stellt *ARID1A* in zahlreichen Tumorentitäten eine vielversprechende therapeutische Option dar, da es auf Grund seiner molekularbiologischen Eigenschaften und Funktionen eine zentrale Rolle in der Transkriptionsregulation, DNA-Reparatur und -Methylierung sowie bei der Histon-Modifikation und Aufrechterhaltung der Pluripotenz spielt. Jedoch variieren die Auswirkungen der *ARID1A*-Level je nach Tumorentität und pharmakologischem Kombinationspartner.

4.4 Diversität der *ARID1A*-Effekte in unterschiedlichen Tumorentitäten und -subtypen

Bei der Bewertung der molekularbiologischen Rolle von *ARID1A* ist jedoch zu beachten, dass - wie in Vorarbeiten gezeigt werden konnte - eine *ARID1A*-Mutation bzw. ein *ARID1A*-Verlust in unterschiedlichen Tumorentitäten zu unterschiedlichen Auswirkungen führte.

Während in KZT und bei Ovarialkarzinomen ein *ARID1A*-Verlust bzw. eine *ARID1A*-Defizienz zu einem verlangsamten Tumorwachstum führte, konnte bei Adenokarzinomen des Ösophagus eine vermehrte Zellproliferation bei *ARID1A*-Verlust beobachtet werden [67]. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass *ARID1A* je nach Tumorentität unterschiedliche Funktionen ausübt.

Die Ausprägung von *ARID1A*-Mutationen kann aber auch innerhalb derselben Tumorentität abhängig vom Subtyp unterschiedlich sein. So konnten beispielsweise *ARID1A*-Mutationen sowohl in klarzelligen als auch in endometrioiden Ovarialkarzinomen nachgewiesen werden,

während das seröse high-grade Ovarialkarzinom keine *ARID1A*-Mutationen aufwies [59]. Auch in KZT scheint *ARID1A* in unterschiedlichen Subtypen unterschiedlich ausgeprägt zu sein. Während bei der Generierung *ARID1A*-defizienter KZT in Seminomen ein homozygoter *ARID1A*-Verlust für das Zellüberleben tolerabel zu sein schien, konnten bei EC lediglich heterozygote Klone hervorgebracht werden.

Auch in anderen Studien wird die „bivalente“ Rolle von *ARID1A* diskutiert, denn es fungiert sowohl bei der Tumorsuppression als auch bei der Tumorentstehung, je nach Tumorart und dem jeweiligen Mutationsstatus [68]. So konnte beispielsweise in *in-vivo*-Leberkrebs-Modellen gezeigt werden, dass *ARID1A* onkogene Funktionen ausübt, indem es oxidativen Stress Cytochrom-P450-vermittelt fördert und somit zur Tumorentstehung führt [69]. Andererseits konnte in anderen Studien *ARID1A* als Tumorsuppressor bei der Entstehung hepatozellulärer Karzinome identifiziert werden. Hierbei wurde in Mausmodellen eine Tumorentstehung durch den Verlust von *ARID1A* in Hepatozyten beobachtet [70].

Daraus lässt sich schließen, dass Tumorentität-übergreifende Untersuchungen notwendig sind, um die Gesamtheit der molekularbiologischen Eigenschaften von *ARID1A* zu entschlüsseln.

4.5 Limitierungen der Studie

Im Folgenden werden die erhobenen Ergebnisse in den klinischen Kontext eingeordnet und die Limitierungen der Studie diskutiert.

Zunächst sollte beachtet werden, dass die *ARID1A*-Funktion und die Auswirkungen einer *ARID1A*-Defizienz lediglich in *in-vitro*-Versuchen bei einem KZT-Subtyp, den Seminomen, durchgeführt wurde. Um ein umfassenderes Verständnis der Eigenschaften von *ARID1A* zu erhalten, wären weitere Untersuchungen, beispielsweise bei anderen Subtypen der KZT, als auch bei anderen Karzinomentitäten, notwendig. Es gilt hierbei zu prüfen, ob *ARID1A* je nach Tumorentität unterschiedliche Funktionen erfüllt und ob eine *ARID1A*-Defizienz in unterschiedlichen Tumorsubtypen zu unterschiedlichen Auswirkungen führt.

Darüber hinaus müssten in einem weiteren Schritt die therapeutischen Optionen in *in-vivo*-Versuchen geprüft werden, um eine höhere Aussagekraft über die klinische Relevanz treffen zu können. Es gilt zu prüfen, ob die in den *in-vitro*-Versuchen geprüften Substanzen in ihrer Dosierung und Darreichungsform in *in-vivo*-Versuchen zu ähnlichen Effekten führen. Hierbei spielen insbesondere die Pharmakodynamik und -kinetik des jeweiligen *ARID1A*-Inhibitors eine entscheidende Rolle bei der Prüfung einer möglichen klinischen Tauglichkeit.

Zudem muss geprüft werden, welche möglichen Toxizitäten und Folgen durch eine gezielte *ARID1A*-Inhibition für den gesamten Organismus entstehen. Im Falle von Romidepsin, welches als HDAC-Inhibitor insbesondere den Schlüsselfaktor *ARID1A* supprimiert [28], konnte in

weiteren klinischen Studien ein breitgefächertes Nebenwirkungsprofil beobachtet werden. Neben einer möglichen Knochenmarkstoxizität mit resultierender Neutropenie und Thrombopenie und damit einhergehenden Infektanfälligkeit, kam es vermehrt zu Übelkeit, Erbrechen und Appetitlosigkeit [71]. Hiernach gilt zu prüfen, ob eine gezielte *ARIDIA*-Inhibition zu ähnlich ausgeprägten Nebenwirkungen führt oder ob, auf Grund der zielgerichteteren Inhibition, ein geringeres Nebenwirkungsprofil besteht.

Darüber hinaus müsste geprüft werden, ob *ARIDIA*-Inhibitoren in gesunden Zellen potenziell zur Tumorentwicklung beitragen und somit zu Zweitmalignomen führen könnten. Da *ARIDIA* als Teil des SWI/SNF-Komplexes zur Tumorsuppression beiträgt, könnten durch eine *ARIDIA*-Defizienz relevante DNA-Reparaturmechanismen beeinträchtigt werden. Dies ist besonders bei Patienten mit KZT, die ohnehin mit den bereits etablierten Therapieregimen einem erhöhten Risiko für Zweitmalignome ausgesetzt sind [72, 73], von hoher Bedeutung. Insbesondere bei Radiotherapien und chemotherapeutischen Substanzen aus der Klasse der Topoisomerase-II-Hemmer, wie Etoposid, konnte die vermehrte Entstehung sekundärer Malignome beobachtet werden [72]. So beschreiben beispielsweise einige Studien eine gehäufte Entstehung sekundärer Leukämien nach Kombinationsbehandlungen mit Cisplatin und Etoposid [72].

Zusammenfassend ist die klinische Umsetzung einer *ARIDIA*-Inhibition auf pharmakologischer Ebene in Bezug auf die Applikationsart, die Dosierung, aber auch die Verträglichkeit inklusive möglicher Nebenwirkungen und Langzeitfolgen noch unerforscht.

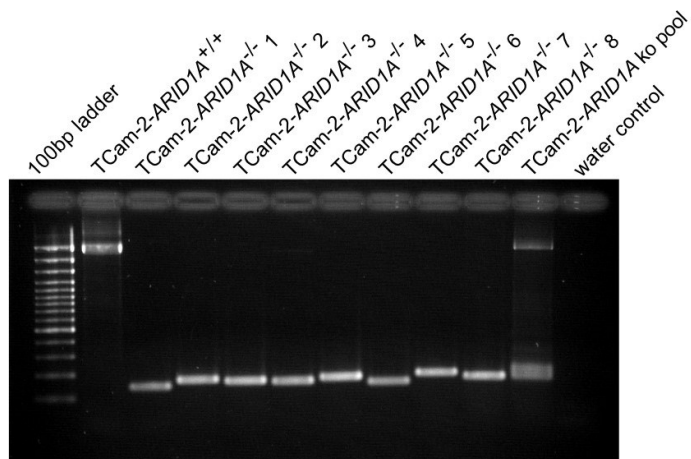
5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Bergmann, M., *Spermatogenese: Physiologie und Pathophysiologie*. Urologe, 2005. **40**: p. 1131-1138.
2. Benninghoff, A., D. Drenckhahn, and B. Christ, *Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*. 2008, München: Elsevier.
3. Kurtz, A., H.-C. Pape, and S. Silbernagl, *Physiologie*. 2014, Stuttgart Georg Thieme Verlag KG.
4. Brandes, R., F. Lang, and R.F. Schmidt, *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. 2019, Berlin: Springer.
5. Alberts, B., et al., *Molekularbiologie der Zelle* 2004.
6. Deutsche Krebsgesellschaft, *Urologische Tumoren*. Vol. 1. 2018, München: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH. 472.
7. Rübben, *Uroonkologie*. 2009: Springer.
8. Oosterhuis, J.W. and L.H. Looijenga, *Testicular germ-cell tumours in a broader perspective*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(3): p. 210-22.
9. Cheng, L., et al., *Testicular cancer*. Nat Rev Dis Primers, 2018. **4**(1): p. 29.
10. Baird, D.C., G.J. Meyers, and J.S. Hu, *Testicular Cancer: Diagnosis and Treatment*. Am Fam Physician, 2018. **97**(4): p. 261-268.
11. Gschwend, J.E. and R. Hautmann, *Urologie*. 2014, Berlin, Heidelberg: Springer.
12. Schmelz, H.U., C. Sparwasser, and W. Weidner, in *Facharztwissen Urologie differenzierte Diagnostik und Therapie*. 2014, Springer: Berlin.
13. Schaaf, C.P., *Basiswissen Humangenetik*. Vol. 2. 2013, Berlin, Heidelberg: Springer.
14. Muller, M.R., et al., *Molecular and epigenetic pathogenesis of germ cell tumors*. Asian J Urol, 2021. **8**(2): p. 144-154.
15. Batool, A., et al., *Testicular germ cell tumor: a comprehensive review*. Cell Mol Life Sci, 2019. **76**(9): p. 1713-1727.
16. Deutsche Gesellschaft für Urologie e.V., *Diagnostik, Therapie und Nachsorge der Keimzelltumoren des Hodens*. 2019: AWMF online.
17. Hires, M., et al., *Glycan Analysis as Biomarkers for Testicular Cancer*. Diagnostics (Basel), 2019. **9**(4).
18. Retz, G., *Medikamentöse Tumorthherapie in der Uroonkologie*. 2010, Berlin, Heidelberg: Springer.
19. Aktories, K., et al., *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 2017, München: Elsevier.
20. Karow, T. and R. Lang-Roth, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden für Studium und Praxis*. 30 ed. 2021, Köln: Karow.
21. Muller, M.R., et al., *Therapeutical interference with the epigenetic landscape of germ cell tumors: a comparative drug study and new mechanistical insights*. Clin Epigenetics, 2022. **14**(1): p. 5.
22. Sheikine, Y., et al., *Molecular genetics of testicular germ cell tumors*. Am J Cancer Res, 2012. **2**(2): p. 153-67.
23. Lehnert, H., *Epigenetik – Grundlagen und klinische Bedeutung Aus der Vortragsreihe der Medizinischen Gesellschaft Mainz e.V.* 2018, Springer: Berlin, Heidelberg.
24. Gujral, P., et al., *Histone acetylation and the role of histone deacetylases in normal cyclic endometrium*. Reprod Biol Endocrinol, 2020. **18**(1): p. 84.
25. Eckschlager, T., et al., *Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs*. International Journal of Molecular Sciences, 2017. **18**(7): p. 1414.
26. Hull, E.E., M.R. Montgomery, and K.J. Leyva, *HDAC Inhibitors as Epigenetic Regulators of the Immune System: Impacts on Cancer Therapy and Inflammatory Diseases*. Biomed Res Int, 2016. **2016**: p. 8797206.
27. Li, G., et al., *Highly compacted chromatin formed in vitro reflects the dynamics of transcription activation in vivo*. Mol Cell, 2010. **38**(1): p. 41-53.

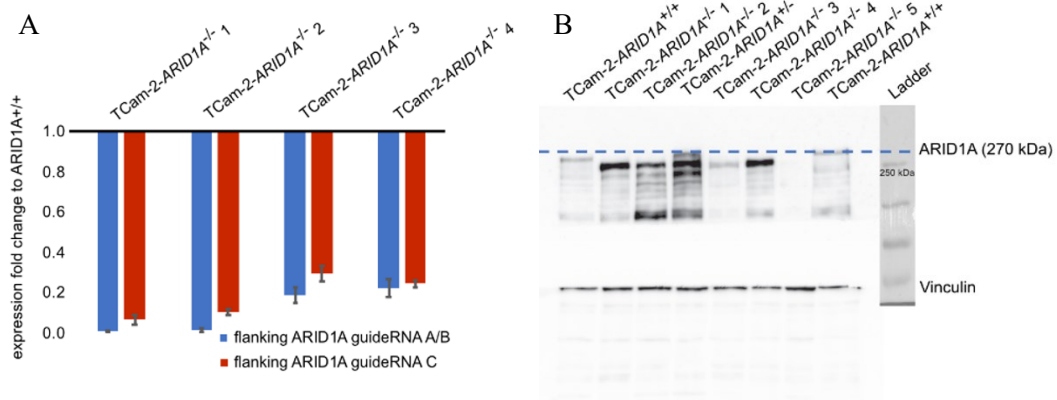
28. Nettersheim, D., et al., *A signaling cascade including ARID1A, GADD45B and DUSP1 induces apoptosis and affects the cell cycle of germ cell cancers after romidepsin treatment*. *Oncotarget*, 2016. **7**(46): p. 74931-74946.
29. Costa, A.L., et al., *DNA methylation profiling as a tool for testicular germ cell tumors subtyping*. *Epigenomics*, 2018. **10**(12): p. 1511-1523.
30. Khan, O. and N.B. La Thangue, *HDAC inhibitors in cancer biology: emerging mechanisms and clinical applications*. *Immunol Cell Biol*, 2012. **90**(1): p. 85-94.
31. Karagiannis, D. and T. Rampias, *HDAC Inhibitors: Dissecting Mechanisms of Action to Counter Tumor Heterogeneity*. *Cancers (Basel)*, 2021. **13**(14).
32. Campas-Moya, C., *Romidepsin for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma*. *Drugs Today (Barc)*, 2009. **45**(11): p. 787-95.
33. Iyer, S.P. and F.F. Foss, *Romidepsin for the Treatment of Peripheral T-Cell Lymphoma*. *Oncologist*, 2015. **20**(9): p. 1084-91.
34. Pattarawat, P., et al., *A triple combination gemcitabine + romidepsin + cisplatin to effectively control triple-negative breast cancer tumor development, recurrence, and metastasis*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2021. **88**(3): p. 415-425.
35. Shi, Y., et al., *Romidepsin (FK228) regulates the expression of the immune checkpoint ligand PD-L1 and suppresses cellular immune functions in colon cancer*. *Cancer Immunol Immunother*, 2021. **70**(1): p. 61-73.
36. Mayr, C., et al., *HDAC Screening Identifies the HDAC Class I Inhibitor Romidepsin as a Promising Epigenetic Drug for Biliary Tract Cancer*. *Cancers (Basel)*, 2021. **13**(15).
37. Jostes, S., et al., *The bromodomain inhibitor JQ1 triggers growth arrest and apoptosis in testicular germ cell tumours in vitro and in vivo*. *J Cell Mol Med*, 2017. **21**(7): p. 1300-1314.
38. Reisman, D., S. Glaros, and E.A. Thompson, *The SWI/SNF complex and cancer*. *Oncogene*, 2009. **28**(14): p. 1653-68.
39. Smith-Roe, S.L., et al., *SWI/SNF complexes are required for full activation of the DNA-damage response*. *Oncotarget*, 2015. **6**(2): p. 732-45.
40. Wang, X., et al., *Expression of p270 (ARID1A), a component of human SWI/SNF complexes, in human tumors*. *Int J Cancer*, 2004. **112**(4): p. 636.
41. Kurz, L., et al., *ARID1A Regulates Transcription and the Epigenetic Landscape via POLE and DMAP1 while ARID1A Deficiency or Pharmacological Inhibition Sensitizes Germ Cell Tumor Cells to ATR Inhibition*. *Cancers (Basel)*, 2020. **12**(4).
42. Oing, C., C. Seidel, and C. Bokemeyer, *Therapeutic approaches for refractory germ cell cancer*. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2018. **18**(4): p. 389-397.
43. Ma, Y., L. Zhang, and X. Huang, *Genome modification by CRISPR/Cas9*. *FEBS J*, 2014. **281**(23): p. 5186-93.
44. Lossel, P., M. van de Waterbeemd, and A.J. Heck, *The diverse and expanding role of mass spectrometry in structural and molecular biology*. *EMBO J*, 2016. **35**(24): p. 2634-2657.
45. Szklarczyk, D., et al., *STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets*. *Nucleic acids research*, 2019. **47**(D1): p. D607-D613.
46. Huang, D.W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki, *Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources*. *Nature protocols*, 2009. **4**(1): p. 44-57.
47. Goldman, M.J., et al., *Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform*. *Nature biotechnology*, 2020. **38**(6): p. 675-678.
48. Buselmaier, W., *Biologie für Mediziner*. 2018, Springer: Berlin, Heidelberg.
49. Koster, R., et al., *Cytoplasmic p21 expression levels determine cisplatin resistance in human testicular cancer*. *J Clin Invest*, 2010. **120**(10): p. 3594-605.
50. Pursell, Z.F., et al., *Yeast DNA polymerase epsilon participates in leading-strand DNA replication*. *Science*, 2007. **317**(5834): p. 127-30.

51. Lee, G.E., et al., *DNA methyltransferase 1-associated protein (DMP1) is a co-repressor that stimulates DNA methylation globally and locally at sites of double strand break repair*. J Biol Chem, 2010. **285**(48): p. 37630-40.
52. Penicud, K. and A. Behrens, *DMP1 is an essential regulator of ATM activity and function*. Oncogene, 2014. **33**(4): p. 525-31.
53. Peng, J., *Gene redundancy and gene compensation: An updated view*. J Genet Genomics, 2019. **46**(7): p. 329-333.
54. Helming, K.C., et al., *ARID1B is a specific vulnerability in ARID1A-mutant cancers*. Nat Med, 2014. **20**(3): p. 251-4.
55. Cheung, H.W., et al., *Systematic investigation of genetic vulnerabilities across cancer cell lines reveals lineage-specific dependencies in ovarian cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(30): p. 12372-7.
56. Wong, K.K., *DNMT1: A key drug target in triple-negative breast cancer*. Semin Cancer Biol, 2021. **72**: p. 198-213.
57. Mohan, K.N., F. Ding, and J.R. Chaillet, *Distinct roles of DMP1 in mouse development*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(9): p. 1861-9.
58. Sapountzi, V., I.R. Logan, and C.N. Robson, *Cellular functions of TIP60*. Int J Biochem Cell Biol, 2006. **38**(9): p. 1496-509.
59. Ma, X., et al., *POLE/POLD1 mutation and tumor immunotherapy*. J Exp Clin Cancer Res, 2022. **41**(1): p. 216.
60. Shen, J., et al., *ARID1A Deficiency Impairs the DNA Damage Checkpoint and Sensitizes Cells to PARP Inhibitors*. Cancer Discov, 2015. **5**(7): p. 752-67.
61. Williamson, C.T., et al., *ATR inhibitors as a synthetic lethal therapy for tumours deficient in ARID1A*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 13837.
62. Long, L., et al., *The promising immune checkpoint LAG-3: from tumor microenvironment to cancer immunotherapy*. Genes Cancer, 2018. **9**(5-6): p. 176-189.
63. Sharma, P. and J.P. Allison, *The future of immune checkpoint therapy*. Science, 2015. **348**(6230): p. 56-61.
64. Shen, J., et al., *ARID1A deficiency promotes mutability and potentiates therapeutic antitumor immunity unleashed by immune checkpoint blockade*. Nat Med, 2018. **24**(5): p. 556-562.
65. Chen, X.Y., et al., *Low level of ARID1A contributes to adaptive immune resistance and sensitizes triple-negative breast cancer to immune checkpoint inhibitors*. Cancer Commun (Lond), 2023. **43**(9): p. 1003-1026.
66. Lin, Y.F., et al., *High-level expression of ARID1A predicts a favourable outcome in triple-negative breast cancer patients receiving paclitaxel-based chemotherapy*. J Cell Mol Med, 2018. **22**(4): p. 2458-2468.
67. Streppel, M.M., et al., *Next-generation sequencing of endoscopic biopsies identifies ARID1A as a tumor-suppressor gene in Barrett's esophagus*. Oncogene, 2014. **33**(3): p. 347-57.
68. Xu, S. and C. Tang, *The Role of ARID1A in Tumors: Tumor Initiation or Tumor Suppression?* Front Oncol, 2021. **11**: p. 745187.
69. Sun, X., et al., *Arid1a Has Context-Dependent Oncogenic and Tumor Suppressor Functions in Liver Cancer*. Cancer Cell, 2018. **33**(1): p. 151-152.
70. Riou, R., et al., *ARID1A loss in adult hepatocytes activates beta-catenin-mediated erythropoietin transcription*. Elife, 2020. **9**.
71. VanderMolen, K.M., et al., *Romidepsin (Istodax, NSC 630176, FR901228, FK228, depsipeptide): a natural product recently approved for cutaneous T-cell lymphoma*. J Antibiot (Tokyo), 2011. **64**(8): p. 525-31.
72. Kollmannsberger, C., et al., *Therapy-related malignancies following treatment of germ cell cancer*. Int J Cancer, 1999. **83**(6): p. 860-3.
73. Bokemeyer, C. and H.J. Schmoll, *Treatment of testicular cancer and the development of secondary malignancies*. J Clin Oncol, 1995. **13**(1): p. 283-92.

6 Anhang



Anhang 1: Gelelektrophorese zur Darstellung der TCam-2-*ARID1A*^{-/-}, siehe Dissertation von Lukas Kurz, aus Kurz et al. [41]: Wildtyp TCam-2-*ARID1A*^{+/+} im Vergleich zu TCam-2-*ARID1A*^{-/-}, inklusive TCam-2-*ARID1A*^{-/-} Pool und Wasserkontrolle



Anhang 2A: qRT-PCR zur Verifizierung der TCam-2-*ARID1A*^{-/-}, siehe Dissertation von Lukas Kurz, aus Kurz et al. [41]

Anhang 2B: Westernblot zur Verifizierung der TCam-2-*ARID1A*^{-/-}, siehe Dissertation von Lukas Kurz, aus Kurz et al. [41]

7 Danksagung

Allen voraus möchte ich Prof. Dr. Daniel Nettersheim für dieses Projekt und die unvergessliche Zeit in der Arbeitsgruppe Translationale Uroonkologie an der Uniklinik Düsseldorf danken. Sowohl die Zeit im Labor als auch die Jahre darüber hinaus hat er durch sein Engagement, seine Expertise und die kontinuierliche Unterstützung diese Dissertation ermöglicht.

Ich danke Dr. Margaretha A. Skowron, PhD, von ganzem Herzen für die kompetente Einarbeitung, ihre hilfreichen Korrekturen und ihre herzliche Art komplizierte Sachverhalte verständlich darzustellen.

Ein besonderer Dank gilt Anna Pehlke. Ohne sie wäre die Arbeit im Labor bis heute für mich ein großes Fragezeichen geblieben. Mit ihrer unermüdlichen Geduld, dem fundierten Wissen und ihrer großen Hilfsbereitschaft hat sie meinen Laboralltag bereichert und erleichtert.

Ebenso möchte ich mich herzlich bei Lukas Kurz, cand. med., und Gillian Ludwig, cand. med., aber auch dem gesamten Laborteam für die unvergessliche gemeinsame Laborzeit, zum Teil bis in die späten Abendstunden, bedanken.

Zu guter Letzt gilt mein tiefster Dank meiner Familie und meinen Freunden, die mich in dieser Zeit in allen Höhen und Tiefen begleitet haben. Insbesondere danke ich aus tiefstem Herzen meiner Mutter für ihre bedingungslose Unterstützung.

Mein größter Dank gilt Dr. med. Felix Brüstle, der stets in jeder Lebenslage meine größte Stütze ist.